

白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究

白海娜¹, 王振宇^{1,2}, 刘瑞海^{1,3}, 赵海田¹, 张华¹

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090) (2. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (3. 康奈尔大学食品科学学院, 纽约伊萨卡 14853-7201)

摘要: 本文研究了白藜芦醇与黑木耳多糖对 ABTS⁺ 自由基清除的协同作用。采用 ABTS⁺ 自由基清除实验与 Chou-Talalay 联合指数 (CI) 方法相结合, 对白藜芦醇和黑木耳多糖单独和复配的清除效果、联合指数 (CI) 及剂量减少指数 (DRI) 进行分析评价, 结果显示: 单独白藜芦醇和黑木耳多糖的 IC₅₀ 值分别为 3.56 mg/L、61.46 mg/L, 复配 (质量比 1:1) 后的 IC₅₀ 值为 2.50 mg/L, 表明复配物对 ABTS⁺ 自由基有明显的清除作用; 联合指数 (CI) 分析, 从清除率 5% 至 97% 相互作用指数都小于 1, 且随着清除率的增加, 联合指数 (CI) 也随之降低; 剂量减少指数 (DRI) 分析, 从清除率 5% 至 97% 剂量减少指数都大于 1, 且随着清除率的增加, 剂量减少指数 (DRI) 也随之增加, 证实质量比 1:1 时, 白藜芦醇与黑木耳多糖之间存在着显著协同抗氧化效应。

关键词: 白藜芦醇; 黑木耳多糖; 协同; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2014)3-64-68

Synergistic ABTS Radical Scavenging Activity of Resveratrol with *Auricularia auricular* Polysaccharides

BAI Hai-na¹, WANG Zhen-yu^{1,2}, LIU Rui-hai^{1,3}, ZHAO Hai-tian¹, ZHANG Hua¹

(1. College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

(2. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(3. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca New York 14853-7201, USA)

Abstract: ABTS⁺ radical scavenging experiments and Chou-Talalay combination index (CI) method was used to evaluate the scavenging effects, combination index (CI) and dose reduction index (DRI) of resveratrol (RES) and *Auricularia auricular* polysaccharides (AAP) individually as well as combination of them. The results showed that IC₅₀ values of RES and AAP were 3.56 mg/L and 61.46 mg/L, respectively, while IC₅₀ value of the combination (mass ratio 1:1) was only 2.50 mg/L, indicating the combination had significant ABTS⁺ radical scavenging effect. CI analysis displayed that the clearance rate of 5~97% interaction index was less than 1. With the removal rate increased, CI was also reduced. DRI analysis demonstrated that the clearance rate of 5~97% DRI was greater than 1. With the removal rate increased, DRI also increased. Therefore, it was confirmed that RES and AAP had significant synergistic antioxidant effect when the mass ratio was 1:1.

Key words: resveratrol; *Auricularia auricular* polysaccharides; synergistic; antioxidant activity

随着科技的发展, 现代技术已渗透到生活中的各个领域, 核能、放射治疗、各种家用电器、通讯、汽车的广泛使用等, 给人们生活带来福利的同时, 也存在着巨大的潜在危害。长期接触上述环境对身体处于氧化应激状态, 产生损伤, 甚至能引起一系列疾病。有人建议, 使用食品的天然抗氧化剂比人工合成的抗

收稿日期: 2013-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000831); 国家自然科学基金项目 (31170510); 黑龙江省自然科学基金项目 (QC2013C012)

作者简介: 白海娜 (1984-), 女, 在读博士, 天然产物开发与功能研究

通讯作者: 王振宇 (1957-), 男, 博士, 教授, 植物化学物与人体健康

氧化剂是更安全的和健康^[1]。

白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是存在于植物中的天然抗氧化剂, 主要通过清除或抑制自由基生成, 抑制脂质过氧化、调节抗氧化相关酶活性等机制发挥抗氧化作用。黑木耳 (*Auricularia auricular* polysaccharides, AAP) 的在我国资源丰富, 它的产量占据世界首位, 属于药食同源真菌, 不仅具有很高的营养价值, 还具有多种药理功能。据文献报道, 黑木耳多糖具有调解人免疫系统、抗氧化、降血脂^[2]、抗肿瘤、增强胃肠功能和抗皮肤老化^[3]等活性, 因此对于它的开发和利用得到越来越多的关注。最近, 有报道黑木耳多糖与

鹿茸提取物对糖尿病小鼠血糖血脂具有协同作用^[4]。另外,也有报道茶多酚和茶多糖对糖尿病防治的协同作用^[5],目前对多酚和多糖的协同研究报道较少。

尽管白藜芦醇和黑木耳多糖都具有较好的抗氧化效果,但复合抗氧化剂相比于单一抗氧化剂抗氧化活性高、成本低,以及可避免抗氧化剂的过多使用可能带来的安全问题,所以本研究对白藜芦醇与黑木耳多糖进行复配,利用周氏导出的中效原理和公式及导出的多种药物计量公式和联合指数,来分析评价药物联用后的效果。研究其协同抗氧化作用,为复合抗氧化剂应用于其他作用研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料

ABTS 购自 Sigma 公司。白藜芦醇购自郑州荔诺生物科技有限公司,纯度为 98% 以上。黑木耳 (*Auricularia auricular*) 购自中国哈尔滨市南极市场。

TDZ4-WS 型低速离心机,长沙湘麓离心机仪器有限公司; Sp-752PC 型紫外可见分光光度计,北京光谱仪器有限公司; R205 型旋转蒸发器,上海申胜生物技术有限公司。

1.2 黑木耳多糖的提取

按照文献^[6],称取 30 g 黑木耳粉,按 1:60 物料比,加入 1800 mL 蒸馏水浸泡,400 W 超声 1 h,90 °C 水浴 3~5 h,4000 r/min,离心 5 min,收集上清液,黑木耳粉再重复提取一次,合并上清液,使用真空旋转蒸发浓缩体积至 1/4,加入三倍体积的 95% 乙醇沉淀 24 h,4000 r/min,离心 5 min,获得粗多糖,干燥。干粉用蒸馏水 80 °C 水浴下溶解,然后用 sewage 法除蛋白,按其体积的 1/5 加入 sewage 试剂(氯仿:正丁醇=5:1),4000 r/min,离心 15 min,除去中间变性蛋白和溶剂层,重复操作 4 次以上,直至除尽蛋白。将除尽蛋白的上清液减压浓缩,加入 3 倍体积 95% 乙醇沉淀 24 h,40 °C 真空干燥,得供试样品。

粗多糖用蒸馏水溶解,采用苯酚-硫酸标准曲线法,紫外分光光度计上检测出粗多糖的葡萄糖浓度为 51% (w/w)。经气相色谱与质谱联用仪分析表明,它由 D-核糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖 (0.43:0.16:0.26:6.77:40.77:37.93:32.88) 组成。经液相色谱与质谱联用仪测定提取物的平均分子量为 330630。

1.3 ABTS⁺ 自由基清除能力的测定

清除 ABTS⁺ 自由基的测定是参照 Re Roberta 等人的方法,并稍作修改^[7]。ABTS 阳离子自由基的产生是通过 ABTS 原液与过硫酸钾在室温黑暗中反应 12~16 h 完成,在供氢抗氧化剂存在的情况下,ABTS⁺ 自由基将会减少。将 7 mmol/L ABTS⁺ 和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾(终浓度)混合,在室温避光条件下静置过夜,将生成的 ABTS⁺ 溶液用水稀释,使其在 30 °C,734 nm 波长下的吸光度为 0.7±0.02,即得到 ABTS⁺ 工作液。取不同浓度的白藜芦醇、黑木耳多糖或复配物(白藜芦醇与黑木耳多糖质量比 1:1) 溶液 1.5 mL,加入试管中,在分别加入 1.5 mL 的 ABTS⁺ 溶液,空白管用蒸馏水代替样品溶液,对照管用蒸馏水代替 ABTS⁺ 工作液,并做重复试验,室温避光放置 6 min,于波长 734 nm 下测定其吸光度。每份样品平行操作 3 次,计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100 \quad (1)$$

注: $A_{\text{空白}}$ 为加入 1.5 mL ABTS⁺ 溶液与 1.5 mL 蒸馏水; $A_{\text{样品}}$ 为 1.5 mL ABTS⁺ 溶液与 1.5 mL 样品溶液; $A_{\text{对照}}$ 为 1.5 mL 样品溶液与 1.5 mL 蒸馏水。

1.4 中效原理

采用剂量-效应分析的 Chou and Talalay 公式^[8]中效原理,通过用不同稀释浓度的剂量-效应曲线,计算白藜芦醇和黑木耳多糖单独和联用使用的效果。

$$f_a / f_u = (D / D_m)^m \quad (2)$$

注: D 是剂量, D_m 是产生中度效果的剂量,这是相当于有效剂量的中值剂量 (EC_{50}), f_a 是反应系统中的 D 剂量的有效部分, $f_u = 1 - f_a$, m 是剂量-效应曲线的系数。

基于 Chou and Talalay 的中效方程的对数形式:

$$\log(f_a / f_u) = m \log(D) - m \log(D_m) \quad (3)$$

根据定义, $f_a + f_u = 1$, 方程 (1) 可以演化出多种公式:

$$f_a = 1 / [1 + (D_m / D)^m] \quad (4)$$

$$D = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m} \quad (5)$$

1.5 联合指数 (CI)

经典的等效线图方程的基础上的联合指数 (CI) 已用于组合药物的数据分析,公式如下:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{1}{(DRI)_1} + \frac{1}{(DRI)_2} \quad (6)$$

D_1 和 D_2 是药物 1 和药物 2 联合作用抑制率为 X% 时的作用浓度, D_{x1} 和 D_{x2} 是药物 1 和药物 2 单独应

用抑制率为 X%时的作用浓度, DRI 是剂量减少指数, 对组合数据进行分析, $CI < 1$ 、 $CI = 1$ 和 $CI > 1$ 分别表示为协同作用、加和作用或拮抗作用^[8-9], DRI 是指剂量减少指数。

1.6 分析软件

将测得的药物浓度和清除效果, 用 Calcsyn 软件处理, 求出联合药物之间相互作用的有关参数, 各清除水平的联合指数 (CI) 和剂量减少指数 (CRI)。

2 结果与讨论

2.1 白藜芦醇和黑木耳多糖单独及复合物对 ABTS⁺ 自由基清除效果

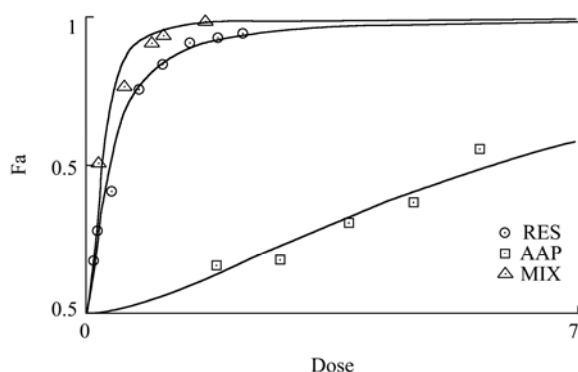


图 1 白藜芦醇和黑木耳多糖单独及复合物对 ABTS⁺ 自由基清除能力的剂量-作用图

Fig.1 Effect of RES, AAP, and RES in combination with AAP in scavenging ability of ABTS⁺ radical

注: RES-白藜芦醇; AAP-黑木耳多糖; MIX-复合物; S-清除率; Fa-作用效果; Dose: 剂量 ($\mu\text{g/mL}$)。

如图 1 所示, 白藜芦醇和黑木耳多糖单独及复合物对 ABTS⁺ 自由基的清除能力随浓度增加而增强, 具有明显的量效关系, 并且白藜芦醇对 ABTS⁺ 自由基的清除能力, 显著高于黑木耳多糖, 复配物的清除能力又高于白藜芦醇。当单独使用浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 白藜芦醇时, 清除率为 17.90%; 当使用单独浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 黑木耳多糖时, 清除率为 16.43%, 而当联合使用白藜芦醇 ($1 \mu\text{g/mL}$) 和黑木耳多糖 ($1 \mu\text{g/mL}$) 时, 清除率为 51.18%, 远大于它们相同剂量的作用之和, 说明该剂量下白藜芦醇与黑木耳多糖具有协同效果。

2.2 白藜芦醇和黑木耳多糖对 ABTS⁺ 自由基清除效果相互作用分析

如图 2a 所示, 根据 1.4 (3) 公式, 可以计算得

出不同清除效果的剂量, 当作用效果达到 0.5 时, 即 Y 轴为零时, 从 X 轴的截距, 我们可以看出它们 EC_{50} 值, 若以 EC_{50} 值来衡量它们的活性大小, 顺序为复合物 > 白藜芦醇 > 黑木耳多糖; 如图 2b 所示, 从清除率 5% 至 97% 相互作用指数都小于 1, 且随着清除效果的增加, CI 也随之降低, 表明白藜芦醇和黑木耳多糖的协同抗氧化效果, 是随作用效果的增加, 协同效果随之增强, 具有很好的协同应用前景。

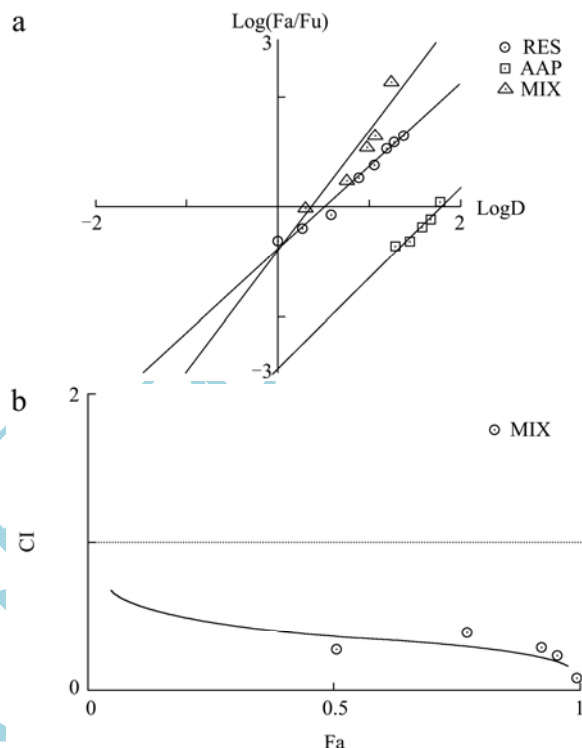


图 2 白藜芦醇和黑木耳多糖组合的相互作用的中效作用图 (a) 和联合指数作用图 (b)

Fig.2 Median- effect (a) and CI- effect (b) plots for interactions between RES and AAP combination.

2.3 白藜芦醇和黑木耳多糖对 ABTS⁺ 自由基清除效果的剂量减小指数

DRI 是指达到一定抑制率所需单一药物的剂量与联合用药时该药的剂量比, 若比值愈大, 表明要达到单一药物相同的疗效, 联合用药时该药的剂量降低愈显著, 由于降低了该药的剂量, 必然减少该药对机体的毒性。分析公式 1.4 (6), 可以发现 $DRI > 1$, 并不一定表示协同, 而 $CI < 1$ 必定表示协同作用。白藜芦醇和黑木耳多糖的 DRI 值, 从 $Fa > 0.05$ 时开始, 均大于 1, 且随作用效果增强, DRI 增大 (见表 1)。相同的清除作用效果下, 黑木耳多糖的剂量显著高于白藜芦醇。通过作用效果与剂量减少指数的对数分析 (图 3), $\text{Log}(DRI)$ 值均大于 0, 且黑木耳多糖显著高于白

藜芦醇,说明对黑木耳多糖单一药物的减药量更大。

表1 白藜芦醇和黑木耳多糖不同清除效果下的浓度及剂量减少指数(DRI)

Table 1 RES and AAP cleared under the effect of different concentrations and dose reduction index (DRI)

Fa	RES Dose /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	AAP Dose /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RES DRI	AAP DRI
0.05	0.50	10.29	1.56	32.17
0.1	0.82	16.20	1.82	35.84
0.2	1.41	26.50	2.14	40.30
0.3	2.02	36.75	2.39	43.56
0.4	2.71	48.05	2.62	46.43
0.5	3.55	61.46	2.84	49.23
0.6	4.65	78.60	3.09	52.20
0.7	6.25	102.78	3.38	55.64
0.8	8.95	142.54	3.77	60.14
0.9	15.36	233.16	4.45	67.62
0.97	36.01	506.62	5.78	81.33

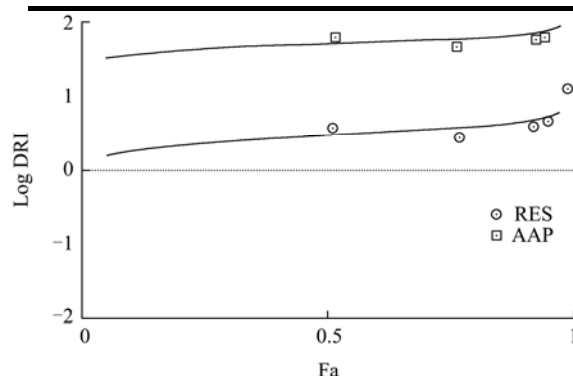


图3 白藜芦醇和黑木耳多糖组合的相互作用效应与剂量减少指数对数作用图

Fig.3 Fa-Log(DRI) plots for interactions between RES and AAP combination

3 讨论

ABTS⁺清除实验是测定化合物抗氧化能力的重要方法^[10],白藜芦醇与黑木耳多糖的组合对ABTS⁺(CI<1)清除具有较好的协同抗氧化效果。研究白藜芦醇与黑木耳多糖抗氧化的相互作用关系,首先要了解它们的结构,本实验选取的白藜芦醇属于二苯乙烯类多酚化合物,黑木耳粗多糖是聚合糖高分子碳水化合物,经高效液相分析,单糖组成包括主要是酸性粘多糖,由葡萄糖、甘露糖、半乳糖和木糖等单糖组成^[11]。前期研究发现,比较几种多酚结构与黑木耳多糖的复配,发现二苯乙烯类结构与多糖的存在协同效果,这可能与其结构有关。两种或两种以上的抗氧化剂复配使用时,各种抗氧化剂在抗氧化之后,也可能使得

产生的游离基相互作用生成新的酚类化合物,继续发挥抗氧化作用,使其抗氧化性能得以增强^[12]。Peyrat-Maillard MN等人研究体外氧化体系下的迷迭香酸与槲皮素或咖啡酸存在协同抗氧化作用,这些复合物协同作用可能是由于抗氧化剂之间的修复机制,分子上可能形成的稳定的分子间配合物的化学结构^[13]。Boath A S等人研究黑醋栗和花秋浆果多酚体外协同抑制 α -葡萄糖苷酶活性,分析其作用可能是两种多酚类的成分,作用不同的活性位点,而最终产生的协同抑制效果^[14]。目前关于抗氧化协同机理主要是抗氧化剂之间修复再生作用,认为复合抗氧化剂可以相互修复再生,形成氧化还原循环系统,对于它们之间相互作用机制还有待于进一步的研究。

4 结论

这项研究的结果表明,葡萄籽中的白藜芦醇和黑木耳多糖复合物,对清除ABTS⁺自由基效果,与单一成分相比更有效,人们可以通过改变日常膳食搭配来增强机体自身的抗氧化能力。以后有必要对于在体内模型中,使用葡萄籽中的白藜芦醇和黑木耳多糖复合物,为阐明相互作用机制进行深入研究。

参考文献

- [1] Elmastas M, Isildak O, Turkecul I, et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20(3-4): 337-345
- [2] Jiangwei M, Zengyong Q, Xia X. Optimisation of extraction procedure for black fungus polysaccharides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(3): 1061-1068
- [3] Peng X, Li Q, Ou L, et al. GC-MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its inhibition against skin aging in mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(2): 304-307
- [4] 于伟,王振宇,刘瑜,等.鹿茸提取物与黑木耳多糖协同作用对糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J].东北林业大学学报,2010,38(6):101-103
Yu w, Wang Z Y, Liu Y, et al. Synergic Effect of Extract from Deer Antler Velvet and Auricularia auricula Polysaccharide on Serum Glucose and Lipid in Diabetic Mice Induced by Alloxan [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2010, 38(6): 101-103
- [5] 李星亚,汪东风,王林戈,等.茶多糖和茶多酚对糖尿病的协

- 同防治作用[J].食品研究与开发,2013,34(11):72-76
- Li X Y, Wang D F, Wang L G, et al. Synergistic-protective Effects of Tea polysaccharides and Tea polyphenols on Diabetes [J]. Food Research And Development, 2013, 34(11): 72-76
- [6] Zhang H, Wang Z, Zhang Z, et al. Purified *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP I-a) prevents oxidative stress in an ageing mouse model [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 638-648
- [7] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [8] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. Pharmacological Reviews, 2006, 58(3): 621-681
- [9] Chou T C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method [J]. Cancer Research, 2010, 70(2): 440-446
- [10] Kim D O, Lee K W, Lee H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(13): 3713-3717
- [11] 刘大政.黑木耳多糖的分离纯化及结构分析[D].长春:东北师范大学,2008
- Liu D Z. Fracitonation and structural analyses of the polysaccharides from *Auricularia auricala* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2008
- [12] 盛雪飞, 彭燕, 陈健初.天然抗氧化剂之间的协同作用研究进展[J].食品工业科技,2010,31(7):414-417
- Sheng X F, Peng Y, Chen J C. Research progress in synergistic effect between natural antioxidants [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(7): 414-417
- [13] Peyrat-Maillard M N, Cuvelier M E, Berset C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2003, 80(10): 1007-1012
- [14] Boath A S, Stewart D, Mcdougall G J. Berry components inhibit alpha-glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 929-936