

# 啤特果多糖分离纯化及抗氧化活性研究

刘晓风<sup>1</sup>, 刘琳<sup>1</sup>, 王永刚<sup>1</sup>, 马燕林<sup>1</sup>, 张伟杰<sup>1</sup>, 朱新强<sup>2</sup>, 王春梅<sup>2</sup>, 王晓力<sup>2</sup>

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

(2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

**摘要:** 以啤特果为原料, 经水提醇沉、脱色脱脂、除蛋白, DEAE-52阴离子交换柱纯化获得啤特果多糖 (PTGP1), 利用光谱、色谱和电镜等技术对PTGP1的结构、组成及分子量进行了分析; 评价了PTGP1的体外抗氧化性能。结果表明, PTGP1是还原性多糖, 不含淀粉、花色苷等物质, 表面呈孔洞褶皱纤维状结构, 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 摩尔比为3.06:2.32:1.56:4.87:3.28:2.18, 含有典型的多糖红外吸收峰, 是一种以 $\alpha$ -糖苷键为主的吡喃糖; HPSEC-LLS分析结果表明PTGP1是由3种不同组分组成的聚合物构成, 主要组分占76%, 重均分子量为 $5.81 \times 10^5$  Da; 抗氧化试验结果表明, PTGP1的还原能力是Vc的0.44倍, 对羟自由基、超氧阴离子和DPPH自由基清除率呈剂量效应, 其 $IC_{50}$ 分别为1.24 mg/mL, 1.05 mg/mL和2.13 mg/mL, 能有效抑制羟自由基引起的脂质过氧化和小鼠肝匀浆MDA的生成。

**关键词:** 啤特果; 多糖; 分离与纯化; 理化性质; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2014)7-179-186

## Purification, Identification and the Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Pyrus sinkiangensis*

LIU Xiao-feng<sup>1</sup>, LIU Lin<sup>1</sup>, WANG Yong-gang<sup>1</sup>, MA Yan-lin<sup>1</sup>, ZHANG Wei-jie<sup>1</sup>, ZHU Xin-qiang<sup>2</sup>, WANG Chun-mei<sup>2</sup>, WANG Xiao-li<sup>2</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

(2. Lanzhou Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, China Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** The polysaccharides of Piteguo (PTGP1) extracted by water-extraction and ethanol-precipitation methods were purified by Soxhlet extraction, Sevag method and DEAE-52 anion exchange column chromatography. The structure, composition and molecular weight of PTGP1 were analyzed by ultraviolet-visible spectra (UV-VIS), infrared spectrum (IR), scanning electron microscopy (SEM), gas chromatography tandem mass spectrometer (GC-MS) and high performance size exclusion chromatography multiangle laser light scattering (HPSEC-LLS). The *in vitro* antioxidant activities of PTGP1 were determined by the total reducing power, DPPH, superoxide radicals, hydroxyl radicals scavenging assays and the inhibition rate of malondialdehyde (MDA) in mice liver homogenate. Results showed that PTGP1 was a reducing sugar without starch and anthocyanins, whose surface was of holes fold fibrous structure. PTGP1 was mainly consisted of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose, with the molar ratio of 3.06:2.32:1.56:4.87:3.28:2.18 in the form of pyranose containing  $\alpha$ -glycosidic bond. HPSEC-LLS analysis showed that the PTGP1 was composed of three different polymers, whose average molecular weight was  $5.81 \times 10^5$  Da and the main composition content was 76%. Oxidation test indicated that the total reduction ability of PTGP1 was 0.45 times compared with Vc, the half inhibit concentration ( $IC_{50}$ ) of PTGP1 for scavenging hydroxyl free radicals, superoxide anion and DPPH free radicals were 1.24 mg/mL, 1.05 mg/mL and 2.13 mg/mL, respectively, which could effectively inhibit lipid peroxidation induced by hydroxyl free radicals, as well as the formation of MDA in mice liver homogenate.

**Key words:** *Pyrus sinkiangensis*; polysaccharide; isolation and purification; physicochemical properties

收稿日期: 2014-01-09

基金项目: 农业行业科研专项: 饲草饲料资源开发利用技术与示范 (201203042); 国家自然科学基金资助项目 (31060041; 51366009); 甘肃省自然科学基金 (1212RJYA008, 1212RJYA034); 兰州理工大学“红柳青年教师培养计划” (Q201207); 兰州理工大学教学研究项目 (JY2012045)

作者简介: 刘晓风, 副教授, 研究方向: 食品营养与卫生; 刘琳, 硕士, 研究方向: 食品营养与卫生

通讯作者: 王晓力, 副研究员, 研究方向: 饲草加工, 营养与卫生

啤特果原名皮囊果, 又名“酸巴梨”、“牙面包”, 是生长在太子山麓的一种独特古老树种, 已有1000多年的栽植历史, 系蔷薇科苹果亚科新疆梨系统 (*Pyrus sinkiangensis*), 处于梨属植物分布的上限。具有树势强健、树龄长、对土壤要求不严、喜阴湿耐寒、抗病虫害、适应性强等特点, 主要种植于甘肃省临夏市和政县, 是当地主要经济作物之一。啤特果品味酸甜、性温, 含有多种氨基酸、糖类、维生素和钾、钙、铁等微量元素, 具有养胃润肺、消渴止咳、软化血管等多种保健功能, 是一种品位极高的绿色水果<sup>[1]</sup>。

多糖是水果中一类重要的功能因子, 又称多聚糖 (Polysaccharide), 是由单糖缩合成的多聚物, 广泛存在于自然界中, 是一类重要的活性物质。近年来, 由于生物材料、免疫物质以及新药物资源的筛选等的研究, 结果发现多糖类物质不仅在生物体中的主要能量物质, 可以作为机体器官结构材料, 而且尤为重要的是多糖积极参与生命现象中诸如细胞识别、细胞生长、分化、代谢、胚胎发育、细胞癌变、病毒感染、免疫应答等应答活动, 具有多种的生物学功能<sup>[2,3]</sup>。现代药理认为, 多糖具有广泛的药理作用, 除了有增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、消化系统保护作用的生物学活性外, 还有抗菌、抗病毒、降血糖、降血脂、抗辐射、抗凝血等作用。其生理活性和结构成为现代医学和食品功能化学关注的焦点<sup>[4-6]</sup>。目前就水果多糖的研究主要集中在水果多糖对于水果储藏保鲜中的作用, 多糖的提取工艺、分离纯化、化学结构以及构效关系、生物学活性及在生物材料中的应用研究<sup>[4-5,7]</sup>。

为此, 本研究以生长在甘肃省高原地区临夏, 成熟在11月份的特殊果梨-啤特果为原料, 采用前期作者优化的提取工艺进行啤特果多糖的热水浸提<sup>[8]</sup>, 对其多糖进行了分离纯化和活性分析, 以期对啤特果的综合开发利用提供参考, 为啤特果多糖的应用研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

材料: 啤特果, 2012年10月采自甘肃省和政县, 果绿, 品质硬度较大; 后熟呈黑色, 皮疏松, 果肉酥软, 于-20℃冻藏。

试剂: 鼠李糖、阿拉伯糖、D-木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖, 均为色谱纯; 盐酸、羟胺、吡啶、醋酸酐、蒽酮、石油醚 (30℃~60℃)、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸二钠、浓硫酸、浓磷酸、硫酸钠、钼酸铵、三羟基甲烷、盐酸、邻苯

三酚、Vc、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等试剂, 均为分析纯, 购于烟台双双化工有限公司; DPPH (二苯基苦味酰基苯肼, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), 购于国药集团化学试剂有限公司; 纤维素DEAE-52购买于美国法玛西亚公司

仪器: ALC-110.4电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; TGL-16高速台式离心机, 上海安亨科学仪器厂; RE-52A旋转蒸发器, 上海亚荣仪器有限公司; FD-1型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器; Cary50紫外分光光度计, 美国瓦里安公司; BSZ-100自动部分收集器, 上海市沪西分析仪器厂有限公司; R-210旋转蒸发器, 瑞士步琪有限公司; GC/6890-MS/5973气相色谱-质谱联用仪, 美国安捷伦; DAWN EOS多角度激光散射仪, Wyatt Technology Co., USA; Ultrahydrogel™柱, 7.8 mm×300 mm, Waters, USA; Dawn optilab折光仪, Wyatt Technology Co., USA

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 啤特果多糖的分离与纯化

称取一定量啤特果, 清洗去皮, 破碎打浆, 蒸馏水溶解, 在85℃恒温水浴中浸提2 h, 过滤取上清液, 减压浓缩至总体积的1/4, 加入4倍体积的无水乙醇, 4℃下静置过夜。次日离心去除上清, 沉淀依次用丙酮脱色、石油醚脱脂, Sevag法 (氯仿:正丁醇=5:1) 除蛋白, 如此反复2次, 最后用无水乙醇洗涤3次。沉淀经真空冷冻干燥得到啤特果多糖, 采用苯酚硫酸法测定多糖含量。

将啤特果多糖配制成100 mg/mL溶液, 微孔过滤, 将1.0 mL多糖滤液上样于预先平衡过的DEAE-52纤维素层析柱 (2.6 cm×20 cm), 依次用蒸馏水, 0.1 mol/L NaCl溶液进行洗脱, 流速为0.2 mL/min, 分步收集, 各试管中收集1.5 mL, 以苯酚硫酸法示踪, 绘制洗脱曲线。合并主峰部位, 透析, 减压浓缩, 乙醇沉淀, 冷冻干燥, 采用苯酚硫酸法测定多糖含量。

#### 1.2.2 多糖含量的测定

参照苯酚-硫酸法<sup>[6]</sup>, 以葡萄糖浓度为横坐标 (μg/mL), 吸光度Y为纵坐标, 在485 nm处测定吸光度, 绘制标准曲线。得回归方程为 $Y=0.0607x-0.0569$ ,  $R^2=0.9977$ , 在0~100 μg范围内线性良好。

#### 1.2.3 多糖光谱学与表面结构特性研究

##### 1.2.3.1 红外光谱分析<sup>[4,9]</sup>

称取1 mg干燥的啤特果多糖于玛瑙研钵中, KBr压片, 在波数4000~400 cm<sup>-1</sup>范围内进行光谱扫描。

##### 1.2.3.2 扫描电镜观察<sup>[10]</sup>

采用离子溅射镀膜法制备啤特果纯化多糖干粉电镜测试样品, 置于扫描电镜的样品室中扫描分析, 调

节加速电压20 kV, 放大100~1000倍, 用随机工作站进行拍摄, 观察多糖表面的形态。

## 1.2.4 理化性质

### 1.2.4.1 显色反应

配制100 mg/mL的啤特果多糖水溶液, 分别进行硫酸—苯酚反应、碘-碘化钾反应、茚三酮反应、双缩脲反应和斐林反应<sup>[11]</sup>。

### 1.2.4.2 比旋光度测定

称取啤特果多糖样品100.0 mg, 去离子水定容至10 mL (浓度1%)。20 °C用10 cm旋光测定管于自动旋光仪上测定旋光度<sup>[11]</sup>。

## 1.2.5 单糖组分及分子量分布测定

### 1.2.5.1 单糖组分及摩尔比分析<sup>[9, 12]</sup>

称取20 mg多糖样品于安瓿瓶中, 分别经三氟乙酸水解, 中和, 洗涤干燥以及乙酰化等过程, 乙酰化的单糖溶液用三氯甲烷稀释后进行气质联用分析。色谱条件为: DB-5色谱柱(0.2 mm×35 m×0.25 μm) (美国安捷伦公司), 载气为高纯氮气, 流量15 mL/min; 进样口温度210 °C; 升温程序: 初始温度120 °C, 保留1 min, 按30 °C/min升温至210 °C保留5 min; MS条件: EI离子源70 eV, 离子源温度250 °C, 传输线温度250 °C, 溶剂延迟5 min, 扫描质量范围: 30~600 amu。

### 1.2.5.2 多糖分子量分析

采用高效液相色谱联用多角度激光散射技术(HPSEC-LLS)<sup>[9, 12]</sup>对多糖进行分子量测定, 精密称取样品20 mg, 溶于10 mL生理盐水, 以0.9%的NaCl溶液作流动相, 流速0.5 mL/min, 进样量为50 μL所有溶液用0.2 μm过滤器过滤后超声脱气, 于25 °C进行SEC-LLS测定。用Astm软件进行数据的采集和分析。折光指数增量(dn/dc)在25 °C下通过Optilab折光仪于690 nm处测定, 调节至0.135 mL/g。

## 1.2.6 抗氧化活性的测定

### 1.2.6.1 羟自由基活性清除率的测定

采用邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>氧化法<sup>[12]</sup>测定多糖对羟自由基的清除率, 以Vc为阳性对照, 自由基清除率为50%样品浓度记为IC<sub>50</sub>。

### 1.2.6.2 超氧阴离子自由基的能力

采用邻苯三酚自氧化法<sup>[12]</sup>测定多糖对羟自由基的清除率, 以Vc为阳性对照, 自由基清除率为50%样品浓度记为IC<sub>50</sub>。

### 1.2.6.3 DPPH·清除率的测定

配制浓度为250 μmol/L的DPPH·标准液, 4 °C避光保存。取2 mL不同浓度的多糖溶液与2 mL DPPH·标准液混合避光反应30 min, 于515 nm处测定吸光度值A<sub>i</sub>; 以乙醇代替样品, 515 nm处测定吸光度值A<sub>0</sub>; 啤

特果多糖溶液(2.0 mL多糖溶液+2.0 mL乙醇)在515 nm处测定吸光度值A<sub>i</sub>。用Vc作阳性对照, 自由基清除率为50%样品浓度记为IC<sub>50</sub>。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\% = [1 - (A_i - A_0) / A_0] \times 100\%$$

### 1.2.6.4 总还原力的测定

参照文献<sup>[12]</sup>方法进行, 取2.5 mL不同浓度的多糖溶液, 加入2.5 mL 0.2 mol/L的磷酸缓冲液(pH6.6)及2.5 mL 1%铁氰化钾溶液, 50 °C水浴20 min后加入2.5 mL 10%的三氯乙酸终止反应, 混匀后3000 r/min离心10 min, 取上清液5 mL, 加蒸馏水4 mL及0.1%三氯化铁1 mL, 静置10 min后于700 nm处比色测定A<sub>700</sub>, 测三次取平均值, 以Vc为阳性对照, 吸光度值与样品的还原能力呈正相关。

### 1.2.6.5 对小鼠肝匀浆自发性脂质过氧化的抑制作用

参照任海伟等<sup>[13]</sup>方法, 将新鲜小鼠肝组织用冷的生理盐水洗净, 制成5.0%肝组织匀浆液。分别取5%肝匀浆1.5 mL, 加入不同浓度的多糖溶液0.5 mL(空白对照组用生理盐水代替), 混匀后在37 °C温育1 h, 反应结束后冰浴冷却, 加入15%三氯乙酸(TCA)1.5 mL终止反应, 3000 r/min离心10 min, 取上清液1.0 mL, 加入0.67%硫代巴比妥酸(TBA)1.5 mL, 沸水浴15 min, 冷却后在测532 nm处测定光吸收值。根据下式计算丙二醛(MDA)生成抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

注: A<sub>1</sub>和A<sub>0</sub>分别代表样品管和对照管吸光度值, 抑制率为50%样品浓度记为IC<sub>50</sub>。以Vc作阳性对照, 平行测定3次。

### 1.2.6.6 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用

参照任海伟等<sup>[13]</sup>方法, 制备1%肝匀浆液, 取1%肝匀浆1.0 mL, 加入不同浓度的PTGPI溶液0.2 mL(空白对照组用生理盐水代替), 再分别加入0.1 mL 6 mmol/L FeSO<sub>4</sub>溶液和0.1 mL 60 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液。混匀后在37 °C温育1 h, 反应结束后冰浴冷却, 加入15% TCA溶液1.0 mL终止反应, 3000 r/min离心10 min, 取上清1.0 mL, 加入1.0 mL 0.67% TBA溶液, 沸水浴15 min, 冷却后在测532 nm处测定光吸收值, 以Vc作对照, 参照上式进行抑制率的计算, 抑制率为50%样品浓度记为IC<sub>50</sub>。

## 1.2.7 数据处理

测定样品设置3个平行, 结果以平均值±标准偏差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 啤特果多糖的分离、纯化及其理化性质



一定量的啤特果分别经热水浸提、无水乙醇沉淀、脱色、脱脂、除蛋白和冷冻干燥等步骤进行初步纯化后,获得浅黄色的粉末,命名为PTGP,得率为4.56%; DEAE-52作为是阴离子交换剂,在pH 6.0时,中性多糖不会被交换剂吸附,能用蒸馏水洗脱下来,而酸性多糖很容易被吸附,酸性基团越多,吸附能力越强,需要用不同离子强度的NaCl溶液进行逐一分离,将1.0 mL 100 mg/mL啤特果多糖溶液用蒸馏水和氯化钠洗脱,以苯酚硫酸法示踪,洗脱曲线如图1中所示,共得到2个主峰,第一峰位水洗脱峰(水相),峰形挺拔,合并试管中的溶液,共15 mL,命名为啤特果多糖1 (PTGP1),多糖含量为3.62 mg/mL,回收率为54.3%,第2个峰为0.05 mol/L NaCl洗脱峰(盐相),共12 mL,记为啤特果多糖2 (PTGP2),多糖含量为1.48 mg/mL,回收率为17.76%,相较水相洗脱峰峰值较小,所以不予研究。对PTGP1经透析,减压浓缩,乙醇沉淀,冷冻干燥后进行理化性质测定,结果显示PTGP1经茚三酮反应、碘—碘化钾反应为阴性、双缩脲反应全为阳性,表明PTGP1中确已无淀粉,而硫酸—苯酚反应和斐林试剂反应成阳性,则说明PTGP1是还原性多糖,有可能是糖蛋白。PTGP1溶液在20 °C下测定比旋光度为+136.21°,具有较大的比旋正数,说明多糖中糖残基间苷键类型为 $\alpha$ -糖苷键。

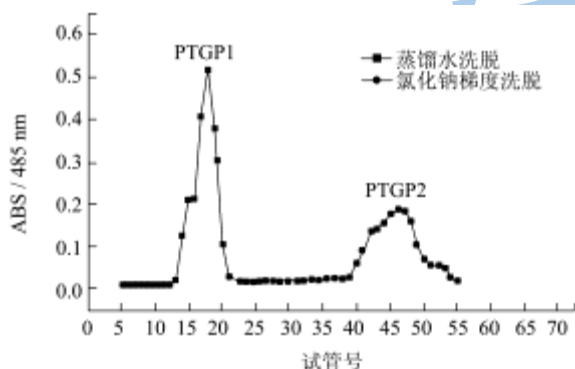


图1 DEAE-52纤维素柱对啤特果多糖的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of PTGP on DEAE-52

## 2.2 PTGP1 的红外光谱特性

将纯化后的PTGP1在400~4000  $\text{cm}^{-1}$ 范围内进行红外光谱分析,结果如图2所示。样品在3428、2998、1635、1498、1395、1240、1145、1075、905、875及615  $\text{cm}^{-1}$ 处出现吸收峰,说明纯化的多糖具有多糖的一般特征。在3428  $\text{cm}^{-1}$ 处出现一个强的吸收峰,是-OH的伸缩震动; 2998  $\text{cm}^{-1}$ 处出现一个弱吸收峰,是糖类不对称C-H的伸缩震动; 1635  $\text{cm}^{-1}$ 出现吸收峰,是N-H变角振动所引起的,说明含有氨基; 13905  $\text{cm}^{-1}$ 为 $\text{CH}_2\text{O-H}$ 中的O-H的变形振动的吸收峰; 1075~1145

$\text{cm}^{-1}$ 为吡喃型糖苷环骨架振动,由于杂合了C-O的伸缩振动,因而吸收峰变宽; 1000~1100  $\text{cm}^{-1}$ 最大吸收峰在1075  $\text{cm}^{-1}$ 附近,是由叔碳醇中的C-O键振动引起的; 875~1075  $\text{cm}^{-1}$ 之间是D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖的特征吸收, 875  $\text{cm}^{-1}$ 处附近有明显吸收峰,表明其多糖结构中含有 $\beta$ -葡聚糖; 615  $\text{cm}^{-1}$ 处为吡喃糖骨架对称伸缩振动的吸收峰。

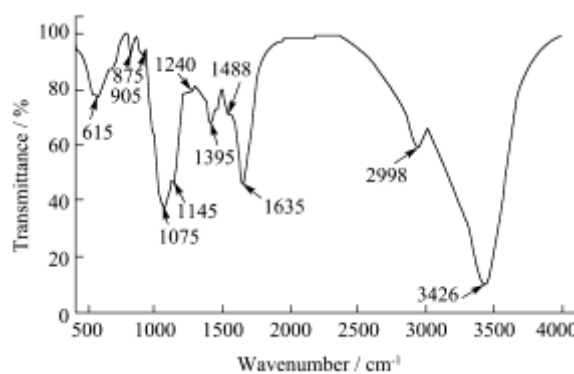


图2 PTGP1 红外光谱扫描图

Fig.2 Infrared absorption spectrum of PTGP1

## 2.3 扫描电镜观察结果

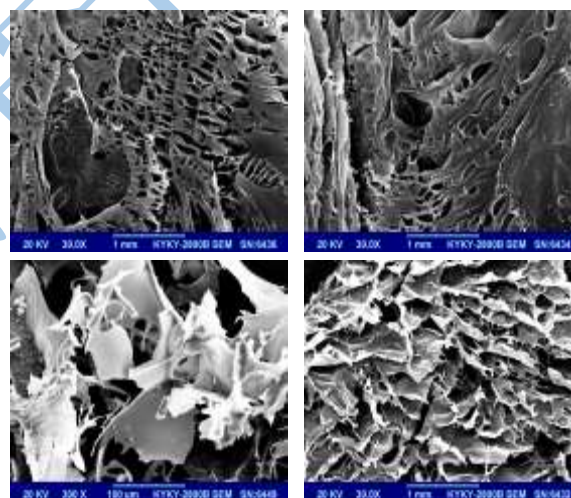


图3 PTGP1扫描电子显微镜扫描图

Fig.3 Scanning electron microscope (SEM) image of PTGP1

将少许PTGP1干粉黏于样品测定台上,置真空溅射仪内镀导电层,电子枪加速电压10 kV,分辨率2 nm。扫描粒度为5~10  $\mu\text{m}$ ,不同部位的电镜扫描结果如图3所示,PTGP1表面凹凸不平,呈不规则的几何外形,部分表面呈现孔洞褶皱纤维状结构,可能是由于许多分子或分子集团聚集成不同样式的束所致,也可能是多糖分子间相互存在排斥力,分子间吸引力较弱造成的。要准确获取多糖聚集体的清晰微观形貌信息,有待与用原子力显微镜进行分析<sup>[10]</sup>。

## 2.4 PTGP1 单糖组分分析

鼠李糖、阿拉伯糖、D-木糖、甘聚糖、葡萄糖和半乳糖经过衍生化后GC-MS检测色谱图如图4a, 各组分的保留时间分别为: 8.79、9.23、9.63、16.7、17.14和18.02 min, PTGP1经水解和衍生化后的色谱图如图4b,

从图4中可以看出, PTGP1组分为较为复杂, 出现10个分离峰, 对照标准单糖的保留时间, 判断PTGP1主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其摩尔比为3.06:2.32:1.56:4.87:3.28:2.18。与雪花梨和香梨等水果多糖组分对比得出<sup>[4]</sup>, 两种果梨中甘露糖含量最低, 半乳糖含量最高, 而啤特果以甘露糖含量最高, 究其原因可能是几种果梨生长地域或者品种不同引起的。

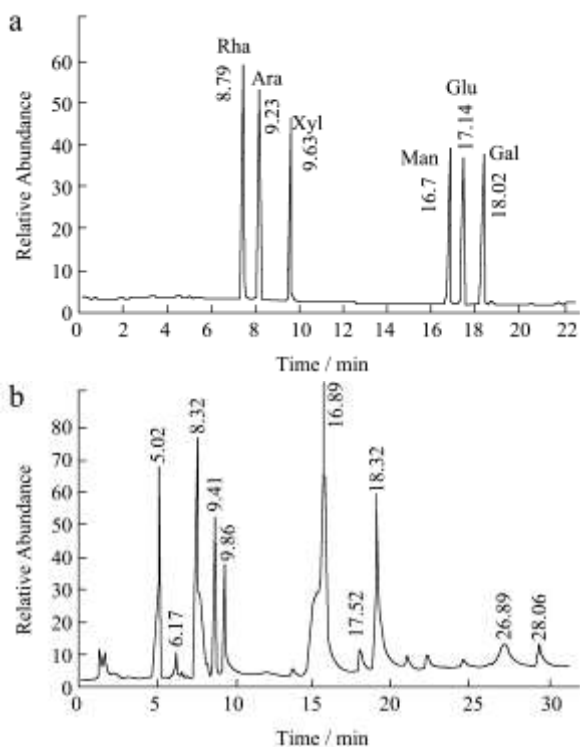


图4 标准单糖和PTGP1 GC-MS色谱图

Fig. 4 GC-MS chromatogram of standard monosaccharide and PTGP1

注: a: 标准单糖; b: PTGP1水解衍生化产物。

### 2.5 PTGP1 分子量分布

采用了凝胶渗透色谱激光光散射联用技术 (HPSEC-LLS) 分析PTGP1的分子量及其分布, 利用示差和光散射两个检测器同时检测高聚物的查出级分, 色谱图如图6, 各组分的数均分子量 (Mn)、重均分子量 (Mw)、分布宽度指数 (Mw/Mn) 及百分比范围如表1。测定结果表明, PTGP1是由3种不同组分组成的聚合物构成, 其中主要组分占76%, 其重均分子量为  $5.81 \times 10^5$  Da。糖的分子量分布形态受聚合方式和聚合

因素的影响而不同, 分布宽度指数越大, 多糖分子大小差别就越大, 分散程度就越明显。从表中可以看出, PTGP1是由三种具有一定平均分子量的多糖组成, 各组分的分布宽度指数均在1.6以下, 表明每部分的分子量皆较为集中。

表 1 PTGP1 的分子量分布特性

Table 1 Molecular characterization of PTGP1 by HPSEC-LLS

样品	组分	数均分子量 (Mn)	重均分子量 (Mw)	Mw/Mn	百分比/%
PTGP1	Peak1	$3.6 \times 10^5$	$5.81 \times 10^5$	1.59	76
	Peak2	$1.16 \times 10^4$	$1.39 \times 10^4$	1.20	15
	Peak3	$0.87 \times 10^4$	$1.25 \times 10^4$	1.44	9

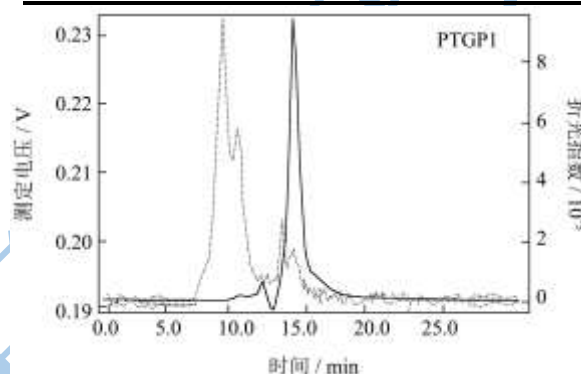


图5 PTGP1的HPSEC-LLS色谱图

Fig.5 HPSEC-LLS chromatograms of PTGP1

### 2.6 抗氧化活性的测定

#### 2.6.1 羟自由基的清除作用

·OH是活性最强的氧自由基, 可引起多种病理变化, 如引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 损伤细胞膜结构和功能等, 因此清除·OH对维持机体正常的生理活动和抗衰老意义重大。采用邻二氮菲- $Fe^{2+}$ 氧化法, 分别测定了浓度为0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0 mg/mL的啤特果多糖溶液对羟自由基的清除作用, 以Vc作为阳性对照, 结果如图6a, 在同等浓度条件下啤特果多糖对·OH自由基的清除作用较Vc弱, 当Vc溶液浓度为1.5 mg/mL时, 清除率趋于稳定, 达到90.42%, 相反在同等浓度下啤特果多糖溶液清除率趋于最大, 达到60.41%,  $IC_{50}$ 值为1.01 mg/mL。由此说明啤特果多糖具有一定清除羟自由基的能力。

#### 2.6.2 超氧阴离子自由基的清除作用

超氧阴离子自由基是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基, 能通过一系列反应生成其它的氧自由基, 引起机体的生理变化。抗氧化物质组成中具有酚羟基、巯基等给电子基团, 能够与氧自由基发生氧化还原反应, 使氧自由基被彻底清除。采用邻苯三

酚自氧化法,分别测定了浓度为0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0 mg/mL的啤特果多糖溶液对超氧阴离子自由基的清除作用,以Vc作为阳性对照,结果如图6b,阳性对照Vc溶液在浓度为1.0 mg/mL时,对超氧阴离子自由基的清除率达到最大值93.56%;而啤特果多糖溶液随着浓度的增加清除率也逐渐增加,在3.5 mg/mL时达到最大值为89.67%, IC<sub>50</sub>值为1.24 mg/mL。有研究表明多糖的抗氧化作用可能与多糖的单糖组成及分子量大小、结构以及构象有关。

### 2.6.3 DPPH·的清除作用

DPPH·是一种人工合成的以氮为中心的稳定自由基,其乙醇溶液呈紫色,在515 nm处有最强吸收,有自由基清除剂存在时其颜色减退,其褪色程度与清除剂的清除能力及数量有定量关系。若受试物能将其清除,则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧化自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链反应的作用。分别研究了浓度为0.1、0.15、0.20、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0 mg/mL的啤特果多糖溶液对超氧阴离子自由基的清除作用,以Vc作为阳性对照,结果如图6c,阳性对照Vc溶液在浓度为1.0 mg/mL时,对DPPH·自由基的清除率达到最大值84.93%;而啤特果多糖溶液随着浓度的增加清除率也逐渐增加,在3.0 mg/mL时达到最大值为61.23%, IC<sub>50</sub>值为1.05 mg/mL。

### 2.6.4 总还原力的测定

生物活性化合物的还原能力与其抗氧化能力之间存在一定关系,参照文献<sup>[12]</sup>方法对浓度为0.1、0.15、0.20、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0 mg/mL的啤特果多糖溶液总还原力进行了测定,结果如图6d,随着Vc溶液和啤特果多糖溶液浓度的增加,在700 nm处的光吸收值逐渐增加,即还原力液逐渐增加,Vc溶液在0.5 mg/mL时,还原力最强,光吸收值达到1.3226,而啤特果多糖溶液在3.0 mg/mL时,光吸收值最大为0.5867。

### 2.6.5 对小鼠肝匀浆自发性脂质过氧化的抑制作用

肝组织匀浆在温育条件下可发生自氧化反应产生自由基,生成MDA,反应过程中吸光度越大,MDA含量越多,抑制率越小。不同浓度的PTGP1溶液对肝匀浆自氧化的影响见表2,由表2可以看出,不同浓度PTGP1溶液对肝匀浆MDA的生成均有抑制作用,且抑制率随着剂量的增加而增大,存在剂量效应,4.0 mg/mL的抑制作用达到82.67%,IC<sub>50</sub>值为1.05 mg/mL,相较Vc在高浓度梯度下抑制作用相当。

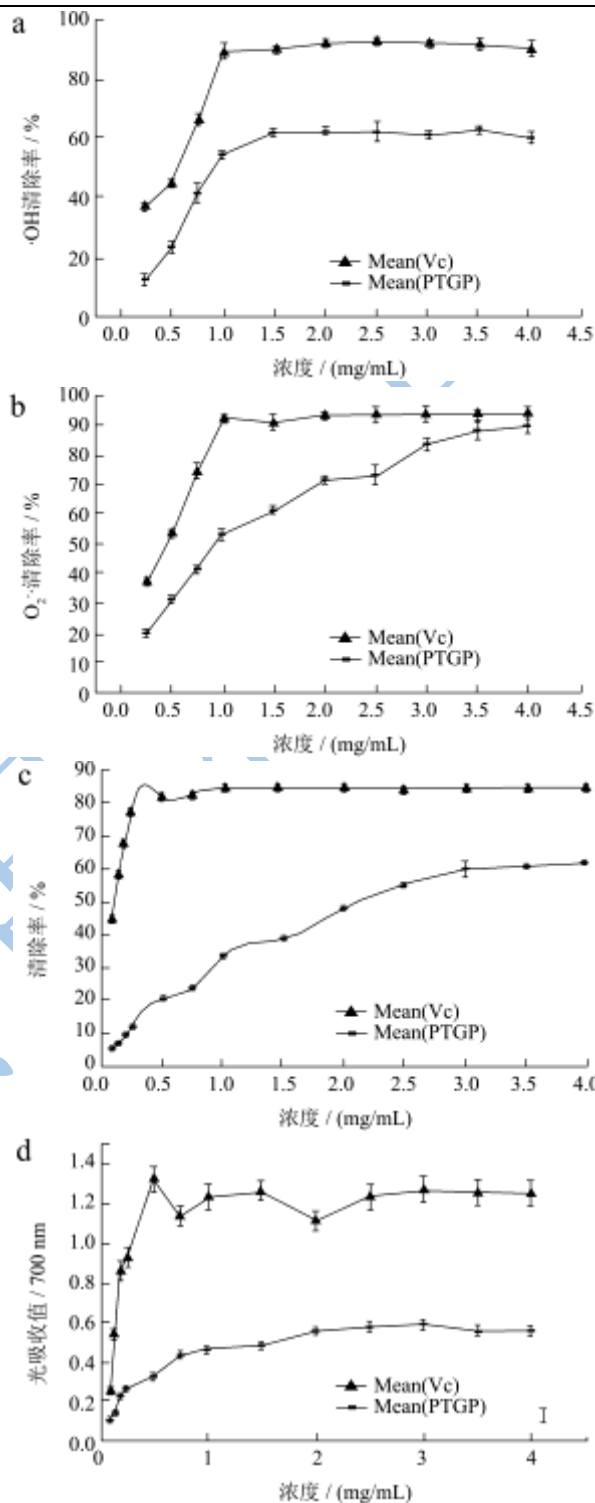


图6 PTGP1的抗氧化特性

Fig.6 Antioxidant activities of PTGP1

注: a.清除羟自由基活性; b.清除超氧阴离子活性; c.清除DPPH自由基活性; d.总还原力测定。Data are shown as mean (n=3). The vertical bars represent the standard deviation of each data point (P<0.05)。

### 2.6.6 对小鼠肝匀浆 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导脂质过氧化的抑制作用



表2 PTGP1 对小鼠肝匀浆自动氧化的影响

浓度/(mg/mL)	测试组抑制率/%	Vc 阳性对照组抑制率/%
空白对照	-	-
0.5	30.77±1.65	37.18±2.71
1	46.15±2.98	61.06±1.85
2	65.38±3.62	78.04±3.06
3	81.41±1.92	83.17±4.16
4	82.69±4.06	85.90±3.84

表3 PTGP1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导肝匀浆脂质过氧化的影响

浓度/(mg/mL)	测试组抑制率/%	Vc 阳性对照组抑制率/%
正常	-	-
空白对照	-	-
0.5	26.72±1.25	32.95±1.83
1	34.30±1.08	45.84±2.17
2	47.40±2.21	54.68±0.96
3	61.75±2.13	68.71±1.68
4	63.20±3.65	73.60±2.94

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是很强的自由基诱导物, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后小鼠肝匀浆产生的 MDA 含量明显增加, 光吸收值会变大, 表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能穿透细胞膜与细胞内 Fe<sup>2+</sup> 反应产生生成·OH, 进而促使小鼠肝匀浆脂质发生过氧化反应。由表 3 可知, 各剂量组的光吸收值与对照组相比明显下降, 即 MDA 生成量逐渐下降, 说明 PTGP1 可抑制·OH 所致的小鼠肝匀浆脂质过氧化, 且抑制率随浓度的增加而提高, IC<sub>50</sub> 值为 1.98 mg/mL。但是相比 Vc 而言, 抑制作用较弱。

### 3 结论

本文以西北地区高原山珍啤特果为原料, 经热水浸提、无水乙醇沉淀、脱色、脱脂、除蛋白等步骤获得浅黄色的粉末, 得率为 4.56%, 再经 DEAE-52 阴离子交换层析柱的进一步分离纯化, 分别以蒸馏水和氯化钠进行洗脱得到多糖组分 PTGP1 和 PTGP2, 回收率分别为 54.3% 和 17.76%。以 PTGP1 为研究对象, 对其理化性质、光谱特性、显微结构特性、单糖组成、分子量分布及抗氧化特性进行了研究, 得出 PTGP1 是还原性多糖, 可能与部分蛋白质相结合, 形成糖蛋白, 多糖中糖残基间苷键类型以为 α-糖苷键为主; PTGP1 红外光谱进一步研究表明, PTGP1 纯度较高, 在 3428、2998、1635、1498、1395、1240、1145、1075、905、875 及 615 cm<sup>-1</sup> 处出现吸收峰, 具有多糖的一般特征, 为 α-吡

喃糖; PTGP1 经扫描电镜显示表面凹凸不平, 呈不规则的几何外形, 部分表面呈现孔洞褶皱纤维状结构, 可能是由于多糖分子间相互存在排斥力造成的; GC-MS 分析结果表明, PTGP1 多糖主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其摩尔比为 3.06:2.32:1.56:4.87:3.28:2.18, 以甘露糖含量最高; HPSEC-LLS 分析认为 PTGP1 是由 3 种不同组分组成的聚合物构成, 其中主要组分占 76%, 其重均分子量为 5.81×10<sup>5</sup> Da; 抗氧化试验结果表明, PTGP1 对各自由基的清除呈现量剂效应, 对羟自由基、超氧阴离子、DPPH 自由基、对小鼠肝匀浆自发性脂质过氧化以及对小鼠肝匀浆 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导脂质过氧化具有较好的清除和抑制作用。因此, 啤特果具有较好的营养保健价值, 有望成为我国西北地区天然保健品资源, 很值得进一步研究开发和利用。

### 参考文献

- [1] 王永刚, 任海伟, 王晓力, 等. 啤特果营养成分的分析评价[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2991-2996  
WANG Yong-gang, REN Hai-wei, WANG Xiao-li, et al. Composition analysis and nutritional evaluation of pyrus sinkiangensis cv. Piteguo [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 2991-2996
- [2] Li J, Ding S, Ding X. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from Zizyphus jujuba cv. Jinsixiaozao [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(1): 176-183
- [3] Rout S, Banerjee R. Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from Punica granatum [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(16): 3159-3163
- [4] Yi Y, Zhang M W, Liao S T, et al. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of Longan pulp [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87: 636-643
- [5] Zhu Z Y, Liu R Q, Si C L, et al. Structural analysis and anti-tumor activity comparison of polysaccharides from Astragalus [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85: 895-902
- [6] Thetsrimuang C, Khamuang S, Chiablaem K, et al. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from Lentinus polychrous Lév [J]. Food Chemistry, 2011, 128: 634-639
- [7] 刘杰超, 焦中高, 周红平, 等. 水果活性多糖的研究现状与展望[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 675-679  
LIU Jie-chao, JIAO Zhong-gao, ZHOU Hong-ping, et al. Research on fruit bioactive polysaccharides: current status

- and future directions [J]. Food science, 2008, 29(10): 675-679
- [8] 杨明俊,吴婧,王永刚,等.啤特果粗多糖提取工艺优化[J].食品与发酵工业,2012,38(1):205-208  
YANG Ming-jun, WU Jing, WANG Yong-gang, et al. Optimization of extraction processing of poly saccharide from piteguo by response surface methodology [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(1): 205-208
- [9] 贺锋嘎,哈森其木格.芥菜多糖的研究[J].光谱学与光谱分析,2006,26(2):321-323  
HE Feng-ga, HasenqmLeng. Study on the mustard of polysaccharides [J]. Spectroscopy and spectral analysis, 2006, 26(2): 321-323
- [10] 龚加顺,胡小静,彭春秀,等.普洱茶及其原料多糖分子组成及光谱学特性研究[J].光谱学与光谱分析,2010,30(7): 1960-1964  
GONG Jia-shun, HU Xiao-jing, PENG Chun-xiu, et al. The molecular composition and spectral properties of polysaccharide isolated from pu-erh tea and its material [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(7): 1960-1964
- [11] 高义霞,张继,姚健,等.沙蒿多糖分离纯化和理化分析[J].西北师范大学学报(自然科学版),2007,5:22  
GAO Yi-xia, ZHANG Ji, YAO Jian, et al. Isolation, purification and physico chemical characterization of Artemisia sead polysaccharide [J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2007, 5: 22
- [12] Wang J, Zhang J, Zhao B, et al. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina L.* polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 84-93
- [13] 任海伟,王常青.黑豆低聚肽的抗氧化活性评价及其氨基酸组成分析[J].食品与发酵工业,2009,35(9):46-50  
REN Hai-wei, WANG Chang-qing. Amino acid composition analysis and antioxidant activity evaluation of oligopeptides from black soybean [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(9): 46-50
- [14] 吕明霞,李媛,张飞,等.气相色谱法分析北方水果中膳食纤维的单糖组成[J].中国食品学报,2012,12(2):213-218  
LV Ming-xia, LI Yuan, ZHANG Fei, et al. Determination of monosaccharide composition in dietary of fruits in northern China by Gas chromatography [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(2): 213-218