

山苦茶多糖结构表征及抗氧化活性研究

赵谋明^{1,2}, 刘敏^{1,2}, 林恋竹^{1,2}, 罗维³, 王祝年⁴

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广东省食品绿色加工与营养调控工程技术研究中心, 广东广州 511400) (3. 华南理工大学分析测试中心, 广东广州 510640) (4. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737)

摘要: 本文从山苦茶中提取得到两个多糖组分水溶性多糖 (MOWP) 和碱溶性多糖 (MOAP), 得率分别为 6.00% 和 3.07%。采用高效凝胶渗透色谱法 (GPC) 分别测定了 MOWP 和 MOAP 的分子量分布; 采用 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法 (HPLC) 分别测定了 MOWP 和 MOAP 的单糖组成; 采用甲基化-气相色谱质谱法 (GCMS) 研究了 MOWP 和 MOAP 的糖苷键连接方式。此外, 采用 DPPH 清除法、还原力法以及氧自由基吸收 (ORAC) 法, 评价了 MOWP 和 MOAP 的体外抗氧化活性。结果表明: MOWP 分子量分别为 906 kDa 和 49 kDa, MOAP 的分子量为 95 kDa。木糖、半乳糖及葡萄糖构成了酸性多糖 MOWP 的骨架结构, 而酸性多糖 MOAP 由甘露糖、木糖及半乳糖构成骨架。MOWP 和 MOAP 中 $\rightarrow 3$ -Xylf(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 3$ -Galp(1 \rightarrow 以及 $\rightarrow 3$ -Glc(1 \rightarrow 残基含量均较高。MOWP 和 MOAP 均有一定的抗氧化能力, MOWP 清除 DPPH 的能力较强, MOAP 具有较强的还原能力和氧自由基吸收能力。

关键词: 山苦茶; 多糖; 单糖组成; 糖苷键连接方式; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2015)7-61-66

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.011

Structural Characteristics and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Mallotus oblongifolius*

ZHAO Mou-ming^{1,2}, LIU Min^{1,2}, LIN Lian-zhu^{1,2}, LUO Wei³, WANG Zhu-nian⁴

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2. Guangdong Food Green Processing and Nutrition Regulation Technologies Research Center, Guangzhou 511400, China)
(3. Analytical and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (4. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: A water-soluble polysaccharide (MOWP) and an alkali-soluble polysaccharide (MOAP) were isolated from *Mallotus oblongifolius*. The MOWP and MOAP yields were 6.00% and 3.07%, respectively. The molecular weights of the MOWP and MOAP were determined by a high performance gel permeation chromatography assay. The molecular weights of the MOWPs were 906 kDa and 49 kDa, and the molecular weight of the MOAP was 95 kDa. The monosaccharide composition was determined by a pre-column derivatization assay. Based on the monosaccharide composition analysis, the MOWP was mainly comprised of glucose, galactose, and xylose. MOAP was mainly comprised of mannose, galactose, and xylose. The glycosidic bonds of MOWPs and MOAPs were determined by a methylation assay. The branched MOWPs and MOAPs were composed mainly of $\rightarrow 3$ -Xylf(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 3$ -Galp(1 \rightarrow and $\rightarrow 3$ -Glc(1 \rightarrow in different ratios. MOWPs and MOAPs exhibited moderate antioxidant capacities. MOWPs showed better DPPH scavenging activity than did MOAPs. MOAPs showed better reducing power and oxygen radical absorbance capacity than did MOWPs.

Key words: *Mallotus oblongifolius*; polysaccharide; monosaccharide composition; glycosidic bond; antioxidant activity

山苦茶 [*Mallotus oblongifolius* (Miq.) Muell. Arg.], 大戟科 (Euphorbiaceae) 野桐属 (*Mallotus*) 植物, 又名鹧鸪茶、禾姑茶、毛茶。山苦茶的分布范围较窄, 主要分布在我国海南岛、中印半岛和苏门答腊岛, 在我国

收稿日期: 2014-07-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101221); “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD37B08-01)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

仅分布在海南岛以及广东南部少数几个县市^[1]。因其叶泡出的茶香气浓郁, 又兼具有清热解毒、利胆消食的功效, 山苦茶在海南民间是一种颇具影响的代茶饮料, 并已开发成为具有浓郁地方特色的旅游产品。山苦茶中含有约 14% 的灰分, 6.8% 的水分, 0.45% 的蛋白质, 0.2% 的氨基酸, 还含有有机酸类, 萜类, 苯丙素类, 以及钙、镁、锌、锶等矿质元素^[2], 山苦茶多糖是山苦茶中主要活性成分之一。目前, 山苦茶醇提

取物的部分化学成分以及其利胆、镇痛、抗菌、抗病毒、抗氧化等活性已有研究报道^[3-6],而对山苦茶多糖的研究仅限于提取分离工艺及简单的抗氧化研究,例如苏冰霞等采用超声辅助—水提法提取山苦茶水溶性多糖,其多糖得率为9.98%,并评价了其抗氧化能力^[6]。但关于山苦茶多糖结构表征的研究鲜有报道。

为了深入了解山苦茶多糖的结构,本文采用水提法提取山苦茶水溶性多糖,继而采用碱法提取山苦茶碱溶性多糖。采用高效凝胶渗透色谱法(GPC)测定了两种多糖的分子量分布;采用PMP柱前衍生-高效液相色谱法(HPLC)、甲基化-气相色谱质谱(GC/MS)法对两种多糖的一级结构进行了研究,为山苦茶多糖的结构表征提供指导。山苦茶多糖是山苦茶中重要活性成分,对其抗氧化活性的研究有利于山苦茶生理功能研究。因此,本文采用DPPH自由基清除法、还原力法和氧自由基吸收(ORAC)法,研究山苦茶多糖的体外抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

原料山苦茶购于海南省海口市农贸市场,经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所王祝年所长鉴定为大戟科野桐属山苦茶。

95%乙醇、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、盐酸、氢氧化钠、甲醇、冰乙酸、二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸酐、无水硫酸钠、碘甲烷、二甲基亚砷、硼氢化钠、氯化钠、溴化钾、吡啶、三氯乙酸、铁氰化钾、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、氯化亚铁、三氯化铁、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)均为分析纯;乙腈、甲醇均为色谱级,购于德国Merck公司;1,1-二苯基-3-硝基苯肼(DPPH)、水溶性维生素E(Trolox)、2,2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)、D-木糖(Xyl)、D-半乳糖醛酸(GalUA)、D-葡萄糖(Glu)、D-阿拉伯糖(Ara)、D-葡萄糖醛酸(GlcUA)、D-半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、L-岩藻糖(Fuc)、L-鼠李糖(Rha)均为标准品,购于美国Sigma公司。

1.1.2 仪器

DFY-500 摇摆式中药粉碎机:温岭市林大机械有限公司;高功率数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;循环水式真空泵:巩义市予华仪器有限责任公司;电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV-2100紫

外可见分光光度计:广州广一科学仪器有限公司;GPC-凝胶渗透色谱仪Waters-1525:美国Waters公司;高效液相色谱仪Waters-600:美国Waters公司;气相色谱-质谱联用仪Trace DSQ-II:美国Thermo公司;冷冻干燥器:德国Christ公司;TR-5MS弹性毛细管柱:美国Thermo公司;Venusil MP-C18:天津博纳艾杰尔科技有限公司;酶标仪:美国Thermo公司;自动定氮仪KDN-103F:上海纤检仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 山苦茶多糖提取方法

取山苦茶200g,烘干粉碎过60目筛,80%乙醇(料液比1:10)回流提取2h,去除醇溶性物质,重复3次,过滤后将滤渣干燥。在滤渣中加入蒸馏水浸提(120℃,料液比1:10),重复提取3次,过滤后将滤渣干燥,合并滤液浓缩,醇沉12h后离心,沉淀干燥后过HP-20大孔树脂除色素、富集,洗脱液浓缩,醇沉12h后离心,离心后沉淀用少量水复溶后冷冻干燥,得山苦茶水溶性多糖(MOWP)。

在滤渣中加入碱液(0.1mol/L NaOH溶液)浸提(120℃,料液比1:10),重复3次,合并滤液浓缩,浓缩液调pH值至7.0,透析三天除去盐,醇沉12h后离心,沉淀干燥后过HP-20大孔树脂除色素、富集,洗脱液浓缩,醇沉12h后离心,离心后沉淀用少量水复溶后冷冻干燥,得山苦茶碱溶性多糖(MOAP)。MOWP和MOAP的得率按以下公式进行计算:

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{干燥后样品重量}}{\text{原料重量}} \times 100\%$$

1.2.2 山苦茶多糖总糖、总酚、蛋白质含量的测定

依照苯酚-硫酸法^[8]测定总糖含量。以葡萄糖为标准品,分别配制0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1mg/mL的葡萄糖溶液。分别吸取1mL不同浓度的葡萄糖溶液加入10mL试管中,加入6%苯酚溶液0.5mL,迅速加入浓硫酸2.5mL,振荡使之混匀,静置反应20min后,在490nm波长处测定其吸光值。根据不同浓度葡萄糖溶液的吸光值建立标准曲线。MOWP和MOAP用蒸馏水复溶后,稀释一定倍数,按照标准曲线测定方法进行测定,根据标准曲线及稀释倍数可计算样品中总糖含量。按下列公式进行计算:

$$\text{总糖含量}(\%) = \frac{C \times D}{\rho} \times 100\%$$

其中:C为样品液相当于葡萄糖溶液的浓度(mg/mL),D为稀释倍数, ρ 为样品溶液的质量浓度(mg/mL)。

采用Folin-Ciocalteu法^[7]测定样品中总酚含量。

以没食子酸为标准品, 配置成 0.1 mg/mL 的没食子酸溶液。分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 没食子酸溶液置于 10 mL 容量瓶中, 加水至 6 mL, 摇匀, 各加 Folin-Ciocalteu 试剂 0.5 mL, 摇匀, 在 1~8 min 内加 20% 碳酸钠溶液 (m/V) 1.5 mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 40 °C 保温 2 h, 迅速冷却, 立即在 760 nm 处测定吸光度。按照标准曲线的绘制方法测定样品中总酚含量。按下列公式进行计算:

$$\text{总酚含量 (\%)} = \frac{C \times D}{\rho} \times 100\%$$

其中: C 为样品液相当于没食子酸溶液的浓度 (mg/mL), D 为稀释倍数, ρ 为样品液的质量浓度 (mg/mL)。

采用凯氏定氮法测定样品中蛋白质含量。按下列公式进行计算:

$$\text{蛋白质含量 (100\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.0140 \times 6.25}{m} \times 100\%$$

其中: V_1 为滴定样品时消耗盐酸的量 (mL), V_2 为空白实验消耗盐酸的量 (mL), C 为盐酸标准液的浓度 (mol/L), m 为样品质量 (g)。

1.2.3 山苦茶多糖的分子量分布测定^[8]

分别精密称取葡聚糖标准品, 分子量分别为 5.2、11.6、23.8、48.6、148、273、410、668 及 1400 kDa, 溶于 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液中, 配制成 1 mg/mL 的葡聚糖标准溶液, 过 0.22 μ m 滤膜, 待 GPC 进样分析。按照如下色谱分离条件测定分子量分布: 色谱柱: G5000PWXL 与 G3000PWXL 凝胶柱串联使用; 柱温: 35 °C; 流动相: 0.02 mol/L 的磷酸二氢钾溶液; 检测器: 示差折光检测器; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 20 μ L。

用标准葡聚糖分子量的对数值 ($\log M_w$) 对淋洗时间作淋洗曲线, 获得葡聚糖分子量分布的标准曲线。样品的测定则是: 分别称取 2.0 mg MOWP、MOAP, 溶于 0.02 mol/L 的磷酸二氢钾溶液, 配成 2 mg/mL 的样品溶液, 过 0.22 μ m 滤膜, 进样后, 依照上述色谱分离条件得到各样品的色谱图, 依照标准曲线得出样品分子量分布。

1.2.4 山苦茶多糖的单糖组成分析

山苦茶多糖单糖组成分析方法根据戴军^[9]等人的方法改进。分别配制 1 mg/mL 的各单糖标准品 (D-木糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖、D-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖、甘露糖、L-岩藻糖、L-鼠李糖), 分别加入 100 μ m 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液, 在 70 °C 的烘箱中衍生化反应 100 min; 冷却后用 0.3 mol/L 盐酸中和; 加水到 2 mL 后, 加入相同体积的氯仿重复萃取三次, 取水相过 0.22 μ m 微孔滤膜, 待 HPLC 进样

分析。配制各单糖浓度均为 1 mg/mL 的混合标品, 按照单标的测定方法进行处理, 并过 0.22 μ m 微孔滤膜, 待 HPLC 进样分析。取 MOWP、MOAP 样品, 配制成 10 mg/mL 的溶液, 加入 200 μ L 4 mol/L 三氟乙酸 (TFA), 121 °C 下水解 120 min; 冷却后加入甲醇溶解, 减压旋蒸, 重复三次去除 TFA; 然后按单标和混标衍生方法衍生、中和、萃取, 并过 0.22 μ m 微孔滤膜, 待 HPLC 进样分析。

色谱条件: 色谱柱为: Venusil MP-C18, 2.1 \times 30 mm, 5 μ m; 流动相: 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7) - 乙腈 (V:V, 83:17); 柱温: 30 °C; 检测波长: 250 nm; 流动相流速: 1 mL/min; 进样体积: 20 μ L。

1.2.5 山苦茶多糖的糖苷键连接方式测定

本文选用甲基化法^[8]研究山苦茶多糖的糖苷键连接方式。MOWP 和 MOAP 样品分别超声溶解于 DMSO, 加入碘甲烷避光甲基化反应 12 h, 然后甲基化衍生物经 4 mol/L 三氟乙酸 110 °C 水解反应 2 h, 再经硼氢化钠还原、吡啶乙酰化, 最终得到部分甲基化的糖醇乙酰衍生物, 过 0.22 μ m 微孔滤膜后待气质联用分析。

GC-MS 分析条件: 色谱柱: TR-5MS 弹性毛细管柱; 载气为: 99.99% 高纯度氮气; 升温程序: 初始柱温为 150 °C, 保持 2 min, 以 10 °C /min 的升温速度将柱温升至 180 °C, 保持 2 min, 再用 15 °C /min 升温速度升至 260 °C, 保持 5 min; 流速: 1 mL/min; 进样量: 1 μ L; 分流比: 10:1; 进样口温度: 250 °C; 质谱条件: 传输线温度为 280 °C; 离子源温度为 250 °C; 电子能量为 70 eV; 质量扫描范围为 m/z 33~500 u。

1.2.6 山苦茶多糖 DPPH 自由基清除能力测定^[10]

Trolox 标准曲线的绘制。Trolox 的浓度梯度设置为 0、1、5、10、12、15、18、20 μ g/mL。分别取 2 mL 不同浓度的 Trolox 溶液与 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液混匀, 置于暗处避光反应 30 min 后, 在 517 nm 波长处测吸光值。以 2 mL 水和 2 mL 无水乙醇作为基准调零。

样品的测定。将 MOWP 和 MOAP 配制成 0.5 mg/mL 的水溶液, 按标准曲线测定方法进行测定。将样品的吸光值带入标准曲线, 换算得到 DPPH 值, 即: 每 100 克样品相当于 Trolox 的量 (g Trolox equivalents /100 g)。

1.2.7 山苦茶多糖还原力测定^[11]

标准曲线的绘制。配置 100 mg/mL 的 Trolox 溶液, 并将其按照 0、10、20、40、60、80 μ g/mL 的浓度梯

度进行稀释处理。各取 1 mL 稀释液,加入 1 mL pH 6.6 的磷酸盐缓冲液和 1 mL 1% (m/V) 铁氰化钾溶液,漩涡混匀于 50 °C 的水浴锅中保温 20 min 后,加入 10% (m/V) 的三氯乙酸 (TCA) 溶液 1 mL,在 3000 g 离心 10 min 使沉淀完全,吸取上清液 1 mL,加入 1 mL 蒸馏水和 0.1% (m/V) 氯化铁溶液 0.2 mL,混匀,静置 10 min 后,在 700 nm 处测其吸光值。

样品的测定。将 MOWP 和 MOAP 配制成 0.5 mg/mL 的水溶液,按标准曲线测定方法进行测定。将样品的吸光值带入标准曲线,换算得到还原力值,即:每 100 克样品相当于 Trolox 的量(g Trolox equivalents/100g)。

1.2.8 山苦茶多糖 ORAC 值测定

ORAC 的评价方法参考 Lin 等^[8]的方法,并加以改进。以 Trolox 为标准品,建立标准曲线,Trolox 的浓度梯度为 0、20、40、60、80、100、200 μmol/L。在洁净的 96 孔板的微孔中分别加入一定浓度的山苦茶多糖样品 20 μL,加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 20 μL,以及浓度为 7 nmol/L 的荧光素溶液 20 μL,将 96 孔板放在酶标仪中,37 °C 下保温 15 min,加入 140 μL AAPH 后,开始计时反应并读数 (f₀),设定激发波长为 485 nm、发射波长为 538 nm,每 1 min 读一次数(f₁, f₂, ..., f₁₀₀),共读 101 次数(测定 100 min)。将每次读数连成曲线。AUC 表示曲线下的面积。

$$AUC=0.5 (f_0+f_{100}) + (f_1+f_2+\dots+f_{99})$$

$$Net\ AUC=AUC_{sample}-AUC_{blank}$$

Trolox 浓度与其 Net AUC 成正比,将样品 Net AUC 代入,换算得到 ORAC 值,即:每 g 样品相当于 Trolox 的量 (μmol Trolox equivalents/g)。

1.2.9 数据分析

每个实验重复三次,所有数据均使用均数±标准偏差 (S.D.) 来表示。使用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析处理,使用方差分析进行显著性分析, p<0.05 认为差异具有显著性。

2 结果与讨论

2.1 山苦茶多糖得率及组成成分分析

山苦茶多糖 MOWP 和 MOAP 的得率分别为 6.00 ±0.32%和 3.07 ±0.53%,山苦茶多糖 MOWP 和 MOAP 的总糖含量分别为 30.95 ±1.49%和 35.03 ±1.60%,而蛋白质和总酚含量均较低。可知,多糖提取前进行醇提,再经大孔树脂纯化及多次醇沉,能除去样品中大部分酚类物质。山苦茶多糖是山苦茶中一个重要组成成分,其活性对山苦茶的生理功能可能存在重要作用。

表 1 山苦茶多糖得率及组成成分分析

Table 1 Yield and chemical composition of two polysaccharide fractions from *M. oblongifolius*

多糖样品	得率 /%	总糖 /%	蛋白质 /%	总酚 /%
MOWP	6.00±0.32	30.95±1.49	1.24±0.01	3.36±0.05
MOAP	3.07±0.53	35.03±1.60	1.87±0.02	4.54±0.16

2.2 山苦茶多糖分子量分布的研究

本文通过高效凝胶渗透色谱法测定了 MOWP 和 MOAP 的分子量分布,分别如图 1a 及 1b 所示。计算分子量大小的标准曲线方程为:

$$\log Mw = 8.36e - 1.42eV + 8.41e^{-1}V^2 - 1.69e^{-2}V^3, R^2 = 0.9992$$

其中, Mw 代表样品分子量, V 代表淋洗体积。

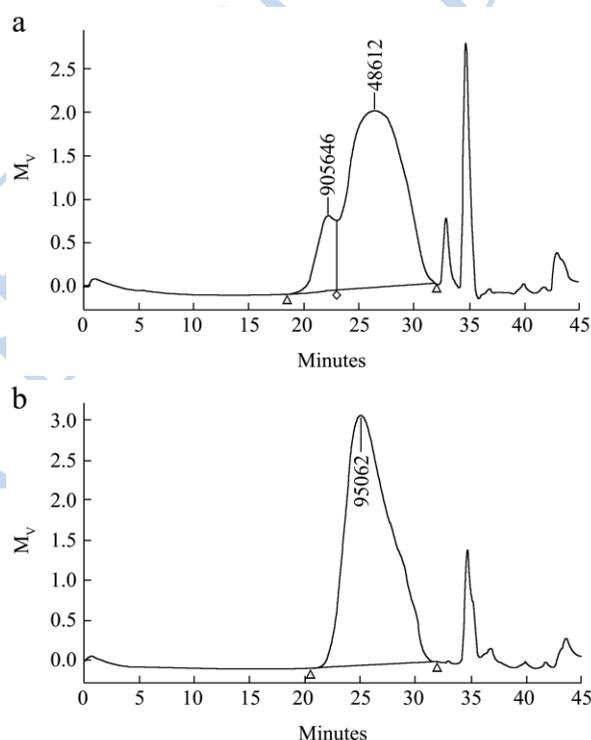


图 1 山苦茶多糖组分的分子量分布

Fig.1 The molecular weight distribution of polysaccharides from *M. oblongifolius*

注: a: MOWP 的分子量分布; b: MOAP 的分子量分布。

结果表明: MOWP 含有两个分子量分布不同的多糖,它们的平均分子量分别为 906 kDa 及 49 kDa; MOAP 的分子量分布比较集中,平均分子量为 95 kDa。多糖分子量分布中的单峰代表分子量分布均一的一类多糖,不代表一种多糖。多糖的活性与聚合度与分子量大小有关,这可能与多糖形成的高级构型有关。多糖分子量大小对多糖活性具有重要影响,适宜的分子量大小有利于多糖活性的发挥。据 Sun 等^[12]报道,分子量 100~200 kDa 的多糖具有很强的抗肿瘤

活性,而相同来源的分子量为 5~10 kDa 的多糖则没有活性,但有些分子量为 10 kDa 的多糖则具有很强的抗 HIV 的活性。而分子量在 6.55~256 kDa 的多糖均表现出较强的抗氧化活性。同时,多糖的活性还取决于其他结构因素,例如单糖组成和糖苷键连接方式。

2.3 山苦茶多糖单糖组成研究

本文采用 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法分别测定了山苦茶水提和碱提多糖的单糖组成,如表 2 所示。根据混合单糖标准品 PMP 衍生物在液相中的保留时间(图 2),可以分别确定 MOWP 和 MOAP 的单糖组成。结果表明:MOWP 和 MOAP 中都含有 5 种单糖和 2 种糖醛酸,包括甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和木糖以及葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸。根据这 5 种单糖和 2 种糖醛酸的摩尔比,可知木糖、半乳糖、葡萄糖是构成 MOWP 最主要的单糖,而 MOAP 则主要由甘露糖、木糖和半乳糖构成。由于 MOWP 和 MOAP 的单糖组成中都含有葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸,说明这两种多糖都是酸性杂多糖。据报道^[11],鱼腥草水溶性多糖也是一种酸性杂多糖,单糖组成同样主要由甘露糖、木糖、半乳糖、葡萄糖和鼠李糖组成,其体外抗氧化实验表明该水溶性多糖比其他溶剂提取的多糖具有更好的自由基清除能力和还原能力。

表 2 山苦茶多糖组分的单糖化学组成分析

Table 2 Chemical composition of two polysaccharide fraction from *M. oblongifolius*

多糖 样品	单糖组成/(mol%)						
	Man	Rha	GlcUA	GalUA	Glu	Gal	Xyl
MOWP	12.38	8.31	7.20	11.84	17.88	18.78	23.60
MOAP	27.99	5.51	9.35	8.31	6.51	18.47	23.86

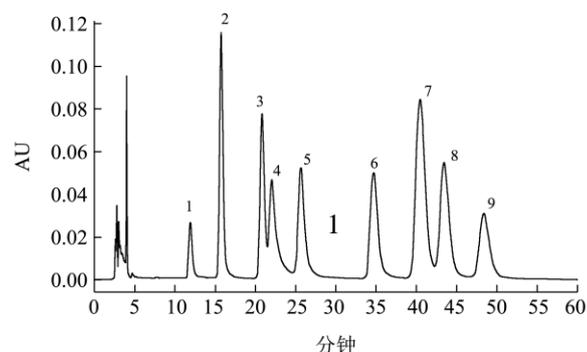


图 2 衍生化后的混合单糖标准品的液相色谱图

Fig.2 Liquid chromatogram of mixed monosaccharide standards after derivatization

注: 1-甘露糖 (RT: 11.917); 2-鼠李糖 (RT: 15.735); 3-葡萄糖醛酸 (RT: 20.817); 4-半乳糖醛酸 (RT: 22.025); 5-葡萄糖 (RT: 25.639); 6-半乳糖 (RT: 34.690); 7-木糖 (RT:

40.464); 8-阿拉伯糖 (RT: 43.456); 9-岩藻糖 (RT: 48.386)。

2.4 山苦茶粗糖苷键连接方式研究

为进一步研究山苦茶多糖的结构,通过碘甲烷甲基化多糖,水解后,经硼氢化钠还原,乙酸酐衍生化,经气相色谱-质谱法分析山苦茶多糖样品中糖苷键的连接方式,结果如表 3 所示。结果表明:山苦茶多糖中存在 13 种不同类型的糖苷键,但这 13 种糖苷键在 MOWP 和 MOAP 中的摩尔比不同。

MOWP 主要由 $\rightarrow 3$ -Xylf-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 3$)-Galp-(1 \rightarrow 以及 $\rightarrow 3$)-GlcP-(1 \rightarrow 残基按 10.24:8.07:7.74 的摩尔比构成,说明 MOWP 主要由木糖残基、半乳糖残基以及葡萄糖残基组成。MOAP 主要由 $\rightarrow 3$ -Xylf-(1 \rightarrow 、 $\rightarrow 3$)-Galp-(1 \rightarrow 以及 $\rightarrow 3$)-GlcP-(1 \rightarrow 残基按 9.51:6.27:4.37 的摩尔比构成,说明 MOAP 主要由木糖残基、半乳糖残基以及葡萄糖残基组成。 $\rightarrow 3,6$ -Manp-(1 \rightarrow 残基的出现,说明 MOWP 和 MOAP 这两种多糖为带有支链结构的多糖。

多糖主链上糖苷键的类型也是决定多糖活性的重要因素。构成山苦茶多糖的 $\rightarrow 3$ -GlcP-(1 \rightarrow 残基是具有抗氧化活性的剑麻多糖的重要组成成分^[10],苦艾活性多糖主要由 $\rightarrow 3$ -Galp-(1 \rightarrow 残基组成^[13],五味子活性多糖中含有 $\rightarrow 3,6$ -Manp-(1 \rightarrow 残基^[14]。

表 3 山苦茶多糖组分糖苷键连接方式

Table 3 Glycosidic linkage of two polysaccharide fractions from *M. oblongifolius*

连接方式	MOWP/mol%	MOAP/mol%
$\rightarrow 3$ -Xylf-(1 \rightarrow	10.24	9.51
$\rightarrow 3$ -Rhap-(1 \rightarrow	3.57	2.28
Manp-(1 \rightarrow	1.62	1.83
$\rightarrow 6$ -Manp-(2 \rightarrow	2.99	3.38
$\rightarrow 3,6$ -Manp-(1 \rightarrow	1.78	4.22
GlcP-(1 \rightarrow	1.60	1.00
$\rightarrow 3$ -GlcP-(1 \rightarrow	7.74	4.37
GlcUAp-(1 \rightarrow	1.00	1.54
$\rightarrow 3$ -GlcUAp-(1 \rightarrow	1.43	2.17
Galp-(1 \rightarrow	2.64	2.22
$\rightarrow 3$ -Galp-(1 \rightarrow	8.07	6.27
GalUAp-(1 \rightarrow	1.82	1.36
$\rightarrow 3$ -GalUAp-(1 \rightarrow	2.43	1.68

2.5 山苦茶多糖抗氧化活性研究

根据山苦茶多糖体外抗氧化方法 DPPH 法、还原力法及 ORAC 法的结果均表明, MOWP 和 MOAP 均有一定的抗氧化能力,但抗氧化能力不及 Vc,且对不

同自由基的清除能力不同。从表 4 我们可以发现, MOWP 的清除 DPPH 的能力大于 MOAP, 而 MOAP 的还原能力和 ORAC 的能力强于 MOWP。DPPH 法和 ORAC 法的测定结果表明: MOWP 和 MOAP 的抗氧化活性存在显著性差异 ($P>0.05$)。根据还原力法的测定结果, MOWP 和 MOAP 的抗氧化活性没有显著性差异 ($P<0.05$)。DPPH 法基于电子转移, 反映样品的还原能力; 还原力法是基于氧化还原反应, 即铁离子还原能力; ORAC 法是基于质子转移的抗氧化方法, 反映样品对氧自由基的清除能力。因此, 不同反应机制的抗氧化方法导致不同评价结果。同时, 分子量、单糖组成以及糖苷键连接方式等结构上的差异, 均是导致 MOWP 和 MOAP 抗氧化活性差异的原因。

表 4 山苦茶多糖抗氧化能力

Table 4 Antioxidant ability of two polysaccharide fractions from *M. oblongifolius*

多糖组分	DPPH 值 /(g Trolox equivalents /100 g)	还原力值 /(g Trolox equivalents /100 g)	ORAC 值 /(μ mol Trolox equivalents/g)
MOWP	14.72 \pm 0.50 ^a	8.98 \pm 0.21 ^a	271.67 \pm 11.23 ^a
MOAP	5.40 \pm 0.17 ^b	10.13 \pm 0.44 ^a	323.16 \pm 17.34 ^b
Vc	513.38 \pm 5.14 ^c	258.00 \pm 3.72 ^b	1734.80 \pm 7.15 ^c

注: 数据来自三次实验的平行值; 对于同种测定指标, 同列中标注不同角标者具有显著性差异 ($p<0.05$)。

山苦茶多糖是酸性多糖, 含有较多的葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸, 糖醛酸上的羧基对供氢和电子转移具有重要作用。同时, 山苦茶多糖分子上含有半缩醛活性羟基, 它们发生氧化还原反应、失去 H 质子后, 形成相对稳定的自由基, 最后分解成对人体无害的产物, 因此可以作为天然抗氧化剂。

3 结论

3.1 本文从山苦茶中分别水提、碱提得到两个多糖组分, 经大孔树脂除色, 得到 MOWP 和 MOAP, 提取率分别为 6.00% 和 3.07%。MOWP 分子量为 906 及 49 kDa, 主要由木糖、半乳糖、葡萄糖构成, 糖苷键组成主要由 \rightarrow 3)-Xylf-(1 \rightarrow 、 \rightarrow 3)-Galp-(1 \rightarrow 以及 \rightarrow 3)-GlcP-(1 \rightarrow 残基构成。MOAP 分子量为 95 kDa, 主要由甘露糖、木糖和半乳糖构成, 糖苷键组成主要由 \rightarrow 3)-Xylf-(1 \rightarrow 、 \rightarrow 3)-Galp-(1 \rightarrow 以及 \rightarrow 3)-GlcP-(1 \rightarrow 残基构成。

3.2 山苦茶多糖 MOWP 和 MOAP 具有一定的抗氧化能力, 但能力均不及 Vc。两者之间的抗氧化能力的差异在于 MOWP 具有较强的清除 DPPH 的能力, 而 MOAP 具有较强的还原能力和氧自由基吸收能力。分

子量的差异和单糖组成、糖苷键连接方式等结构上的不同都是造成其活性不同的原因。而要完整阐述山苦茶多糖分子结构与功能的关系, 则需要进一步研究多糖的结构。多糖的结构, 特别是高级结构的研究对揭示多糖的生理功能及构效关系十分重要。

参考文献

- [1] 韩碧群, 彭勇. 山苦茶的应用历史与研究现状[J]. 中国现代中药, 2013, 15(5): 434-438
HAN Bi-qun, PENG Yong. Traditional Uses and Modern Research of the Leaves of *Mallotus furetianus*: A review [J]. Modern Chinese Medicine, 2013, 15(5): 434-438
- [2] 刘国明, 李娟玲, 王小精, 等. 海南鹧鸪茶的民族植物学研究[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2007, 20(2): 167-172
LIU Guo-min, LI Juan-ling, WANG Xiao-jing, et al. A study on ethnobotany of *Mallotus Oblongifolius* in Hainan [J]. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2007, 20(2): 167-172
- [3] 林连波, 符小文, 艾朝晖, 等. 海南山苦茶叶的化学成分研究 I [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(6): 477-479
LIN Lian-bo, FU Xiao-wen, AI Chao-hui, et al. Studies on chemical constituents in leaves of *Mallotus furetianus* I [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006, 31(6): 477-479
- [4] 王久辉, 李佩琼, 林莲波, 等. 山苦茶利胆作用活性部位的筛选[J]. 中国热带医学, 2006, 6(1): 23-25
WANG Jiu-hui, LI Pei-qiong, LIN Lian-bo, et al. Screening of choleric effect of active fraction in *Mallotus furetianus* [J]. China Tropical Medicine, 2006, 6(1): 23-25
- [5] Liu Yueli, Wang Liqun, Wu Haitao, et al. Comparison of anti-atherosclerotic effects of two different extracts from leaves of *Mallotus furetianus* [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2011, 4(11): 878-882
- [6] 苏冰霞, 葛会林, 段云, 等. 山苦茶多糖提取工艺及其部分成分分析[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 51-55
SU Bing-xia, GE Hui-lin, DUAN Yun, et al. Extraction of Polysaccharides and Analysis of Ingredients in *Mallotus furetianus* Tea [J]. Food Science, 2013, 34(12): 51-55
- [7] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356
- [8] Lin Lianzhu, Zhuang Mingzhu, Zou Linwu, et al. Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from *Rabdosia serra*(MAXIM.) HARA leaf and stem and their

- antioxidant capacities [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 730-737
- [9] 戴军,朱松,汤坚,等.PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J].分析测试学报,2007, 26(2): 206-210
- DAI Jun, ZHU Song, TANG Jian, et al. Analysis of Monosaccharide Composition in Polysaccharides from *D.Salina* by Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2007, 26(2): 206-210
- [10] Zhang Xuehong, Liu Lina, Lin Cuiwu. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39:10-18
- [11] Tian Lingmin, Zhao Yan, Guo Chao, et al. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 537-544
- [12] Sun Liqin, Wang Changhai, Shi Qanjian, et al. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45(1): 42-47
- [13] Correa-Ferreira ML, Noieto GR, Petkowicz CLO. Artemisia absinthium and Artemisia vulgaris: A comparative study of infusion polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102:738-745
- [14] Zhao Ting, Mao Guanghua, Feng Weiwei, et al. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Schisandra sphenanthera*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105:26-33