

文章编号: 1672 - 058X(2009)01 - 0054 - 03

黄瓜多糖抗氧化活性研究

许 平

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

摘 要:建立了热水提取、乙醇沉淀、Sevage法除蛋白、有机溶剂分离精制提取黄瓜多糖的方法,并用蒽酮-硫酸比色法测定其含量;采用超氧阴离子自由基、羟基自由基、二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)体系,对黄瓜多糖的抗氧化活性进行了研究,结果表明:黄瓜多糖对 DPPH·、·OH and O_2^- ·具有较强的清除能力,与其浓度呈线性关系。

关键词:黄瓜;多糖;自由基;清除;抗氧化性

中图分类号: Q 591. 1

文献标识码: A

多糖是生物体内普遍存在的一类生物大分子,具有许多重要的生物活性,如参与细胞骨架的构成,具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫、抗肿瘤、抗辐射、抗衰老、抗炎、降低血脂及改善动物生产性能等一系列作用。几乎所有的动物、植物和微生物体内都含有多糖^[1]。自由基是人体的代谢产物,可以造成生物膜系统损伤以及细胞内氧化磷酸化障碍,是人体疾病、衰老和死亡的直接参与者,对人体的健康和长寿危害非常大。研究自由基与许多病理现象的关系,寻找其清除剂已成为当今十分活跃的研究领域。黄瓜(Cucumis sativus L.)为葫芦科,黄瓜属。现代医学认为,黄瓜富含多种营养成分,是难得的排毒养颜食品,其种子有利尿作用^[2],瓜汁在几种化妆品配方中用作收敛剂。采用水浸提法从黄瓜果实中提取制备多糖,分别用超氧阴离子自由基体系(O_2^- ·)、羟基自由基体系(·OH)、二苯代苦味肼基自由基体系(DPPH·),对黄瓜多糖体外清除自由基能力进行了研究,为黄瓜功能食品和保健品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄瓜,购于本地农贸市场;旋转蒸发仪,冷冻离心机,电子天平,电热恒温水浴锅,紫外可见分光光度计,干燥箱,组织捣碎机;DPPH·,三羟基甲基氨基甲烷(Tris)、邻苯三酚、水杨酸等分析纯试剂。

1.2 实验方法

(1) 多糖的提取与精制。黄瓜经破碎、80 ℃ 恒温水浴锅中浸提 3 h,然后用 4 层纱布过滤,减压浓缩、Sevage法脱蛋白、流水透析,95%乙醇沉淀,0 ℃ 过夜,收集沉淀物,冷冻离心,沉淀经无水乙醇、丙酮洗涤各 2 次,60 ℃ 烘干备用,即得精制黄瓜多糖样品。

(2) 黄瓜多糖含量的测定。多糖标准曲线溶液的制作,用葡萄糖作为标样,采用蒽酮-硫酸法测定多糖含量^[3,4],用分光光度计在 620 nm 处测定吸光值 A,得回归方程;样品多糖含量测定时,准确称取 10.00 mg 黄瓜多糖,定至 100 mL,准确吸取黄瓜粗多糖溶液 1.00 mL,加入蒽酮试剂,以蒸馏水作空白,于沸水浴中加热 10 min,测定吸光值 A 620,重复 3 次,计算糖含量。

(3) 黄瓜多糖对超氧阴离子自由基(O_2^- ·)的清除实验^[5,6]。邻苯三酚在弱碱性条件下能迅速自身氧化,释放出氧自由基 O_2^- ·,生成有色的中间产物,由此出现的一系列颜色变化,可以利用分光光度法进行测定。

收稿日期: 2008 - 08 - 01;修回日期: 2008 - 11 - 10。

作者简介:许平(1956 -),女,江苏人,副教授,从事生物化学及生物大分子的分离纯化研究。

当有抑制剂存在时,可清除氧自由基,从而阻止中间产物的积累,根据吸光度数值的变化可求出抗氧化剂的活性;反应液在 325 nm 的吸光值在反应开始后 5 min 之内随时间变化而线性增大,因此可以利用分光光度法进行测定。将黄瓜多糖用水配成 4、8、12、16、20、24、28 mg/mL 浓度的溶液备用;取 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,置于 25 ℃ 水浴中预热,分别加入不同浓度 1 mL 试样和 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液,于 25 ℃ 水浴中反应,加入 8 mmol/L HCl 1 mL 终止反应,325 nm 下每隔 1 min 测定吸光度 (A_0),计算线性范围内每分钟吸光度的增加,每个浓度平行做 3 次,取其平均值,氧自由基清除率的计算公式为:抑制率 (%) = $(A_0 - A) / A_0 \times 100$,其中 A_0 为邻苯三酚的自氧化速率, A 为加入多糖溶液后邻苯三酚的氧化速率,单位均为吸光度每分钟的增值。

(4) 黄瓜多糖清除羟自由基的清除实验。利用 Fenton 体系^[7]测试,该物质在 510 nm 有吸收峰,如果在反应体系中加入有清除 ·OH 能力的物质,与水杨酸竞争 ·OH,使有色物质生成量减少。在 510 nm 下测定各浓度的吸光度。反应体系中含有 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL、9 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇 1 mL、不同浓度的多糖溶液 1 mL。最后加 H_2O_2 启动反应,与蒸馏水为参比,在 510 nm 下测定各浓度的吸光度。以 9 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇 1 mL、不同浓度的多糖溶液 1 mL 和 1 mL 蒸馏水作为多糖的本底吸收值。每个浓度重复 3 次,取光吸收值的平均值。自由基清除率的计算公式为:清除率 (%) = $A_0 - (A_x - A_{x_0}) / A_0 \times 100$,其中 A_0 为不加多糖空白对照液的吸光度, A_x 为加入多糖溶液后的吸光度, A_{x_0} 为不加显色剂 H_2O_2 多糖溶液本底的吸光度。

(5) 黄瓜多糖清除 DPPH· 自由基的清除实验^[8,9]。DPPH· 是一种在有机溶剂中非常稳定的自由基,呈紫色,在 517 nm 处有一个特征吸收峰,当其遇到自由基清除剂时,与 DPPH 的孤电子配对,使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小。通过测定吸光度的变化来评价对 DPPH 自由基的清除效果;实验中每个浓度平行做 3 次,取其平均值。不同浓度的多糖溶液,加入 2 mL DPPH 溶液,在 517 nm 下测得吸光值为 A_i ;空白组为 2 mL 95% 的乙醇溶液代替 DPPH 溶液,测得吸光值为 A_j ;对照组 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水在 517 nm 下测得吸光值为 A_0 ;并以等体积蒸馏水和 95% 的乙醇混合液作为空白调零。清除率按公式计算:DDD 自由基清除率 % = $(A_0 - (A_i - A_j)) / A_0 \times 100$ 用抑制率为 50% 时的多糖浓度 (IC_{50}) 来衡量样品对自由基的清除能力,其值越小,样品清除自由基能力越强。

2 结果与分析

2.1 多糖提取物鉴定及含量测定

实验中制得的黄瓜多糖溶液对双缩脲试剂和茚三酮均无颜色反应,遇蒽酮 - 硫酸试剂发生相应的特征性颜色反应,表明该物质为多糖;实验数据处理后得回归方程:

C (mg/mL) = $9.96A + 0.0214$, 其中决定系数 $r = 0.9994$, 标准葡萄糖的吸光度在 10 ~ 80 mg/mL 之间呈良好的线性关系,此回归方程可以很好的拟合实验数据。黄瓜粗

多糖溶液吸光值共实验 3 次,分别为 0.4073, 0.4058, 0.4076, 其平均吸光值为 0.4069, 由回归方程和稀释倍数,样品重量得:多糖浓度为 4.1 mg/mL 提取液,黄瓜多糖含量为 32.8 mg/g, 粗多糖中含糖量为 77.4%。

2.2 黄瓜多糖对自由基的清除作用

黄瓜多糖对非细胞体系产生的超氧阴离子自由基、DDD 自由基、羟自由基均有明显的清除作用,且有量效关系,其清除率随着多糖浓度的增加而提高,见图 1。当其浓度在 8 mg/mL 时,对超氧阴离子的清除率基本上达 74%, 多糖半数抑制浓度 IC_{50} 是 5.2 mg/mL; 黄瓜多糖清除羟基自由基的结果见图 1, 随着多糖浓度的升高,对羟基自由基的清除能力逐渐增强,当加入量 < 20 mg/mL 时,羟基自由基的清除率逐渐增大,增至 20 mg 时清除率最高达 81%, 当多糖加入量超过 20 mg 时,随着多糖的增加,其自由基的清除率基本不发生变化,多糖的 IC_{50} 为 4.5 mg/mL 左右。DPPH 是一类较为稳定的自由基,它具有 3 个芳环结构,属于芳香类自由基;研究黄瓜多糖与 DPPH 自由基相结合的行为,可大致推测黄瓜多糖对芳香自由基的清除能力,由

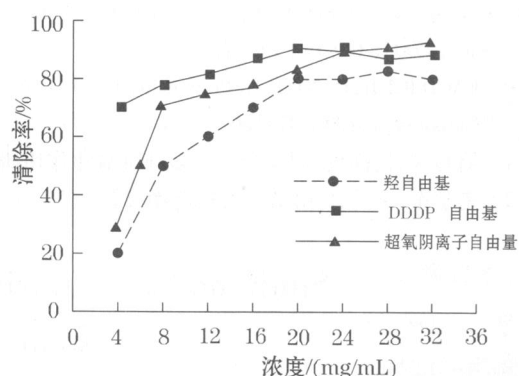


图 1 黄瓜多糖对自由基的清除

图 1 可知,在实验质量浓度范围内,多糖对 DPPH 自由基的清除率均大于 70%,说明多糖对 DPPH 自由基具有较好的清除能力,是一种很好的质子供体,可作为一种抗氧化剂。

3 讨论

试验采用生物化学法在体外产生各种自由基,并把不同浓度的黄瓜多糖加入各体系中,测定多糖的抗氧化性作用。试验结果表明,黄瓜多糖对 $O_2^- \cdot$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH \cdot 自由基均具有较强的还原能力,并且清除作用和还原能力与其浓度呈正相关性,其作用机理可能是多糖分子上具有还原性的半缩醛羟基,可与即活性氧自由基发生氧化还原作用^[10, 11];对于 $\cdot OH$ 而言,可快速地获取多糖碳氢链上的氢原子结合成水,多糖的碳原子上则留下一个成单电子,成为碳自由基,进一步氧化形成过氧化自由基,最后分解成对机体无害的产物,可将激发能传递给多糖,使多糖处于激发态而本身回到基态(猝灭)^[12];在机体中,外来多糖作为一种半抗原或完全抗原存在会刺激机体产生免疫反应。因此,多糖可作为人体系统中的抗氧化剂,它具有较强的清除自由基的能力。试验研究了黄瓜多糖对自由基的作用,并初步探讨了多糖抗自由基的机理,为此物的营养研究提供了一定的科学理论依据。

参考资料:

- [1] 汪志好. 植物多糖的研究进展(综述)[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2007, 6(2): 86 - 88
- [2] 汪峰. 黄瓜把儿别扔 可排毒养颜[J]. 中华养生保健, 2007(9): 9
- [3] 付学鹏, 杨晓杰. 蒲公英多糖的提取及含量测定[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 37 - 39
- [4] 刘春泉, 李大婧, 刘荣. 蒽酮-硫酸法测定北冬虫夏草多糖含量[J]. 江苏农业科学, 2006(2): 122 - 124
- [5] 林丽清, 黄丽英, 郑艳洁, 等. 金线莲多糖的提取及清除氧自由基作用的研究[J]. 福建中医学学报, 2006, 16(5): 37 - 39
- [6] 贺亮, 宋先亮, 律威. 木立芦荟多糖提取的工艺优化及其清除活性氧自由基的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(2): 35 - 37
- [7] 陈留勇, 孟宪军. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 167 - 170
- [8] 孟洁, 杭翊. 珂子抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(2): 9 - 1
- [9] CHOW ST, CHAO W W, CHUNG Y C. Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic extract[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 21 - 25
- [10] PACIFIC IR, DAVISE K. Protein lipid and DNA repair system in oxidative stress the free radical theory of aging revisited[J]. Gerontology, 1991, 37: 166
- [11] 周林珠, 杨祥良, 周井炎, 等. 多糖抗氧化作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(4): 210 - 212
- [12] 雷学军. 抗氧自由基的天然药物[J]. 日用化学工业, 1997, 27(5): 35 - 39

Study on the antioxidative activities of polysaccharides from *Cucumis sativus* L.

XU Ping

(College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: Cucumber polysaccharides (CP) were obtained by hot water extraction, ethanol precipitation, sewage method removing proteins and organic solvent purification. Polysaccharides content was determined by anthrone - H_2SO_4 colorimeter. Using the superoxide radical system, hydroxyl radical system, and system of 2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH \cdot), the antioxidation activities of cucumber polysaccharides is studied. The results showed that CP had strong radical scavenging activity towards DPPH \cdot , $\cdot OH$ and $O_2^- \cdot$. The capacity of scavenging free radicals of cucumber polysaccharides showed linear connections with the concentration.

Key words: cucumber; polysaccharide; free radicals; scavenging; antioxidant activity

责任编辑:田 静