

酸法提取菜籽多糖的抗氧化活性研究

税丹¹, 王立峰^{1,2}, 袁建¹, 何荣², 王雪峰¹, 高瑀珑¹, 鞠兴荣^{1,*}

(1.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省粮油品质控制及深加工技术重点实验室, 江苏 南京 210003;

2.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:为进一步开发利用菜籽资源, 本研究从菜籽饼粕中以酸法提取菜籽多糖并对其抗氧化性进行研究。测定指标包括还原能力、DPPH 自由基清除能力、羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力。结果表明: 酸法提取菜籽多糖具有一定的清除 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基的能力及还原能力, 而且其抗氧化能力与多糖的质量浓度成正相关性; 其中, 当多糖质量浓度为 2mg/mL 时, DPPH 自由基清除能力能达到 49.9%; 当多糖质量浓度为 4mg/mL 时, $\cdot\text{OH}$ 的清除能力能达到 30.4%; 但其对于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 几乎没有清除作用。

关键词: 菜籽多糖; 酸法提取; 抗氧化性

Antioxidant Effect of Rapeseed Polysaccharides Extracted by Hydrochloric Acid

SHUI Dan¹, WANG Li-feng^{1,2}, YUAN Jian¹, HE Rong², WANG Xue-feng¹, GAO Yu-long¹, JU Xing-rong^{1,*}

(1. Key Laboratory of Grain and Oils Quality Control and Deep-Utilizing Technology of Jiangsu Province, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to make further use of rapeseed resources, rapeseed polysaccharides were extracted with hydrochloric acid and their antioxidant effect was investigated in terms of reducing power activity and DPPH, hydroxyl and superoxide anion free radical scavenging activity. The results showed that the rapeseed polysaccharides extracted with hydrochloric acid had some DPPH and hydroxyl free radical scavenging activity and reducing power activity in a concentration-dependent fashion. The DPPH free radical scavenging rate was 49.9% at the concentration of 2 mg/mL and the hydroxyl free radical scavenging rate 30.4% at 4 mg/mL. Nevertheless, almost no scavenging activity against superoxide anion free radicals was observed.

Key words: rapeseed polysaccharide; acid extraction; antioxidant effect

中图分类号: TS222.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0098-04

油菜是我国重要的油料作物, 其种植广泛且年产量位居世界前列, 因此对菜籽饼粕资源的充分利用能带来较可观的经济效益。目前, 对于菜籽饼粕中的蛋白质研究应用较为常见, 但其他成分的应用尚属开发阶段, 如植酸、多酚、甾醇、多糖等^[1]。多糖是广泛存在于自然界的酮糖和醛糖, 通过糖苷键连接在一起而形成的生物大分子。它是生物体内除蛋白质与核酸之外的又一类重要的信息分子, 与生物机能的维持密切相关。多糖与蛋白质、脂类所形成的糖蛋白、脂多糖在细胞的识别、分泌以及蛋白质转移等方面起着重要作用。目前已有研究表明: 多糖具有抗氧化、抗衰老、抗感染、

抗病毒、抗辐射、抗肿瘤、降血糖、免疫促进等多种生物活性^[2]。由于多糖具有多种生物活性功能, 以及在功能食品和临床上的广泛使用, 使其成为近年来的研究热点。

活性氧等自由基对人体健康的影响很大, 如肿瘤发生、辐射致癌、心脑血管疾病、器官的缺血再灌注、药物中毒和人体衰老等过程都涉及到自由基和活性氧^[3]。如果菜籽多糖能清除活性氧等自由基, 将是一种对人体健康十分有益的功能成分^[4]。近来许多研究证明, 酸提植物多糖亦具有较高的生理活性, 且其中一些功能非水提植物多糖所能取代^[5-6]。因此, 酸提菜籽饼粕多糖的

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 农业科技成果转化基金项目(2009GB2C100123); 江苏省农业科技自主创新基金项目(cx(10)444; cx(10)234)

作者简介: 税丹(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物多糖的开发和利用。E-mail: shuidan0425@yahoo.cn

* 通信作者: 鞠兴荣(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养及功能性成分。E-mail: xingrongju@163.com

开发利用有望为人们提供一种有益于健康且原料来源丰富的功能性成分, 这也可使得菜籽饼粕的综合利用率大大提高。本研究以酸法提取菜籽多糖并对其还原能力、DPPH 自由基清除能力、 $\cdot\text{OH}$ 清除能力和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力进行了测定, 以期对菜籽多糖的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菜籽饼粕: 2009 年产秦优 7 号菜籽经实验室自制所得。

石油醚(30~60℃沸程)、无水乙醇、硫酸、苯酚、葡萄糖、氢氧化钠、盐酸、三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三氯化铁、铁氰化钾、甲醇、邻二氮菲、七水合硫酸亚铁、过氧化氢、VC, 以上试剂均为分析纯; 1,1-二苯基苦酰基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

JLGJ45 检验砻谷机、锤式旋风磨 上海嘉定粮油仪器有限公司; TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器厂; pH-3C 型精密数显 pH 计 上海精密科学仪器厂; PB303-N 分析天平 瑞士梅特勒(上海)有限公司; HH-2 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; RE 52-05 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司; AIPHAI-4LD PLUO 真空冷冻干燥机 德国 Christ 公司; WH-3 微型漩涡混合仪 上海沪西分析仪器厂有限公司; UV-2401PC 紫外-可见分光光度计 日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 菜籽饼粕的制备

2009 年产秦优 7 号菜籽→脱壳处理→风选→粉碎→过 80 目筛→用石油醚脱油→通风干燥→实验所需低温菜籽粕

1.3.2 菜籽饼粕中粗多糖的提取

菜籽饼粕→80% 乙醇脱单糖、色素(液料比 3mL/g, 0.5h, 2 次)→残渣→盐酸溶液浸提→离心取上清液→浸提液浓缩→除蛋白(三氯乙酸法)→离心取上清液→3 倍无水乙醇沉淀→离心取沉淀→洗涤→透析→冷冻干燥→粗多糖

$$\text{菜籽多糖得率} \% = \frac{\text{菜籽多糖质量}}{\text{菜籽饼粕质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 菜籽多糖浸提液中多糖浓度的测定

采用苯酚-硫酸法^[7], 所得多糖标准曲线方程为: $y = 6.8497x + 0.0029$, $R^2 = 0.9999$ 。将菜籽多糖浸提液定容至 100mL, 取 5mL, 再定容至 50mL。取 1mL 此溶

液至具塞试管, 加蒸馏水补足 2mL, 再各加 5% 苯酚 1mL, 混匀, 迅速加入 5mL 浓硫酸, 立刻摇匀。放置 30min, 于波长 490nm 处测定吸光度。通过与标准曲线对比, 得到菜籽多糖浸提液中多糖浓度。

1.3.4 菜籽多糖得率的计算^[8]

菜籽多糖得率可以根据公式(2)计算得到。

$$\text{菜籽多糖得率} \% = \frac{\rho V D f}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中: ρ 为多糖溶液中葡萄糖的质量浓度/(mg/mL); V 为实验所取已稀释后粗多糖浸提液的体积, 取 1mL; D 为稀释因素, 取 1000; f 为多糖的换算因子, 取 0.91; m 为菜籽饼粕的质量/mg。

1.3.5 体外抗氧化性实验

1.3.5.1 还原力测定^[9]

将不同质量浓度的 2.5mL 样液与 2.5mL 的磷酸缓冲溶液(0.2mol/L, pH 6.6)混合, 再加入 2.5mL 1% 的铁氰化钾, 混匀后于 50℃ 条件下水浴 20min。在加入 2.5mL 10% 三氯乙酸后, 于 3000r/min 条件下离心 10min。取上清液 5mL 加入 5mL 水与 1mL 0.1% 的三氯化铁, 混匀, 静置 10min。于波长 700nm 处测定吸光度。以去离子水代替样液作为空白。VC 作为有还原能力的样品对照。

1.3.5.2 DPPH 自由基清除能力测定

参照文献[10]方法, 略作修改。

DPPH 储备液的制备: 准确称取 50mg DPPH 溶于 100mL 甲醇作为储备液; 4℃ 避光保存。使用时取 5mL 定容至 50mL, 得到可使用 DPPH 溶液。

测定方法: 以 2.0mL 甲醇、1.0mL pH7 磷酸缓冲液及 1.0mL 蒸馏水混合, 25℃ 水浴 1h 后, 于波长 517nm 处调吸光度为 0。样品组的反应体系为 1mL 样液、1.0mL pH7 磷酸缓冲液以及 2mL DPPH 溶液(A_i), 样品参比组以 2.0mL 甲醇代替 DPPH 溶液(A_j), 对照组为 2.0mL 甲醇和 2.0mL DPPH 溶液(A_0), 各组反应液漩涡混合 30s, 于 25℃ 水浴 1h 后, 于波长 517nm 处测定吸光度。

$$\text{清除率} \% = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

1.3.5.3 $\cdot\text{OH}$ 清除能力测定

参照文献[11]方法。

损伤管: 在 0.5mL 0.75mmol/L 邻二氮菲的无水乙醇溶液中加入 1mL 0.15mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH7.4)以及 0.5mL 蒸馏水, 充分混匀后加入 0.5mL 0.75mmol/L 的硫酸亚铁, 混匀后再加入 0.5mL 0.01% 的过氧化氢。混匀后于 37℃ 水浴 60min。再于 536nm 处测定吸光度, 记为 $A_{\text{损}}$ 。

未损伤管：以 0.5mL 蒸馏水代替过氧化氢重复以上操作。于波长 536nm 处测定吸光度，记为 $A_{未损}$ 。

样品管：将损伤管中的 0.5mL 蒸馏水以 0.5mL 样液代替。于波长 536nm 处测定吸光度，记为 $A_{样}$ 。

样品参比管：将 1mL 0.15mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.4)加入 0.5mL 样品液，混匀后加入 2mL 蒸馏水，无需水浴直接测定吸光度，记为 $A_{参}$ 。

空白参比管：将 1mL 0.15mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.4)加入 2mL 蒸馏水，无需水浴直接测定吸光度，记为 $A_{空}$ 。

$$\text{清除率}/\% = \frac{(A_{样} - A_{参}) / (A_{未损} - A_{空})}{A_{未损} - A_{空}} \times 100 \quad (4)$$

1.3.5.4 O_2^- 清除能力测定^[12]

取 0.05mol/L 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(pH8.2)4.5mL，置 25℃ 水浴中预热 20min 后，分别加入 1mL 试样溶液和 0.4mL 25mmol/L 邻苯三酚溶液，混匀后于 25℃ 水浴中反应 5min，加入 8mmol/L HCl 1mL 终止反应，在紫外-可见分光光度计波长 325nm 处测定溶液的吸光度(A_i)。空白对照组以相同体积的蒸馏水代替样品溶液，用紫外-可见分光光度计在波长 325nm 处测定溶液的吸光度(A_0)，每个试样作 3 个平行样，取其平均值。测得的数据代入式(5)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = (1 - A_i/A_0) \times 100 \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 酸法提取菜籽多糖的得率

笔者经前期研究，通过响应面法优化提取条件，所得酸法提取菜籽多糖的理论最高得率为 4.07%。经验证，实际得率能达到 4.01%。以下抗氧化性实验所用菜籽多糖均为此条件下所得产物。

2.2 还原力测定结果

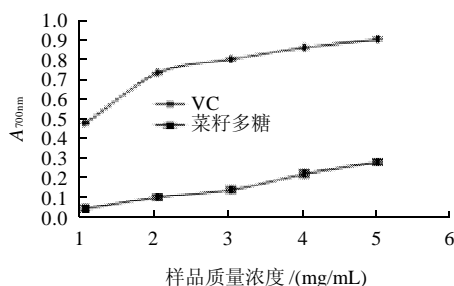


图1 菜籽多糖还原能力

Fig.1 Reducing power activity of rapeseed polysaccharides

图1所示是以 VC 为阳性对照组，考察在质量浓度的影响下，样品吸光度的变化趋势(即还原力的变化趋

势)。由图1可知，菜籽多糖质量浓度越高，吸光度越大，即还原力越大。虽然菜籽多糖具有一定的还原力，但与 VC 相比，其还原力还是较低。

2.3 DPPH 自由基清除能力测定结果

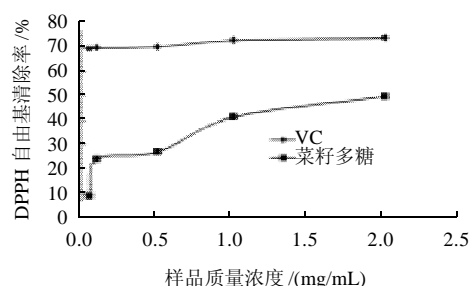


图2 菜籽多糖对 DPPH 自由基清除能力

Fig.2 DPPH free radical scavenging activity of rapeseed polysaccharides

如图2所示，不同质量浓度的菜籽多糖清除 DPPH 自由基的能力不同。最初随着菜籽多糖质量浓度增大，DPPH 自由基清除率相应增加。但随着菜籽多糖质量浓度增加，DPPH 自由基清除率增加变缓。虽然菜籽多糖具有一定的 DPPH 自由基清除能力，但与 VC 相比，其 DPPH 自由基清除能力还是较低，在 VC 的清除率达到 73.8% 时，菜籽多糖的清除率为 49.9%。

2.4 $\cdot OH$ 清除能力测定结果

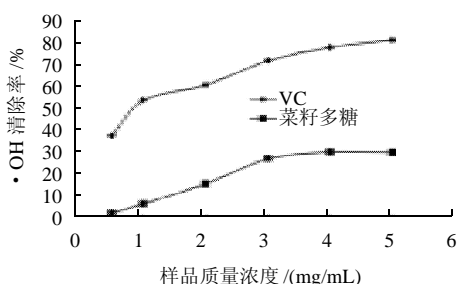


图3 菜籽多糖对 $\cdot OH$ 清除能力

Fig.3 Hydroxyl free radical scavenging activity of rapeseed polysaccharides

如图3所示，最初随着菜籽多糖质量浓度增大， $\cdot OH$ 清除率相应增加。但之后随着菜籽多糖质量浓度继续增加， $\cdot OH$ 增加变缓。虽然菜籽多糖对 $\cdot OH$ 具有一定的清除能力，但与 VC 相比，其 $\cdot OH$ 清除能力还是较低，在 VC 的清除率达到 81.8% 时，菜籽多糖的清除率为 30.2%。

2.5 O_2^- 清除能力测定结果

如图4所示，菜籽多糖对邻苯三酚的自氧化没有明显抑制作用，在 VC 达到 97% 清除率的质量浓度条件下，继续加大质量浓度，菜籽多糖对 O_2^- 的清除率依旧很

低。这说明酸提菜籽多糖对于 $O_2^- \cdot$ 清除几乎没有作用。

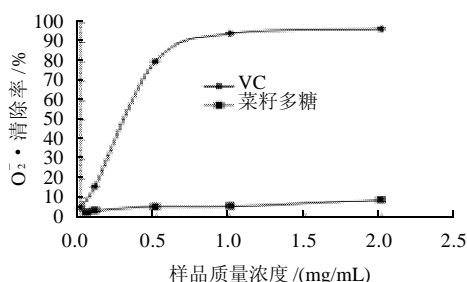


图4 菜籽多糖对 $O_2^- \cdot$ 清除能力

Fig.4 Superoxide anion free radical scavenging activity of rapeseed polysaccharides

3 结 论

体外抗氧化实验的结果表明, 酸法提取的菜籽多糖具有一定的清除 $\cdot OH$ 、DPPH 自由基的能力及还原能力, 而且其抗氧化能力与多糖的质量浓度成正相关性。其中, 当多糖质量浓度为 2mg/mL 时, DPPH 自由基清除能力能达到 49.9%; 当多糖质量浓度为 4mg/mL 时, $\cdot OH$ 的清除能力能达到 30.4%。但其对于 $O_2^- \cdot$ 几乎没有清除作用。

参考文献:

- [1] 严奉伟, 吴谋成, 江洪, 等. 菜籽粕综合提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(2): 209-212.
- [2] 孙汉巨, 姜绍通, 梁定雪, 等. 菜籽饼粕多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 567-571.
- [3] MARX J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235: 529-531.
- [4] 方允中, 杨胜, 武国耀. 自由基、抗氧化剂、营养素与健康的关系[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 337-342.
- [5] 董洪新, 吕作舟. 阿魏侧耳酸提水溶性多糖的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 101-103.
- [6] 林玉满, 鄢春生, 余萍. 短裙竹荪子实体酸提水溶性多糖的研究: Dd-2DE 的分离纯化和组成鉴定[J]. 福建师范大学学报, 1998, 14 (2): 62- 66.
- [7] 马莺. 功能性食品活性成分测定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [8] 魏行, 程明, 冯睿, 等. 碱溶性菜籽多糖的提取条件优化及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 195-198.
- [9] OYAIZU M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [10] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, et al. Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948.
- [11] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{3+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [12] 严成, 严夏. 枸杞多糖提取工艺比较及体外抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(17): 183-187.