

杜香多糖的抗氧化活性及物理性质研究

Antioxidative activity and physical property of polysaccharide from *Ledum palustre* L.

张乔会^{1,2,3}

王建中^{2,3}

逢锦慧^{2,3}

ZHANG Qiao-hui^{1,2,3} WANG Jian-zhong^{2,3} PANG Jin-hui^{2,3}

崔洁^{2,3} 杨喆^{2,3} 罗兴武¹

CUI Jie^{2,3} YANG Zhe^{2,3} LUO Xing-wu¹

(1. 湖北民族学院科技学院, 湖北恩施 445000; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 3. 林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083)

(1. Science and Technology College of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China;

2. Beijing Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety, Beijing 100083, China;

3. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

摘要:以杜香为原料,采取水提醇沉法提取杜香多糖,利用红外和紫外分析,发现提取物含多糖典型基团,粗提物中多糖含量为69.95%。通过测定多糖对DPPH自由基(DPPH·)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力、总还原能力,得到杜香多糖清除DPPH·、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 的 EC_{50} 值分别为0.52, 1.41, 1.71 mg/mL,还原力接近BHT且与浓度呈正相关,杜香多糖具有较强的抗氧化活性。杜香多糖在190℃以内稳定,在190~550℃范围内发生热解,其结晶度为3.6%,结晶度低,分子刚性差。

关键词:杜香;多糖;抗氧化;物理性质;X射线衍射;热重分析

Abstract: The polysaccharide was extracted from *Ledum*, and the content and characteristics of polysaccharide from *Ledum* were investigated by IR, UV spectra, thermal analysis (TG) and X-ray diffraction (XRD). The results from IR and UV spectra showed that the extracts containing the typical group of polysaccharide. It was noted that the content of *Ledum* polysaccharide was 69.95%. In addition, the antioxidant activity containing total reductive ability, scavenging ability for DPPH radical (DPPH·), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$) were investigated. The results showed that the EC_{50} for scavenging DPPH·, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ were 0.52, 1.41, 1.71 mg/mL, which means that the polysaccharide

from *Ledum* possessed a notable antioxidant activity. Moreover, the antioxidant ability was close to BHT and increased with the growth of the content of polysaccharide. The results of thermal stability from thermal analysis (TG) showed that the chemical decomposition of polysaccharide from *Ledum* was occurred at 190℃. The crystallinity of polysaccharide from *Ledum* was 3.6%, the low degree of crystallinity resulted in a poor molecular rigidity.

Keywords: *Ledum palustre* L.; polysaccharide; antioxidant activity; physical property; XRD; TG

杜香(*Ledum palustre* L.)为杜鹃花科杜香属的常绿灌木^[1],是中国东北、内蒙古大兴安岭林区的主要组成树种,其分布面积约占大兴安岭林地面积的70%^[2]。据统计^[3],大兴安岭杜香干叶年产量达53.6万t。杜香枝叶成分丰富,含有多种挥发性精油、熊果酸、多糖等^[4,5]。

杜香资源丰富,目前主要研究其精油^[6]、熊果酸^[7]等,而对杜香多糖的理化性质研究未见报道。随着保健品市场的活跃,杜香资源开发潜力巨大,研究杜香多糖的抗氧化性、稳定性、分子刚性等对于杜香的综合开发利用具有重要意义。本研究拟通过水提醇沉法提取杜香多糖^[8],利用红外分析鉴定多糖基团,利用蒽酮硫酸法^[9]测定杜香多糖粗物中多糖的含量,通过总还原力测定^[10-12]和分别清除羟基自由基^[13-16]、DPPH自由基^[17-19]、超氧阴离子^[20-22]能力4种评价方法,分析杜香多糖的抗氧化活性。并采用一般材料分析方法分析杜香多糖的物理性质,为其开发利用提供理论依据。

基金项目:林业公益性行业科研专项(编号:201004081)

作者简介:张乔会(1986—),男,湖北民族学院科技学院助教。

E-mail: qiaohui.86@163.com

通讯作者:王建中

收稿日期:2015-07-01

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杜香:由内蒙古金河林业局提供,经北京林业大学植物专家鉴定,自然风干后磨粉并过40目筛,放干燥器中备用;

1,1-二苯基-2-苦肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、邻苯三酚、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、V_C、铁氰化钾、三氯乙酸、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、三氯化铁、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氢氧化钠、邻菲罗啉:分析纯,北京化工厂。

1.2 试验仪器

FT-IR 红外光谱仪:Tensor27 型,德国 Bruker 公司;

热重分析仪:TGA60 型,日本 Shimadzu 公司;

旋转蒸发仪:RE-5203 型,上海亚荣生化仪器厂;

电子天平:METTLER TOLEDO 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

X 射线衍射仪:XRD-6000 型,日本 Shimadzu 公司;

冻干机:LL1500 型,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

分光光度计:普析 T6 型,北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 试验方法

1.3.1 杜香多糖的提取 采用水提醇沉法:准确称取一定量的杜香枝叶粉,按 1:35 ($m:V$)加入去离子水,然后放入恒温水浴震荡箱中 80℃震荡 6 h,离心分离液体和固体粉末,向上清液中加入酒精至浓度为 85%,置于 4℃冰箱中静置 1 h,然后分离固液两相,固体为粗多糖。

1.3.2 杜香多糖纯化 将 1.3.1 得到的样品按 1:10 ($m:V$)加入石油醚处理 5 h 进行脱脂,接着将脱脂样品按 1:2 ($m:V$)溶解于去离子水中,加入酒精至浓度为 85%,置于 4℃冰箱中静置 1 h,分离固液两相,重复上述操作 4 次,然后采用 Sevag 法^[23]脱蛋白,所得样品在-110℃下冷冻干燥,便可得到杜香多糖成品。将脱脂脱蛋白和脱脂未脱蛋白的多糖样品配成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,利用紫外光谱分析脱脂、脱蛋白前后杜香多糖的变化。

1.3.3 杜香多糖的红外分析 取少量样品置于红外光谱仪中进行测定,扫描分辨率 2 cm^{-1} ,扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} ,扫描次数 32 次^[24]。

1.3.4 杜香多糖含量测定 采用蒽酮硫酸法^[23],并以葡萄糖为参照制作标准曲线。

1.3.5 杜香多糖清除 DPPH·、·OH、·O₂⁻ 及总还原力的测定 参照文献^[25]。

1.3.6 杜香多糖的 TG 分析 准确称取 3~8 mg 的杜香多糖,放入综合热重分析仪内进行热综合(TG)分析测定,以考察杜香多糖的热稳定性。分析条件:扫描温度 20~600℃,升温速度 10℃/min, N₂ 流速 40 mL/min^[24]。

1.3.7 杜香多糖的 X-RD 分析 取一定量的杜香多糖于 X 射线衍射仪的样品室内进行扫描,扫描范围为 5°~60°,在扫描范围内以 5°/min 的变化速率进行 X 射线照射,利用得到的数据绘制 XRD 衍射强度曲线图,并计算出样品的结晶度。

根据衍射角与衍射强度的关系绘制 XRD 曲线。

1.4 数据分析

采用 Microsoft Excel(Office 2007)软件整理数据,Origin 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 杜香多糖纯化结果分析

由图 1 可知:未脱蛋白前,杜香多糖溶液在 280 nm 处有明显的吸收峰,说明其含有蛋白成分。脱蛋白后的样品在 280 nm 处没有明显的吸收峰,说明其不含蛋白。与未脱蛋白的样品进行比较,同一波长下,脱蛋白样品的吸收值偏低,这可能是因为未脱蛋白的多糖样品中含有一定的核酸及蛋白,这两种物质含有一定数量的碱基和疏水基团,从而使样品的紫外吸收产生增色效应。脱蛋白后,蛋白、核酸被除去,产生增色效应的基团也被除去,样品紫外吸收恢复正常,因而在同一波长下,脱蛋白的多糖样品比未脱蛋白的多糖样品紫外吸收值要略低。

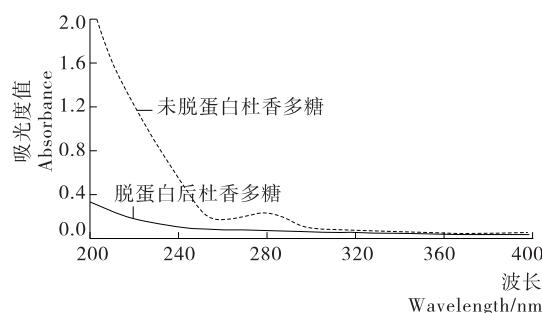


图 1 杜香多糖样品紫外扫描光谱

Figure 1 UV scanning spectrum of polysaccharide from *Ledum palustre* L.

2.2 杜香多糖红外分析

由图 2 可知,谱图在 3 389 cm^{-1} 和 1 156~1 024 cm^{-1} 的峰分别为 O—H 和 C—O 的伸缩振动,1 024 cm^{-1} 的较强吸收也说明了杜香多糖中可能有葡萄糖结构,2 889 cm^{-1} 的尖峰以及 1 567~1 370 cm^{-1} 的峰分别为 C—H 的伸缩振动和变角振动,1 648 cm^{-1} 处出现吸收峰,推测该峰为醛基中 C=O 的伸缩振动引起的,谱图在 1 648 cm^{-1} 波数处还出现一较强的吸收峰,说明杜香多糖中可能有酰氨取代基,谱图在 903 cm^{-1}

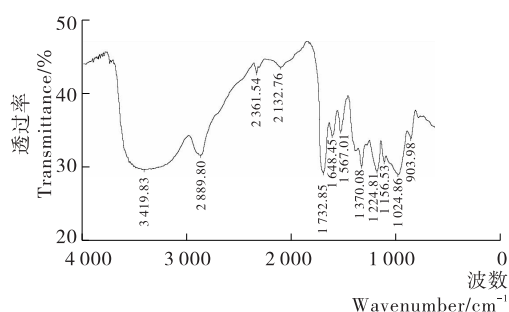


图 2 杜香多糖的红外光谱图

Figure 2 IR spectrum of polysaccharide from *Ledum palustre* L.

波数处还出现吸收峰,说明杜香多糖可能含有 β -型糖苷键。总之,杜香水提醇沉物具有多糖的一般吸收峰,证明杜香水提醇沉物为杜香多糖。

2.3 杜香多糖含量的测定结果

由图 3 可知:在含量为 0.00~0.05 mg/mL 的范围内,葡萄糖含量与吸光度线性关系良好。标准曲线方程为 $y=9.79x-0.002$,回归系数 $R^2=0.995$ 。测得杜香粗提物的吸光值为 0.272,从而计算出杜香多糖粗提物中多糖的含量为 69.95%。

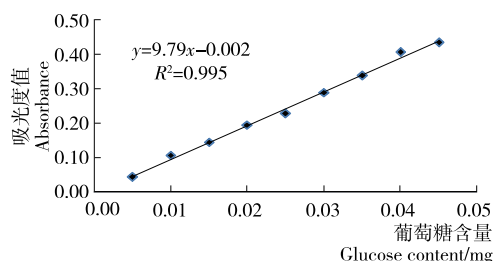


图 3 葡萄糖标准曲线

Figure 3 Standard curve of glucose

2.4 杜香多糖抗氧化结果分析

2.4.1 清除 DPPH $\cdot$ 的能力 由图 4 可知:抗氧化剂(Vc, BHT 等)明显比杜香多糖的清除能力强,这是因为抗氧化剂采用的是纯品,单位体积内浓度相对较高,而制备的杜香多糖粗提物纯度相对较低所致。随浓度升高,杜香多糖对 DPPH $\cdot$ 的清除率呈明显上升趋势,在 0.60 mg/mL 处,达到 54.70%。利用线性关系得出杜香多糖清除 DPPH $\cdot$ 的 EC_{50} 值为 0.52 mg/mL。

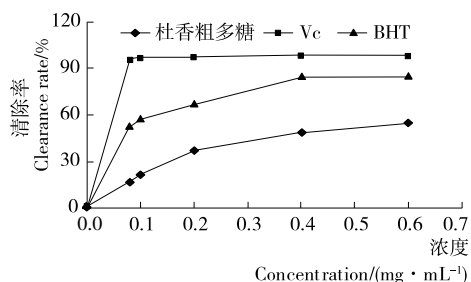


图 4 杜香多糖与 Vc、BHT 清除 DPPH $\cdot$ 能力的比较

Figure 4 The scavenging rate of DPPH radical on polysaccharide from *Ledum palustre* L. compared with Vc, BHT

2.4.2 清除 $\cdot$ OH 的能力 由图 5 可知:随浓度升高,杜香多糖和 Vc 对 $\cdot$ OH 的清除率呈递增趋势;Vc 对 $\cdot$ OH 的清除效果明显优于杜香多糖。当浓度为 1.00 mg/mL 时,杜香多糖的清除率为 40.97%。利用线性关系得出杜香多糖对 $\cdot$ OH 的 EC_{50} 值为 1.41 mg/mL。

2.4.3 清除 $\cdot$ O $_2^-$ 的能力 由图 6 可知:随着浓度的增加,杜香多糖和 BHT 对 $\cdot$ O $_2^-$ 的清除率逐渐增大,但不呈正相关;杜香多糖对 $\cdot$ O $_2^-$ 的清除能力明显比同等浓度的 BHT 低。杜香多糖对 $\cdot$ O $_2^-$ 清除的 EC_{50} 值为 1.71 mg/mL。

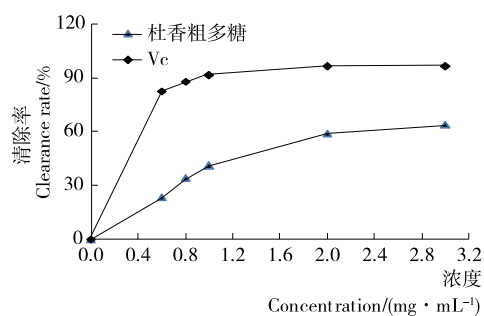


图 5 杜香多糖与 Vc 清除 $\cdot$ OH 能力的比较

Figure 5 The scavenging rate of hydroxyl radical on polysaccharide from *Ledum palustre* L. compared with Vc

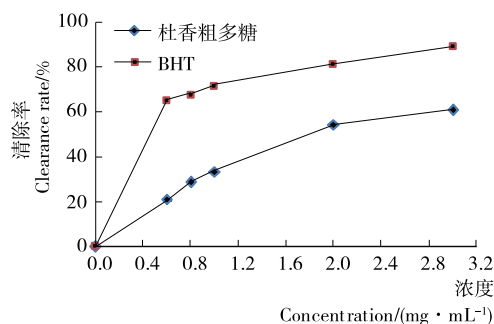


图 6 杜香多糖与 BHT 清除 $\cdot$ O $_2^-$ 能力的比较

Figure 6 The scavenging rate of superoxide anion radical on polysaccharide from *Ledum palustre* L. compared with BHT

2.4.4 总还原力 还原能力的测定是以样品是否为有效的电子供应者为评价指标的。若是有效的电子供应者,其供应的电子可将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,还可与自由基形成较惰性物质,从而中断自由基连锁反应。一般情况下,物质的吸光度越大,还原能力越强,其抗氧化能力也越高^[25]。由图 7 可知:随浓度增加,吸光度值增加趋势比较平缓,相同浓度时抗氧化剂 BHT 的总还原能力明显优于杜香多糖。杜香多糖的还原力随浓度的增加呈线性增加,杜香多糖的还原力在 0.95~1.00 mg/mL 范围内高于 0.095~0.100 mg/mL 的 BHT 的溶液,还原力较强。

2.5 杜香多糖物理性质分析结果

2.5.1 热重分析 由图 8 可知,杜香多糖具有 2 次明显的失重过程,这与多糖的含水量、组成和聚集态等有关。第 1 次

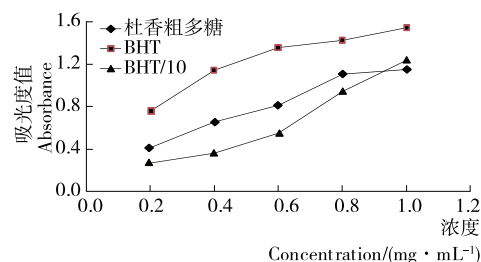


图 7 杜香多糖与 Vc、BHT 还原力的比较

Figure 7 The reducing power of polysaccharide from *Ledum palustre* L. compared with Vc, BHT

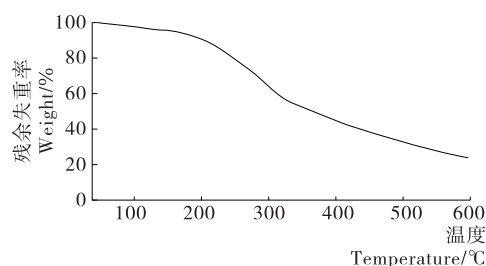


图8 杜香多糖失重图(氮气保护)

Figure 8 TGA analysis of polysaccharide from *Ledum palustre* L. under N_2 condition

失重出现在 78 °C 左右,失重率为 1.50%,可能是多糖受热失水形成的失重峰;第 2 次失重出现在 190~550 °C,失重率为 41.97%,此温度区间的失重快,说明杜香多糖在该温度范围内发生了剧烈的分解反应,也说明在 190 °C 以内时,杜香多糖是相对稳定地发生热裂解。550 °C 以后的温度范围,杜香多糖失重率为 13.80%,说明在这个范围内,杜香多糖进一步降解。

2.5.2 X 射线衍射分析 由图 9 可知,杜香多糖的 X 射线衍射强度曲线最高峰出现在 2θ 为 20°附近,且峰形圆顿,基本呈现典型馒头峰的特性,说明结晶度较低。 2θ 为 30°和 40°时,有 2 个圆顿的小肩峰,也说明了其结晶度低。这可能是因为杜香多糖是由几种多糖混合而成的一种混合性多糖,不同成分的衍射强度曲线的最高峰出现的 2θ 位置不同,从而产生了肩峰现象。总体来说,杜香多糖的结晶度低(3.6%),分子刚性较差。这也可以作为鉴定杜香多糖的一种方式。

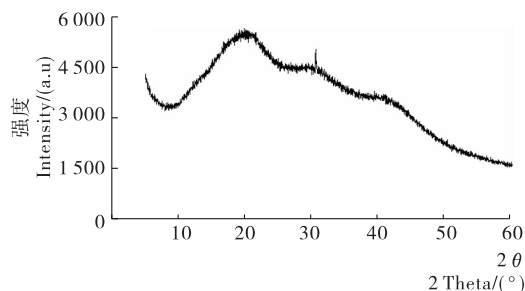


图9 杜香多糖的 X-衍射强度曲线图

Figure 9 XRD intensity curves of polysaccharide from *Ledum palustre* L.

3 结论

杜香多糖具有一定的抗氧化活性,并与浓度呈一定的函数关系,且在一定范围内随浓度增高,其活性逐渐增强。杜香多糖清除 DPPH·、 O_2^- 、·OH 的 EC_{50} 值分别为 0.52, 1.41, 1.71 mg/mL,还原力接近 BHT 并与浓度呈正相关。杜香多糖结晶度低,分子刚性差,其在 190 °C 温度范围内稳定,超过该温度,将发生剧烈的热分解使其失重。本试验研究了杜香多糖的理化性质,可为其开发利用提供一定的理论基础。但关于杜香多糖的纯化、单糖分析及结构鉴定仍需进一步的研究。

参考文献

1 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1999:4.

2 冯旭,周勇,郭立新. 黑龙江省野生香料植物资源及其利用[J]. 国土与自然资源研究,1995(2):68~72.

3 周以良. 中国大兴安岭植被[M]. 北京:科学出版社,1991:239~310.

4 赵岷,张敏,武文斌,等. 杜香黄酮提取纯化工艺及其抗炎作用研究[J]. 中成药,2012,34(8):1590~1594.

5 路博琼,罗书勤,张力平,等. 超临界 CO_2 萃取杜香挥发油工艺优化及成分分析[J]. 现代农业科技,2014(6):173~176.

6 姜玮,刘静波,卢静,等. 杜香挥发油研究概述[J]. 食品科学,2010,31(13):337~341.

7 张乔会,逢锦慧,王建中,等. 不同提取方法对杜香熊果酸提取率的影响[J]. 食品工业科技,2014,35(23):217~222.

8 岳春,李靖靖,方永远. 虫草多糖微波辅助提取工艺的优化[J]. 食品与机械,2014,30(1):192~195.

9 蔡芳,赵阳,白音夫,等. 蒽酮—硫酸法测定蒙药荨麻多糖的含量[J]. 中国民族医药杂志,2014(3):58~59.

10 刘光宪,冯健雄,王辉,等. 不同纯化方法对花生多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械,2014,30(1):189~191.

11 秦铁,侯小桢,章斌,等. 柠檬精油的化学成分分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2014,30(3):169~173.

12 阮长青,刘肇明. 黄豆酱中低聚肽的分离及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2014,30(3):151~153.

13 刘颖,梁盈,林亲录,等. 南瓜多糖的提取及其抗氧化活性研究进展[J]. 食品与机械,2014,30(3):239~243.

14 余凡,杨恒拓,田光辉,等. 紫薯色素的微波提取及其稳定性和抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技,2014,34(4):321~326.

15 刘萍,高云涛,张丽珠,等. 山奈酚清除 DPPH 自由基的新型微量光度滴定方法研究[J]. 食品工业科技,2014,35(5):53~57.

16 Hana Kim, Jeong Yong Moon, Hyeonji Kim, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2):429~436.

17 Ribe Iro S M R, Barbosa L C A, Queiroz J H, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties [J]. Food Chemistry, 2008, 110(3):620~626.

18 Hao Jing, David D Kitts. Antioxidant activity of Sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429(2):154~163.

19 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲— Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2 / Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553.

20 王飞,张洪,刘秀玲. 枳椇子各部位清除羟自由基作用的比较[J]. 华西药学杂志,2006,21(1):48.

21 魏银花,申迎宾,王立,等. 紫米多酚提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2013,29(3):111~115.

22 张京芳,王冬梅,周丽,等. 香椿叶提取物不同极性部位体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报,2007,7(5):12~16.

23 梁丽军,曾哲灵,熊涛,等. 蒽酮—硫酸法测定大蒜多糖含量[J]. 食品科学,2008,28(9):499~502.

24 Pang Jin-hui, Wu Miao, Zhang Qiao-hui, et al. Comparison of physical properties of regenerated cellulose films fabricated with different cellulose feedstocks in ionic liquid[J]. Carbohydrate Polymers, 2015(121):71~78.

25 崔洁,顾欣,王建中,等. 山杏果肉可溶性膳食纤维的抗氧化活性与红外光谱分析[J]. 食品与发酵工业,2012,38(1):123~127.