

软枣猕猴桃多糖的体外抗氧化活性

刘长江, 潘松, 梁爽

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 利用水提醇沉法提取软枣猕猴桃粗多糖, 经脱蛋白、脱脂, 软枣猕猴桃粗多糖的提取率为1.41%。利用DEAE-52纤维素离子交换层析对软枣猕猴桃多糖进行初步分离, 得到4种软枣猕猴桃多糖组分。利用Sephadex G-200凝胶柱层析对组分II和III实现了完全分离。通过测定清除自由基能力, 评价软枣猕猴桃多糖组分II的抗氧化活性。结果表明: 软枣猕猴桃多糖对DPPH自由基及烷基自由基($\bullet R$)有较强的清除能力, IC_{50} 值分别为0.497、0.547 mg/mL。在受试范围内, 随软枣猕猴桃多糖质量浓度的增加, 清除能力增强, 当软枣猕猴桃多糖质量浓度达到1 mg/mL时, 其对DPPH自由基及 $\bullet R$ 的清除率分别达到86.4%、87.1%, 与VC的清除率相近。软枣猕猴桃多糖对羟自由基($\bullet OH$)有一定的清除能力, IC_{50} 值为0.668 mg/mL。其清除能力随多糖质量浓度的增加而有所增加, 但其对 $\bullet OH$ 的清除率较VC有一定的差距。软枣猕猴桃多糖对 $O_2^{\bullet -}$ 的清除率较低, 清除能力较弱。由此可见, 软枣猕猴桃多糖具有较强的抗氧化活性。

关键词: 软枣猕猴桃; 多糖; 抗氧化活性; 自由基; 清除率

in vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Actinidia arguta* Sieb. et Zucc. Fruits

LIU Chang-jiang, PAN Song, LIANG Shuang

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Crude polysaccharides from *Actinidia arguta* Sieb. et Zucc. fruits were extracted by hot water extraction and ethanol precipitation, deproteinized and defatted and the yield of crude polysaccharides was found to be 1.41%. The crude polysaccharide extract was separated by DEAE-cellulose 52 ion exchange chromatography to obtain four fractions (I, II, III and IV). Complete separation of fractions II and III was achieved by Sephadex G-200 column chromatography. The antioxidant activity of fraction II was investigated by measuring free radical scavenging activity. Polysaccharide fraction II was found to have strong radical scavenging activity against DPPH and alkyl radicals with an IC_{50} of 0.497 mg/mL and 0.547 mg/mL, respectively. Its radical scavenging activity increased with increasing concentration within the concentration range investigated and the scavenging rate at a concentration of 1 mg/mL was 86.4% and 87.1% for DPPH and alkyl radicals, respectively, which was comparable to that of vitamin C. Moreover, this fraction also had radical scavenging activity against hydroxyl radical with an IC_{50} of 0.668 mg/mL in a concentration-dependent manner but was inferior to vitamin C. However, its radical scavenging activity against superoxide anion radical was weak. Based on the above results, we conclude that polysaccharide fraction II has potent antioxidant activity.

Key words: *Actinidia arguta* Sieb. et Zucc.; polysaccharides; antioxidant activity; free radical; scavenging rate

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0079-04

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta* Sieb. et Zucc.)又名软枣子, 为猕猴桃科猕猴桃属, 多年生落叶藤本植物^[1]。主要分布于我国东北、西北及长江流域。我国东北三省年自然产量超过6000t。软枣猕猴桃果实鲜美, 香气浓郁, 适于加工果酱等保健食品^[2]。软枣猕猴桃营养丰富, 含大量VC、蛋白、脂肪、钙、磷、铁、镁等多种微量元素、多种氨基酸及果胶等营养成分^[3]。软枣猕猴桃具有滋补强身、生津润肺等作用, 对高血压、高血脂、心绞痛等症有

一定的疗效^[4]。多糖又称多聚糖, 由单糖聚合成聚合度大于10的极性大分子, 与生命的多种生理功能密切相关^[5]。多糖具有多种临床作用, 如免疫调节、抗氧化、降血糖血脂等作用, 并对防治肿瘤、糖尿病、冠心病等有一定作用^[6-8]。多糖具有清除自由基的作用, 能提高抗氧化酶活性和抑制脂质过氧化的活性, 起到保护生物膜和延缓衰老的作用^[9]。软枣猕猴桃多糖含量丰富, 对软枣猕猴桃多糖抗氧化性质的研究, 对软枣猕猴桃的功效研究以及

收稿日期: 2011-10-06

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903013)

作者简介: 刘长江(1955—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: liucj597@sohu.com

开发利用有重要意义。本实验通过水提醇沉法提取软枣猕猴桃粗多糖,采用Sevag法脱蛋白,并对软枣猕猴桃多糖进行分离纯化,从而得到均一纯品软枣猕猴桃多糖。本实验对软枣猕猴桃多糖清除自由基能力进行研究,以研究其抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

软枣猕猴桃果实,采自辽宁省海城市九龙川自然保护区。采摘时间为8、9月份。5℃条件下保存。

邻苯三酚、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢、磷酸、亚油酸、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、VC、无水乙醇、DEAE-52纤维素 国药集团药业股份有限公司; Sephadex G-200 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

5805高速冷冻离心机 德国Investment公司; LL3000冻干机 丹麦Heto公司; RE-52旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; HH-4数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; BS-100A自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; U2910紫外分光光度计 日本Hitachi公司。

1.3 方法

1.3.1 提取软枣猕猴桃多糖的操作要点

采用水提醇沉法提取软枣猕猴桃多糖:将软枣猕猴桃果实洗净匀浆,加入80%乙醇于80℃水浴除杂^[10],3500r/min离心10min;将沉淀进行水浴提取,提取温度为100℃,提取时间为2h,液料比为6:1(V/m),离心;上清液浓缩至50mL,浓缩物用90%乙醇沉淀4h,过滤;沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚淋洗,过滤;沉淀冷冻干燥,得到软枣猕猴桃粗多糖。在50℃条件下,用石油醚索氏提取5h对粗多糖进行脱脂^[11];采用Sevag法^[12]对粗多糖进行脱蛋白。粗多糖提取率的计算公式如(1)所示。

$$\text{粗多糖提取率}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: m_1 为提取出粗多糖干品质量/g; m_2 为原料质量/g。

1.3.2 软枣猕猴桃粗多糖的分离纯化

采用DEAE-52纤维素离子交换柱层析法对软枣猕猴桃粗多糖进行初步分离^[13]:以蒸馏水、0.1、0.2、0.3mol/L NaCl溶液为洗脱剂。洗脱剂流速为2mL/min, 4min/管。洗脱液用苯酚-硫酸法^[14]检测绘制洗脱曲线。根据洗脱曲线收集各均一组分。透析、浓缩、冻干得半纯品软枣猕猴桃多糖。

采用Sephadex G-200柱层析对软枣猕猴桃多糖组分进行进一步分离^[15]:以相应洗脱剂洗脱,洗脱剂流速为2mL/min, 4min/管。绘制洗脱曲线,根据洗脱曲线收集主

要组分。透析、浓缩、冻干得高纯品软枣猕猴桃多糖。

1.3.3 软枣猕猴桃多糖抗氧化活性测定

1.3.3.1 清除 O_2^- 能力^[16]

自氧化速率测定:4.5mL 50nmol/L、pH8.2 Tris-HCl缓冲液与4.2mL蒸馏水混匀后在25℃水浴中保温20min,加入在25℃预热过的3mmol/L邻苯三酚0.3mL(以10mmol/L HCl配制),混匀,在325nm波长处每隔0.5min比色一次,以上述Tris-HCl缓冲液为空白,计算邻苯三酚的自氧化率 v_0 。

以不同质量浓度高纯品多糖溶液或VC溶液代替蒸馏水,按上述方法操作,计算邻苯三酚的自氧化率 v_1 。

$$\text{清除率}/\% = \frac{v_0 - v_1}{v_0} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3.2 清除DPPH自由基能力^[17]

取不同质量浓度多糖溶液0.5mL,加入25mL 6.5×10^{-5} mol/L DPPH溶液,立即混匀,静置30min后,以60%乙醇为空白,于517nm波长处测定吸光度 $A_{\text{样品}}$,同时,测定0.5mL多糖溶液与2.5mL 60%乙醇混合液在517nm波长处的吸光度 $A_{\text{对照}}$,再测定2.5mL DPPH溶液与0.5mL 60%乙醇在517nm波长处的吸光度 $A_{\text{空白}}$ 。多糖对DPPH自由基的清除率计算公式如(3)所示。

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

1.3.3.3 清除 $\cdot OH$ 能力

在反应体系中加入8mmol/L $FeSO_4$ 2mL、8mmol/L水杨酸-乙醇溶液2mL,不同质量浓度多糖溶液1mL,最后加1mL体积分数0.03% H_2O_2 启动反应,在37℃反应30min。在525nm波长处测定吸光度 A_i ,以相同质量浓度的多糖溶液不加0.03% H_2O_2 为本底吸光度 A_j 。并以蒸馏水为参比液测定吸光度 A_0 。清除率计算公式如(4)所示。

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

1.3.3.4 清除 $\cdot R$ 能力^[18]

将5mL乙醇,5mL 0.1mol/L pH8的磷酸缓冲溶液,0.1mL亚油酸,1mL不同质量浓度多糖溶液混合,用紫外灯照射60min,然后加入20%三氯乙酸4mL,3%硫代巴比妥酸1mL,95℃水浴中反应90min,冷却后3500r/min离心10min,于532nm波长处测得吸光度 A_i 。以蒸馏水作为空白,测得吸光度 A_0 。清除率计算公式如(5)所示。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 软枣猕猴桃粗多糖的提取率

采用水提醇沉法提取软枣猕猴桃粗多糖,并对粗多

糖进行脱脂、脱蛋白处理,制得的软枣猕猴桃粗多糖呈乳白色粉末。软枣猕猴桃粗多糖的提取率为1.41%。

2.2 软枣猕猴桃多糖的分离纯化结果

2.2.1 DEAE-52纤维素离子交换柱层析初步分离结果

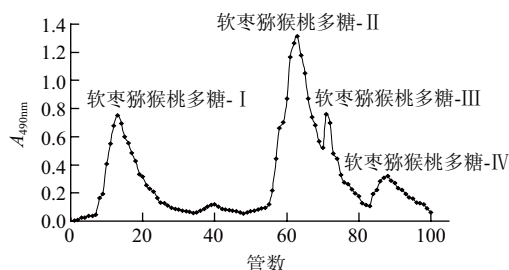


图1 软枣猕猴桃多糖DEAE-52纤维素离子交换柱层析结果

Fig.1 Elution profile of polysaccharides from *Actinidia arguta* Sieb. et Zucc. on DEAE-cellulose 52 cellulose column

由图1可知,经DEAE-52纤维素离子交换柱层析,得到4个明显洗脱峰,其中,软枣猕猴桃多糖-I为蒸馏水洗脱产物;软枣猕猴桃多糖-II和软枣猕猴桃多糖-III为0.2mol/L NaCl洗脱产物,这两种多糖组分没有完全分离,需进一步分离纯化;软枣猕猴桃多糖-IV为0.3mol/L NaCl洗脱产物。其中,软枣猕猴桃多糖-II为主要组分,后续实验对其进行进一步分离,并以该组分为研究对象。

2.2.2 Sephadex G-200凝胶柱层析进一步分离结果

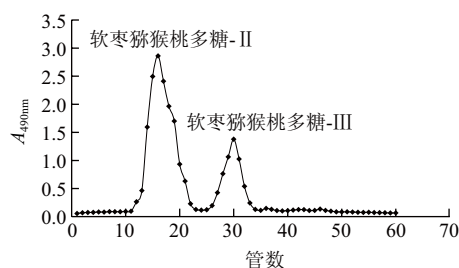


图2 软枣猕猴桃多糖Sephadex G-200柱层析结果

Fig.2 Elution profile of polysaccharides from *Actinidia arguta* Sieb. et Zucc. on Sephadex G-200 cellulose column

由图2可知,经Sephadex G-200凝胶柱层析进一步分离,软枣猕猴桃多糖-II和软枣猕猴桃多糖-III组分完全分离,可分别收集各组分。由于软枣猕猴桃多糖-II为主要组分,后续实验对此组分进行研究。收集软枣猕猴桃多糖-II组分,将其透析,浓缩,冻干,得纯品软枣猕猴桃多糖。

2.3 软枣猕猴桃多糖抗氧化活性测定结果

2.3.1 软枣猕猴桃多糖清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力

邻苯三酚在碱性条件下自氧化生成带色的中间产物 $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ 能促进邻苯三酚自氧化,因此通过测定某物质对邻苯三酚自氧化抑制作用,即可表征其对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用^[19]。软枣猕猴桃多糖及VC清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力如图3所示。

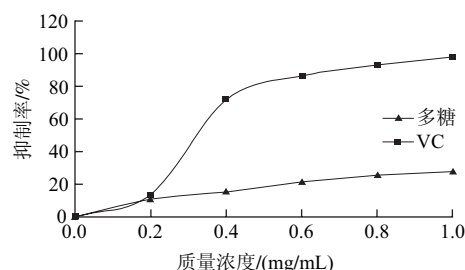


图3 软枣猕猴桃多糖及VC清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力

Fig.3 Scavenging effects of fraction II and vitamin C against superoxide anion radical

由图3可知,在所选质量浓度范围内,软枣猕猴桃多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力随多糖质量浓度的增加有所上升,但清除率低于50%,而VC的清除率在其质量浓度为0.4mg/mL时即超过50%。由此可见,软枣猕猴桃多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力较VC有较大差距。

2.3.2 软枣猕猴桃多糖清除DPPH自由基能力

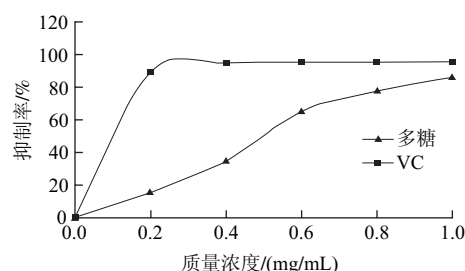


图4 软枣猕猴桃多糖及VC清除DPPH自由基能力

Fig.4 Scavenging effects of fraction II and vitamin C against DPPH radical

由图4可知,在所选质量浓度范围内,VC对DPPH自由基有较强的清除能力,当其质量浓度达到0.2mg/mL时对DPPH自由基的清除率就接近90%,而后仍有所升高。随软枣猕猴桃多糖质量浓度的升高,其对DPPH自由基的清除率有所增加,且逐渐接近VC的清除率。当软枣猕猴桃多糖质量浓度达到1mg/mL时,其对DPPH自由基的清除率达到86.4%。回归分析分别计算出VC及软枣猕猴桃多糖的 IC_{50} 值分别为0.068、0.497mg/mL。由 IC_{50} 值可以看出,VC对DPPH自由基的清除能力高于软枣猕猴桃多糖。由此可见,当软枣猕猴桃多糖达到一定质量浓度时对DPPH自由基有较强的清除能力。

2.3.3 软枣猕猴桃多糖清除 $\cdot OH$ 能力

由图5可知,在所选质量浓度范围内,VC对 $\cdot OH$ 的清除率随着其质量浓度的增加而增大,当VC质量浓度达到1mg/mL时,其对 $\cdot OH$ 的清除率达到99.4%,基本能完全清除体系中的 $\cdot OH$ 。随着软枣猕猴桃多糖质量浓度的增加,其对 $\cdot OH$ 的清除能力有所提高,其清除率最大达到65.7%,但明显低于VC的清除率。回归分析分别计算出VC及软枣猕猴桃多糖的 IC_{50} 值分别为0.314、0.668mg/mL。由此可

见,软枣猕猴桃多糖对 $\cdot\text{OH}$ 有一定的清除作用,但其清除能力较VC有一定差距。

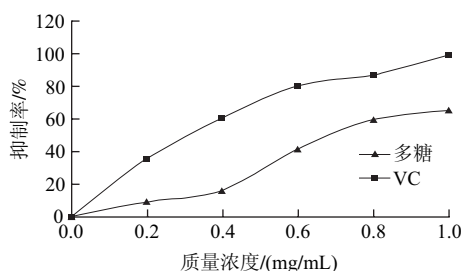


图5 软枣猕猴桃多糖及VC清除 $\cdot\text{OH}$ 能力

Fig.5 Scavenging effects of fraction II and vitamin C against hydroxyl radical

2.3.4 软枣猕猴桃多糖清除 $\cdot\text{R}$ 能力

通过测定物质对烷基自由基引发亚油酸体系的抑制作用,从而能判定物质清除 $\cdot\text{R}$ 的能力^[20]。软枣猕猴桃多糖及VC清除 $\cdot\text{R}$ 能力如图6所示。

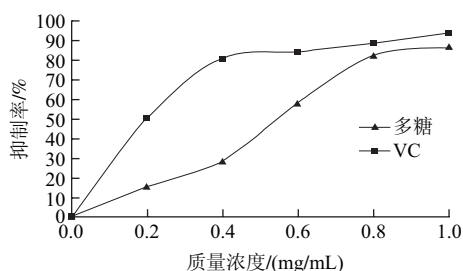


图6 软枣猕猴桃多糖及VC清除 $\cdot\text{R}$ 能力

Fig.6 Scavenging effects of fraction II and vitamin C against alkyl radical

由图6可知,在所选质量浓度范围内,随VC质量浓度的增加,其对 $\cdot\text{R}$ 的清除率随之增加,最终基本能清除反应体系中的所有烷基自由基。软枣猕猴桃多糖对 $\cdot\text{R}$ 的清除能力也随其自身质量浓度的增加而提高,当其质量浓度达到0.8mg/mL时,其对烷基自由基的清除率与VC接近,之后其清除率仍有所增加。回归分析分别计算出VC及软枣猕猴桃多糖的 IC_{50} 值分别为0.197、0.547mg/mL。由此可知,软枣猕猴桃多糖对 $\cdot\text{R}$ 的清除能力较VC对其的清除能力有一定差距。当软枣猕猴桃多糖达到一定质量浓度时具有较强的清除 $\cdot\text{R}$ 的能力。

3 结论

软枣猕猴桃多糖经水提醇沉法提取,脱脂,脱蛋白,粗多糖的提取率为1.41%。软枣猕猴桃粗多糖经DEAE-52纤维素离子交换层析初步分离,得到4种软枣猕猴桃多糖组分。经Sephadex G-200凝胶柱层析进一步分离,得到软枣猕猴桃多糖纯品。通过对软枣猕猴桃多糖清除自由基能力的研究,以此评价软枣猕猴桃多糖的抗氧化

化活性。软枣猕猴桃多糖对有机自由基DPPH自由基及 $\cdot\text{R}$ 有较强的清除能力, IC_{50} 值分别为0.497、0.547mg/mL。在受试范围内,随软枣猕猴桃多糖质量浓度的增加,清除能力增强,最终其对DPPH自由基及 $\cdot\text{R}$ 的清除率与VC相近。在受试范围内,软枣猕猴桃多糖对 $\cdot\text{OH}$ 有一定的清除能力, IC_{50} 值为0.668mg/mL。其清除能力随多糖质量浓度的增加而有所增加,但其对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率较VC有一定的差距。软枣猕猴桃多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率较低,清除能力较弱。由此可见,软枣猕猴桃多糖具有较强的抗氧化活性。对软枣猕猴桃多糖抗氧化活性的研究有较高的研究开发价值及实际应用价值。

参考文献:

- [1] 王菲,许金光,刘长江.软枣猕猴桃中的功能保健成分及其在食品加工中的应用[J].食品工业科技,2010,31(8):421-423.
- [2] 马月申,袁福贵,赵淑兰.软枣猕猴桃果实营养成分的测定[J].特产研究,1999(1):44-45.
- [3] 邵信儒,孙海涛,姜瑞平,等.长白山野生软枣猕猴桃果肉果冻的研制[J].食品研究与开发,2010,31(5):115-118.
- [4] 辛广,张博,冯帆,等.软枣猕猴桃果实香气成分分析[J].食品科学,2009,30(4):230-232.
- [5] 王涛,赵谋.多糖的研究进展[J].现代食品科技,2005,23(1):103-106.
- [6] PAULINE M R, TIME E, PETER C, et al. Glycosylation and immune system[J]. Science, 2001, 291: 2370-2375.
- [7] 朱晓霞,罗学刚.多糖提取与纯化技术应用进展[J].食品研究与开发,2007,28(3):186-188.
- [8] KIHOTO T, MORIMOTO H, KOBAYASHI T, et al. Effect of a polysaccharide (TAP) from the fruiting bodies of *Tremella aurantia* on glucose metabolism in mouse liver[J]. Biotechnol Biochem, 2000, 64(2): 417-419.
- [9] 龚涛,王晓辉,赵靓,等.枸杞多糖抗氧化作用的研究[J].生物技术,2010,20(1):84-86.
- [10] 翠娥,蒋立科,李苗苗.大豆多糖提取分离工艺的优化研究[J].安徽农学通报,2009,15(3):148-150.
- [11] 刘国凌,宁正祥,郭红辉,等.苦瓜果实中多糖的分离纯化及性质分析[J].食品科学,2010,31(3):30-34.
- [12] 高莉,王强,帕提古力·玛合木提.核桃隔膜多糖的分离纯化及单糖组成分析[J].食品科学,2010,31(21):182-185.
- [13] 谢丽源,张勇,郭勇,等.桑黄菌丝体多糖的分离纯化及理化性质分析[J].食品科学,2011,32(5):143-147.
- [14] 刘桂萍.冬虫夏草多糖测定方法的研究进展[J].药学实践杂志,2008,26(1):53-54.
- [15] WU Yalin, PAN Yuanjuan, SUN Cuirong. Isolation, purification and structural investigation of a water-soluble polysaccharide from *Solanum lyratum* Thunb[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 36(4): 241-245.
- [16] YANG Yan, LIU Wanshun, Han Baoqin, et al. Antioxidative properties of a newly synthesized 2-glucosamine-thiazolidine-4(R)-carboxylic acid (GlcNH₂Cys) in mice[J]. Nutrition Research, 2006, 26: 369-377.
- [17] SANCHEZ-MORENO C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems[J]. Food Science and Technology International, 2002, 8(3): 121-137.
- [18] 查学强,王军辉,潘利华.石斛多糖体外抗氧化活性的研究[J].食品科学,2007,28(10):90-93.
- [19] 高春燕,田呈瑞.枸杞多糖体外抗氧化特性研究[J].粮食与油脂,2005(7):28-29.
- [20] 李顺峰,张丽华,付娟妮,等.真姬菇子实体多糖体外抗氧化特性研究[J].西北农业学报,2008,17(4):302-305.