

美洲大蠊多糖的水解工艺及其抗氧化活性研究

顾 婷, 和 英, 肖培云, 杨永寿*

大理大学药学院, 大理 671000

摘要:美洲大蠊因具有广泛的药理活性而受到研究者的青睐,但其多糖的水解工艺和抗氧化活性鲜见报道,研究采用响应面法对美洲大蠊多糖的水解条件进行优化,通过单因素实验确定水解时间、温度和三氟乙酸用量对美洲大蠊多糖水解的影响,以高效液相色谱图中单糖的总峰面积为响应值,结合响应面实验,确定美洲大蠊多糖的最佳水解条件:水解时间 1 h,水解温度 120 °C,三氟乙酸用量 3.5 mL,在该水解条件下测得的单糖总峰面积最大;同时,对 DPPH、OH、ABTS 自由基清除能力进行测定,IC₅₀ 分别为 0.028、0.78、0.07 mg/mL,且具有一定的还原能力。本研究建立了美洲大蠊多糖中单糖组成的分析方法,并对其水解工艺及抗氧化活性进行了研究,为美洲大蠊资源的开发利用提供了科学依据。

关键词:美洲大蠊;多糖;水解工艺;响应面;抗氧化活性

中图分类号:R284.2;R961.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)4-0612-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.4.011

Research on hydrolysis process and antioxidant activity of polysaccharide from *Periplaneta americana*

GU Ting, HE Ying, XIAO Pei-yun, YANG Yong-shou*

College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China

Abstract: *Periplaneta americana* is favored by researchers because its wide range of pharmacological activities, but its polysaccharide hydrolytic process and antioxidant activity are rarely reported. The hydrolytic conditions of *P. americana* polysaccharide were optimized by response surface method. The influence of hydrolysis time, hydrolysis temperature and the dosage of trifluoroacetic acid on the hydrolysis of *P. americana* polysaccharide were determined by single factor experiment. The total peak area of monosaccharides in the high performance liquid chromatography (HPLC) was used as the response value, and the optimal hydrolysis conditions for *P. americana* polysaccharide were determined, which were combined with response surface method. The optimum hydrolysis conditions of the polysaccharide of *P. americana* were as follows: the hydrolysis time was 1 h, the temperature was 120 °C, the amount of trifluoroacetic acid was 3.5 mL, and the total peak area of monosaccharides were measured by HPLC, under which the total peak area of monosaccharides was the largest. At the same time, The reducing ability and scavenging ability of *P. americana* polysaccharide on DPPH, OH and ABTS free radicals were determined by antioxidant activities test in vitro. *P. americana* polysaccharide have a good scavenging capacity for DPPH, OH and ABTS free radicals, with IC₅₀ of 0.028, 0.78 and 0.07 mg/mL, respectively, which has a certain reducing capacity. In this study, a method for the analysis of monosaccharides composition in the polysaccharide of *P. americana* was established, and its hydrolytic process and antioxidant activities were studied, which provide scientific basis for the development and utilization of resources of *P. americana*.

Key words: *Periplaneta americana*; polysaccharide; hydrolysis process; response surface method; antioxidant activities

美洲大蠊 (*Periplaneta americana* L.) 是蜚蠊属

中最大的昆虫之一^[1]。蜚蠊药用价值在《神农本草经》和明代的《本草纲目》早有记载^[2]。20 世纪 80 年代以来,以李树楠教授为主的科研人员致力于美洲大蠊的药用研究,将人工饲养的美洲大蠊乙醇提取物内服或者外用,用于治疗溃疡、癌症等^[3]。研

收稿日期:2020-9-28

接受日期:2021-02-01

基金项目:国家自然科学基金(81560634,82060747);云南省地方本科高校部分基础研究联合专项(2019FH001-034)

* 通信作者 Tel:86-013887219065; E-mail:yysh2257415@126.com

究发现,美洲大蠊的化学成分包括:蛋白质、氨基酸、肽类、糖类、脂肪酸、信息素及其他,有抗肿瘤、抗肝纤维化、抑菌、抗病毒、抗氧化等生物活性^[4]。

糖类物质是地球上数量最多的有机化合物,占总生物量的3/4,而多糖类物质约占其中总量的90%^[5]。多糖的生物活性主要包括抗肿瘤、降血糖、抗衰老、增强骨髓造血机能、调节免疫等,且基本无毒副作用,因而受到人们的广泛关注,在医药领域极具应用前景^[6]。其活性与其相对分子质量、化学组成、苷键构型、连接方式和空间构型有关^[7]。为了解美洲大蠊多糖的特性,可以采用水解反应,分析单糖组成及含量的变化,为美洲大蠊多糖的质量控制提供依据。实验以美洲大蠊多糖为实验对象,在单因素实验的基础上,以高效液相色谱图中单糖总峰面积为指标,利用响应面实验,优化美洲大蠊多糖的水解工艺以获得单糖含量最高的工艺,此外,对美洲大蠊多糖的抗氧化活性进行了研究,为美洲大蠊多糖的结构鉴定和后续开发利用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);TU-1901 双光束紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);AL240-IC 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);HYQ-3110 涡旋混匀器(美国精骐有限公司)。

1.2 材料

美洲大蠊药材(云南省大理州弥渡县美蠊养殖基地)经大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室杨自忠教授鉴定为昆虫纲蜚蠊科昆虫美洲大蠊 *Periplaneta americana* L.; 葡萄糖(Glu,批号171206)、甘露糖(Man,批号170921)、半乳糖(Gal,批号171206)、鼠李糖(Rha,批号171024)、岩藻糖(Fuc,批号170831)、木糖(Xyl,批号170912)、盐酸氨基葡萄糖(Gah,批号171210)、阿拉伯糖(Ara,批号171219),均购于上海融禾医药科技有限公司,以上单糖纯度均>98%。

2 实验方法

2.1 美洲大蠊多糖提取

称取500 g美洲大蠊药材,料液比1:10,60℃回流提取2次,2 h/次,4 000 rpm,离心15 min,取上清液,石油醚脱脂,60℃浓缩。加入4倍体积的95%乙醇溶液醇沉24 h,离心,取沉淀,加水溶解,加入1/4体积的Sevage试剂(氯仿:正丁醇=4:1),震

荡10 min,离心,取水相,浓缩,冷冻干燥后即得美洲大蠊多糖。

2.2 PMP-HPLC 衍生化法测定美洲大蠊多糖的单糖组成

2.2.1 美洲大蠊多糖水解液的配制

精密称取美洲大蠊多糖20 mg,置安剖瓶中,1 mL蒸馏水溶解,加2 mol/L三氟乙酸(TFA),充氮,熔封,置于烘箱中水解。将安剖瓶中水解液转移至旋蒸瓶中,加少量甲醇洗涤安剖瓶,洗液转移至旋蒸瓶中,50℃旋蒸至干,重复加甲醇,蒸干至无酸味。依次精加1、0.5、0.5 mL水超声溶解样品,并将其转移至EP管中,离心即得美洲大蠊多糖水解液。

2.2.2 混合单糖对照品溶液的配制

精密称取葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、岩藻糖、木糖、盐酸氨基葡萄糖、阿拉伯糖各约1 mg分别置EP管中,精加1 mL水溶解,即得各单糖对照品溶液。移液枪吸取葡萄糖50 μL、甘露糖30 μL、半乳糖40 μL、鼠李糖20 μL、岩藻糖10 μL、木糖10 μL、盐酸氨基葡萄糖30 μL、阿拉伯糖15 μL至EP管中即得混合单糖对照品溶液。

2.2.3 衍生化反应

精密吸取混合单糖对照品溶液100 μL和美洲大蠊多糖水解液200 μL,分别加入0.5 mol/L PMP甲醇溶液与0.3 mol/L氢氧化钠溶液各200 μL,混匀,70℃水浴反应100 min,冰浴冷却,加250 μL 0.3 mol/L的盐酸溶液,混匀。氯仿洗涤3次,每次2 mL,离心,取上清,0.45 μm微孔滤膜过滤,即得单糖标准品及多糖PMP衍生物。

2.2.4 HPLC 条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温:35℃;流速:0.8 mL/min;检测波长:250 nm;流动相:A:0.025 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.86),B:乙腈。梯度洗脱条件(以B的比例记录):0~20 min,16.5→17%;20~35 min,17→22%;进样量:10 μL。

2.3 单因素实验(n=3)

2.3.1 TFA 用量考察

精密称取美洲大蠊多糖5份,20 mg/份,置安剖瓶中,1 mL蒸馏水溶解,分别加入2、3、4、5、6 mL TFA,充氮,熔封。置于烘箱中,110℃水解8 h,后将安剖瓶中水解液转移至旋蒸瓶中,加少量甲醇洗涤安剖瓶,洗液转移至旋蒸瓶中,50℃旋蒸至干,重复加甲醇,蒸干至无酸味。依次精加1、0.5、0.5 mL水

超声溶解样品,并将其转移至 EP 管中,精密吸取美洲大蠊多糖水解液 200 μL ,分别加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液与 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液各 200 μL ,混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 100 min,冰浴冷却,加 250 μL 0.3 mol/L 的盐酸溶液,混匀。氯仿洗涤 3 次,每次 2 mL,离心,取上清,0.45 μm 微孔滤膜过滤,得多糖 PMP 衍生物,HPLC 上机检测,计算单糖总峰面积。

2.3.2 水解时间考察

精密称取美洲大蠊粗多糖 5 份,20 mg/份,置安剖瓶中,1 mL 蒸馏水溶解,加 3 mL TFA,充氮,熔封。置于烘箱中,110 $^{\circ}\text{C}$ 分别水解 0.5、1、1.5、2、4 h,然后将安剖瓶中水解液转移至旋蒸瓶中,后续操作与“2.3.1”项下一致,HPLC 上机检测,计算单糖总峰面积。

2.3.3 水解温度考察

精密称取美洲大蠊粗多糖 5 份,20 mg/份,置安剖瓶中,1 mL 蒸馏水溶解,加 3 mL TFA,充氮,熔封。置于烘箱中,90、100、110、120、130 $^{\circ}\text{C}$ 水解 1 h,然后将安剖瓶中水解液转移至旋蒸瓶中,后续操作与“2.3.1”项下一致,HPLC 上机检测,计算单糖总峰面积。

2.4 响应面实验优化美洲大蠊的水解工艺

在单因素实验基础上,依据 Design-Expert 8.0.6 Trial 软件,运用 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,以水解时间、水解温度、TFA 用量三个因子为自变量,以美洲大蠊多糖水解出来的单糖总峰面积为响应值,对美洲大蠊多糖的水解条件进行优化,响应面实验的因素及水平见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factor and level of response surface test

水平 Level	因素 Factor		
	TFA 用量 TFA dosage (mL)	水解时间 Hydrolysis time (h)	水解温度 Hydrolysis temperature ($^{\circ}\text{C}$)
-1	2	0.5	110
0	3	1	120
1	4	1.5	130

2.5 数据处理

使用统计软件 Design-Expert 8.0.6 进行响应面实验分析。

2.6 美洲大蠊多糖抗氧化活性研究

2.6.1 清除 DPPH 自由基能力的测定

参照 Li 等^[8]和 Feng 等^[9]方法,并做相应调整。精密称取 7.87 mg DPPH,无水乙醇定容至 100 mL (0.02 mmol/L)。分别精取 2 mL 不同浓度 (0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL) 的样品和维生素 C (Vc) 溶液,精加 2 mL DPPH 溶液,混合均匀,室温放置 30 min 后,4 000 rpm 离心 10 min,取上清液于 517 nm 处测吸光度。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%$$

其中, A_0 : 2 mL 无水乙醇 + 2 mL DPPH 溶液的吸光度; A_1 : 2 mL 样品溶液 + 2 mL DPPH 溶液的吸光度; A_2 : 2 mL 样品溶液 + 2 mL 无水乙醇的吸光度。

2.6.2 总还原能力的测定

参照 Wang 等^[10]方法,并做相应修改。在 10

mL 离心管中分别精取 0.025 mol/L pH 6.86 的磷酸盐缓冲液 2 mL 和不同浓度 (0.04、0.08、0.12、0.16、0.20、0.24 mg/mL) 的样品和 Vc 溶液 2 mL,精加 2 mL 1% 铁氰化钾,混匀后于 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min。取出后精加 2 mL 10% 三氯乙酸终止反应,4 000 rpm 离心 10 min。精取上清液 2 mL,精加入 2 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% FeCl_3 ,混匀后静置 10 min,在 700 nm 处检测吸光度。

$$\text{还原能力} = A_1 - A_2$$

其中, A_1 : 样品组吸光度; A_2 : 样品本底吸光度 (以等体积蒸馏水代替 FeCl_3 溶液)。

2.6.3 羟自由基清除率的测定

参照 Li 等^[11]方法,并做相应修改。精取 9 mmol/L FeSO_4 、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液各 1 mL,1 mL 不同浓度 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL) 的样品及 Vc 溶液。精加 1 mL 1% H_2O_2 启动反应,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,以蒸馏水为参比,在 510 nm 处测定各浓度样品的吸光度。

$$\text{OH 自由基清除率} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%$$

式中, A_0 :1 mL 水杨酸 + 1 mL FeSO_4 + 1 mL 水 + 1 mL H_2O_2 ; A_1 :1 mL 水杨酸 + 1 mL FeSO_4 + 1 mL 样品 + 1 mL H_2O_2 ; A_2 :1 mL 水杨酸 + 1 mL FeSO_4 + 1 mL 样品 + 1 mL H_2O 。

2.6.4 ABTS 自由基清除能力的测定

参考 Zhang 等^[12]方法,略作修改。将等体积 7.4 mmol/L 的 ABTS 和 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液混合,室温避光下静置 12~16 h,制成 ABTS 储备液。用 pH 7.4 的磷酸缓冲液稀释储备液,使其在 734 nm 下的吸光度在 (0.70 ± 0.02) ,制成 ABTS 工作液。精取不同浓度(0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 mg/mL)的多糖样品及 Vc 溶液各 1 mL,精加 ABTS 工作液 6 mL,混合均匀,室温下静置 6 min,测定 734 nm 下的吸光度。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\%$$

其中, A_0 :1 mL 蒸馏水 + 6 mL ABTS 工作液的

吸光度; A_1 :1 mL 样品液 + 6 mL ABTS 工作液的吸光度; A_2 :1 mL 样品液 + 6 mL 蒸馏水的吸光度。

3 结果

3.1 单因素实验结果

TFA 用量考察结果:在水解温度为 110 °C,水解时间 8 h 的条件下,TFA 用量为 3 mL 时,单糖总峰面积达到最大;水解时间考察结果:在 TFA 用量为 3 mL,水解温度 110 °C 条件下,水解 1 h,单糖总峰面积达到最大;水解温度考察结果:在 TFA 用量为 3 mL,水解时间 1 h 的条件下,水解温度为 120 °C 时,单糖总峰面积达到最大。

3.2 美洲大蠊多糖水解的响应面结果

3.2.1 响应面设计及结果

根据单因素实验所得结果进行响应面设计,PMP-HPLC 柱前衍生法测定各组单糖总峰面积,响应面实验设计及结果如表 2 所示。

表 2 响应面实验设计及结果($n=3$)

Table 2 Response surface test designs and results ($n=3$)

No.	A:水解时间 Hydrolysis time (h)	B:水解温度 Hydrolysis temperature(°C)	C:TFA 用量 TFA dosage(mL)	Y:单糖总峰面积 Total peak area of monosaccharides (mAU · min)
1	1	120	3	4 456.3
2	0.5	120	2	2 425.4
3	1	120	3	5 160.8
4	0.5	130	3	3 997.4
5	1.5	120	4	3 607.0
6	1	120	3	4 726.2
7	1	110	4	3 326.5
8	1.5	120	2	3 211.6
9	0.5	120	4	3 956.4
10	1	130	2	2 234.3
11	1	110	2	2 726.2
12	1.5	130	3	3 274.3
13	0.5	110	3	2 423.4
14	1	130	4	3 803.7
15	1	120	3	4 446.1
16	1	120	3	5 026.0
17	1.5	110	3	4 207.1

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中所得的实验数据进行分析,以单糖总峰面积 Y 对自变量进行模型拟合,通过决定系数(R^2)和方差分析对拟合

模型进行评价,通过比较各拟合方程的拟合度,得到二次多项回归拟合方程: $Y = 4 763.08 + 187.18A + 78.31B + 512.01C - 626.70 AB - 283.90AC +$

242. 27BC - 505.05A² - 782.48B² - 957.93C²。

对模型进行二项式模型的 ANOVA 方差分析见表 3。由表 3 可知,模型 $P < 0.001$,表明回归方程呈显著,在统计学上有意义;失拟项 $P = 0.7951 > 0.05$ 不显著;该模型 $R^2 = 0.9603$,表明方法可靠,该方程模拟真实分析有现实意义;模拟项的二次项

B^2 、 C^2 值达到极显著水平 ($P < 0.001$),因子 C 、因子 AB 以及模拟项的二次项 A^2 也达到了显著水平 ($P < 0.05$);结合 F 值可以看出,3 个因素对总峰面积的影响顺序分别为: $C > A > B$;该模型 $R_{Adj}^2 = 0.9092$,说明该模型实验拟合度好。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

项目 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	1.29×10^7	9	1.43×10^6	18.79	0.0004**
A:水解时间 Hydrolysis time	2.80×10^5	1	2.80×10^5	3.68	0.0966
B:水解温度 Hydrolysis temperature	4.91×10^4	1	49062.78	0.64	0.4486
C:TFA 用量 TFA dosage	2.10×10^6	1	2.10×10^6	27.54	0.0012*
AB	1.57×10^6	1	1.57×10^6	20.63	0.0027*
AC	3.22×10^5	1	3.22×10^5	4.23	0.0786
BC	2.35×10^5	1	2.35×10^5	3.08	0.1225
A ²	1.07×10^6	1	1.07×10^6	14.1	0.0071*
B ²	2.58×10^6	1	2.58×10^6	33.85	0.0007**
C ²	3.86×10^6	1	3.86×10^6	50.74	0.0002**
残差 Residual	5.33×10^5	7	76153.47	-	-
失拟项 Lack of fit	1.10×10^5	3	36605.26	0.35	0.7951
纯误差 Pure error	4.23×10^5	4	1.06×10^5	-	-
总离差 Cor total	1.34×10^7	16	-	-	-

注:** 差异极显著 ($P < 0.001$); * 差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: ** Very significant difference ($P < 0.001$); * Significant difference ($P < 0.05$).

3.2.2 响应面曲面分析

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行分析,作出响应面的 3D 和等高线分析图,可以形象地反应出各自变量对总峰面积的影响。由图 1~3 可知,在所选范围内存在极值即响应面最高点,也是

等值线最小椭圆的中心点,曲面坡度大,说明变化明显;响应面图能较直观反映出各因素与响应值的关系及各个因素间的交互作用。此外,等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。由图还可知,水解时

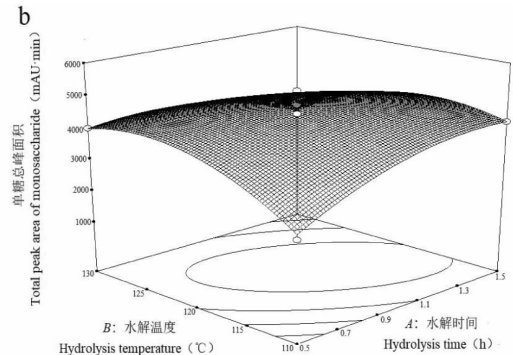
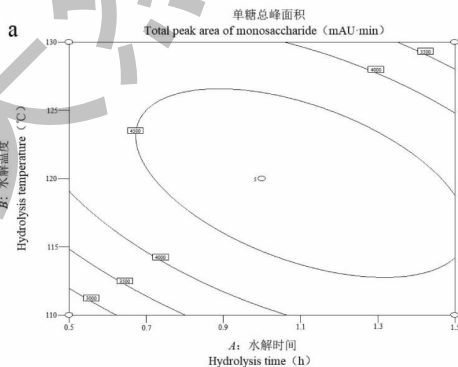


图 1 水解时间和水解温度等高线 (a) 及对单糖总峰面积 (b) 影响的响应面

Fig. 1 Contour plots (a) and response surface plots (b) for effects of hydrolysis time and hydrolysis temperature on the total peak area of monosaccharides

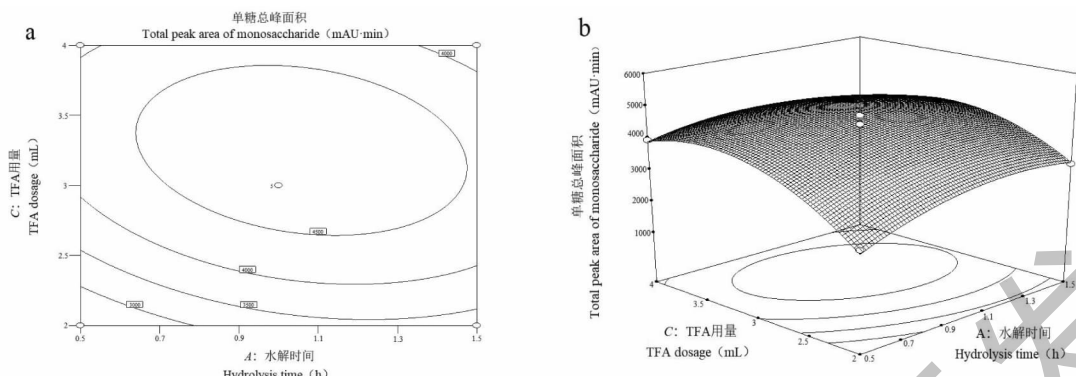


图2 TFA 用量和水解时间等高线 (a) 及对单糖总峰面积影响的响应面图 (b)

Fig. 2 Contour plots (a) and response surface plots (b) for effects of TFA dosage and Hydrolysis time on the total peak area of monosaccharide

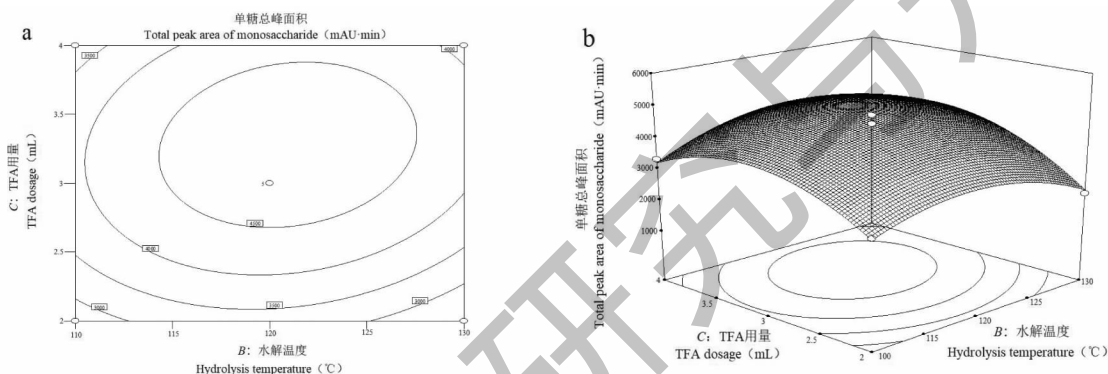


图3 TFA 用量和水解温度等高线 (a) 及对单糖总峰面积影响的响应面图 (b)

Fig. 3 Contour plots (a) and response surface plots (b) for effects of TFA dosage and Hydrolysis temperature on the total peak area of monosaccharide

间与水解温度这两者之间存在显著的交互作用;而 TFA 用量和水解温度之间无显著交互作用;TFA 用量和水解时间之间也无显著交互作用;交互作用强弱为: $AB > AC > BC$, 与方差分析结果一致。

3.2.3 验证实验

响应面实验预测的最佳水解条件为:水解时间 1.04 h, 水解温度 120.62 °C, TFA 用量 3.26 mL, 模型预测值为 4 839.97。为了检验模型的可行性, 考察预测结果的可靠性, 在优化的工艺参数下进行验证试验, 考虑到实际操作条件, 实际校正后将最佳工艺参数修正为:水解时间 1 h, 水解温度 120 °C, TFA 用量 3.5 mL, 所得总峰面积为 4 740.15, 与模型预测值相对误差为 2.1%。图 4 为优化条件下测定的美洲大蠊单糖及标准单糖液相色谱图。

3.3 美洲大蠊多糖抗氧化活性结果

3.3.1 美洲大蠊多糖对 DPPH 自由基的清除能力

用“2.6.1”项方法测定 Vc 和美洲大蠊多糖对

DPPH 自由基的清除曲线, 见图 5, 随着给药浓度的增加, Vc 和美洲大蠊多糖对 DPPH 自由基的清除能力增强, 当美洲大蠊多糖浓度为 0.08 mg/mL 时, 清除率为 88.34%, 此时, Vc 的清除率为 96.43%。美洲大蠊多糖对 DPPH 自由基清除作用的 IC_{50} 数值为 0.028 mg/mL, 结果显示美洲大蠊多糖有一定的清除 DPPH 自由基的能力。

3.3.2 美洲大蠊多糖的还原能力

用“2.6.2”项方法测定 Vc 和美洲大蠊多糖的总还原能力, 结果见图 6, 随着多糖和 Vc 浓度的增加, 美洲大蠊多糖的还原力都出现较为明显的上升。当 Vc 的浓度达到 0.16 mg/mL 时, 吸光度值达到最大, 为 1.214; 而当美洲大蠊多糖的浓度为 0.16 mg/mL 时, 吸光度为 0.667, 虽还原能力不及 Vc, 但本实验仍能证明美洲大蠊多糖具有一定的还原能力。

3.3.3 美洲大蠊多糖对 OH 自由基的清除能力

由图 7 可知, 在多糖浓度为 0.4 ~ 1.6 mg/mL

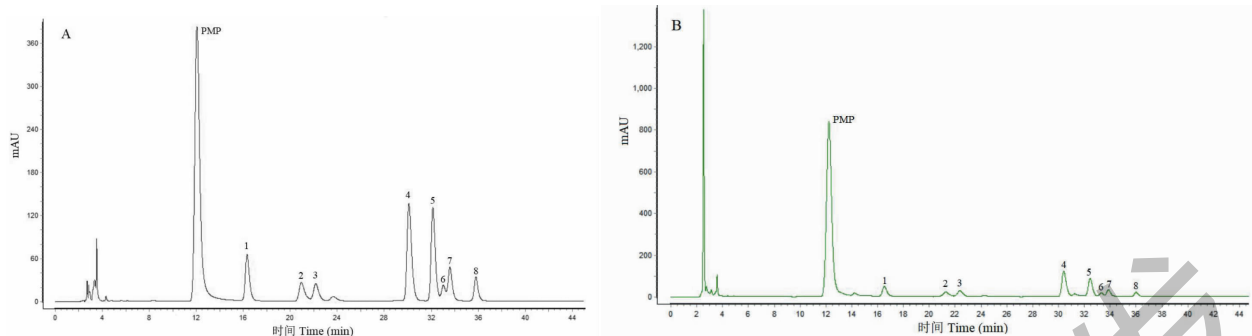


图4 混合对照品(A)及美洲大蠊单糖组成(B) HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of monosaccharides of reference substances solution (A) and monosaccharides composition of *P. americana* (B)

注:1:甘露糖;2:盐酸氨基葡萄糖;3:鼠李糖;4:葡萄糖;5:半乳糖;6:木糖;7:阿拉伯糖;8:岩藻糖。Note:1:Man;2:Gah;3:Rha;4:Glu;5:Gal;6:Xyl;7:Ara;8:Fuc.

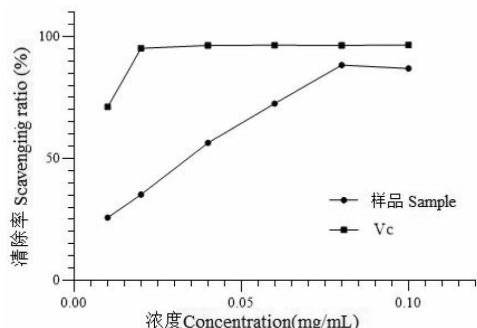


图5 美洲大蠊多糖对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 5 Scavenging activity of *P. americana* polysaccharide on DPPH free radicals

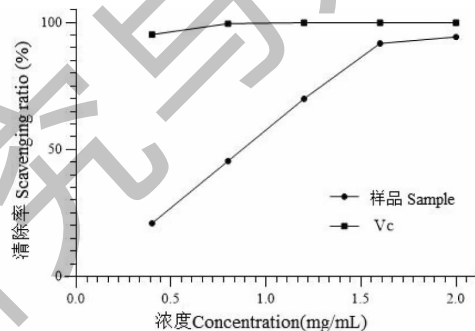


图7 美洲大蠊多糖对 OH 自由基的清除率

Fig. 7 Scavenging ability of *P. americana* polysaccharide on OH free radicals

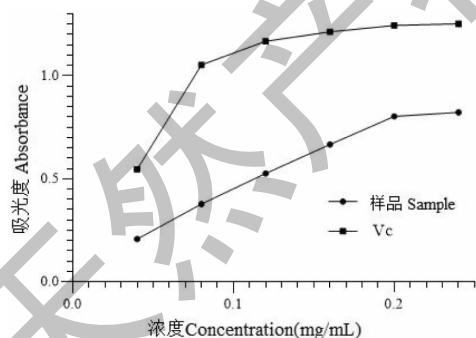


图6 美洲大蠊多糖的总还原能力

Fig. 6 Reducing ability of *P. americana* polysaccharide

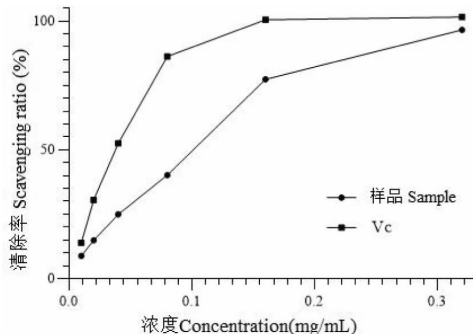


图8 美洲大蠊多糖对 ABTS 自由基的清除率

Fig. 8 Scavenging ability of *P. americana* polysaccharide on ABTS free radicals

时,OH 自由基清除率随着多糖浓度的增加而增加,当多糖浓度达到 1.6 mg/mL 时,清除率为 94.28%,此时,Vc 清除率为 99.91%,二者清除能力较为接近。美洲大蠊多糖对 OH 自由基清除作用的 IC_{50} 值为 0.78 mg/mL,表明美洲大蠊多糖具有良好的清除 OH 自由基的能力。

3.3.4 美洲大蠊多糖清除 ABTS 自由基的能力

由实验结果(见图 8)可知,美洲大蠊多糖在 0.01~0.16 mg/mL 时,美洲大蠊多糖清除 ABTS 自由基能力曲线相对较陡,清除能力随多糖浓度增加地较快;当多糖在 0.16~0.32 mg/mL 时,曲线较平缓;当多糖浓度为 0.32 mg/mL,美洲大蠊多糖对

ABTS 自由基的清除率为 97%, 此时, Vc 清除能力为 102%。美洲大蠊多糖和 Vc 对 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.07、0.035 mg/mL, 表明美洲大蠊多糖有一定的清除 ABTS 自由基的能力。

4 结论与讨论

本研究采用单因素实验与响应面实验相结合的方法, 对美洲大蠊多糖的提取工艺条件进行了优化, 并对其抗氧化能力进行了初步评价。得到美洲大蠊多糖水解的最佳工艺条件为: 水解时间 1 h, 水解温度 120 °C, TFA 用量 3.5 mL, 总峰面积为 4 740.15。抗氧化活性测定结果表明, 美洲大蠊多糖具有较好的抗氧化活性, 其对 DPPH、OH、ABTS 自由基具有较好的清除能力, IC_{50} 分别为 0.028、0.78、0.07 mg/mL, 且具有一定的还原能力。Zhang 等^[13]发现霸王花多糖中半乳糖和阿拉伯糖的比例与其清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 存在一定的正相关性。Shang 等^[14]将 5 种食用真菌多糖的化学组成及单糖组成与抗氧化活性 (IC_{50}) 进行 Pearson 相关性分析发现, 岩藻糖、甘露糖和半乳糖的含量对多糖的 ABTS 自由基清除活力有影响; 葡萄糖和甘露糖含量对多糖的 OH 自由基清除活力有显著影响, 岩藻糖含量和多糖的超氧阴离子的 IC_{50} 值呈正相关。Ai^[15]发现甘露糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖对茶多糖抗氧化活性有较大影响。相关文献表明, 多糖的抗氧化活性与其单糖组成及各单糖的含量有着密切关系。实验发现美洲大蠊多糖对 DPPH、OH、ABTS 自由基具有较好的清除能力, HPLC 测试结果发现其水解液含有甘露糖、盐酸氨基葡萄糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖, 摩尔比为 17.0:13.2:9.6:53.4:21.8:1.0:4.6:1.3; 美洲大蠊多糖抗氧化作用可能与其单糖组成有关, 而水解后的美洲大蠊多糖抗氧化活性能否保持或增加, 有待实验的进一步研究。

参考文献

- Jiang LY, Liu X, Xia CL, et al. Research advance on chemical constituents and anti-tumor effects of *Periplaneta americana* L. [J]. Med Plant, 2012(11):95-97.
- Zeng CJ, Liao Q, Hu Y, et al. The role of *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattellidae) in modern versus traditional Chinese medicine [J]. J Med Entomol, 2019, 56:1522-1526.
- Li SN. The magical effect of *Periplaneta americana* [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Medica (云南中医中药杂志), 1981(5):25.
- Lin Z, Li QX, Xu J, et al. Research progress on chemical constituents and biological activity of *Periplaneta americana* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48:3645-3649.
- Jin ZY, Gu ZB, Tong QY, et al. Carbohydrate Chemistry (碳水化合物化学) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.
- Zhang XR, Zhang YH, Zhou YC, et al. Research progress on chemical structure and pharmacological action of polysaccharides from traditional Chinese medicine [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med (黑龙江中医药), 2018, 47(1):88-89.
- Niu F, Gao JM, Duan XW, et al. Optimization of hydrolysis process of polysaccharides from *Chrysanthemum indicum* flowers by response surface methodology [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2019, 40(1):156-161.
- Li YF, Fu WP, Ding L, et al. Research on *Pinus yunnanensis* Franch pine needle polysaccharides effect of scavenging free radical and anti-lipid peroxidation [J]. J Dali Univ (大理大学学报), 2017, 2(4):28-31.
- Feng SZ, Lu YF, Liu NY, et al. Effect of monosaccharide composition on antioxidant activity of algal polysaccharides [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:116-121.
- Wang H, Luo QH, Wei MY, et al. In vitro antioxidant activity of Chinese giant salamander oil [J]. Chin Oils Fats (中国油脂), 2018, 43(9):149-153.
- Li WJ, Wang CZ, Ye JZ, et al. Effect of different extraction order on the yield of *Lycium barbarum* pigment and polysaccharides and their antioxidant activities [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31(6):932-939.
- Zhang ZQ. Research on the effects of Rhizoma Gastrodiae extract on the physicochemical properties, antioxidant activities and biological activities of the exopolysaccharide fractions of *Grifola frondosa* [D]. Guiyang: Guizhou University (贵州大学), 2019.
- Zhang Q, Feng F, Yang SL, et al. Studies on monosaccharide composition and antioxidant activity of crude polysaccharide from *Hylocereus undatus* (Haw.) Urilt. et. Rose of different regions [J]. J Shanghai Jiaotong Univ: Agr Sci (上海交通大学学报: 农科版), 2019(2):83-89.
- Shang JQ, Zou DY, Teng XY, et al. Structural characterization and antioxidant activity of five kinds of edible fungus polysaccharides [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2020, 41(15):77-83.
- Ai YJ. Study on the structure-activity relationship of antioxidant tea polysaccharides [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural Univ (华中农业大学), 2019.