

超声处理对生姜多糖理化特性和抗氧化活性的影响

贾凤霞, 吴 振, 李孝彬, 杨 勇*

重庆市中药研究院 中药健康学重庆市重点实验室, 重庆 400065

摘要: 本文对比分析了热水提取生姜多糖(HWGP)和超声提取生姜多糖(UEGP)对生姜多糖(GP)理化特性和抗氧化活性的影响。通过傅立叶变换中红外光谱、扫描电子显微镜、热重分析揭示超声处理对GP结构特性的影响;采用清除DPPH·、OH·和O₂⁻能力评价超声处理对GP抗氧化活性的影响。结果表明:超声处理并未改变生姜多糖的特征基团,但其特性和热力学特性均有变化,且其颗粒结构变小并易降解;UEGP清除DPPH·和OH·的半抑制浓度(IC₅₀)分别为2.72、1.94 mg/mL;HWGP清除DPPH·和OH·的IC₅₀要高于UEGP,但清除O₂⁻的能力要强于UEGP。GP的抗氧化活性差异与超声处理导致多糖的聚集行为和热力学特性改变有关,为植物多糖的构效关系研究提供参考。

关键词: 生姜多糖;超声处理;理化特性;抗氧化活性

中图分类号: R282.4; R94

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0035-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.007

Effects of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and antioxidant activities of ginger polysaccharides

JIA Feng-xia, WU Zhen, LI Xiao-bin, YANG Yong*

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing Key Laboratory of Chinese medicine & Health Science, Chongqing 400065, China

Abstract: In this paper, ginger polysaccharides (GPs) were extracted by hot water method (HWGPs) and ultrasonic method (UEGPs). A comparative analysis of physicochemical properties and antioxidant activities were researched. The physicochemical properties of GPs were researched by FTIR, SEM and TG. The scavenging effects of GPs on DPPH free radical (DPPH·), hydroxyl free radical (OH·) and superoxide free radical (O₂⁻) were used to evaluate the antioxidant activities of GPs. The results showed that the ultrasonic treatment did not change the characteristic group of GPs, but the conformation property and the thermodynamic properties were changed, the particle structures become smaller and easily degradable. The half-inhibitory concentration (IC₅₀) of UEGPs based on scavenging activities against DPPH· and OH· were 2.72 and 1.94 mg/mL respectively. The IC₅₀ of HWGPs against DPPH· and OH· was higher than that of UEGPs, but the scavenging effect on O₂⁻ was stronger than that of UEGPs. The difference of antioxidant activities of GPs are relevant to change of conformation property thermodynamic properties caused by ultrasonic treatment. We provided a reference for the study on the structure-activity relationship of plant polysaccharides.

Key words: ginger polysaccharides; ultrasonic treatment; physicochemical properties; antioxidant activities

生姜(*Zingiber officinalis*)是姜科姜属多年生草本植物的根茎,别名有姜根、百辣云、勾装指、因地辛等,属于国家卫生部首批公布的药食兼用资源,是我国重要的调味蔬菜和出口创汇蔬菜^[1]。生姜不仅

仅是一种调味料还是常用的中药,早在我国古代就有用生姜治病的记载,姜的根茎(干姜)、栓皮(姜皮)、叶(姜叶)均可入药。研究表明生姜含有多种氨基酸、可溶性多糖、姜酚、黄酮等有效成分,具有散寒、止呕、健胃解毒、延缓衰老、降低胆固醇、抗癌和抑菌等功效^[2-4]。

多糖广泛存在于动物、植物及微生物组织中^[5,6],是由十个以上单糖基通过缩合而成的一类

收稿日期: 2019-03-04 接受日期: 2019-05-06

基金项目: 重庆市重点产业共性关键技术创新专项(csc2017zdcy-zdyfx0013); 重庆市集成示范计划(cstc2015 jcsf-kjfp80014)

*通信作者 Tel: 86-23-81381617; E-mail: neimen@163.com

结构复杂而庞大的天然高分子化合物。植物多糖具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎等很多生物活性与功能^[7-9]。多糖几乎没有细胞毒性,并且其具有良好的生物相容性和可降解性,因此对多糖类化合物的研究已逐渐成为国际上的热点。生姜的药理活性多数与生姜多糖(GPs)有关,水溶性生姜多糖由于具有优异的抗氧化活性和抗疲劳效果而受到越来越多的关注^[10,11]。国内外研究发现,提取方法及其参数均对植物多糖的产量、分子量、单糖组成、聚集特性及构象和生物活性有不同程度的影响^[12,13],其中超声波辅助提取水溶性多糖主要利用超声波的空化作用、机械效应和热效应,加速植物细胞壁的破碎,促进胞内有效成分的溶出和迁移,从而缩短提取时间和提高提取效率^[14];同时超声波处理也对植物多糖的结构特性和生物活性产生未知的影响,一般超声处理均会导致植物多糖发生一定程度的降解,但对其聚集形态、热力学特性和生物活性的影响更为复杂^[15]。多糖的提取方法很多,主要包括热水提取法、酶法、超滤法、超声波法、微波法等。本文采用热水提取和超声提取法分别提取生姜多糖,研究两种方法得到的生姜多糖在分子结构、聚集形态、热力学特性和抗氧化活性等方面的差异,为植物多糖的构效关系研究、生姜多糖提取及其后续综合利用提供支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生姜购买于当地超市;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 山东西亚化学股份有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris) 天津市光复精细化工研究所;溴化钾(国产光谱纯)、邻苯三酚、硫酸亚铁、水杨酸、盐酸、过氧化氢均为国产分析纯;所用水为双蒸水,所用溶液均自行配制。

1.2 仪器与设备

DHG 电热恒温鼓风干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司);LGJ-10C 冷冻干燥机(四环福瑞科仪科技发展有限公司);HH-S 型水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AUW220D 电子天平(日本岛津);SU8020 场发射扫描电子显微镜(日本日立公司);耐驰 STA449F3 同步热分析仪(德国耐驰);Nicolet IS10 红外光谱仪(美国尼高力);752 型紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 传统热水与超声辅助提取生姜多糖

传统热水提取生姜多糖(HWGs):生姜切片→60℃烘干→粉碎并过60目筛→传统热水提取1.5h(70℃,料液比:20 mL/g)→收集滤液→4倍体积95%乙醇→离心(4 000 rpm, 15 min, 4℃)→Sevag法脱蛋白→冷冻干燥→HWGs。

超声辅助提取生姜多糖(UEGs):生姜切片→60℃烘干→粉碎并过60目筛→超声辅助提取1.5h(400 w, 70℃, 料液比:20 mL/g)→收集滤液→4倍体积95%乙醇→离心(4 000 rpm, 15 min, 4℃)→Sevag法脱蛋白→冷冻干燥→UEGs。

按式(1)计算生姜多糖得率

$$\text{生姜多糖得率}(\%) = \frac{\text{多糖质量}(g)}{\text{姜粉质量}(g)} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 结构表征方法

将多糖样品与干燥的KBr按照质量比1:100混合,充分研磨,压片,在4 000~400 cm⁻¹波长范围内用傅立叶变换红外光谱仪扫描^[16]。取适量生姜多糖HWGs与UEGs粉末,分别粘在实验台的导电胶上,用吸耳球吹去浮样,真空喷金,电子枪加速电压为20 kV,进行SEM观察^[17-19]。采用热分析系统研究生姜多糖样品热特性^[20]。测定条件:多糖样品5 mg,氮气环境(静态),测试温度:25~600℃,升温速率:10℃/min。

1.3.3 体外抗氧化活性的测定

1.3.3.1 清除DPPH自由基(DPPH·)的测定

参照Liu等^[21]方法进行将DPPH 1 mL(0.2 mmol/L, 95%乙醇)与不同质量浓度(1.0~5.0 mg/mL)的样品溶液3 mL混合均匀,置于暗室反应30 min,与517 nm处测定吸光度 A_t ,同时将DPPH 1 mL与样品空白3 mL混匀后测定吸光度 A_0 ,将不同质量浓度的样品溶液与95%乙醇1 mL混匀后测定吸光度 A_j ,按式(2)计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_t - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

以样品质量浓度对DPPH自由基清除率作图,求出清除率为50%时所需样品质量浓度,即半抑制浓度(IC₅₀)。

1.3.3.2 清除羟自由基(hydroxyl free radicals, OH·)的测定

Fenton反应是最常见的产生羟自由基的化学反应,OH·能被水杨酸有效的捕捉,并生成有色物质,

但若加入具有清除作用的物质,便会与水杨酸竞争,从而使有色产物生成量减少。在 10 mL 的试管中依次加入 6.0 mmol/L 的 FeSO_4 溶液 1 mL,不同质量浓度的样品溶液(1.0 ~ 5.0 mg/mL) 1 mL,6.0 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 1 mL,摇匀,静置 10 min,再加入 6.0 mmol/L 的水杨酸溶液 1 mL,摇匀,静置 30 min 后,以双蒸水为参比,与 510 nm 处测其吸光度^[22] A_i ,以水代替多糖溶液测定吸光度 A_0 ,以水代替水杨酸溶液测定吸光度 A_j ,按式(3)计算 $\text{OH}\cdot$ 的清除率。

$$\text{OH}\cdot \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

以样品质量浓度对 $\text{OH}\cdot$ 清除率作图,求出清除率为 50% 时所需样品质量浓度,即半抑制浓度 (IC_{50})。

1.3.3.3 清除超氧阴离子自由基 (superoxide free radicals, $\text{O}_2^{\cdot-}$) 的测定

参照 Liu 等^[23] 方法并加以改进,在具塞比色管中依次加入不同质量浓度的样品溶液(1.0 ~ 5.0 mg/mL) 4 mL,0.1 mol/L Tris-HCL 缓冲液(pH 8.2) 2.5 mL 混匀,25 °C 水浴保温 10 min 后加入 6.0 mmol/L 的邻苯三酚溶液(25 °C 水浴预热) 2.5 mL,准确反应 3 min 后用 0.1 mL 浓盐酸终止反应,在 325 nm 波长处测定吸光度 A_i ,以水代替邻苯三酚溶液测定吸光度 A_j ,以水代替样品溶液测定吸光度 A_0 ,按式(4)计算 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (4)$$

1.3.4 数据统计分析

采用 SPSS 15 数据处理软件,各组数据结果均以 $\bar{x} \pm s(n=3)$ 表示,LSD 法多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 超声对生姜多糖得率的影响

HWGPs 和 UEGPs 得率分别是 3.92% 和 4.72%。UEGPs 得率显著高于 HWGPs,这是因为超声波的机械、空化等效应,超声过程中形成的微流对溶液中的姜粉产生切力加速溶剂向细胞中渗透。超声可以使姜粉细胞周围形成微流,并且能使姜粉细胞破裂,进而使水浸入细胞中,增加姜粉有效成分在水中的溶解度,从而提高得率。

2.2 超声辅助提取对生姜多糖结构特性的影响

2.2.1 生姜多糖 HWGPs 和 UEGPs 红外检测结果

生姜多糖 HWGPs 和 UEGPs 红外光谱扫描结果

见图 1,由图 1 可知两种多糖都具有多糖的特征吸收峰。在 3399 cm^{-1} 和 3402 cm^{-1} 出现的峰为 O-H 伸缩振动引起的,表明两种多糖均存在分子间和分子内氢键;在 2963 cm^{-1} 和 2967 cm^{-1} 处出现的吸收峰为 C-H 伸缩振动引起的; 1653 cm^{-1} 和 1646 cm^{-1} 出现的峰为多糖中结晶水引起的。对比两种光谱图,可以发现在结构上两者并没有什么不同,这也说明超声处理并未改变多糖的特征基团。

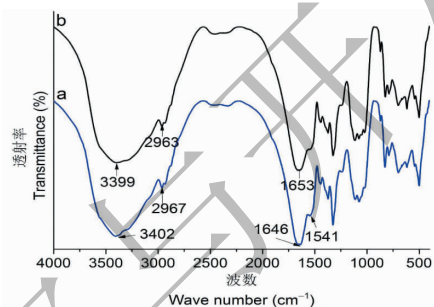


图 1 生姜多糖红外光谱图(a:UEGPs;b:HWGPs)

Fig. 1 The FT-IR spectrum of HWGPs and UEGPs(a:UEGPs;b:HWGPs)

2.2.2 生姜多糖 HWGPs 和 UEGPs 扫描电镜结果

生姜多糖 HWGPs 与 UEGPs 粉末试样不同放大倍数的扫描电镜图像见图 2,实验结果表明,样品 HWGPs 呈现片状或碎屑状堆积,而样品 UEGPs 中片状结构明显变小,并且晶体结构比较规则。比较 HWGPs 与 UEGPs 扫描电镜图像,可以看出两种多糖在形貌上存在明显的区别,经过超声作用的生姜多糖比热水提取的生姜多糖颗粒明显变小并且规则,这也说明超声作用影响了多糖的结构特性。

2.2.3 生姜多糖 HWGPs 和 UEGPs 热稳定性测定结果

生姜多糖 HWGPs 和 UEGPs 的 TG 曲线见图 3,由图 3 可以看出,两种多糖在 25 ~ 600 °C 温度逐渐升高过程中,有三次比较大的质量损失。第一次为 25 ~ 100 °C 左右,主要为失去吸附水的过程;第二次在 200 ~ 400 °C 左右,失重率较大,说明多糖自身发生了分解反应,主要为多糖分子的热降解过程;第三次在 420 ~ 600 °C 过程中,多糖质量继续减少,但速率较之前明显减小,最后趋于恒定,这主要是因为残留物质的转化。比较两种多糖的 TG 曲线,可以看出热水提取的生姜多糖 HWGPs 相对于超声提取的生姜多糖 UEGPs 热稳定性稍强。

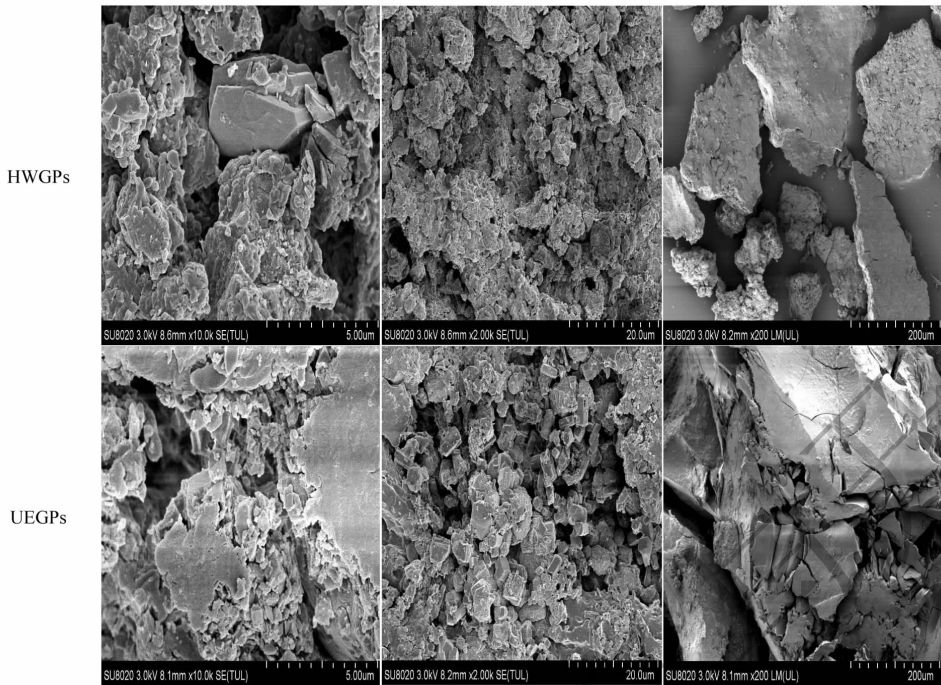


图2 生姜多糖 HWGPs 与 UEGPs 粉末试样扫描电镜图像
Fig. 2 SEM images of powder samples of HWGPs and UEGPs

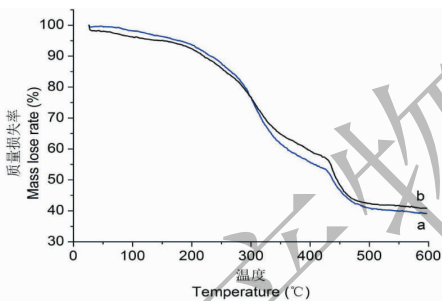


图3 生姜多糖 HWGPs 与 UEGPs 的 TG 曲线(a:UEGPs;b:HWGPs)

Fig. 3 The TG curves of HWGPs and UEGPs (a:UEGPs;b:HWGPs)

2.3 超声辅助提取对生姜多糖体外抗氧化活性的影响

生姜多糖 HWGPs 和 UEGPs 对 DPPH·、OH· 和 O₂⁻ 的清除效果见图 4, 由图 4 可知, GPs 对 DPPH·、OH· 和 O₂⁻ 的清除率随着 GPs 质量浓度的增加而逐渐增大, 且均具有剂量依赖的关系。低浓度时(1.0 ~ 3.0 mg/mL) HWGPs 和 UEGPs 对 DPPH· 清除效果差异较小, 但随着浓度增加, UEGPs 表现出更强的清除能力; 2.0 mg/mL 时, HWGPs 和 UEGPs 对 DPPH· 清除效果无显著性差异 ($P > 0.05$), 其余各

浓度差异显著 ($P < 0.05$)。随着浓度的增加(1.0 ~ 5.0 mg/mL), UEGPs 清除 OH· 能力均强于 HWGPs, 并且差异均显著 ($P < 0.05$); 但是 UEGPs 清除 O₂⁻ 的能力明显低于 HWGPs, 并且差异均显著 ($P < 0.05$)。HWGPs 清除 DPPH·、OH· 的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 3.81、2.86 mg/mL; UEGPs 清除 DPPH·、OH· 的 IC₅₀ 分别为 2.72、1.94 mg/mL。两种多糖在抗氧化活性方面具有很大的差异, 这可能与超声处理导致多糖的降解、形态及热力学特性变化有关, 其具体机制还需进一步研究。

3 结论

本文对比研究了传统热水提取和超声辅助提取两种方法对生姜多糖结构特性和抗氧化活性的影响。通过对比可以看出超声处理在一定程度上影响了多糖的结构, 使其结构发生了改变, 其特性和热力学特性也均有变化。因为超声处理后生姜多糖在结构、特性和热力学特性等方面发生了改变, 所以两种生姜多糖在抗氧化活性上存在明显的差异, 超声处理的生姜多糖清除 DPPH 自由基和羟自由基的能力要强于热水提取的生姜多糖, 但在清除超氧阴离子自由基方面, 热水提取的生姜多糖要明显强于超声处理的生姜多糖。

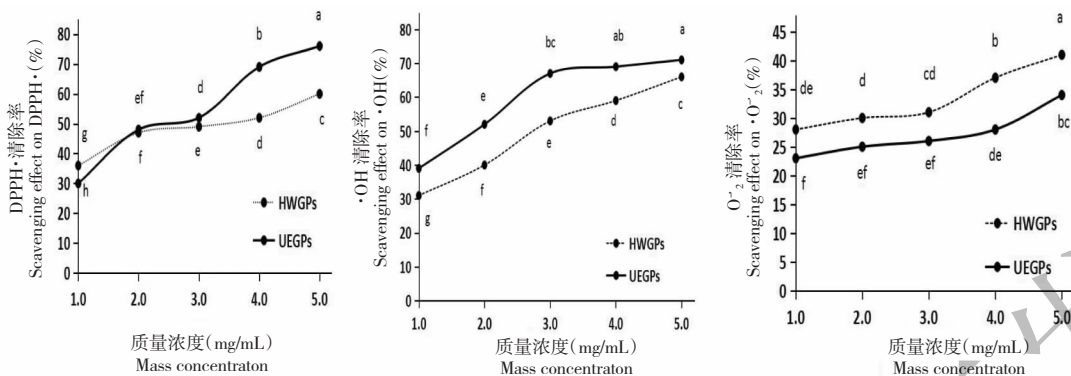


图4 HWGPs 和 UEGPs 清除 DPPH·、·OH·、O₂⁻ 活性

Fig. 4 The scavenging effects of HWGPs and UEGPs on DPPH·、·OH·、O₂⁻

参考文献

- 1 Wu XH, Gu GP, Zhang WM, et al. Development of studies on comprehensive utilization and processing techniques of zingiber officinale[J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2003, 22(3): 5-8.
- 2 Ding PF, Wu WR. The exploit of ginger and mango-mixed beverage[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2010, 31: 110-112.
- 3 Gao G, Tang XZ, Qiao XG. Composition and antimicrobial activity of essential oil from ginger[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2013, 25: 54-56.
- 4 Yang Y. Study on extraction method and antioxidant activity of flavonoid from zingiber officinalis[J]. Food Sci(食品科学), 2002, 23(4): 45-50.
- 5 Zong AZ, Cao HZ, Wang FS. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research[J]. Carbohydr Polym, 2012, 90: 1395-1410.
- 6 Skvortsov IM, Ignatov VV. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from Azospirillum species: properties and the possible role in interaction with plant roots[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 165: 223-229.
- 7 Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell[J]. Antiviral Research, 2005, 66: 103-110.
- 8 Zhang BZ, Yan PS, Chen H, et al. Optimization of production conditions for mushroom polysaccharides with high yield and antitumor activity[J]. Carbohydr Polym, 2012, 87: 2569-2575.
- 9 Kang SM, Kim KN, Lee SH, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of ecklonia cava in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. Carbohydr Polym, 2011, 85(1): 80-85.

- 10 Zhang Z, Wang X, Zhang J, et al. Potential antioxidant activities in vitro of polysaccharides extracted from ginger (Zingiber officinale) [J]. Carbohydr Polym, 2011, 86: 448-452.
- 11 Xia S, Wu Q. Extraction of polysaccharides from ginger and its anti-fague effect [J]. Jiangsu Agric Sci, 2014, 42: 240-242.
- 12 Yu J, Ji HY, Yang ZZ, et al. Relationship between structural properties and antitumor activity of astragalus polysaccharides extracted with different temperatures [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 124: 469-477.
- 13 He L, Yan XT, Liang J, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from denclrobium officinale stem [J]. Carbohydr Polym, 2018, 198: 101-108.
- 14 Wang YG, Zhang X, Ma XQ, et al. Study on the kinetic model, thermodynamic and physicochemical properties of Glycyrrhiza polysaccharide by ultrasonic assisted extraction [J]. Ultrason Sonochem, 2019, 51: 249-257.
- 15 Yan JK, Wang YY, Ma HL, et al. Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from Phellinus linteus mycelia [J]. Ultrason Sonochem, 2016, 29: 251-257.
- 16 Liu JC, Sun YX, Yu CL, et al. Chemical structure of one low molecular weight and water-soluble polysaccharide (EFP-WI) rom the roots of Euphorbia fischeriana [J]. Carbohydr Polym, 2010, 87: 1236-1240.
- 17 Hassan AN, Awad S. Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat cheddar cheese: cryo-scanning electron microscopy observations [J]. J Dairy Sci, 2005, 88: 4214-4220.
- 18 Prabasari I, Pettolino F, Liao ML, et al. Pectic polysaccharides from mature orange (Citrus sinensis) fruit albedo cell walls: sequential extraction and chemical characterization [J]. Carbohydr Polym, 2011, 84: 484-494.