

# 黑穗醋栗果实多糖清除自由基活性及结构初步研究

徐雅琴, 宋秀梅, 任中杰, 邵铁华, 张鑫

(东北农业大学理学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 以黑穗醋栗果实为原料, 分别用80%、70%、60%、50%、40%、30%乙醇醇沉并采用D4006大孔树脂初步纯化制备6种多糖。分别进行DPPH·、OH·和O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除试验, 结果表明6种多糖对自由基均有不同程度的清除作用, 其中80%醇沉制备的多糖(BCP-1)对三种自由基的清除作用最强。利用葡聚糖凝胶SephadexG-100对BCP-1纯化制备均一组分BCP-1-II, 采用气相色谱法和高效液相色谱法对BCP-1-II进行单糖组成分析及分子量测定。结果表明: BCP-1-II分子量为51880 u, 并且由4种单糖组成, 摩尔比为阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖=9.08:1.00:15.77:0.41。红外光谱扫描结果表明其含有多糖的特征吸收峰, 并且可能含有吡喃糖环及α-糖苷键。

**关键词:** 黑穗醋栗; 多糖; 自由基; 分子量; 单糖组成

**文章编号:** 1673-9078(2013)12-2821-2825

## Analysis of Structure and Free Radical Scavenging Activities of *Ribes nigrum* Polysaccharides

XU Ya-qin, SONG Xiu-mei, REN Zhong-jie, SHAO Tie-hua, ZHANG Xin

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Six kinds of crude polysaccharides were precipitated with 80%, 70%, 60%, 50%, 40% and 30% ethyl alcohol respectively from *Ribes nigrum* fruit. Then the DPPH·, OH· and O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging activities were investigated after purified by macroporous resin D4006. The results showed that six kinds of polysaccharides had certain scavenging activities and the polysaccharides precipitated with 80% ethanol (BCP-1) had stronger free radical elimination capacity. Homogeneous component (BCP-1-II) was prepared after further purification from BCP-1 by Sephadex G-100. The compositions of the main fraction BCP-1-II were identified and quantified by GC and HPLC. Results indicated that BCP-1-II had an average molecular weight of 51880 u and contained arabinose, mannose, glucose and galactose with the molar ratio of 9.08:1.00:15.77:0.41. Characteristic absorption of polysaccharide was shown in IR spectrum and the monomer of backbone of BCP-1-II might be α-pyranose.

**Key words:** *Ribes nigrum*; polysaccharide; free radical; molecular weight; monosaccharide composition

多糖, 又称多聚糖, 是由10个以上的单糖通过糖苷键连接而成的一种高分子化合物。研究表明, 多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂、抑菌、抗炎、抗病毒等多种生物活性<sup>[1]</sup>。目前多糖的研究较多的集中在药用植物多糖和真菌多糖, 而对于小浆果-黑穗醋栗果实多糖的研究相对较少<sup>[2~3]</sup>。

黑穗醋栗 (*Ribes nigrum* L.), 又名黑加仑, 俗名黑豆果, 是虎耳草科茶藨子属多年生小灌木。黑穗醋栗果实有广泛的经济用途, 既可以鲜食, 又可用黑穗醋栗果实为原料, 加工制成各种黑穗醋栗果酱、果冻、果酒、糖果、清凉饮料等系列产品。

收稿日期: 2013-08-28

基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目 (12531023); 黑龙江省研究生创新科研项目 (YJSCX2012-010HLJ)

作者简介: 徐雅琴 (1964-), 女, 教授, 主要研究方向为天然产物化学

黑穗醋栗果实不仅风味独特, 而且含有丰富的黄酮、花色苷、多糖、维生素、氨基酸、脂肪酸及矿物质元素等多种活性物质, 具有重要的生理活性<sup>[4~5]</sup>。研究表明黑穗醋栗多糖具有免疫调节作用、抗肿瘤活性及辅助降低血清胆固醇作用<sup>[6]</sup>。黑穗醋栗果实清除自由基活性的研究主要集中在黄酮、花色苷等组分上<sup>[7]</sup>。对于黑穗醋栗多糖清除自由基活性的研究报道较少, 而且只局限于粗多糖<sup>[8]</sup>。

目前对于多糖的提取常采用醇沉法, 而不同浓度的醇得到的多糖的分子量不同, 结构也不同, 而结构对多糖的活性影响较大。对于不同乙醇浓度醇沉所得黑穗醋栗果实多糖的体外清除自由基活性比较及80%乙醇醇沉所得多糖的结构尚未见报道。本试验通过不同乙醇浓度醇沉得到不同组分黑穗醋栗果实多糖, 进行体外清除自由基活性试验, 筛选得到高活性黑穗醋

栗多糖并对结构初步测定。此研究可为黑穗醋栗多糖的进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

黑穗醋栗(黑丰),东北农业大学园艺站;1,1-二苯基-2-苦味酰基自由基(DPPH)、单糖标准品D-葡萄糖、D-半乳糖、D-鼠李糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、果糖, Sigma公司;葡聚糖DextranT-10、T-40、T-70、T-110,北京拜尔迪生物公司;大孔吸附树脂D4006,南开大学化工厂;葡聚糖凝胶Sephadex G-100, Pharmacia公司进口分装;浓硫酸、苯酚、邻二氯菲、抗坏血酸、邻苯三酚等均为分析纯。

### 1.2 仪器

JY92-2D超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;TU-1901双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;FTS135型傅立叶变换红外光谱仪,美国BID-BAD公司;高效液相色谱仪岛津LC-10AVP,日本岛津公司;气相色谱仪,日本岛津公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黑穗醋栗果实多糖的制备

称取一定量黑穗醋栗果实匀浆,按液料比20:1(mL/g)加入去离子水,功率400 W,超声波提取25 min,提取液过滤、浓缩,分别用80%、70%、60%、50%、40%、30%乙醇进行沉淀,4℃冰箱静置过夜,所得沉淀冻干,得到6种紫红色黑穗醋栗果实粗多糖。

#### 1.3.2 黑穗醋栗果实多糖的初步纯化

选取大孔树脂D4006对1.3.1中所得6种粗多糖进行初步纯化,上样浓度4.0 mg/mL,上样流速1.0 mL/min,收集流出液;然后以去离子水为洗脱剂,洗脱流速1.0 mL/min,收集洗脱液。苯酚-硫酸法跟踪检测多糖含量,合并多糖流出液和洗脱液。所得多糖溶液浓缩、冻干得到6种灰白色多糖并依次命名为BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5及BCP-6。苯酚-硫酸法检测其纯度分别为57.2%、53.6%、56.9%、54.2%、50.4%、52.5%。紫外光谱扫描结果显示,6种多糖在280、260 nm处均无吸收,表明不含蛋白质、多肽及核酸,在520 nm处无吸收,表明不含花色苷等色素类物质。

#### 1.3.3 黑穗醋栗果实多糖的清除自由基试验

按照文献方法,对BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、

BCP-5及BCP-6分别进行DPPH清除试验<sup>[9]</sup>、OH·清除试验<sup>[10]</sup>、O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除试验<sup>[11]</sup>,选择清除自由基活性较高的组分进一步纯化,制备均一组分多糖。

#### 1.3.4 葡聚糖凝胶法分离纯化BCP-1的研究

称取5.0 g葡聚糖凝胶SephadexG-100,加适量去离子水煮沸6 h,超声脱气后装柱。用蒸馏水平衡72 h,当填料液面高度保持不变即可使用。

称取10 mg BCP-1溶于10 mL去离子水后上样,用去离子水进行洗脱,洗脱流速20 mL/h,每3 min为一管,每管1 mL收集洗脱液,苯酚-硫酸法跟踪检测至无糖检出,收集各主峰组分BCP-1-I、BCP-1-II、BCP-1-III。富集主峰BCP-1-II,冻干得到固体精多糖BCP-1-II。

#### 1.3.5 BCP-1-II的纯度鉴定

将BCP-1-II上样于平衡好的SephadexG-100柱上,以去离子水进行洗脱,苯酚-硫酸法检测多糖含量,绘制洗脱曲线并观察峰形。

#### 1.3.6 BCP-1-II的分子量测定

##### 1.3.6.1 色谱条件

日本Shimadzu公司高效液相色谱仪;色谱柱:Waters Ultrahydroe 2000, 7.8×300 mm;洗脱剂:超纯水;检测器:示差折光检测器RID-10A;数据处理工作站:Shimadzu CLASS-Vp工作站;进样量:10 μL;流速:1.0 mL/min,压力:1.4 MPa。

##### 1.3.6.2 BCP-1-II分子量的测定

精密称取各葡聚糖标准品配制成2.0 mg/mL溶液,0.45 μm微孔滤膜过滤后进样,体积10 μL,测定色谱峰保留时间,以保留时间为横坐标,标准品分子量的对数值为纵坐标,绘制标准曲线。称取精多糖BCP-1-II按上法操作,得到保留时间,计算分子量。

#### 1.3.7 BCP-1-II的单糖组成分析

##### 1.3.7.1 色谱条件

石英毛细管色谱柱;检测器:氢火焰离子化检测器(FID);程序升温:180℃(5℃/min)~220℃(5 min),220℃(10℃/min)-280℃(20 min);汽化温度280℃;检测器280℃;载气:高纯氮气。

##### 1.3.7.2 BCP-1-II的单糖组成分析

按照文献<sup>[12]</sup>方法,将BCP-1-II进行酸水解,将各单糖标准品进行衍生化后混合进样,气相色谱仪进行分析检测(肌醇作为内标),计算BCP-1-II的单糖组成。

#### 1.3.8 黑穗醋栗多糖的红外光谱分析

采用溴化钾压片法,在4000~500 cm<sup>-1</sup>范围内进行红外光谱扫描,鉴定主要官能团。

#### 1.3.9 数据处理

所有试验均进行三次重复,所有数据均以平均值±标准偏差(mean±SD)表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黑穗醋栗果实多糖的清除自由基活性

#### 2.1.1 DPPH·清除试验

BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5及BCP-6对DPPH·清除作用如图1。

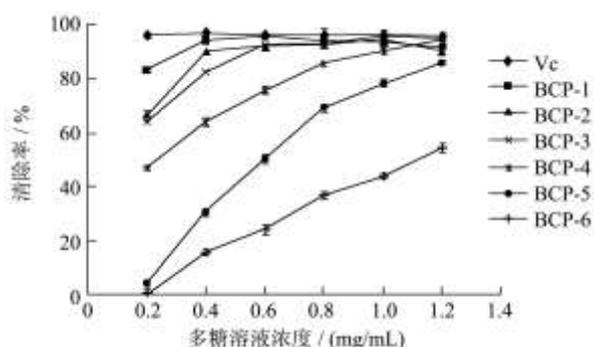


图1 6种多糖及Vc对DPPH·的清除作用

Fig.1 Elimination effect of six *Ribes nigrum* polysaccharides and Vc on DPPH·

注:BCP-1为80%乙醇醇沉多糖;BCP-2为70%乙醇醇沉多糖;BCP-3为60%乙醇醇沉多糖;BCP-4为50%乙醇醇沉多糖;BCP-5为40%乙醇醇沉多糖;BCP-6为30%乙醇醇沉多糖。

如图1所示,BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5、BCP-6及Vc在0.2~1.2 mg/mL范围内对DPPH·均具有不同程度的清除作用,清除率最高值分别为95.81%、94.29%、95.80%、94.54%、85.96%、54.51%和96.37%,但清除率均低于Vc,BCP-1、BCP-2及BCP-3对DPPH·清除作用较强,随着浓度的不断增加清除率达到最高值后变化不大。BCP-4、BCP-5及BCP-6对DPPH·的清除作用均表现出明显的浓度依赖性。

#### 2.1.2 OH·清除试验

BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5及BCP-6对OH·清除作用如图2。

如图2所示,BCP-1及Vc在0.2~1.2 mg/mL范围内对OH·具有较强的清除作用,清除率均随着浓度的增大而增大,最大值分别为57.66%和87.99%。BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5及BCP-6在该浓度范围内对OH·也具有一定的清除作用,清除率随着浓度的增大先升高后降低。BCP-2、BCP-3、BCP-4及BCP-6在浓度为0.6 mg/mL时清除率达到最大值,分别为28.30%、24.58%、20.87%和18.63%。BCP-5在浓度为0.4 mg/mL时清除率达到最大值17.18%。

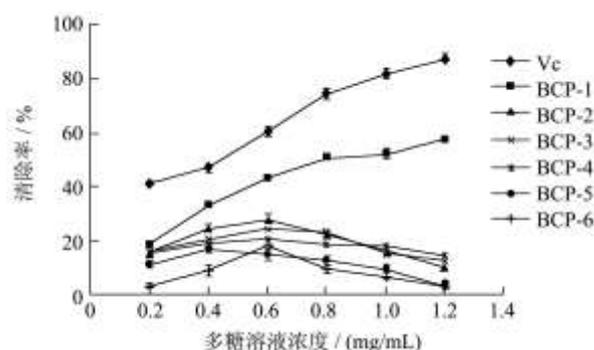


图2 6种多糖及Vc对OH·的清除作用

Fig.2 Elimination effect of six *Ribes nigrum* polysaccharides and Vc on OH·

#### 2.1.3 O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除试验

BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5及BCP-6对O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除作用如图3。

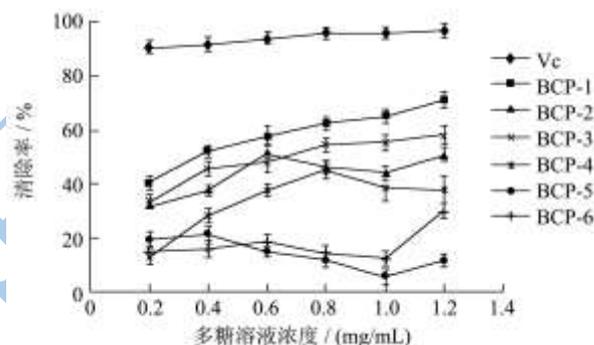


图3 6种多糖及Vc对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除作用

Fig.3 Elimination effect of six *Ribes nigrum* polysaccharides and Vc on O<sub>2</sub><sup>-</sup>

如图3所示,各多糖对O<sub>2</sub><sup>-</sup>均具有一定的清除作用。BCP-1、BCP-3及Vc在0.2~1.2 mg/mL范围内对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除率均随着浓度的增大而增大,最大值分别为71.05%、50.88%和96.84%。BCP-2和BCP-4对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的清除率随着浓度的增大先升高后降低,最大值分别为51.75%和44.74%。BCP-5和BCP-6的最高清除率分别为21.05%和29.82%。

综上所述,6种多糖对DPPH·、OH·、O<sub>2</sub><sup>-</sup>均有一定的清除作用,但是不同乙醇浓度醇沉所得到的6种多糖对自由基的清除作用不同,究其原因不同乙醇浓度醇沉得到多糖分子量不同,结构也不同。多糖的生物活性与其结构、分子量等有着密切的关系,因此6种多糖清除自由基的活性不同。在这6种多糖中80%乙醇醇沉所得BCP-1对3种自由基具有非常明显的清除作用,所以选择BCP-1进一步的纯化及结构鉴定。

## 2.2 SephadexG-100 纯化 BCP-1

用葡聚糖凝胶SephadexG-100纯化BCP-1结果如

图 4。

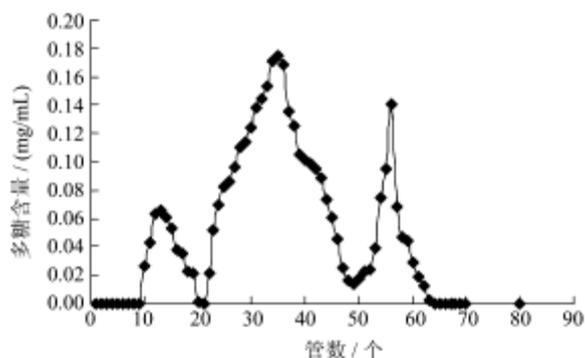


图 4 SephadexG-100 柱对 BCP-1 的洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of BCP-1 on SephadexG-100

如图 4 所示, 用去离子水洗脱得到 BCP-1-I、BCP-1-II、BCP-1-III 3 个多糖洗脱峰, 其中 BCP-1-II 多糖的含量较高。将 BCP-1-II 多次富集后浓缩, 冻干, 备用。

### 2.3 BCP-1-II 的纯度鉴定

SephadexG-100 葡聚糖凝胶检验 BCP-1-II 的纯化效果如图 5。

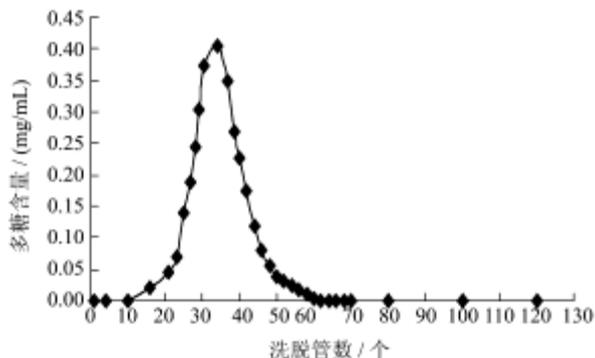


图 5 BCP-1-II 的 SephadexG-100 柱层析洗脱曲线

Fig.5 Elution curve of SephadexG-100 column chromatography of BCP-1-II

由图 5 可以看出, 洗脱峰为单一吸收峰, 峰形狭窄且对称, 且无拖尾现象说明 BCP-1-II 纯度较高。

### 2.4 BCP-1-II 分子量的测定

根据高效液相色谱分析得到各标准品 DextranT-10、DextranT-40、DextranT-70、DextranT-110 保留时间及其重均分子量  $M_w$ , 绘制以  $M_w$  的对数为纵坐标, 保留时间为横坐标的标准曲线。回归方程:  $y = -0.3406x + 11.964$  ( $R^2=0.9911$ )。BCP-1-II 的液相色谱图如图 6。

由图 6 可知, BCP-1-II 保留时间 21.178 min, 根据回归方程计算可得 BCP-1-II 的重均分子量为 51880 u。

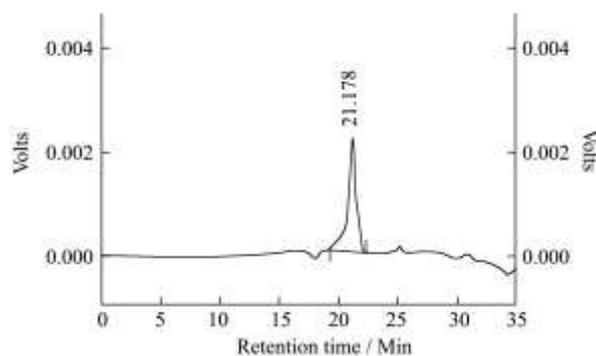


图 6 BCP-1-II 的液相色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of BCP-1-II

### 2.5 BCP-1-II 的单糖组成分析

各单糖衍生物的气相色谱图见图 7, BCP-1-II 的气相色谱图见图 8。

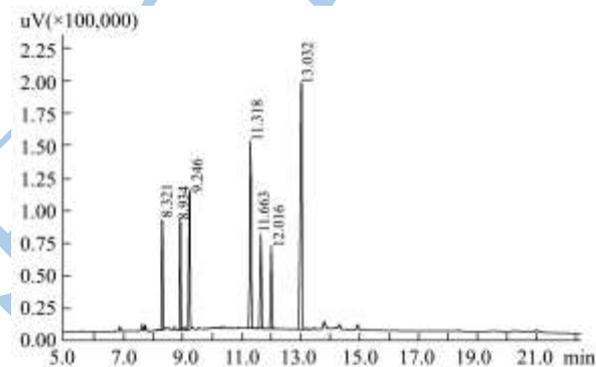


图 7 标准单糖经乙酰化后的气相色谱图

Fig.7 GC profile of standard monosaccharides with acetylation

注: 从左至右依次为 1.鼠李糖; 2.阿拉伯糖; 3.木糖; 4.甘露糖; 5.半乳糖; 6.葡萄糖; 7.内标物肌醇。

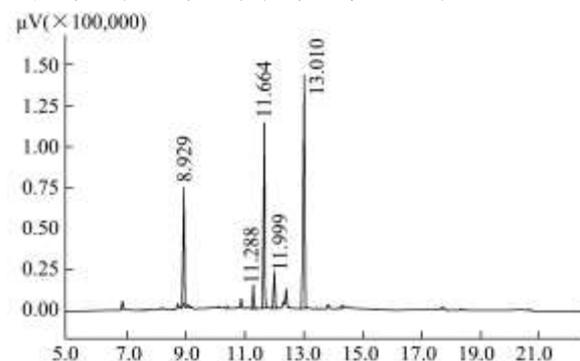


图 8 BCP-1-II 经酸水解、乙酰化后的气相色谱图

Fig.8 GC profile of BCP-1-II with acid hydrolysis and acetylation

各单糖标准品及 BCP-1-II 的气相色谱分析结果见表 1。

气相色谱分析结果表明, 黑穗醋栗多糖 BCP-1-II 由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其摩尔比为阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖=9.08:1.00:

15.77:0.41。

表 1 单糖标准品及 BCP-1-II 水解物的气相色谱分析结果

Table 1 Gas chromatography results of BCP-1-II and monosaccharide standards

单糖标准品	标准品出峰时间/min	峰面积	黑穗醋栗精多糖 BCP-1-II		
			出峰时间	峰面积	摩尔比
鼠李糖	8.321	202815			
阿拉伯糖	8.934	189245	8.929	145967	9.08
木糖	9.246	237933			
甘露糖	11.318	394560	11.288	40940	1.00
葡萄糖	11.663	195411	11.664	314254	15.77
半乳糖	12.016	180563	11.999	60849	0.41
肌醇(内标)	13.032	700293	13.010	508015	

### 2.6 BCP-1-II 的红外光谱分析

BCP-1-II 的红外光谱图见图 9。

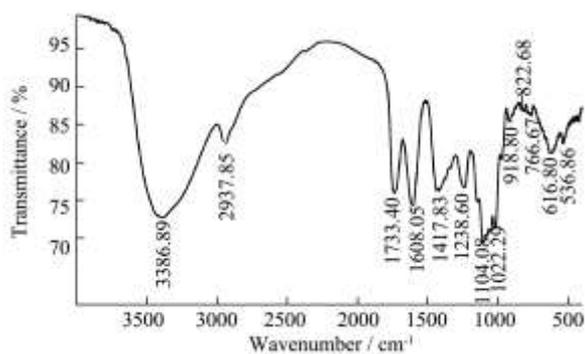


图 9 BCP-1-II 的红外光谱图

Fig.9 IR spectra of BCP-1-II

从图 9 中可以看出，在 4000~500  $\text{cm}^{-1}$  范围内，BCP-1-II 表现出明显的多糖特征吸收峰。3386.89  $\text{cm}^{-1}$  处强且宽的吸收峰为多糖中 O-H 的伸缩振动，2937.85  $\text{cm}^{-1}$  处为 C-H 伸缩振动，1733.40  $\text{cm}^{-1}$  和 1608.05  $\text{cm}^{-1}$  处为酯化羰基 C=O 和羧基 COO- 的伸缩振动，1417.83  $\text{cm}^{-1}$  处为羧基的伸缩振动，说明多糖 BCP-1-II 组分中存在糖醛酸，这与硫酸-咔唑法测定结果相吻合（文中没有列出），1022.29  $\text{cm}^{-1}$  处为糖环内 C-O 的伸缩振动，918.80  $\text{cm}^{-1}$  处显示吡喃环的非对称环伸缩振动，822.88  $\text{cm}^{-1}$  处为  $\alpha$ -糖苷键的特征峰。

### 3 结论

本文从黑穗醋栗(黑丰)中提取多糖，分别用 80%、70%、60%、50%、40%、30% 乙醇醇沉并初步纯化后得到不同多糖 BCP-1、BCP-2、BCP-3、BCP-4、BCP-5 及 BCP-6，清除自由基活性试验结果表明，6 种多糖对 DPPH·、OH·、 $\text{O}_2\cdot$  均有不同程度的清除作用，其中 BCP-1 对三种自由基的清除作用最强，因此选择

BCP-1 进行研究。通过葡聚糖凝胶对 BCP-1 进行纯化，得到均一组分多糖 BCP-1-II。其分子量为 51880 u，单糖组成为阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖，其摩尔比为 9.08:1.00:15.77:0.41。红外光谱扫描结果表明其含有多糖的特征吸收峰，并且可能含有吡喃糖环及  $\alpha$ -糖苷键。

### 参考文献

- [1] Aizhen Zong, Hongzhi Cao, Fengshan Wang. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research [J]. Carbohydrate polymers, 2012, 90(4): 1395-1410
- [2] Liqun Yang, Li-Ming Zhang. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 349-361
- [3] Hauke Hiltz, Edwin J Bakx, Henk A Schols, et al. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries-characterisation in berries, juice, and press cake [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(4): 477-488
- [4] Tatsuo Suzutani, Masahiro Ogasawara, Itsuro Yoshida, et al. Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L [J]. Phytother Research, 2003, 17(6): 609-613
- [5] Jessica Tabart, Thierry Franck, Claire Kevers, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1116-1122
- [6] Ryoji Takata, Reiko Yamamoto, Takaaki Yanai, et al. Immunostimulatory effects of a polysaccharide-rich substance with antitumor activity isolated from black currant (*Ribes nigrum* L.) [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69(11): 2042-2050
- [7] Na Jia, Youling L Xiong, Baohua Kong, et al. Radical scavenging activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 382-390
- [8] 王晓燕.黑加仑多糖抗氧化及降血脂实验研究[D].新疆:新疆医科大学,2009  
WANG Xiao-yan. The Experimental study on antioxidative and hypolipidemic of blackcurrant polysaccharide [D]. Xinjiang: Xinjiang Medical University, 2009
- [9] Rufeng Wang, Ping Chen, Fang Jia, et al. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Panax japonicus* C.A. Meyer [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(4): 1402-1406
- [10] Liangshuan Zhang, Xuan Wang, Lulu Dong. Antioxidation and

- antiglycation of polysaccharides from *misgurnus anguillicaudatus* [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 183-187
- [11] 朱振元,原静,李盛峰,等.古尼虫草多糖硫酸酯化修饰及其抗氧化活性[J].现代食品科技,2011,27(1): 1-5
- ZHU Zhen-yuan, YUAN Jing, LI Sheng-feng, et al. Preparation of sulfured polysaccharides from *Cordyceps gunnii* and its anti-oxidation activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(1): 1-5
- [12] 聂永心,姜红霞,苏延友,等.黄伞子实体多糖的提取纯化及单糖组成分析[J].食品与发酵工业,2010,36(4): 198-200
- NIE Yong-xin, JIANG Hong-xia, SU Yan-you, et al. Purification and Monosaccharide Composition Analysis of Polysaccharide from Fruit Bodies of *Pholiota adiposa* [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(4): 198-200

现代食品科技