

干燥方法对瘤背石磺多糖抗氧化性和还原力的影响

Effects of drying methods on antioxidant activities and reducing capacity of polysaccharides extracted from *Onchidium struma*

程知庆 沈和定 姚理想 刁亚

CHENG Zhi-qing SHEN He-ding YAO Li-xiang DIAO Ya

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,
Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

摘要:以瘤背石磺为原料,采用传统的水提醇沉法提取瘤背石磺多糖,研究真空冷冻干燥和烘箱干燥两种方式对多糖抗氧化活性的影响。以 Vc 作为阳性对照,通过清除 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和亚硝酸盐来检测多糖的抗氧化活性,用分光光度法检测其总还原力。结果表明,瘤背石磺的冻干多糖比烘干多糖具有更高的抗氧化活性,冻干多糖对 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$ 和亚硝酸盐的 IC_{50} 分别为 4.14, 2.96, 2.05 mg/mL,清除率与多糖浓度呈明显的量效关系;但是两种多糖的总还原力不强,对 O_2^- 基本没有清除能力;在同等浓度下,多糖的抗氧化活性均弱于 Vc。

关键字:瘤背石磺;多糖;抗氧化;还原力;干燥方法

Abstract: The polysaccharide of *Onchidium struma* was extracted by using traditional hot water extraction and alcohol precipitation method, the influence of vacuum freeze drying and oven drying on the antioxidant activity of polysaccharides was investigated. The antioxidant activities of the polysaccharide was evaluated by scavenging DPPH free radical, hydroxyl free radical, superoxide anion radical and sodium nitrite, and the total reducing capacity of polysaccharide was studied by spectrophotometric method. The results showed that the scavenging effect of freeze dried polysaccharide was stronger than the oven dried polysaccharide, the IC_{50} for scavenging activities against DPPH free radical, hydroxyl and sodium nitrite were 4.14, 2.96 and 2.05 mg/mL, which showed the relationship to close-dependence, but the polysaccharide had little scavenging effect on superoxide anion radical, and the reducing capacity was weak. The antioxidant activities of two polysaccharides were weaker than Vc under the same concentration.

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:41276157);上海高校水产一流学科建设项目资助

作者简介:程知庆(1992—),女,上海海洋大学在读硕士研究生。

E-mail:986256709@qq.com

通讯作者:沈和定

收稿日期:2015-08-09

Keywords: *Onchidium struma*; polysaccharide; antioxidation resistance; reducing power; drying method

瘤背石磺(*Onchidium struma*)俗称土海参、海癞子、土鸡、乌纱鳖等,为软体动物门、腹足纲、肺螺亚纲、柄眼目、石磺科的一种全身裸露无壳贝类,广泛分布于江苏、上海、浙江、福建等地的滩涂潮间带高潮线附近;沿海地区流传其具有治哮喘、治风湿病、滋补、助消化、消除疲劳、明目等功效,是一种特色的海洋中药^[1-2]。黄金田等^[3]详细分析了瘤背石磺的营养成分,结果表明瘤背石磺具有较高的食用价值和保健作用。管菊等^[4]研究发现瘤背石磺中总糖的含量高达 26.06%,为瘤背石磺多糖的研发提供了基础资料。

人体内产生的自由基主要有超氧阴离子自由基(O_2^- ·)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot\text{OH}$),均具有强氧化性可导致脂质过氧化,损害膜蛋白,降低细胞膜的渗透性,进而引起慢性疾病及衰老效应^[5-7],从动植物体内提取的天然抗氧化剂具有安全、无毒的优点^[8],研究^[9-10]发现贝类多糖具有良好的抗氧化活性,但关于瘤背石磺多糖抗氧化活性的研究未见相关报道。

多糖的抗氧化活性受多种因素的影响,不同的干燥方法因传热方式、受热条件、失水速度等因素的不同,可能使多糖的化学结构发生改变进而影响其生理活性^[11-12]。传统工艺中多糖的干燥多以烘干为主,该法较为经济,易操作,但样品活性损失较大。本试验旨在研究瘤背石磺多糖的抗氧化活性,探讨提取工艺中常用的两种干燥方法(真空冷冻干燥和烘箱干燥)对多糖抗氧化活性的影响,以期对瘤背石磺多糖作为天然抗氧化剂用于医药、保健品行业提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

瘤背石磺:采自上海崇明岛,去其内脏洗净后放入-80℃冷冻保存,备用;

无水乙醇、DPPH(苯代苦肼自由基)、水杨酸、硫酸亚铁、30%过氧化氢、邻苯三酚(焦性没食子酸)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸萘乙二胺、NaNO₂、对氨基苯磺酸、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

多功能粉碎机:XL-130B 型,永康市小宝电器有限公司;
电子分析天平:AL104 型,梅特勒—托利多(上海)有限公司;

紫外分光光度计:UV-6100 型,上海美谱达仪器有限公司;

电热恒温干燥箱:DHG-9077A 型,上海精密实验设备有限公司;

双列六孔恒温水浴锅:HWS-26 型,上海慧泰仪器制造有限公司;

低速台式大容量离心机:TDL-40B 型,上海圣科仪器设备有限公司;

超纯水仪:MLLI-Q 型,美国 Millipore 公司;
真空冷冻干燥机:GAMMA1-16LSC 型,德国 Christ 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 提取工艺流程

瘤背石磺→预处理→热水浸提→过滤→离心→减压浓缩→脱蛋白→透析→醇沉→干燥→瘤背石磺粗多糖

1.2.2 操作要点

(1) 瘤背石磺的预处理:用组织搅碎机将石磺绞碎,室温下用 3 倍体积石油醚浸泡 12 h 脱脂,纱布过滤后取滤渣,再用 3 倍体积无水乙醇浸泡 4 h 以脱色及除去单糖和低聚糖,经纱布过滤后取滤渣,置于 50 ℃烘箱中烘干。

(2) 热水浸提:称取 60 g 的瘤背石磺,按料液比 1:30 (*m*:*V*)、浸提温度 90 ℃、提取时间 15 h 提取 2 次。

(3) 脱蛋白:采用 sewage 法脱蛋白(*V*_{多糖溶液}:*V*_{氯仿}:*V*_{正丁醇}=20:4:1),多次脱蛋白至少较少或无白色沉淀为止。

(4) 乙醇沉淀:加入多糖溶液 4 倍体积的 95%乙醇,放入 4 ℃的冰箱静置过夜,离心收集沉淀,再用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤数次。

(5) 瘤背石磺多糖的干燥:① 烘箱干燥:将多糖置于电热恒温干燥箱,于温度 50 ℃,恒温干燥(约 12 h)至恒重得到烘干多糖;② 真空冷冻干燥:经过-80 ℃冰箱预冻处理后,将多糖放入真空冷冻干燥机中干燥,温度设置为-55 ℃,真空度为 13 Pa,干燥 24 h 后得到冻干多糖。

1.2.3 抗氧化活性研究

(1) DPPH 自由基清除能力:准确称取 1 g 瘤背石磺粗多糖,配制 10 mg/mL 的多糖溶液,用蒸馏水分别稀释至质量浓度为 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mg/mL,各取 2 mL 置于 25 mL 锥形瓶中,加入 0.05 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液(50%乙醇溶液配制)2 mL,摇匀后室温下避光反应 30 min,以 50%乙醇校零,测定在 517 nm 处溶液的吸光值 *A_i*。以 *V_c*作为阳性对照,每个浓度组平行试验 3 次,求取平均值,按式(1)计算多糖对 DPPH 自由基的清除率^[13]。

$$P=\frac{A_o-(A_i-A_{io})}{A_o}\times 100\%$$
 (1)

式中:

P——清除率,%;

A_i——加入 DPPH 后多糖溶液的吸光度;

A_{io}——未加 DPPH 的多糖溶液的吸光度;

A_o——未加多糖溶液的 DPPH 吸光度。

(2) •OH 清除能力:配制 10 mg/mL 的瘤背石磺多糖溶液,用蒸馏水稀释至质量浓度为 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mg/mL。取 0.9 mmol/L 水杨酸—乙醇和 0.9 mmol/L FeSO₄ 溶液各 1 mL 于 25 mL 锥形瓶中,然后加入 0.88 mmol/L 过氧化氢溶液 1 mL 启动反应,在 37 ℃的水浴锅中加热 30 min,于 510 nm 处测得吸光度 *A₀*;将各浓度梯度多糖溶液各取 1 mL 分别加入锥形瓶中,37 ℃水浴 30 min,测得吸光度 *A_x*;考虑到色素本身的吸光度,做样品对照试验:将 H₂O₂ 溶液换成蒸馏水,重复上述步骤测得吸光度 *A_{xo}*。以 *V_c*作为阳性对照,每个浓度组平行试验 3 次,求取平均值,按式(2)计算多糖对 •OH 的清除率^[14]。

$$P=\frac{A_o-(A_x-A_{xo})}{A_o}\times 100\%$$
 (2)

式中:

P——清除率,%;

A_x——加入硫酸亚铁、水杨酸—乙醇、过氧化氢、多糖溶液的吸光度;

A_{xo}——加入硫酸亚铁、水杨酸—乙醇、多糖溶液,不加过氧化氢引发反应的溶液吸光度;

A_o——只加入硫酸亚铁、水杨酸—乙醇、过氧化氢,不加入多糖溶液的吸光度。

(3) O₂^{-•} 清除能力:吸取 25 ℃恒温水浴 15 min 后的 Tris—HCl(pH 8.2,0.05 mol/L)3 mL 和 5 mmol/L 邻苯三酚溶液(用 10 mol/L HCl 处理配制)0.2 mL。震荡摇匀,反应 3.5 min 后,加入 0.1 mL,8 mol/L 的 HCl 终止反应。在 325 nm 处测吸光度 *A₁*;再加入预热后不同浓度的多糖稀释液 1 mL,重复上述步骤,测 *A₂*。用 0.2 mL 的盐酸代替邻苯三酚溶液测得对照组的吸光值 *A₃*。以 *V_c*作为阳性对照,每个浓度组平行试验 3 次,求取平均值,按式(3)计算多糖对 O₂^{-•} 的清除率^[8]。

$$P=\frac{A_1-(A_2-A_3)}{A_1}\times 100\%$$
 (3)

式中:

P——清除率,%;

A₁——邻苯三酚自氧化的吸光度;

A₂——加入多糖溶液后邻苯三酚自氧化的吸光度;

A₃——未加邻苯三酚的多糖溶液的吸光度。

(4) 亚硝酸盐清除能力:根据文献[8],修改如下:取待测多糖溶液的浓度为 10 mg/mL,分别量取 1~6 mL 于 6 支 25 mL 比色管中,溶液反应后定容至 25 mL,在 540 nm 处测得吸光度 *A*。以 *V_c*作为阳性对照,每个浓度组平行试验 3 次,求取平均值,按式(4)计算多糖对亚硝酸钠的清除率。

$$P=\frac{A_o-(A_p-A_{pi})}{A_o}\times 100\%$$
 (4)

式中:

P——清除率,%;

A_p ——加入亚硝酸钠后多糖溶液的吸光值;
 A_{pi} ——多糖溶液(未加亚硝酸钠)的吸光值;
 A_o ——测定亚硝酸钠溶液(未加多糖溶液)的吸光值。

1.2.4 瘤背石磺多糖还原力的测定 根据文献[8],修改如下:缩短溶液的反应时间为 20 min,在 700 nm 处测得吸光值,每个浓度组平行试验 3 次,求取平均值。

2 结果与分析

2.1 对 DPPH 自由基的清除能力

由图 1 可知,在测定浓度范围内,多糖对 DPPH 自由基的清除能力随着质量浓度的增加而增加; V_c 的清除力比多糖强且维持在较高的水平。经计算,多糖对 DPPH 自由基的清除率为 50%(IC_{50})时对应的冻干多糖和烘干多糖的浓度分别为 4.14、5.44 mg/mL。这在一定程度上表明真空冷冻干燥对瘤背石磺多糖活性结构的破坏较小。

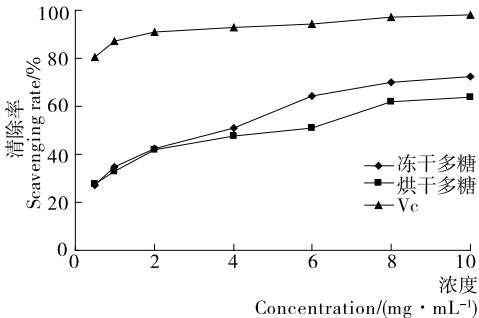


图 1 瘤背石磺多糖和 V_c 对 DPPH 自由基清除能力
Figure 1 DPPH radical scavenging capacity of *Onchidium struma* polysaccharides and V_c

2.2 对羟自由基的清除能力

由图 2 可知, V_c 和多糖对 $\cdot OH$ 均具有较强的清除力,相同浓度下不同干燥方法得到的多糖其活性都低于 V_c 阳性对照组。对 $\cdot OH$ 的清除率与多糖的浓度基本呈正相关关系。经计算,冻干多糖和烘干多糖对 $\cdot OH$ 的 IC_{50} 分别为 2.96、3.12 mg/mL。 $\cdot OH$ 是一种夺电子能力即氧化能力极强的活泼氧,清除结果表明瘤背石磺多糖具有较强的供氢或供电子的能力,而烘箱干燥时 50 $^{\circ}C$ 的持续高温可能在一定程度上减弱了多糖的供氢活性。所以经不同的干燥方法处理后,冻干多糖对 $\cdot OH$ 的清除率大于烘干多糖。

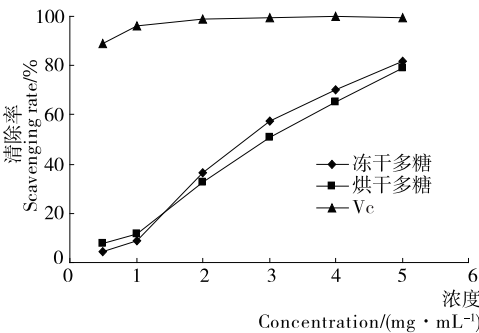


图 2 瘤背石磺多糖和 V_c 对羟自由基清除作用
Figure 2 Hydroxyl radical scavenging capacity of *Onchidium struma* polysaccharides and Vc

2.3 对超氧阴离子自由基的清除能力

由图 3 可知,在浓度范围内, V_c 对 $O_2^{\cdot -}$ 有较高的清除作用,而经不同干燥方法处理后的多糖对 $O_2^{\cdot -}$ 基本没有清除作用,随着多糖浓度的增加清除率基本维持在较低的水平,当多糖的质量浓度为 10 mg/mL 时,冻干多糖和烘干多糖清除率分别为 32.9%、30.7%。冻干多糖和烘干多糖对 $O_2^{\cdot -}$ 的 IC_{50} 分别为 37.70、34.28 mg/mL。经冻干和烘干的多糖对 $O_2^{\cdot -}$ 基本没有清除作用。

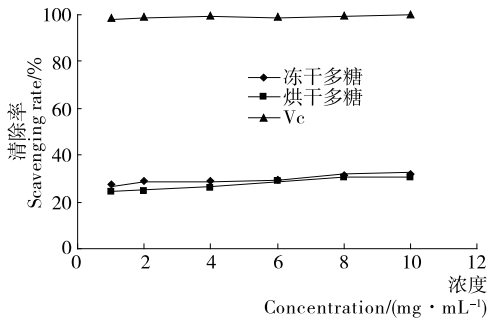


图 3 瘤背石磺多糖和 V_c 对超氧阴离子自由基清除能力
Figure 3 Superoxide anion radical scavenging capacity of *Onchidium struma* polysaccharides and Vc

2.4 对亚硝酸盐的清除能力

由图 4 可知,冻干多糖对亚硝酸钠具有一定的清除作用,但活性低于 V_c 阳性对照组。多糖浓度低于 1.2 mg/mL,两种多糖对亚硝酸钠的清除率较低且增加缓慢,当浓度达到 2.4 mg/mL 时,冻干多糖清除率最高可达到 56.13%,而烘干多糖在浓度范围内的清除率增加缓慢,清除效果不明显。经计算,对亚硝酸钠的清除率为 50%(IC_{50})时对应的冻干多糖和烘干多糖的浓度分别为 2.05、4.59 mg/mL,可能是因为多糖中具有清除亚硝酸钠功能的结构对温度较为敏感,过高的温度容易导致其原有的结构发生改变,从而使样品活性减弱。所以经不同的干燥方法处理后,冻干多糖对亚硝酸钠的清除能力大于烘干多糖。

2.5 还原力的测定

抗氧化剂具有还原力,通过自身氧化提供电子从而实现自由基的清除,多糖可提供电子将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,而 Fe^{2+} 在 700 nm 处有强吸收,吸光值越大则表明还原能力越强。

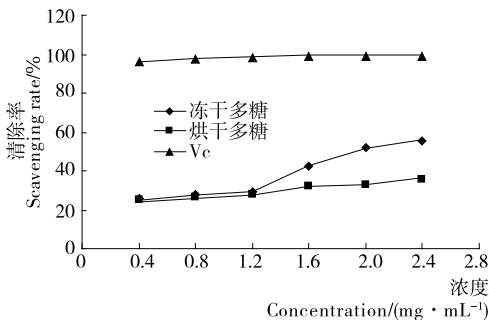


图 4 瘤背石磺多糖和 V_c 对亚硝酸钠清除能力
Figure 4 Sodium nitrite radical scavenging capacity of *Onchidium struma* polysaccharides and Vc

由图 5 可知,在测定的浓度范围内,混合液反应后出现吸光值且吸光值不断增加,说明多糖的还原力随着浓度的增加而增强。冻干多糖的还原力增加幅度较大,说明真空冷冻干燥对多糖的结构和还原能力破坏相对较小。所以经不同的干燥方法处理后,冻干多糖的还原能力强于烘干多糖。

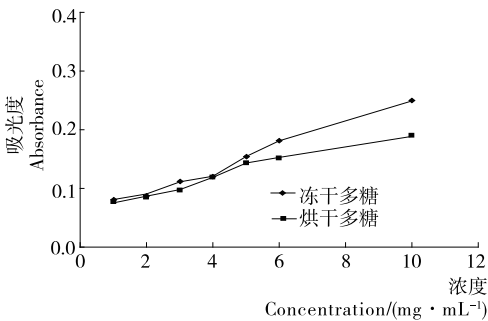


图 5 瘤背石磺多糖的还原力

Figure 5 Reducing capacity of *Onchidium struma* polysaccharide

3 结论

本试验研究了瘤背石磺粗多糖的抗氧化活性及其总还原力,并比较两种干燥方法对多糖体外抗氧化活性的影响。结果表明,瘤背石磺多糖在测定浓度范围内的清除率与其质量浓度呈正相关关系,但抗氧化活性均低于 V_C 阳性对照。对 DPPH 自由基和 ·OH 均具有较好的清除效果,对亚硝酸盐也有一定的清除作用,但总还原力不强,对 O₂⁻ · 基本没有清除能力。真空冷冻干燥相较于烘箱干燥能在一定程度上保持多糖的抗氧化活性。在研发瘤背石磺多糖的药用及保健功效时,要根据多糖抗氧化活性的特点,对原料采取不同的干燥方式;两种干燥方法得到的瘤背石磺多糖的结构差异

及其对抗氧化活性影响机理仍需进一步研究。

参考文献

- 1 邱立言. 苏沪沿海瘤背石磺的形态和习性[J]. 动物学杂志,1991, 26(3):33~36.
- 2 孙雯娜,沈和定. 特色海洋中药—石磺[J]. 现代养生,2013 (22):8.
- 3 黄金田,王爱民. 瘤背石磺营养成分分析及品质评价[J]. 海洋科学,2008,32(11):29~35.
- 4 管菊,沈和定,钱静,等. 四种石磺营养成分分析及价值评价[J]. 食品工业科技,2013,34(17):349~353.
- 5 邓育红. 自由基与人体健康[J]. 化学教育,2003,24(6):26~27.
- 6 王春霖,郭芳,王永利. 自由基与衰老[J]. 河北医科大学学报, 2005,26(4):308~309.
- 7 李素云,王立芹,郑稼琳,等. 自由基与衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2007(20):2 046~2 048.
- 8 李粉玲,蔡汉权,林泽平. 红豆多糖抗氧化性及还原能力的研究 [J]. 食品工业,2014,35(2):190~194.
- 9 朱涛,李朝品. 贝类多糖抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国医疗前沿,2009(5):24~26.
- 10 程知庆,沈和定,姚理想,等. 贝类多糖的生物活性研究现状及其药用价值[J]. 安徽农业科学,2015(24):17~19.
- 11 黄寿恩,李忠海,何新益. 干燥方式对柑橘皮中主要抗氧化成分及其活性的影响[J]. 食品与机械,2014,30(5):190~195.
- 12 Fan Liu-ping, Li Jin-wei, Deng Ke-quan, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 87(2): 1 849~1 854.
- 13 叶文姣,冯武,黄文,等. 蛹虫草胞外多糖的体外抗氧化活性分析 [J]. 华中农业大学学报,2014,33(5):105~110.
- 14 王超,甄润英,海芦笋多糖超声波辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2012,28(6):138~141.

(上接第 131 页)

4 试验部分

依据剥衣效率约 300 个/h,剥衣时间约 12 s/个的椰子剥衣机,对输送机构的输送参数进行安排。

在搅料机构的作用下料斗中的椰子落入挡料连杆机构,通过挡料连杆机构使椰子每隔 12 s 下落一个至两异向水平旋转滚筒上,并在滚筒上运动 6 s,在机械手作用下,椰子沿两异向倾斜旋转滚筒滑至椰子托盘,实现摆正,共用时 4 s,其中机械手伸缩用时 2 s;然后机械手将椰子送至椰子剥衣机,用时 2 s,如此 1 个循环共用时 12 s。试验发现,如果剥衣时间变化,则需要调整料斗中椰子下落的时间和在两异向水平旋转滚筒上运动的时间。

5 结论

本设计现阶段处于试验完善阶段,该椰子自动上下料装置设计独特,结构简单,制造成本低廉,大大有利于推广试用,处理能力可达到 300 个/h 以上,解决了某种椰子剥衣机

的椰子上料环节因人工送料而带来的效率不高,自动程度低等问题。减少了工作流程,降低工人劳动强度,减轻工厂负担,提高了椰子加工过程的效率,增加了经济效益。

参考文献

- 1 林勇,张燕. 椰子自动剥衣机的研究[J]. 食品与机械,2013,29 (4):122~124.
- 2 伍湘君,樊军庆,毛舟,等. 椰子剥衣机研究现状与发展趋势[J]. 食品与机械,2014,30(2):262~265.
- 3 曾宪君. BYY 型液压式椰子剥衣机[J]. 油脂科技,1984(SD):102.
- 4 黄艳. 泰国发明一种剥椰衣机器[J]. 世界热带农业信息,2007 (12):27~27.
- 5 王旺平,李诗龙,刘晓艳,等. 椰子剥壳机的研制[J]. 农业机械, 2011(20):179 ~181.
- 6 王锐,樊军庆. 椰子剥衣机自动上料机构的设计[J]. 食品与机械, 2012,28(5):144~146.
- 7 肖仁鹏,马鑫,刘四新,等. 椰子自动剥衣机的设计[J]. 食品与机械,2012,28(1):142~143.