

牛奶子树不同部位多糖抗氧化活性比较研究

孙晓春, 闫桂琴*

(山西师范大学生命科学学院, 生物多样性研究所, 山西临汾 041004)

摘要: 从牛奶子(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)的叶片、枝条、种子中提取多糖,并研究其抗氧化活性。采用热水提取、Savage 法除蛋白,80%乙醇沉淀得其粗多糖。以Vc为对照,用番红花红光度法测定其对羟基自由基的清除作用;用邻苯三酚自氧化法测定其对超氧阴离子的清除作用;用 Fe^{3+} 还原力法测定其还原能力。结果表明:3个部位所含多糖对羟基自由基、超氧阴离子自由基都可起到有效的清除或抑制作用,其中对羟基自由基清除活性依次为:种子>叶片>枝条>Vc,对超氧阴离子自由基清除活性依次为:种子>Vc>叶片>枝条,3个部位所含多糖都有还原性,但效果都不如硫脲。

关键词: 牛奶子树;多糖;提取;抗氧化活性

中图分类号: Q946.3; Q949.761.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)06-0734-04

Comparisons of Antioxidant Activity of the Polysaccharide from Different Parts of *Elaeagnus umbellata* Thunb.

SUN Xiao-Chun, YAN Gui-Qin*

(School of Life Science, Institute of Biodiversity, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China)

Abstract: Polysaccharide of branches, leaves, and seeds of *Elaeagnus umbellata* Thunb. were extracted with hot water. Protein was excluded using the savage method, and then concentrated and precipitated with 80% ethanol to obtain the polysaccharide. Antioxidant activity of polysaccharide was evaluated by the efficiency of scavenging the hydroxyl radical and superoxide anion radical and reductive potential, with ascorbic acid used as a positive control. Results showed that the polysaccharide with three parts was effective in removing hydroxyl radical, superoxide free radicals, the scavenging activity on hydroxyl radical from the highest to the lowest was seeds > leaves > branches > Vc, while superoxide removal activity from the highest to the lowest was seeds > Vc > leaves > branches. All of polysaccharides possessed strong reducing power, but the effect was not as Thiourea.

Key words: *Elaeagnus umbellata* Thunb.; Polysaccharide; Extraction; Antioxygenic property

牛奶子(*Elaeagnus umbellata* Thunb.),又名甜枣子、半春子、羊奶子等。属胡颓子科胡颓子属,落叶灌木,是亚热带和温带地区常见的植物,多分布于我国西部地区。牛奶子不仅是蜜源植物、观赏植物和保持水土、绿化荒山的先锋树种,而且也是一种具有开发前景的药用植物^[1,2],关于牛奶子的研究,目前主要集中于其生态学习性、营养成分分析^[3]、组织培养^[4]和药用成分分离与测定^[5]等方面,而关

于牛奶子树多糖的研究报道很少。植物多糖具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、免疫调节等功能,这些功能主要跟多糖的抗氧化作用有关。生物体内的自由基主要以活性氧为主,其中包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)及单线态氧等,这些自由基与很多疾病有关^[6],多糖抗氧化价值正引起更多人们的关注。因此对天然食品活性成分清除自由基作用的研究具有重要的意义^[7]。本试验对牛奶子树不同部位多糖

收稿日期: 2011-03-01, 修回日期: 2011-06-25。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470296); 山西省自然科学基金项目(2008011058-1)。

作者简介: 孙晓春(1985-),女,硕士研究生,从事植物遗传多样性研究(E-mail: sunxiaochun8890@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence): 闫桂琴,女,博士,博士生导师,教授,主要从事植物分子生态学、植物遗传多样性研究。

的体外抗氧化作用进行了比较研究,以期为科学合理开发该植物资源提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

牛奶子(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)的枝条、叶片、种子均于2010年9月采自山西霍山。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖的提取与纯化

参考汤俊等的方法^[7]并略加改进,将牛奶子树叶片、枝条和种子洗净、烘干、粉碎后各称300 g,先后用石油醚、80%的乙醇室温浸泡1 h,回流提取1 h,滤过(此操作重复3次)。滤渣挥干,按料液比1:20加入蒸馏水浸泡1 h,回流提取2 h,滤过。滤液浓缩至100 mL,透析除去小分子化合物,再次浓缩,且采用Savage法除蛋白多次,加无水乙醇至含醇量达80%,置冰箱内静置过夜,次日离心收集沉淀,并以无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤数次,60℃烘干,置于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 多糖的理化鉴定

将提取的少许多糖溶于水观察其形状、颜色,再取少许多糖加入乙醇、丙酮、乙醚和正丁醇等试剂,观察其溶解性。进行Molish反应、Fenling试剂反应。如果Molish反应为阳性,说明含有糖类, Fenling试剂反应为阳性,说明多糖具有还原性。

1.2.3 对羟基自由基的清除作用

参考张爱梅、邵芬娟等的方法^[8,9]测定牛奶子树的不同部位多糖对羟基自由基的清除。即取比色管依次加入0.03%的番红花红T溶液0.8 mL, 0.2 mol/L的H₂SO₄溶液0.7 mL, 0.4 mmol/L的MnSO₄溶液1.6 mL, 0.3% H₂O₂溶液1.2 mL,作为反应体系,依顺序加入1 mL不同浓度牛奶子树多糖溶液,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,放置10 min,以蒸馏水作参比,在554 nm处测定吸光值。用以下公式计算其清除率:

$$R = [(A_s - A) / (A_0 - A)] \times 100\%$$

式中, A_s为加入抗氧化剂溶液的吸光值; A₀为番红花红T和H₂SO₄作为空白体系的吸光值; A为未加抗氧化剂的羟基自由基反应体系的吸光值。

1.2.4 对超氧阴离子的清除作用

采用邻苯三酚自氧化法^[10,11]测定不同浓度多糖对超氧阴离子的清除。取0.05 mol/L pH=8.2

Tris-HCl缓冲液4.5 mL于试管中,置于25℃水浴中预热25 min,分别加入0.1 mL不同浓度的多糖试样液。2.5 mmol/L邻苯三酚0.4 mL,以蒸馏水为空白,混匀后于25℃水浴中准确反应4 min,立即用8 mol/L的HCl两滴终止反应,并在299 nm处测其吸光值。清除率用以下公式计算:

$$R = [1 - (A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}})] \times 100\%$$

式中, A_{对照}为蒸馏水组的光吸收值; A_{样品}为加入多糖液各组的光吸收值。

1.2.5 还原力的测定

参考Obaidy^[12]和吴艳兵等^[13]的方法。操作步骤为:取1 mL各浓度样品溶液,加入2.0 mL的0.2 mol/L的磷酸缓冲液及2.0 mL 0.1%铁氰化钾溶液,于试管中混匀,50℃水浴中反应20 min,急速冷却,速冷并加2 mL 10%三氯乙酸溶液混匀,混匀后于3000 r/min离心10 min,取2 mL上清液加0.4 mL 0.1% FeCl₃混匀,再加入2.0 mL蒸馏水摇匀后,以蒸馏水调零,用硫脲代替样品作为阳性对照。在700 nm处测吸光度,以表示还原能力的大小,吸光度越大还原能力越强。每个浓度测3个平行样,取其平均值。

2 研究结果

2.1 对羟基自由基的清除作用

·OH被认为是毒性最强的活性氧自由基,可直接损伤各种生物膜,导致多种疾病发生,辐射损伤等物理理化因子都会促进其形成。由图1可以看出,牛奶子树叶片、枝条和种子中所含多糖对羟基自由

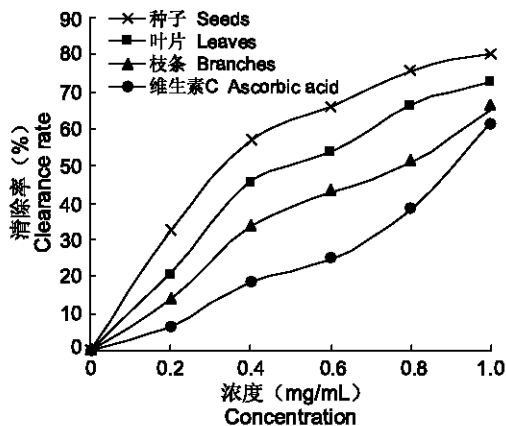


图1 牛奶子树不同部位多糖对羟基自由基的清除效果
Fig.1 Effect of variation concentrations the polysaccharide from different parts of *Elaeagnus umbellata* on the scavenging of hydroxyl radicals

基均有明显的清除作用,清除活性依次为:种子 > 叶片 > 枝条 > Vc,且种子多糖的清除活性优于其它两个部位和 Vc,清除率达 80.21%;在所测浓度范围内,3 个部位所含多糖对羟基自由基的清除率均随多糖浓度增加而提高。种子、叶片、枝条 3 个部位所含多糖浓度(C)与羟基自由基清除率(y)之间的量效方程依次为,种子: $y = -0.8763C^2 + 1.645C + 0.01612$ ($R^2 = 0.995, p < 0.05$); 叶片: $y = -0.5379C^2 + 1.265C - 0.00319$ ($R^2 = 0.993, p < 0.05$); 枝条: $y = -0.1858C^2 + 0.8231C + 0.00008$ ($R^2 = 0.990, p < 0.05$)。

2.2 对超氧阴离子的清除作用

O_2^- 是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基,可以经过一系列的反应生成其它的氧自由基,多糖分子上均有还原性的半缩醛羟基,能与 O_2^- 发生氧化还原反应,从而终止自由基链式反应。牛奶子树叶片、枝条和种子中所含多糖和 Vc 均可有效地清除超氧阴离子自由基(O_2^-),就清除效果而言,种子 > Vc > 叶片 > 枝条,种子多糖的清除率达 82.13%,且清除率随多糖浓度增加而提高(见图 2)。种子、叶片、枝条对超氧阴离子的清除率随多糖浓度变化的拟合方程依次为,枝条: $y = 0.2903C^2 + 0.1694C + 0.00851$, ($R^2 = 0.983, p < 0.05$); 叶片: $y = 0.2452C^2 + 0.3135C + 0.02176$ ($R^2 = 0.981, p < 0.05$); 种子: $y = -0.9982C^2 + 1.746C + 0.0386$ ($R^2 = 0.979, p < 0.05$)。

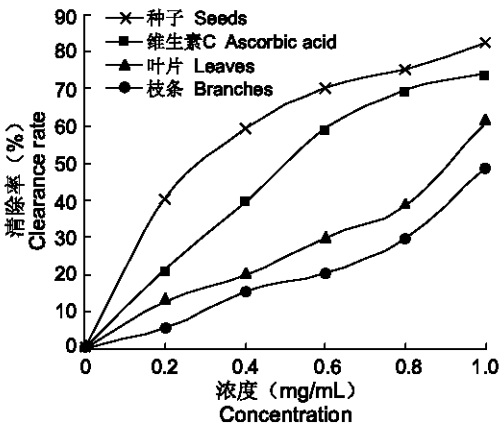


图 2 牛奶子树不同部位多糖对超氧阴离子自由基的清除效果

Fig.2 Effect of variation concentrations of the polysaccharide from different parts of *Elaeagnus umbellata* on the removal of superoxide free radicals

2.3 多糖还原力的测定

物质的还原能力与其抗氧化活性之间有着明显的相关性。牛奶子树不同部位多糖的还原力随浓度增加而增加(见图 3),虽然这 3 个部位多糖都具有较强的还原能力,但其还原能力不如硫脲。

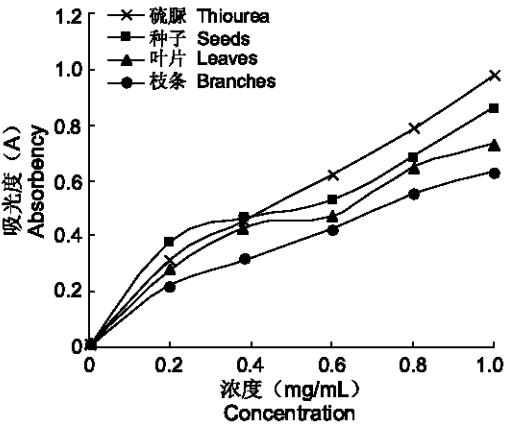


图 3 牛奶子树不同部位多糖的还原力
Fig.3 Reducing power of polysaccharides from different parts of *Elaeagnus umbellata*

3 讨论

两种自由基反应体系对牛奶子树不同部位多糖抗氧化活性测定的结果均表明:牛奶子树不同部位多糖对羟基自由基、超氧阴离子自由基均有清除或抑制效果,且存在较好的量效关系。根据 2.1 中方程计算可知,各部位多糖在试验浓度范围内对羟基自由基的清除作用都达到半清除率 EC_{50} ,种子、叶片、枝条、Vc 的 EC_{50} 值分别为 0.366、0.508、0.727、0.900 mg/mL。根据 2.2 中方程计算可知,种子、Vc、叶片在试验浓度范围内对超氧阴离子的清除率都达到半清除率 EC_{50} ,而枝条对超氧阴离子的清除率没有达到 50%,种子、Vc、叶片的 EC_{50} 值分别为 0.325、0.499、0.897 mg/mL。根据得出的 EC_{50} 值,比较同种部位的多糖对羟基自由基和超氧阴离子清除能力的大小为,种子部位多糖对超氧阴离子的清除作用强于对羟基自由基的清除作用,叶片和枝条部位的多糖对羟基自由基的清除作用强于对超氧阴离子的清除作用。

通过比较发现,种子中多糖的抗氧化活性强于其它两个部位,叶片次之、枝条第三;由此推断,牛奶子树不同部位所含多糖组成上有所差异,在两种自由基反应体系中不同部位起抗氧化作用的多糖组分可能不完全一致,为此有待于对各部位多糖的组分

进一步深入研究。另外也可以参考张艳萍等的方法^[14]利用不同乙醇浓度分段醇沉多糖,然后比较不同浓度乙醇醇沉的多糖的体外抗氧化能力的大小。在还原力方面,虽然种子多糖的还原力不如硫脲,但已表明种子多糖具有一定的体外抗氧化能力,种子也可作为从该植物中筛选天然抗氧化剂的优选部位。

参考文献:

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第52卷,第2分册[M]. 北京: 科学出版社,1983: 51.
- [2] 山西植物志编辑委员会. 山西植物志:第3卷[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000: 279-280.
- [3] 柴发熹. 牛奶子营养成分及开发利用途径[J]. 林业科技开发,1995(1): 50-51.
- [4] 姜长阳,宁淑香. 牛奶子的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37 (1): 41-42.
- [5] 徐裕彬,国兴明,周杰,等. 牛奶子根化学成分的分离与测定[J]. 山地农业生物学报, 2005, 24 (2): 138-141.
- [6] 吴青,黄娟,罗兰欣,等. 15 种中草药提取物抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 284-

289.

- [7] 汤俊,胡征宇. 3 种念珠藻多糖对自由基的清除作用[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 63-66.
- [8] 张爱梅,李林尉,宁晓东,王秀琳. 番红花红 O-Mn²⁺-H₂O₂ 光度法测定茶叶的抗氧化性[J]. 分析科学学报, 2006, 22(1): 90-91.
- [9] 邵芬娟,闫桂琴,张直峰,等. 翅果油树叶片中总生物碱抗氧化活性研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28 (7): 1339-1342.
- [10] 钟仙龙. 绒毛鹿茸草多糖提取工艺优化及多糖体外抗氧化研究[J]. 养殖与饲料, 2010, 3: 34-37.
- [11] 王新风,杨芳,戈群妹,陈珊珊. 葎草多糖含量测定及其抗氧化性研究[J]. 广西植物, 2009, 29 (3): 413-416.
- [12] Obaidy H M, Siddiqi A M. Properties of broad bean lipooxygenase[J]. *J Food Sci*,1981, 46: 622-629.
- [13] 吴艳兵,谢荔岩,谢联辉,等. 毛头鬼伞(*Coprinus comatus*)多糖的理化性质及体外抗氧化活性[J]. 激光生物学报, 2007,16(4): 438-442.
- [14] 张艳萍,尤玉如,戴志远. 山茱萸多糖体外清除自由基和抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8 (6): 18-22.

(责任编辑:王豫鄂)

欢迎订阅 2012 年《福建果树》

《福建果树》是福建省农业科学院果树研究所与福建省农业厅种植业管理局共同主办的果树科技期刊。着重报道亚热带果树最新科研成果、实用技术、品种资源、生产动态及国内外最新果树科技信息,科学实用,信息量大。本刊为季刊,国际标准 16 开,每期订价 6.00 元,全年 24.00 元;可随时汇款到编辑部订阅,免费邮寄;需挂号邮寄者,全年另加 12 元。欢迎订阅、投稿和发布广告,并欢迎代理,建立发行点(报酬优厚)。

地址:福州新店埔兜 福建省农科院果树所《福建果树》编辑部

邮编:350013

电话:0591-87572655、87573975(传真)

E-mail: fjgs0591@yahoo.com.cn