

节节草多糖的体外抗氧化活性

张俊生, 陈莉华*, 朱士龙, 吴孝涛, 肖 斌
(吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 从节节草中提取多糖并进行纯化, 分别研究其多糖粗品及纯化品对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO_2^- 的清除作用和对油脂氧化的抑制作用, 并与VC进行比较。结果表明: 两种多糖对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 NO_2^- 具有不同程度的清除能力, 清除效果与多糖质量浓度均呈现一定的量效关系, 节节草多糖粗品的清除能力强于纯化品, 对油脂氧化有显著的抑制作用, 但两种多糖抗氧化效果均弱于VC。

关键词: 节节草; 多糖; 抗氧化活性

in vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf.

ZHANG Jun-sheng, CHEN Li-hua*, ZHU Shi-long, WU Xiao-tao, XIAO Bin
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: Crude and purified polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. were evaluated for antioxidant properties and compared with VC. Both crude and purified polysaccharides had scavenging activity against $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and NO_2^- in a concentration-dependent manner. The crude polysaccharides showed stronger free radical scavenging activity and potent inhibitory effect against lipid oxidation, but both polysaccharide samples had weaker antioxidant effect than VC.

Key words: *Equisetum ramosissimum* Desf.; polysaccharide; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)05-0086-04

节节草为木贼科多年生草本植物, 在《中国药典》2010版中学名为木贼^[1], 含黄酮^[2]、生物碱^[3]、植物多糖及有机硅等活性成分。节节草药用历史悠久, 已有报道证实其具有降血脂、保护血管内皮细胞、降低炎症因子分泌等效应^[4-6]。天然多糖由于具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血糖等生物活性在食品和药品开发与利用方面已引起广泛关注。从常见的植物食品如黄瓜^[7]、芦笋^[8]、野艾蒿^[9]提取纯化多糖的研究不断见诸报道。国内外目前已报道了200多种天然多糖^[10], 其中95%以上为植物多糖, 充分利用植物多糖的天然无毒性开发各种功能性食品和保健品满足了人类对天然产品的渴望。

本实验以节节草为原料, 采用超声波辅助提取多糖, 探讨节节草多糖粗品和多糖纯品的体外抗氧化活性, 并与VC进行对比, 以期为节节草资源的合理利用及进一步开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

节节草采于吉首本地, 经吉首大学资环学院植物学

教研室鉴定确认。动物油为市售新鲜猪板油熬制而成, 金健牌茶籽油(植物油)购于吉首本地超市。

苯酚、没食子酸、VC、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷、冰醋酸、淀粉、KI、 H_2SO_4 、 CHCl_3 、 I_2 等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ250-E型超声波清洗器、SHB-III循环水式多用真空泵、K-201B-II旋转蒸发器 郑州长城科工贸有限公司; GZX-9070MBE数显鼓风干燥箱 上海基伟试验仪器设备有限公司; 723可见分光光度计 上海荆和分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 节节草多糖的提取纯化及含量测定

称取一定量节节草粉末, 按料液比1:10(m/V)加入蒸馏水, 在温度60℃、功率250W条件下超声波提取40min, 提取3次后合并滤液, 减压浓缩, 浓缩液加入3倍量95%乙醇, 醇沉两次, 将沉淀离心, 用乙醚除脂质2次, Sevag法除蛋白质3次, 再次离心收集上清液, 即得到节节草多糖粗品溶液, 将多糖粗品溶液以液料比10:1(V (多糖粗品): m (树脂))过D-101树脂柱, 0.2mol/L的NaCl溶液进行洗脱, 收集洗脱液, 得到节节草多糖纯品溶液。

收稿日期: 2011-12-21

基金项目: 科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(10C26214302421; 11C26414305373); 吉首大学校级科研计划项目(11JDY051)

作者简介: 张俊生(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物分析。E-mail: zhangjunshenggirl@163.com

*通信作者: 陈莉华(1961—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物提取及分离分析。E-mail: chenlihua99@163.com

采用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[7-9]。以葡萄糖为对照品, 波长490nm处测得吸光度(A)与葡萄糖质量浓度(ρ)之间的回归方程为: $A=0.0055\rho-0.0053(R^2=0.9998)$, 线性范围: 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 。多糖粗品溶液多糖含量8.42%, 多糖纯品溶液多糖含量30.57%。

1.3.2 节节草多糖提取液清除 $\cdot\text{OH}$ 作用测定

建立Fenton反应体系模型^[7-9]。取2mmol/L FeSO_4 溶液3mL于比色管中, 加入1mmol/L H_2O_2 溶液3mL, 再加入6mmol/L水杨酸溶液3mL, 立即摇匀, 37℃水浴下加热15min后取出, 然后加入1.0mL提取液, 继续水浴加热15min, 以空白液为参比在波长510nm处测其吸光度 A_x 。取1.0mL蒸馏水代替提取液按照以上方法进行检测, 37℃水浴恒温15min后测得其吸光度 A_0 , 重复3次。以相同质量浓度VC溶液作对比, 按式(1)计算样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率。

$$\cdot\text{OH清除率}/\% = (1 - \frac{A_x - A_{x_0}}{A_0}) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为空白对照液吸光度; A_x 为待测样品液吸光度; A_{x_0} 为本底吸光度。

1.3.3 节节草多糖提取液清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 作用测定

邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生稳定的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 并生成有色中间产物, 可通过比色法检测^[7-9]。取pH8.2的50mmol/L Tris-HCl缓冲溶液4.5mL和1.0mL样品提取液, 混匀, 室温条件下放置4min, 325nm波长处测定样品吸光度(A_j)。再取Tris-HCl缓冲溶液4.5mL和7mmol/L邻苯三酚3.0mL, 混匀, 室温条件下放置4min, 325nm波长测其吸光度(A_0)。依上法, 取Tris-HCl缓冲溶液4.5mL和1.0mL样品提取液, 混匀后在室温条件下放置4min, 加入3.0mL邻苯三酚, 计时, 5min后于波长325nm处测定体系的吸光度(A)。以相同质量浓度VC溶液作对比, 计算样品对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}/\% = (1 - \frac{A - A_j}{A_0}) \times 100 \quad (2)$$

式中: A 为样品加入缓冲溶液及邻苯三酚后的吸光度; A_j 为样品加入缓冲溶液后的吸光度; A_0 为缓冲溶液加入邻苯三酚后的吸光度。

1.3.4 节节草多糖提取液对 NO_2^- 清除作用的测定

NO_2^- 在酸性条件下与对氨基苯磺酸发生反应, 再与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色络合物, 该络合物在波长538nm处有最大吸收, 因此, 可用分光光度法间接测定 NO_2^- 的量。

标准曲线绘制: 精密吸取10 $\mu\text{g/mL}$ 亚硝酸钠溶液0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL于50mL容量瓶中, 分别加入4g/L的对氨基苯磺酸溶液2.0mL, 混匀, 静置5min, 再加入2g/L的盐酸萘乙二胺溶液1mL, 加水至刻度, 混匀, 静置15min。在波长538nm处测定吸光度, 得标准曲线: $A=0.3969\rho+0.0403(R^2=0.9969)$, NO_2^- 在0~0.2 $\mu\text{g/mL}$ 之间有良好的线性关系。

吸取1mL样品液, 加入10 $\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸钠溶液1.0mL, 以相同质量浓度VC溶液作对比, 按照标准曲线方法计算 NO_2^- 量及样品对 NO_2^- 的清除率。

$$\text{NO}_2^- \text{清除率}/\% = \frac{\rho - \rho_0}{\rho} \times 100 \quad (3)$$

式中: ρ 为未加多糖提取液前由标准曲线计算得到的 NO_2^- 的量/ $(\mu\text{g/mL})$; ρ_0 为加入多糖提取液后由标准曲线计算得到的 NO_2^- 的量/ $(\mu\text{g/mL})$ 。

1.3.5 节节草多糖提取液抗油脂氧化实验

参照文献[11]绘制标准曲线并求出碘量-吸光度之间的数学关系。碘量(M , μmol)与吸光度 A 在0~0.96 μmol 间有良好的线性关系, 回归方程为 $M=4.0153A+0.0039(R^2=0.9986)$ 。

多糖提取液对油脂的抗氧化性采用国际上通用的烘箱强化贮存法: 称取20g油脂, 加入2mL提取物, 搅拌均匀后, 放入烘箱中强化保存, 间隔1h交换在烘箱中的位置并取1mL待测样品, 参照标准曲线方法分别测定波长585nm处的吸光度。以同质量浓度VC溶液作对比, 比较其抗氧化能力。按式(4)计算油脂过氧化值(POV)及多糖对油脂的氧化抑制率(η)。

$$\text{POV}/(\text{mmol/kg}) = \frac{M}{m} \quad (4)$$

式中: M 表示碘生成量/mmol; m 表示油脂质量/kg。

$$\eta/\% = (1 - \frac{\text{POV}_{\text{未1}} - \text{POV}_{\text{初}}}{\text{POV}_{\text{未2}} - \text{POV}_{\text{初}}}) \times 100 \quad (5)$$

式中: $\text{POV}_{\text{初}}$ 为未对油脂进行强化氧化时的过氧化值/(mmol/kg); $\text{POV}_{\text{未1}}$ 为添加多糖的油脂强化氧化后的过氧化值/(mmol/kg); $\text{POV}_{\text{未2}}$ 为未添加多糖的油脂强化氧化后的过氧化值/(mmol/kg)。

取相同质量浓度的节节草多糖溶液加入到20g植物油和猪油中, 充分搅拌后, 分别置于40、50、60℃烘箱内, 间隔1h取样检测。

2 结果与分析

2.1 节节草多糖质量浓度对清除 $\cdot\text{OH}$ 的影响

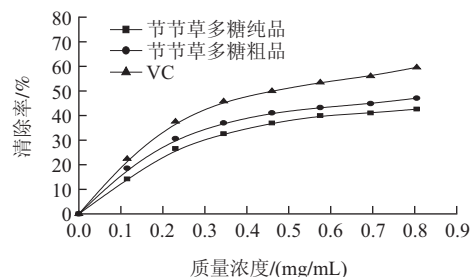


图1 多糖质量浓度对 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响

Fig.1 Concentration-dependent scavenging activity of crude and purified polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. against $\cdot\text{OH}$

由图1可知, 节节草多糖粗品、纯化品清除·OH的作用均比较明显; 在质量浓度0~0.9mg/mL范围内, 随着两种多糖质量浓度的增大, 清除率逐渐升高, 但均低于VC的清除率; 此外, 节节草粗多糖对·OH的清除率均较纯化多糖高。总体而言, 对·OH清除率的大小排序为: VC>节节草多糖粗品>节节草多糖纯化品。

2.2 节节草多糖质量浓度对清除O₂⁻·的影响

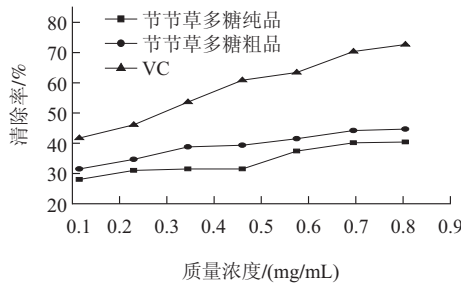


图2 多糖质量浓度对O₂⁻·清除率的影响

Fig.2 Concentration-dependent scavenging activity of crude and purified polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. against O₂⁻·

由图2可知, 在实验所选取质量浓度范围内, 两种节节草多糖对O₂⁻·的清除率具有相同趋势, 都是随着多糖质量浓度的增大而升高, 节节草多糖粗品的清除率略高于多糖纯化品, 但明显都较VC的清除率低。

2.3 节节草多糖质量浓度对清除NO₂⁻的影响

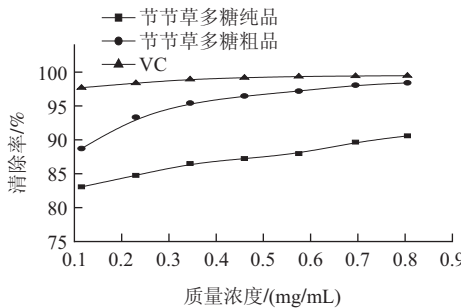


图3 多糖质量浓度对NO₂⁻清除率的影响

Fig.3 Concentration-dependent scavenging activity of crude and purified polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. against NO₂⁻

由图3可知, 随着多糖质量浓度的增大, 3种溶液对NO₂⁻的清除率均呈上升趋势, 且VC对NO₂⁻的清除率最高。在质量浓度为0.23mg/mL时, VC对NO₂⁻的清除率已大于97.5%, 质量浓度大于0.3mg/mL后, 清除率上升不明显, 基本稳定在98%左右。多糖粗品、多糖纯化品对NO₂⁻的清除率也随质量浓度的升高而增大, 但在实验质量浓度范围内, 多糖粗品清除率均好于多糖纯化品。

2.4 节节草多糖对·OH、O₂⁻·及NO₂⁻清除能力比较

由表1、2可知, 节节草多糖粗品、多糖纯化品均对·OH、O₂⁻·及NO₂⁻有很好的清除作用, 相同质量浓

度下, 两种多糖的清除能力为: NO₂⁻>O₂⁻·>·OH, 但多糖粗品清除率均高于多糖纯化品。

表1 不同质量浓度的多糖粗品对·OH、O₂⁻·及NO₂⁻的清除率
Table 1 Scavenging activity of crude polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. at different concentrations against ·OH, O₂⁻· and NO₂⁻

自由基	粗多糖质量浓度/(mg/mL)						
	0.12	0.23	0.35	0.46	0.58	0.70	0.80
·OH	18.57	30.60	36.98	41.07	43.23	44.86	47.04
O ₂ ⁻ ·	31.52	34.67	38.8	39.35	41.5	44.2	44.7
NO ₂ ⁻	88.71	93.34	95.44	96.47	97.19	98.06	98.41

表2 不同质量浓度的多糖纯化品对·OH、O₂⁻·及NO₂⁻的清除率
Table 2 Scavenging activity of purified polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf. at different concentrations against ·OH, O₂⁻· and NO₂⁻

自由基	纯化多糖质量浓度/(mg/mL)						
	0.12	0.23	0.35	0.46	0.58	0.70	0.80
·OH	14.2	26.58	32.57	36.95	39.96	41.04	42.59
O ₂ ⁻ ·	28.02	31.02	31.52	31.52	37.43	40.17	40.41
NO ₂ ⁻	83.10	84.77	86.50	87.24	87.97	89.66	90.59

一般来说, 植物多糖的活性与其分子质量、溶解度、黏度和化学结构有关^[12]。富硒花生中的粗多糖相对于纯化多糖, 具有更长的诱导时间、更高的DPPH自由基清除能力和更高的还原力^[13], 对虫草与富硒虫草多糖的体外抗氧化活性研究表明, 虫草多糖对O₂⁻·和H₂O₂的清除能力依次为富硒虫草胞外多糖>富硒虫草胞内多糖>虫草胞外多糖>虫草胞内多糖, 而对·OH的清除能力依次为: 富硒虫草胞外多糖>虫草胞外多糖>富硒虫草胞内多糖>虫草胞内多糖^[14]。多糖的活性还与共存的植物蛋白有关, 对娑罗子多糖的生物活性研究表明, 对·OH、H₂O₂和DPPH自由基的清除作用, 粗多糖的活性强于去蛋白多糖^[15]。本研究结果也表明, 节节草中的多糖粗品比去蛋白后的多糖纯化品具有更好的清除·OH、O₂⁻·、NO₂⁻的能力。

2.5 多糖对油脂的抗氧化活性

2.5.1 温度对多糖抗油脂氧化效果的影响

由图4可知, 在测定节节草多糖粗品对植物油氧化抑制率的过程中, 温度对测定结果的影响很大。3种温度条件下, 多糖对植物油氧化抑制率均随时间的延长先增大后又降低。此外, 40~50℃时, 随着温度的升高, 多糖的氧化抑制率也不断升高, 但温度升高至60℃时, 多糖对油样的氧化抑制率反而下降。产生这种现象的原因可能是在加热条件下, 引发了植物油发生了自氧化反应, 同时温度较高使多糖的热稳定性降低, 造成抗氧化剂对植物油的氧化抑制率降低。

同样, 节节草多糖粗品对动物油氧化抑制与对植物油的抑制效果相似, 均是随着温度的升高, 抑制率先上升后下降, 比较图4a和图4b可以明显看出: 节节草多糖

粗品对植物油的氧化抑制率随温度的变化更为明显, 在相同条件下, 节节草多糖粗品对植物油氧化抑制效果大于对动物油的氧化抑制效果。

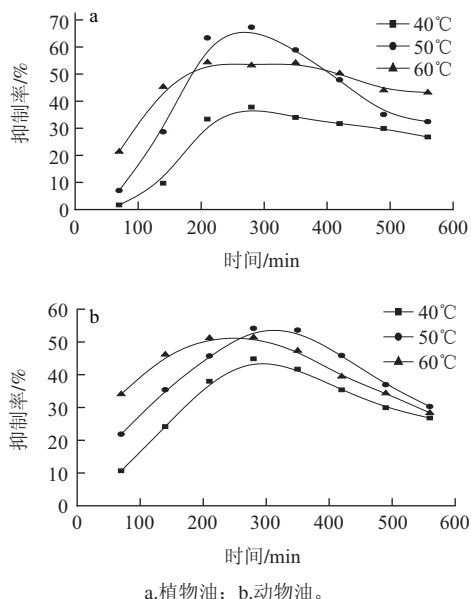


图4 温度对多糖抑制油脂氧化的影响

Fig.4 Influence of temperature on anti-lipid oxidation activity of crude polysaccharides from *Equisetum ramosissimum* Desf.

2.5.2 多糖纯化前后对油脂的抗氧化性比较

分别比较了VC、节节草多糖粗品、纯化品对植物油和动物油的抗氧化效果。分别在20g植物油和猪油中加入质量浓度均为0.5mg/mL的节节草多糖粗品溶液、多糖纯品溶液及VC溶液2mL, 混合均匀后, 分别置于40℃烘箱内, 每隔1h取样检测, 结果见表3、4。

表3 多糖纯化前后对植物油氧化抑制率比较

Table 3 Antioxygen on antioxidation activity of polysaccharide to vegetable oil

组别	时间/min								%
	70	140	210	280	350	420	490	560	
植物油+节节草多糖粗品组	1.66	9.71	35.35	37.82	31.77	33.97	29.91	26.76	
植物油+节节草多糖纯品组	1.29	6.30	33.34	40.55	32.03	32.61	28.97	26.76	
植物油+VC组	70.35	74.28	59.52	66.06	65.63	70.39	69.48	75.93	

表4 多糖纯化前后对动物油氧化抑制率比较

Table 4 Antioxygen on antioxidation activity of polysaccharide to fat

组别	时间/min								%
	70	140	210	280	350	420	490	560	
动物油+节节草多糖粗品组	10.65	24.12	37.97	44.72	41.35	35.60	29.73	26.64	
动物油+节节草多糖纯品组	12.21	28.86	52.65	49.83	46.35	42.70	33.10	16.36	
动物油+VC组	22.74	40.33	57.91	51.43	49.83	45.34	47.02	32.74	

由表3、4可知, 相同质量浓度条件下, 节节草多糖粗品、多糖纯化品对植物油和猪油均有较好的抗氧化效果, 对动物油来说, 节节草多糖粗品抗氧化效果明显弱

于多糖纯化品, 而对植物油来说, 却无显著差别, 但两者均不及VC的抗氧化作用, 在烘箱放置时间变化很大时, 多糖粗品对油样的抑制率变化并不大, 而多糖纯化品对油样的抑制率变化比较大。

3 结论

节节草多糖粗品及纯化品的体外抗氧化结果表明, 二者在一定质量浓度范围内对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\text{NO}_2^{\cdot-}$ 均有一定的清除作用, 且清除效果与多糖质量浓度有剂量效应关系。

在清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\text{NO}_2^{\cdot-}$ 时, 相同质量浓度条件下节节草多糖纯化品的清除效果均弱于同质量浓度的多糖粗品, 这是因为植物多糖的活性与其不仅与其分子质量、溶解度、黏度和化学结构有关, 而且与共存的植物蛋白也有关系, 在清除自由基方面, 含植物蛋白的粗多糖往往比纯化多糖效果更好。

节节草多糖粗品及纯化品对植物油及动物油均有一定的抗氧化效果, 总体而言, 多糖粗品对植物油氧化抑制率大于对动物油氧化抑制率, 但受温度、时间的影响变化较大。

节节草多糖具有良好的抗氧化能力, 原料来源广, 提取工艺简单, 作为一种新的天然、保健的绿色食品抗氧化剂应有良好的开发前景。

参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典 2010年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 42-43.
- [2] 张俊生, 陈莉华, 张文龙. 湘西节节草总黄酮的超声波提取及抗氧化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 71-75.
- [3] 陈莉华, 张俊生, 张丽, 等. 湘西节节草总生物碱的提取及抑菌性研究[J]. 湖南农业科学, 2011(9): 101-104.
- [4] 李志永, 李国拉, 王辉, 等. 木贼有效部位提取物对氧化低密度脂蛋白致内皮细胞凋亡的干预[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30 (15): 2160-2162.
- [5] 甄艳军, 刘志敏, 姜秀娟, 等. 两种木贼提取物对高血脂大鼠内皮凋亡及p53、caspase-3表达干预[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14 (2): 154-155.
- [6] 丁晓猛, 姜秀娟, 王旭辉, 等. 木贼水煎剂对大鼠食饵性脂肪肝的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(21): 3136-3138.
- [7] 何念武, 杨兴斌, 田灵敏, 等. 黄瓜多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 70-74.
- [8] 李姣, 王珂, 王瑞坡, 等. 芦笋多糖提取纯化工艺及其体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 65-69.
- [9] 戴喜末, 熊子文, 罗丽萍. 响应面法优化野艾蒿多糖的超声波提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 93-97.
- [10] 倪福太, 庄妍. 植物多糖的研究进展(综述)[J]. 牡丹江师范学院学报, 2010(4): 34-36.
- [11] 孙德明. 碘量比色法在食品油脂测定中的应用[J]. 黑龙江科技信息, 2009(4): 47.
- [12] 郑建仙. 功能性食品学[M]. 2版. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 27.
- [13] 张卓, 赵萍, 王雅, 等. 富硒花生中硒的主要赋存形态及其抗氧化性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4): 87-91.
- [14] 武忠伟, 许桂芳, 曹蓬勃, 等. 虫草与富硒虫草多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 76-78.
- [15] 边静静, 付娟, 赵桦. 婆罗子多糖的提取、含量测定及生物学活性研究[J]. 食品工业科技, 2010(10): 72-75; 77.