

# 石斛多糖体外抗氧化活性的研究

查学强, 王军辉, 潘利华, 罗建平\*, 吕明明  
(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘要:** 本实验利用对邻苯三酚自氧化体系产生的超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )的清除作用、Fenton 反应检测对羟基自由基( $\cdot OH$ )的清除作用以及对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系的抑制作用, 对霍山石斛和铁皮石斛多糖抗氧化活性进行了研究。结果表明, 两种多糖对超氧阴离子自由基和羟基自由基具有不同程度的清除作用, 同时对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系也有显著的抑制作用。研究还发现霍山石斛多糖的抗氧化能力显著强于铁皮石斛多糖。  
**关键词:** 霍山石斛; 铁皮石斛; 抗氧化; 多糖; 自由基

Study on Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Dendrobium* Species

ZHA Xue-qiang, WANG Jun-hui, PAN Li-hua, LUO Jian-ping\*, LÜ Ming-ming  
(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** The antioxidant activities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium candidum* were evaluated by scavenging activities of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) generated by pyrogallol autoxidation system and hydroxyl free radicals ( $\cdot OH$ ) generated by Fenton reaction and inhibiting activity of oxidation system of linoleic acid induced by alkyl radical. Results showed that polysaccharides from the two *Dendrobium* species had distinctive scavenging effects of superoxide radical and hydroxyl radical and their inhibition responses on oxidation system of linoleic acid induced by alkyl radical were also remarkable. In addition, the antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* was stronger than that of *Dendrobium candidum*.

**Key words** *Dendrobium huoshanense*; *Dendrobium candidum*; antioxidant; polysaccharide; free radical

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0090-04

自由基(free radical)是一类含有未配对电子的基团、分子或原子, 主要包括超氧阴离子、羟自由基等, 是人体内的代谢产物, 在正常情况下, 处于动态平衡, 且浓度很低。当这一平衡被打破, 就会对机体造成损害、引发一系列疾病, 目前已发现有100余种此类疾病<sup>[1]</sup>。多糖(polysaccharide)是一类存在于植物、动物和微生物中的主要的天然活性物质, 具有调节机体免疫力<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>等广泛的药理作用, 且不同来源多糖表现出不同的生物学活性。迄今为止, 人们已成功地从百种植物中提取了多糖, 并广泛用于医药和保健食品中的研究和开发中, 植物多糖研究得比较深入的是稻草、麦秸多糖, 竹多糖, 刺五加多糖等<sup>[5]</sup>。抗氧化是多糖的重要应用领域之一, 与其他外源性抗氧化剂相比, 抗氧化多糖具有低毒、安全和来源广等特点<sup>[6-8]</sup>。

药用石斛是我国历代本草记载的一类名贵中草药

含有石斛多糖、生物碱等多种活性成分, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等多种功效<sup>[9]</sup>。现代药理研究表明它还具有提高机体免疫力、抗肿瘤和防治白内障等功能<sup>[10]</sup>。药用石斛的种类很多, 我国约有30多种, 主要分布于西南、华南、台湾等热带、亚热带和秦岭以南各区。化学成分分析发现, 药用石斛所含的化学成分类型多样, 各类成分的化学结构又各不相同, 药理作用也存在较大差异<sup>[10]</sup>。为此, 作者利用邻苯三酚、Fenton 和烷基自由基三个体系测定霍山石斛和铁皮石斛多糖的抗氧化活性, 为石斛多糖在保健食品、药品领域中的开发利用提供一定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

霍山石斛和铁皮石斛分别采自大别山区安徽省霍山

收稿日期: 2007-07-20

\* 通讯作者

基金项目: 教育部博士学科点专项科研基金项目(20060359006); 安徽省自然科学基金项目(00041508)

作者简介: 查学强(1979-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物加工技术。

县和云南思茅山区,并按文献[11]方法进行无菌繁殖。

亚油酸 Sigma 公司;其它药品均为国产分析级。

## 1.2 方法

### 1.2.1 石斛多糖的提取

取一定量无菌石斛苗于 40℃ 下干燥至衡重,并粉碎,于索氏提取器中用丙酮和甲醇分别提取 24h 和 48h,去除色素等杂质,残留粉末于 40℃ 下干燥至衡重后,用双脱氧水在 50~60℃ 条件下温浴提取 4 次,收集水提液,并减压浓缩,加入 4 倍量 95% 乙醇,过夜,离心(15min, 12000g)收集沉淀。沉淀复溶于双脱氧水,重复以上步骤 3 次。最终离心收集的沉淀溶于双脱氧水,用 Sevag 法<sup>[12]</sup>脱蛋白,离心收集的上清液为石斛多糖溶液,并于 4℃ 下保存备用。多糖质量分数测定采用苯酚-硫酸比色法测定<sup>[12]</sup>。

### 1.2.2 石斛多糖对超氧阴离子自由基清除作用的测定

邻苯三酚在碱性的溶液中易发生氧化反应,生成有色中间物质和超氧阴离子,随着时间的进行,有色产物得到积累,同时超氧阴离子清除剂能减小反应体系在 320nm 处的吸光度。取 2.25ml Tris-HCl 缓冲液(0.05mol/L, pH8.2),于 25℃ 下预热 20min,加入 0.5ml 不同浓度的石斛多糖溶液和 0.2ml 25mmol/L 邻苯三酚溶液,迅速混匀后于 25℃ 下反应,在一定时间后,于 320nm 波长处测定溶液的吸光度。 $O_2^- \cdot$ 清除率计算式:

$$\text{清除率} = (A_{\max 0} - A_{\max P}) / A_0 \times 100\%$$

式中,  $A_{\max 0}$  和  $A_{\max P}$  分别表示空白溶液和被测液在 320nm 波长处的最大吸光度。每组实验 3 次重复。

### 1.2.3 石斛多糖对羟基自由基清除作用的测定

$H_2O_2/Fe^{2+}$  体系可以通过 Fenton 反应产生羟自由基:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ 。邻二氮菲- $Fe^{2+}$  水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲- $Fe^{3+}$  后,其 536 nm 处最大吸收峰消失,因此可以采用邻二氮菲- $Fe^{2+}$  氧化法检测  $H_2O_2/Fe^{2+}$  体系产生的羟自由基<sup>[13]</sup>。羟自由基的检测:以去离子水将 50mmol/L 的邻二氮菲无水乙醇溶液稀释至,取 0.75ml 邻二氮菲无水乙醇溶液(5mmol/L)、2.0ml 磷酸盐缓冲液(0.75mol/L、pH7.4)、0.5ml 硫酸亚铁溶液(7.5mmol/L)、2.5ml 双脱氧水,充分混匀,加入 0.5ml  $H_2O_2$  (1%) 启动反应,反应液在 37℃ 保温 1.0h,于 536nm 处测定吸光度  $A_{536}$  损伤。多糖清除羟基自由基的测定:将 2.5ml 多糖样品溶液代替 2.5ml 双脱氧水,按上述方法于 37℃ 启动反应 1.0h 后,于 536nm 处测定吸光度  $A_{536}$  加药。未损伤管中以等体积的双脱氧水代替  $H_2O_2$  (1%) 及多糖样品液,测定吸光度  $A_{536}$  未损伤。多糖对羟基自由基的清除率(E)公式:

$$E(\%) = \frac{A_{536\text{加药}} - A_{536\text{损伤}}}{A_{536\text{未损伤}} - A_{536\text{损伤}}}$$

每组实验三次重复。

### 1.2.4 石斛多糖对烷基自由基清除作用的测定

取 2.5ml 乙醇、2.5ml 0.1mol/L pH8 磷酸缓冲液、0.05ml 亚油酸和 0.5ml 多糖样品液,充分混合,用 10W 紫外灯外光照射 60min,然后加入 2ml 三氯乙酸(20%)和 0.5ml 硫代巴比妥酸(3%, W/V),95℃ 水浴反应 90min,冰浴冷却,离心,于 532nm 波长处测定吸光度。对照组以等体积双脱氧水代替多糖样品液,每组实验 3 次重复。清除烷基自由基能力的计算公式:

$$P(\%) = 100(A_0 - A_i) / A_0$$

式中,  $A_0$  为对照组吸光度;  $A_i$  为加多糖样品液组的吸光度。

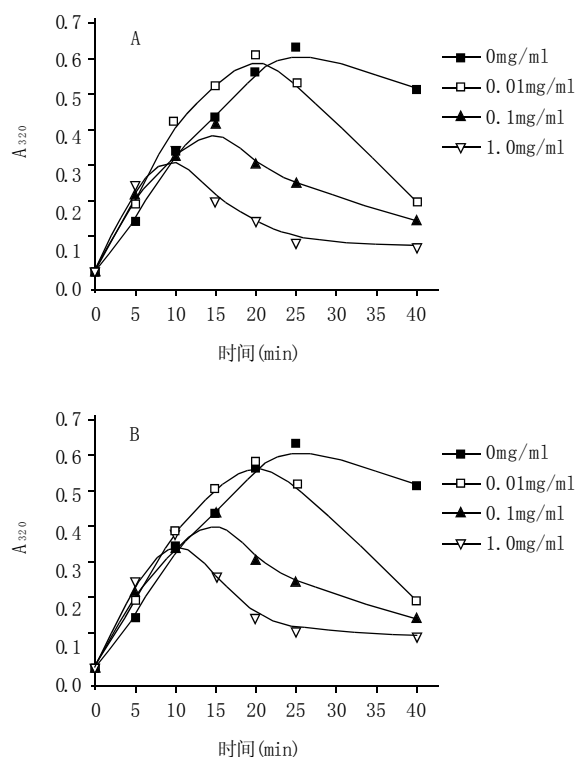
## 1.3 统计分析

所有实验数据经 SPASS 软件统计比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 石斛多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

多糖分子能显著减小反应体系在 320nm 处的吸光度,表明霍山石斛多糖和铁皮石斛多糖均具有清除阴离子自由基的能力。当加入相同浓度的两种多糖后,两种来源多糖对邻苯三酚的自氧化的促进作用具有相似的



A 和 B 分别代表霍山石斛多糖和铁皮石斛多糖的清除效应。

图1 霍山石斛和铁皮石斛多糖对超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )的清除作用  
Fig.1 Scavenging superoxide anion ( $O_2^- \cdot$ ) activities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium candidum*

变化趋势,但霍山石斛多糖的作用效果较优于铁皮石斛多糖(图1、2)。在考察的浓度范围内,320nm处的吸光度的降低程度和达到最高值时的时间提前程度与多糖浓度呈量效关系,随着多糖浓度的增加,两者均有不同程度的提高(图2)。当浓度达到1.0mg/ml时,霍山石斛和铁皮石斛多糖均在反应10min时 $A_{320}$ 达到最大值,此时超氧阴离子自由基的清除率分别比对照组降低了46%和39%,反应时间均比对照组提前了60%(图2)。

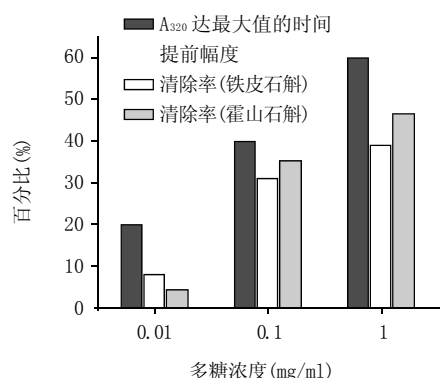


图2 石斛多糖对超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )的清除率在不同反应体系中 $A_{320}$ 达到最大值时的反应时间提前幅度

Fig.2 Scavenging superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) ratios of polysaccharides from *Dendrobium* species and advancement extends of the reaction time of reaching maximum value of  $A_{320}$  at different concentrations of polysaccharides

## 2.2 石斛多糖对羟基自由基的清除作用

利用Fenton反应,检测石斛多糖对羟基自由基的清除作用,结果如图3所示。结果表明,在实验浓度范围内,两种来源多糖对羟基自由基都有一定的清除作用,作用效果与多糖浓度呈量效关系,清除率随着多糖浓度的提高而增大,且在不同浓度范围内,清除率有显著差异( $p < 0.05$ )。当多糖浓度达到0.5mg/ml时,霍山石斛多糖和铁皮石斛多糖对羟基自由基的清除率分别达到57%和52%,比各自浓度在0.01mg/ml时的效果

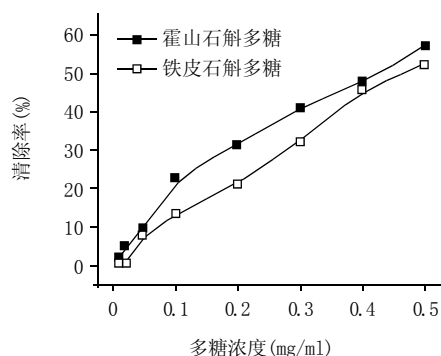


图3 石斛多糖对羟基自由基( $\cdot OH$ )的清除作用  
Fig.3 Scavenging hydroxyl free radicals ( $\cdot OH$ ) ratios of polysaccharides from *Dendrobium* species

分别提高了约34倍和202倍。研究结果还表明,在所选的浓度范围内霍山石斛多糖对羟基自由基的清除率显著优于铁皮石斛多糖,在相同浓度下,前者清除率是后者的1.1~9.4倍(图3)。

## 2.3 石斛多糖对烷基自由基的清除作用

按1.2.4方法分别对不同质量浓度的霍山石斛和铁皮石斛多糖溶液对亚油酸氧化体系的抑制能力进行实验,结果见图4。从图4中可以看出,霍山石斛和铁皮石斛多糖对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系均有不同程度的抑制作用,且与2.2所述结果类似,两种来源多糖在实验浓度范围内对烷基自由基的清除作用与多糖浓度呈量效关系,清除率随着多糖浓度的提高而增大。当多糖浓度小于0.1mg/ml时,两种多糖的作用效果相当,平均清除率分别为13.5%和12.8%。当多糖浓度超过0.1mg/ml时,霍山石斛多糖的抑制作用显著强于铁皮石斛,霍山石斛多糖质量浓度为0.3mg/ml时,清除率已达52%。当浓度为0.5mg/ml时,清除率达到71%。而铁皮石斛多糖质量浓度为0.5mg/ml时,清除率才达到52%。说明霍山石斛多糖具有较强的清除烷基自由基的能力。

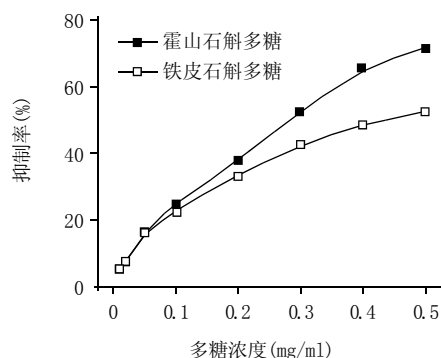


图4 石斛多糖对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系的抑制作用  
Fig.4 Inhibitory activities of polysaccharides from *Dendrobium* species in oxidation system of linoleic acid induced by alkyl radical

## 3 结论

霍山石斛和铁皮石斛多糖体外抗氧化性能研究表明,两种来源多糖对碱性条件下邻苯三酚产生的超氧阴离子、Fenton体系产生的羟基自由基的清除作用和对烷基自由基引发的亚油酸氧化体系的抑制作用均有显著的效果,表明两种药用石斛多糖具有较好的抗氧化活性,结合前期的药理学研究结果<sup>[14]</sup>,提示这两种多糖作为抗氧化功能因子在保健功能食品中具有很大的前瞻性,应用前景可观。本研究还发现,两种石斛多糖虽然都具有较好的抗氧化活性,但作用效果差异显著,其中霍山石斛多糖的抗氧化活性明显强于铁皮石斛,原因可能是两种石斛多糖在结构上存在很大差异<sup>[15-16]</sup>,多糖结构

# 荸荠中硒的赋存形态及分布研究

张 驰<sup>1,2</sup>, 刘信平<sup>2</sup>, 周大寨<sup>2</sup>, 唐巧玉<sup>2</sup>, 朱玉昌<sup>2</sup>, 孙甜华<sup>2</sup>

(1. 北京林业大学生命科学与技术学院, 北京 100083

2. 湖北民族学院 湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北 恩施 445000)

**摘 要:** 研究了湖北恩施所购买的荸荠中硒的赋存形态、分布及含硒大分子的提取分离技术。采用不同的浸提液提取荸荠中的蛋白质, 水提取荸荠中的多糖, 并测定它们的含量, 用微波消化法消化, 原子吸收分光法测各组份中的含硒量。结果表明, 蛋白硒是荸荠中硒的主要赋存形态, 其占总硒含量的50.45%; 蛋白质组分中, 以醇溶性蛋白质结合的硒量最多, 占总硒含量的38.66%; 也有部分硒和多糖结合。

**关键词:** 荸荠; 蛋白硒; 多糖硒; 赋存形态

## Study on Distribution and Combined Forms of Selenium in Water Chestnut

ZHANG Chi<sup>1,2</sup>, LIU Xin-ping<sup>2</sup>, ZHOU Da-zhai<sup>2</sup>, TANG Qiao-yu<sup>2</sup>, ZHU Yu-chang<sup>2</sup>, SUN Tian-hua<sup>2</sup>

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Hubei Institute for Nationalities, Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Enshi 445000, China)

**Abstract:** The combined forms and distribution of selenium, the extraction and separation technology of macromolecule containing selenium in water chestnut of Enshi city were studied. With various extraction solvent polysaccharide and protein of

收稿日期: 2007-08-20

基金项目: 湖北生物资源保护与利用重点实验室开放基金项目(2007019)

作者简介: 张驰(1965-), 男, 副教授, 主要从事植物生化和天然产物开发研究。

是其生物活性的基础, 因此进一步的分离纯化、结构分析和构效关系方面的研究工作有待进行。

### 参考文献:

- [1] MARX J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235: 529.
- [2] 杨虹, 王峥涛, 胡之璧. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(4): 54-56.
- [3] 徐程, 陈云龙, 张铭. 细茎石斛多糖DMP2a-1的结构分析[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(12): 900-902.
- [4] CHEN H X, ZHANG M, XIE B J. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea[J]. Food Chemistry, 2005, 90(1/2): 17-21.
- [5] 郭世宜, 杨永利. 植物多糖活性研究进展[J]. 中华实用医药杂志, 2004, 23(4): 32-34.
- [6] LI S P, SU Z R, DONG T T X, et al. The fruiting body and its host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity[J]. Phytomedicine, 2002(9): 319-324.
- [7] LI S P, ZHAO K J, JI Z N, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury[J]. Life Sciences, 2003, 73: 2503-2513.
- [8] LI S P, LI P, DONG T T X, et al. Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*[J]. Phytomedicine, 2001(8): 207-212.
- [9] 查学强, 罗建平. 霍山石斛原球茎液体培养的营养调节[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2004, 27: 53.
- [10] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [11] 查学强, 罗建平, 石玮, 等. 金属离子对霍山石斛类原球茎增殖及植株再生的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 179-181.
- [12] ZHA X Q, LUO J P, JIANG S T, et al. Enhancement of polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by optimization of medium and feeding of sucrose[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(3): 344-351.
- [13] 王顺春, 方积年. 香菇多糖硫酸化衍生物的制备及其结构分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(5): 594-597.
- [14] ZHA X Q, LUO J P, JIANG S T. Induction of immunomodulating cytokines by polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*[J]. Pharmaceutical Biology, 2007, 45(1): 71-76.
- [15] HUA Y F, ZHANG M, FU C X, et al. Structural characterization of a 2-O-acetylglucosaminan from *Dendrobium officinale* stem[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339: 2219-2224.
- [16] ZHA X Q, LUO J P, LUO S Z, et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(1): 86-93.