

文章编号:1001-6880(2016)1-0041-06

不同处理方法对白刺多糖抗氧化活性的影响

谢 瑞^{1,2}, 魏艳霞^{1,2}, 丁玉竹¹, 刘 燕^{1,2}, 李 梦¹, 张 继^{1,2,3*}¹西北师范大学生命科学学院; ²甘肃特色植物有效成分制品工程技术研究中心; ³西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070

摘要:本文研究了不同处理方法对白刺多糖抗氧化活性的影响。实验通过热干、冷干、脱色等方法处理白刺多糖,从清除超氧自由基、DPPH自由基、抑制羟基自由基的产生、还原力4个指标系统地研究了不同处理方法对白刺多糖体外抗氧化活性的影响。经热干、冷干及脱色等不同方法处理得到的白刺多糖,实验所得EC₅₀值小于0.1 mg/mL,总体来说,与经冷干得到的多糖样品相比,热干所得样品抗氧化能力有所下降,这可能是由于在热干过程中由于温度的原因引起多糖活性部分丧失,由实验数据可知经过脱色的样品对清除羟自由基(·OH)和DPPH的能力较强,而对于氧自由基(O₂[·])的清除和还原力有所下降,相反,未经脱色的样品对氧自由基(O₂[·])的清除能力和还原力较强,而对羟自由基(·OH)和DPPH的清除能力有所下降。结论:在体外抗氧化实验中,与热干、未脱色的多糖相比,经冷干及脱色处理得到的白刺多糖表现出较好的自由基清除能力,尤其是对超氧自由基(O₂[·])和DPPH自由基的清除能力,因此,白刺多糖具有较好的抗氧化能力,可作为一种潜在的抗氧化剂运用于食品行业。

关键词:多糖;白刺;抗氧化;还原力

中图分类号:S567.239

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.1.008

Effects of Different Processing Methods on the Antioxidant Activity of Polysaccharide from *Nitraria sibirica* Pall

XIE Rui^{1,2}, WEI Yan-xia^{1,2}, DING Yu-zhu¹, LIU Yan^{1,2}, LI Meng¹, ZHANG Ji^{1,2,3*}¹College of Life Science, Northwest Normal University; ²Bioactive Products

Engineering Research Center For Gansu Distinctive Plants, Northwest Normal University;

³College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: This paper studied the effects of different processing methods on the antioxidant activity of polysaccharide from *Nitraria sibirica* Pall. In this experiment, polysaccharide was obtained through hot-drying, freeze-drying and decolorization. By different processing methods, the superoxide free radical (O₂[·]) and DPPH free radical (·DPPH), hydroxyl free radical (·OH) scavenging effects and reducing power of the extracted sample were measured to study the antioxidant ability of polysaccharide from *N. sibirica*. The results showed that the EC₅₀ values of polysaccharide samples processed by hot-drying, freeze-drying and decolorization were all less than 0.1 mg/mL. Compared with the polysaccharide samples obtained by freeze-drying, the antioxidant ability of the samples obtained by hot-drying decreased because of high temperature resulting in the partial loss of antioxidant activity during the hot-drying process. In addition, experimental results also showed that the capability of scavenging hydroxyl free radical (·OH) in decolorization sample increased. Meanwhile, the superoxide free radical (O₂[·]) scavenging and reducing power decreased. Conversely, in the non-decolorization samples, the scavenging ability of hydroxyl free radical (·OH) and DPPH free radical (·DPPH) declined, the scavenging capacity of superoxide free radical (O₂[·]) and reducing power increased. These results indicated that the polysaccharides from *N. sibirica* with different processing methods showed different antioxidant activities. It can be used as a potential antioxidant agent in food industry.

Key words: polysaccharide; *Nitraria sibirica* Pall; antioxidant; free radicals

收稿日期:2015-09-10 接受日期:2015-12-21

基金项目:国家科技支撑计划(2012BAD20B06);国家自然科学基金(31202055)

*通讯作者 Tel: 86-013893689836; E-mail: 1083928195@qq.com

许多疾病与自由基导致的生物大分子(如蛋白质、脂质以及DNA)氧化损伤有关^[1]。由太阳光、紫外线、电离辐射、化学反应和代谢过程等产生的自由

基可能引起很多的疾病,如DNA损伤,细胞癌变以及与细胞老化有关的变性等,并且导致免疫系统的下降^[2]。人体体内含有抗氧化成分,如α-生育酚、抗坏血酸、类胡萝卜素和酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等^[3],其作用是防御脂质过氧化,保护细胞膜在自由基攻击的早期阶段清除自由基的活性。自由基是生物体氧化过程中产生的中间代谢产物,具有很强的氧化能力。生物体内少量的自由基是生命体维持正常生理功能所必需的,但过多的自由基则会与体内的其他化学物质发生反应进而损伤组织,引起衰老和各种疾病^[4],如心脑血管疾病、退行性疾病和组织损伤炎症等。当其存在超出机体防御系统所具有的清除能力时,这些自由基就会直接或间接地引起细胞膜损伤和交联键的形成、降低酶的活性、促使多糖降解、DNA链断裂,从而引起体内代谢紊乱,引发各种疾病^[5]。因此适当的补充外源性抗氧化剂,可清除自由基、阻断脂质过氧化反应。现在常用的抗氧化剂绝大多数为合成品,其安全性已引起人们的质疑。因此,天然抗氧化剂逐渐引起广泛的关注。

当前在药物工业中合成的各种抗氧化剂对肝脏的损伤和致癌作用已成为不容忽视的问题。因此,为了减小自由基对人体的危害,开发具有低毒、高效的天然抗氧化剂已成为当前研究的热点之一。大量资料表明,药用植物多糖具有较强的抗氧化性,可以作为一类新型的天然抗氧化剂而得到开发利用。已有研究证明,多糖还具有抗肿瘤、抗感染、免疫促进、抗辐射、抗类风湿症、抗艾滋病等免疫损伤或免疫缺损症等多方面功能和生物活性,这些功效的发挥与它们的抗氧化活性密切相关^[6]。

白刺(*Nitraria sibirica Pall*)是蒺藜科(Zygophyllaceae)的旱生或超旱生典型荒漠植物,其抗逆性强,耐干旱盐碱、能适应高温低寒,自然分布在干燥、盐碱、多风、植被稀少的严酷环境中,是防风固沙的优良灌木。全世界有11个种,我国有8个种。白刺是传统药材,广泛用于多种疾病的治疗,近年来的实验还显示白刺果有一定的清除自由基、抗脂质过氧化作用等作用^[7]。本实验从清除超氧自由基、清除DPPH自由基、抑制羟基自由基的产生以及还原力4个指标系统地研究了不同处理方法对白刺多糖体外抗氧化活性的影响。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

白刺购于甘肃省兰州市药材市场,样品经兰州化学物理研究所师彦平研究员鉴定,保存于甘肃特色植物有效成分制品工程技术研究中心;抗坏血酸(Vc)标准品购于北京嘉世玉禾化工技术研究院。

不同处理方法所得白刺多糖BCH(BCH-H1:高温干燥、脱色的白刺多糖;BCH-H2:高温干燥、未脱色的白刺多糖;BCH-C1:冷冻干燥、脱色的白刺多糖;BCH-C2:冷冻干燥、未脱色的白刺多糖)。

1.2 实验仪器

BL320H电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;DF-101B集热式恒温磁力搅拌器,浙江乐清市乐成电器厂;TDL5M台式大容量冷冻离心机,湘仪离心机厂;RE-52A旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;LGJ-18S冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;Labtech UV1000紫外可见分光光度计,北京莱伯泰科仪器有限公司。

1.3 实验流程

白刺种子经粉碎、过筛得到白刺种子粗粉,然后经过水浴提取、离心分离获得上清液经浓缩、醇沉、干燥获得白刺多糖,用于实验中抗氧化活性测定。

2 实验方法

2.1 提取方法

利用单因素、响应面法采用水提醇沉法从白刺种子中提取多糖,通过测得其得率与总糖得率,得到最佳工艺参数^[8],温度50℃,料液比1:15,提取时间为10 h,提取次数1次。采用优化出的最佳工艺条件提取,并对所得的白刺多糖的理化性质进行表征。

2.2 抗氧化实验

按实验步骤配制样品,用Labtech UV1000紫外可见分光光度计测得吸光值,得出清除率。以浓度对清除率平均值作图,得到清除自由基50%的样品浓度,即EC₅₀。

2.3 不同处理方法对白刺多糖抗氧化活性的影响

2.3.1 对羟自由基(·OH)的清除作用^[9]

精确称取一定量的多糖样品,用适量蒸馏水充分溶解,制成浓度为5.0 mg/mL的多糖母液,依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

精确称取一定量的抗坏血酸(V_c)，配制为浓度为5.0 mg/mL的母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

分别量取不同浓度的多糖溶液、 V_c 溶液各2 mL，依次加入6 mmol/L的 $FeSO_4$ 溶液2 mL，混匀后加入6 mmol/L的 H_2O_2 溶液2 mL，混匀，静置10 min，再加入6 mmol/L的水杨酸溶液2 mL，混匀，静置30 min后于510 nm处测定吸光值 A_i ；用蒸馏水代替水杨酸测定 A_j 。空白对照以双蒸水代替多糖溶液，测定 A_0 。根据以下公式计算羟自由基($\cdot OH$)清除率：

$$\text{清除率 \%} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100\%$$

每个样品重复三次，以浓度对清除率的平均值作图，得到清除羟自由基($\cdot OH$)50%的样品浓度，即 EC_{50} 。

2.3.2 对超氧阴离子(O_2^-)的清除作用

精确称取一定量的多糖样品，用适量蒸馏水充分溶解，配制成浓度为5.0 mg/mL的多糖母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

精确称取一定量的抗坏血酸(V_c)，配制为浓度为5.0 mg/mL的母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

分别量取不同浓度的多糖溶液、 V_c 溶液各1 mL，依次加入1 mL浓度为557 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的还原型辅酶二钠(NADH-2Na)、1 mL浓度为45 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的吩嗪硫酸甲酯(PMS)及1 mL浓度为108 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的氯化硝基氮蓝四唑(NBT)，在25℃温浴5 min，用蒸馏水调零，在510 nm下测吸光值 A_i 。

以1 mL蒸馏水代替多糖溶液，依次加入1 mL浓度为557 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的NADH-2Na、1 mL浓度为45 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的PMS及1 mL浓度为108 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的NBT，在25℃下温浴5 min，用蒸馏水调零，在510 nm处测吸光值 A_0 ，根据以下公式计算 O_2^- 清除率：

$$\text{清除率 \%} = \left(1 - \frac{A_i}{A_0} \right) \times 100\%$$

每个样品重复三次，以浓度对清除率的平均值作图，得到清除 O_2^- 50%的样品浓度，即 EC_{50} 。

2.3.3 对DPPH自由基的清除作用^[10]

精确称取一定量的多糖样品，用适量蒸馏水充分溶解，制成浓度为5.0 mg/mL的多糖母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

精确称取一定量的抗坏血酸(V_c)，配制为浓度为5.0 mg/mL的母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

分别量取不同浓度的多糖溶液、 V_c 溶液各2 mL，分别与0.5 mL浓度为 2.0×10^{-4} mol/L的DPPH溶液混合，摇匀后置于暗处放置30 min，以相对应的溶剂为对照，在517 nm处测定吸光值 A_i 。

分别量取不同浓度的多糖溶液、 V_c 溶液各2 mL，分别与2 mL相对应的溶剂混合均匀后，以溶剂为对照，在517 nm处测定吸光值 A_j 。

量取0.5 mL浓度为 2.0×10^{-4} mol/L的DPPH溶液与蒸馏水混合，以相对应的溶剂为对照，在517 nm处测定吸光值 A_c 。以以下公式计算清除率：

$$\text{清除率 \%} = \frac{1 - (A_i - A_j)}{A_c} \times 100\%$$

每个样品重复三次，以浓度对清除率的平均值作图，可以得到清除DPPH自由基50%的样品浓度，即 EC_{50} 。

2.3.4 还原力^[11]

精确称取一定量的多糖样品，用适量蒸馏水充分溶解，配制成浓度为5.0 mg/mL的多糖母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

精确称取一定量的 V_c ，配制为浓度为5.0 mg/mL的母液，依次稀释至浓度分别为2、1、0.6、0.2、0.1、0.06、0.02 mg/mL。

分别量取不同浓度的多糖溶液、 V_c 溶液各1 mL，依次加入磷酸缓冲液(pH 6.6)和铁氰化钾($K_3Fe(CN)_6$)溶液(1 wt%)各2.5 mL，混匀后50℃水浴20 min，然后加入三氯乙酸溶液(10 wt%)2.5 mL，混匀，1000 rpm离心10 min，取上清液2.5 mL，再加入蒸馏水和氯化铁($FeCl_3$, 0.1 wt%)各2.5 mL，混匀，静置10 min，蒸馏水调零，在700 nm处测定吸光值，每个样品重复三次，以700 nm吸光值的平均数表示还原力的高低。

3 结果与讨论

3.1 不同处理方法对白刺多糖抗氧化活性的影响

3.1.1 对羟自由基($\cdot OH$)的清除作用

不同处理方法对白刺多糖BCH清除羟自由基($\cdot OH$)的影响如图1。由图1可知，在实验浓度范围内，清除率随BCH浓度的增加而增大。Ker等指出活性羟基基团的浓度越高，多糖清除各种自由基的能力越强^[12]。在浓度为5 mg/mL时，BCH-H1清

除率约为 70.92%, BCH-H2 清除率达到 70.46%, BCH-C1 清除率约为 71.15%, BCH-C2 清除率约为 61.15%, BCH-H1 对应的 EC₅₀ 值为 0.192 mg/mL, BCH-H2 对应的 EC₅₀ 值为 0.489 mg/mL, BCH-C1 对应的 EC₅₀ 值为 0.185 mg/mL, BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值为 0.4 mg/mL。BCH-H1 和 BCH-H2、BCH-C1 和 BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值相比较, 可知经脱色的 BCH 对 ·OH 的清除能力较强, 这可能是由于经脱色的 BCH 样品中色素等杂质对其活性基团的影响减少了, 因此清除羟自由基(·OH)的能力较好, BCH-H1 和 BCH-C1、BCH-H2 和 BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值相比较, 可知经热干所得的 BCH 对 ·OH 的清除能力有所下降, 这可能是高温使多糖构象发生了改变而影响了对羟自由基(·OH)的清除能力。

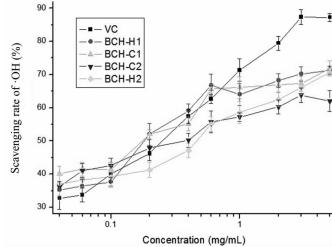


图 1 不同处理方法对白刺多糖 BCH 清除羟自由基(·OH)的影响

Fig. 1 The effects of different processing methods on the ·OH scavenging ability of polysaccharide from *N. sibirica* (BCH)

3.1.2 对超氧阴离子(O₂^{·-})的清除作用

不同处理方法对白刺多糖 BCH 清除超氧自由基(O₂^{·-})的影响如图 2。由图 2 可知, 在实验浓度范围内, 清除率随 BCH 浓度的增加而增大。在浓度为 5 mg/mL 时, BCH-H1 清除率约为 90.63%, BCH-H2 清除率达到 85.63%, BCH-C1 清除率约为 88.70%, BCH-C2 清除率约为 86.88%, BCH-H1 对应的 EC₅₀ 值为 0.044 mg/mL, BCH-H2 对应的 EC₅₀ 值为 0.131 mg/mL, BCH-C1 对应的 EC₅₀ 值为 0.048 mg/mL, BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值为 0.077 mg/mL, 由于样品具有特别低的 EC₅₀ 值(<0.1 mg/mL), 因此, 对于超氧自由基(O₂^{·-})表现出很好的清除能力。BCH-H1 和 BCH-H2、BCH-C1 和 BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值相比较, 可知未经脱色的 BCH 对超氧自由基(O₂^{·-})的清除能力更强一些, 其原因可能是在去除色素的过程中造成了 BCH 部分活性的损失, 而经热干和冷干所得的 BCH 对超氧自由基(O₂^{·-})的清除能力相差不大, 这

表明温度的因素对 BCH 清除氧自由基(O₂^{·-})的影响并不明显。

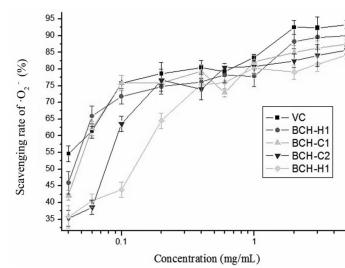


图 2 不同处理方法对白刺多糖 BCH 清除超氧自由基(O₂^{·-})的影响

Fig. 2 The effects of different processing methods on the O₂^{·-} scavenging ability of polysaccharide from *N. sibirica* (BCH)

3.1.3 对 DPPH 自由基的清除作用

不同处理方法所得白刺多糖 BCH 对自由基 DPPH 的清除能力如图 3。由图 3 可知, 在实验浓度范围内, 清除率随 BCH 浓度的增加而增大, 但其增大趋势不明显。Ker 等表示在多糖浓度较高时对自由基 DPPH 的清除能力没有显著增强这可能是由于溶解度的限制以及氢键的增加造成的。在浓度为 5 mg/mL 时, BCH-H1 清除率约为 76.80%, BCH-H2 清除率达到 78.10%, BCH-C1 清除率约为 79.20%, BCH-C2 清除率约为 77.50%, BCH-H1 对应的 EC₅₀ 值为 0.05 mg/mL, BCH-H2 对应的 EC₅₀ 值为 0.142 mg/mL, BCH-C1 对应的 EC₅₀ 值为 0.048 mg/mL, BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值为小于 0.04 mg/mL。由于样品具有特别低的 EC₅₀ 值(<0.1 mg/mL), 因此, 对于自由基 DPPH 表现出很好的清除能力。在浓度 0.4 mg/mL 之前, BCH-H1 所代表的曲线在 BCH-H2 支上, 说明在此浓度范围内未经脱色的 BCH 清除 DPPH 的能力较强, 而在 0.4 mg/mL 之后, BCH-H1 所代表的曲线在 BCH-H2 以下, 说明在此浓度范围内经脱色的 BCH 清除能力较强, 而对于冷干所得的 BCH, 在实验浓度范围内 BCH-C1 所代表曲线始终在 BCH-C2 以上, 因此, 经脱色的 BCH 清除能力较强, 这可能是由于经脱色的 BCH 样品中色素等杂质对其活性基团的影响减少了, 因此清除羟自由基 DPPH 的能力较好, BCH-H1 和 BCH-C1、BCH-H2 和 BCH-C2 对应的 EC₅₀ 值相比较, 可知经热干所得的 BCH 对 ·OH 的清除能力有所下降, 这也可能是由于高温使多糖构象发生了改变而引起 DPPH 清除能力的下降。

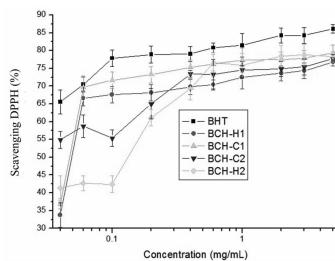


图 3 不同处理方法对白刺多糖 BCH 清除 DPPH 自由基的影响

Fig. 3 The effects of different processing methods on the DPPH · scavenging ability of polysaccharide from *N. sibirica* (BCH)

3.1.4 还原力

不同处理方法对白刺多糖 BCH 还原力的影响如图 4。由图 4 可知,在实验浓度范围内,BCH 的还原力随浓度的增加而增强。在浓度为 0.4 mg/mL 之前,BCH-H1、BCH-H2、BCH-C1、BCH-C2 的还原力增强趋势不明显,在 0.4 mg/mL 之后,随着 BCH 浓度的增大还原力明显增强,由此可知,BCH 的还原力很大程度上依赖于浓度,浓度增大其活性基团的浓度也随之增加,相应地还原力随之增强。由于 BCH-H2 和 BCH-C2 对应的曲线分别在 BCH-H1 和 BCH-C1 对应曲线之上,可知经脱色的 BCH 还原力有所下降。其原因可能是在清除色素的过程中使多糖活性有所损失。BCH-H1 和 BCH-C1、BCH-C2 和 BCH-H2 所对应的曲线相比较,BCH-H2 和 BCH-C2 的曲线分别在 BCH-H1 和 BCH-C1 之上,因此,经热干所得的 BCH 其还原力有所下降,这可能是高温使多糖构象发生了改变而引起其抗氧化活性明显下降。

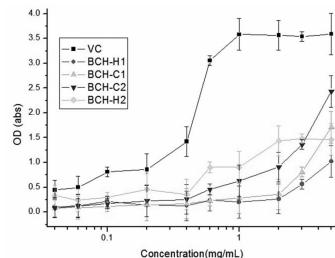


图 4 不同处理方法对白刺多糖 BCH 还原力的影响

Fig. 4 The reducing power of polysaccharide from *N. sibirica* (BCH) with different processing methods

4 结论

此次实验结果表明,经热干、冷干及脱色等不同方法处理得到的白刺多糖,在体外抗氧化实验中表

现出很好的抗氧化能力,尤其是对氧自由基(O_2^-)和 DPPH 的清除能力,实验所得 EC_{50} 值都较小($< 0.1 \text{ mg/mL}$,总体来说,与经冷干得到的多糖样品相比,热干所得样品抗氧化能力有所下降,这可能是由于在热干过程中由于温度的原因引起部分活性丧失,高温使多糖构象发生了改变而引起抗氧化活性下降,由实验数据可知经过脱色的样品对清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)和 DPPH 的能力较强,而对于氧自由基(O_2^-)的清除及还原力却有所下降,相反,未经脱色的样品对后两者的清除能力较强,而对前两者的清除能力有所下降。表明脱色过程对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和 DPPH 自由基清除有利,而对于氧自由基(O_2^-)的清除及还原力起到抑制作用。综上所述,在体外抗氧化实验中,经冷干及脱色处理得到的白刺多糖表现出较好的清除能力,尤其是对超氧自由基(O_2^-)和 DPPH 自由基的清除能力,因此,白刺多糖具有较好的抗氧化能力,可作为一种潜在的抗氧化剂应用于食品行业。对于其他方面的抗氧化作用,例如在体内多糖样品是否也具有以上的抗氧化效果,这还需要更进一步的实验来证明。

致谢:感谢西北师范大学张继研究员以及甘肃特色植物有效成分制品工程技术研究中心对本实验研究的大力支持。

参考文献

- Zhang ZQ (张泽庆), Tian YJ (田应娟), Zhang J (张静). Study on antioxidant activity of polysaccharides from *Radix Saponnikoviae*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2008, 31: 268-272.
- Zhou FX. Tissue blood perfusion and microcirculation-oxidative stress and disease. *J Sur Concepts Pract*, 2007, 6(12): 5-12.
- Tan PX, Ye T, Liu XX, et al. Progress in research on antioxidant components and mechanism of plant extracts. *Food Sci*, 2010, 124: 205-222.
- Cheng W, Ling YC, Ma XY, et al. Anti-oxidation or oxidation function and mechanism of some antioxidants. *Chin J Anim Nutr*, 2012, 24: 595-605.
- Lin BY. Discussion on the damage of free radicals on the body and the scavenging method. *Sci Technol West Chin*, 2007, 18: 37-48.
- Yao LH, He GQ, Chen Q. Research progress on biologically active component of Aloe and their functional mechanism. *Bull Sci Technol*, 2007, 23: 812-815.