

玉米须硒多糖的抗氧化活性研究

侯巍¹, 张云杰¹, 侯艳秋², 于连生¹, 滕杨¹, 赵稷¹, 高金波^{1,*}

(1. 黑龙江省教育厅生物药剂重点实验室, 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 佳木斯红十字中心血站, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:以自提的玉米须多糖(CSPL)为原料制备玉米须硒多糖(Se-CSPL),研究 Se-CSPL 抗氧化活性并与 CSPL 进行比较。采用 Sephadex G-75 对合成的 Se-CSPL 进行纯化和小鼠急毒试验后,用 HPLC 法测定对 DPPH 自由基的清除能力,分别用邻苯三酚法及 Fenton 体系测定各物质对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的抑制作用。试验结果表明:Se-CSPL 对 $\cdot OH$ 的清除能力稍强于 CSPL,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力明显强于 CSPL,当 Se-CSPL 的浓度大于 1.0 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率为 94.9% 与 V_c 96.2% 相近。说明 Se-CSPL 有良好的抗氧化活性,可以作为优良的抗氧化剂使用。

关键词:玉米须;多糖;硒化反应;抗氧化;清除自由基

Study on Antioxidant Activities of Selenide Polysaccharides in Corn Silk

HOU Wei¹, ZHANG Yun-jie¹, HOU Yan-qiu², YU Lian-sheng¹, TENG Yang¹, ZHAO Ji¹, GAO Jin-bo^{1,*}

(1. The Key Laboratory of Biological Drugs, Education the Department of Heilongjiang Province, Pharmacy

College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China; 2. Jiamusi Red Cross Center Blood

Stations, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China)

Abstract: Selenium polysaccharides (Se-CSPL) was synthesized with corn silk polysaccharide and Na_2SeO_3 , then researched antioxidant activity of Se-CSPL were compared with CSPL. After Se-CSPL purified with Sephadex G-75 and mouse acute toxicity test, scavenging DPPH $\cdot$ activity was measured by HPLC. Determined inhibition on $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ by pyrogallol method and Fenton system separately. The results showed that the scavenging $\cdot OH$ of Se-CSPL was little stronger than CSPL and scavenging $O_2^{\cdot-}$ capacity was stronger than CSPL. When the concentration of Se-CSPL greater than 1.0 mg/mL, scavenging DPPH $\cdot$ radical rate of 94.9% was similar to V_c of 96.2%. Se-CSPL has a good antioxidant activity, may be used as an excellent antioxidant.

Key words: corn silk; polysaccharide; selenium chemical reaction; antioxidant activity; scavenging free radical

自由基在人体内能引起机体氧化, 损害细胞, 导致机体衰老和各种疾病^[1]。但体内的自由基的浓度随年龄的增长而增加, 清除能力反而减弱^[2-4]。玉米须又叫玉米胡子, 植物名 *Zea mays*, 为禾本科玉蜀属植物玉米的干燥花柱和柱头^[5], 其有效成分玉米须多糖具有清热、平肝、利尿、降血糖和提高免疫等功效^[6-7]。硒作为一种生命必需的微量元素, 能清除活性自由基, 延缓衰老, 防治癌症和心血管疾病, 治疗克山病和大骨节病, 提高视力和防治肝坏死等作用^[8-9]。天然硒多糖

较少^[10], 很多研究者开始通过化学手段进行其合成研究^[11-12]。硒多糖是一种多糖有机硒化合物, 具备了硒和多糖两者的活性^[13], 这样一来既能有效地提高硒的生物利用度, 又能降低无机硒毒性有望作为一种安全、有效、健康的富硒营养源^[14], 硒还可作为部分重金属元素的天然解毒剂。因此, 利用东北盛产的玉米须为原料, 通过化学手段合成玉米须硒多糖^[15], 研究其抗氧化活性, 在寻找外源性自由基清除剂在人体保健、治病方面具有重要意义。

基金项目: 省卫生厅项目, 玉米须多糖的硒化及其抗氧化降血糖抗肿瘤生物活性研究(2012-258)

作者简介: 侯巍(1963—), 男(汉), 教授, 本科, 研究方向: 天然药物的研究与开发。

* 通信作者: 高金波(1960—), 女(汉), 教授, 研究方向: 天然药物的研究与开发。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂、仪器

SPF 级昆明种小鼠: 哈尔滨医科大学实验动物学部, 体重 22 g~25 g, δ η 各半; 玉米须多糖: 黑龙江省

教育厅生物药制剂重点实验室自制、经多次纯化所得均一多糖,分子量为 2.0×10^5 g/mol。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基:美国Sigma公司;甲醇(色谱纯):天津科密欧化学试剂有限公司;亚硒酸钠(分析纯):上海新宝精细化工厂;高氯酸、硝酸、无水乙醇均为国产分析纯化学试剂。

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括四元泵,自动进样器,柱温箱和紫外检测器等):美国安捷伦仪器有限公司;UV-7501 紫外可见分光光度计:无锡科达仪器厂;PHS-3C 型酸度计:上海盛磁仪器有限公司。

1.2 玉米须硒多糖的制备

准确称取玉米须多糖 0.25 g 放入锥形瓶中,加入体积分数 0.3 % 的硝酸水溶液 25 mL,加热搅拌使多糖全部溶解,加入 0.30 g Na_2SeO_3 ,加热到 70 °C 搅拌反应 8 h,冷却反应液,无水碳酸钠调节 pH5~6,抽滤,滤液对流水透析,取透析液少量,加入抗坏血酸检测至无红色时停止透析,醇沉,于 4 °C 条件下放置过夜,离心,沉淀用无水乙醇洗涤 2 次,在 -0.8 kPa, 30 °C 真空干燥,得玉米须硒多糖(Se-CSPL)。

1.3 玉米须硒多糖的纯化

Sephadex G-75 葡聚糖凝胶充分溶胀后,均匀地装入 1.5 cm×50 cm 的玻璃柱中,用 0.05 mol/L 氯化钠溶液作洗脱,流速为 24 mL/h。将玉米须硒多糖溶解于水,用吸管加入约 5 mL 过柱,流出液每 5 mL 收集一份,用邻苯二胺显色,采用 HPLC 法检测每份溶液中的硒量,用苯酚硫酸法测定多糖含量,以硒量和多糖含量为纵坐标,流出小瓶序号为横坐标作图,收集双峰流分,醇沉、低温干燥,备用。经测定双峰流分(Se-CSPL)的含硒量平均为 5.36 mg/g。用 Na_2SeO_3 代替玉米须硒多糖重复上述过程。

1.4 玉米须硒多糖的急性毒性实验

配制 Na_2SeO_3 和 Se-CSPL 水溶液,浓度分别为 20 mg/mL 和 100 mg/mL,选用健康昆明种小鼠进行灌胃给药。首先进行预试验,得到死亡率 0 % 和 100 % 时的剂量,然后在两个剂量间设计 5 个具有一定级差的给药剂量,相应地将小鼠随机分成 5 组,每组 10 只,经灌胃给 Se-CSPL,观察动物两周,待其稳定;同时,另 5 组小鼠灌胃给 Na_2SeO_3 进行比较实验。

1.5 对羟基自由基的清除作用

将样品溶液用去离子水配成 0.1、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mg/mL 的溶液,各取 2 mL,并依次加入 6 mmol/mL 的硫酸亚铁溶液 2 mL,混匀,再加入 6 mmol/mL 双氧水溶液 2 mL,混匀,静置 10 min,再加入 6 mmol/mL 水杨酸溶液 2 mL,混匀,37 °C 下放置 30 min 后于 510 nm

测吸光度 A 值,以 V_c 作对照来测定其对羟基自由基的清除效果。

$$\cdot\text{OH 清除率}/\% = 1 - \frac{A_2 - A_0}{A_1} \times 100$$

式中: A_1 为以去离子水代替样品溶液的吸光值; A_2 为样品溶液的吸光值; A_0 为以去离子水替代水杨酸时的样品溶液吸光值。

1.6 对超氧阴离子自由基的清除作用

加入 3.00 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH=8.2) 和 0.10 mL 不同浓度的样品,25 °C 水浴 20 min,后加入 3.00 mL 浓度为 7 mmol/L 的邻苯三酚,反应 4 min 后加入 10 mol/L 的 HCl 溶液 1.00 mL 终止反应,以蒸馏水为参比液,在 420 nm 处测吸光度值,同时以 V_c 作对照。其清除率可用下列公式计算:

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}/\% = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

式中: A_1 为样品加入缓冲溶液及邻苯三酚后的吸光度; A_2 为样品加入缓冲溶液后的吸光度; A_0 为缓冲溶液加入邻苯三酚后的吸光度。

1.7 DPPH 自由基的清除作用

1.7.1 HPLC 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇:水=80:20(体积比);柱温:25 °C;流速:1.0 mL/min;检测波长:517 nm。

1.7.2 清除作用

准确吸取浓度为 0.02 mol/L DPPH 甲醇溶液 2 mL 置于试管中,再分别取浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的样品溶液 2 mL,并迅速混匀,于 37 °C 的恒温水浴下避光反应 30 min,立刻用 0.45 μm 有机滤膜过滤,20 μL 进样,检测 DPPH 的峰面积。以 V_c 作对照,其清除率可用下列公式计算:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}/\% = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为 2.00 mL DPPH+2 mL 蒸馏水时 DPPH 的色谱峰面积; A_1 为 2 mL DPPH+2 mL 样品溶液时 DPPH 的色谱峰面积; A_2 为 2 mL 样品溶液+2 mL 乙醇时 DPPH 的色谱峰面积。

2 结果与分析

2.1 凝胶纯化结果

图 1 是玉米须硒多糖粗品的凝胶层析谱图。

由图 1 可知,多糖峰和含硒峰在 6~10 小瓶处刚好重合,证实硒与玉米须多糖发生了化学键合,形成一种新的含硒多糖化合物;且经过凝胶层析后,发现玉米须硒多糖中存在没有与硒结合的多糖峰,游离的

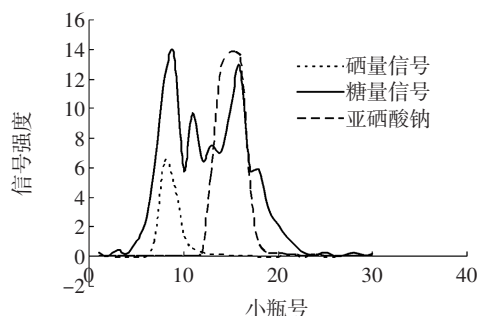


图1 玉米须硒多糖粗品的 Sephadex-75 色谱图

Fig.1 Sephadex-75 chromatogram of crude selenium polysaccharide in corn silk

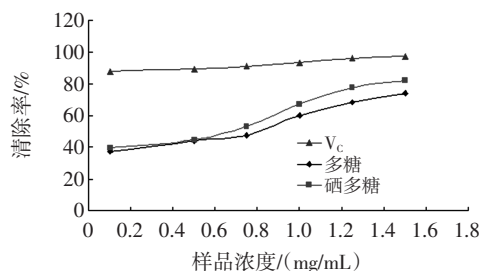
Na_2SeO_3 经过透析已基本除净。所以合成的玉米须硒多糖可通过凝胶层析进行纯化,获得较为纯净且含硒量相对较高的 Se-CSPL。

2.2 急性毒性初步实验结果

灌胃 Se-CSPL 组:当 Se-CSPL 的浓度为 4 000 mg/kg (以硒计为 21.44 mg/kg)时,小鼠仍没有死亡,未能测出 LD_{50} 值。灌胃 Na_2SeO_3 组,当小鼠死亡率为 0 % 和 100 % 时, Na_2SeO_3 的浓度分别为 4 mg/kg 和 14 mg/kg,其 LD_{50} 为 10.6 mg/kg (以硒计为 4.66 mg/kg),与文献报道^[16]结果相一致。小鼠在急性毒性中的体征表现有濒死的抽搐、轻微的呼吸困难、腹泻等与硒的相关研究报告^[17]基本吻合,可见硒对神经及呼吸系统均有所影响。实验中用肉眼观察灌胃 Se-CSPL 小鼠的主要脏器并没有发现明显的病理变化,也说明了 Se-CSPL 的低毒性。若要进一步研究其病理变化,可做长期毒性试验深入观察。

2.3 对羟基自由基的清除能力

H_2O_2 与 Fe^{2+} 发生 Fenton 反应,生成反应活性高的 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 能够与水杨酸有效地反应并生成有色物质;但若加入具有清除自由基能力的物质,便会与水杨酸进行竞争,从而使有色物质的量减少。图 2 为玉米须多糖、玉米须硒多糖与 V_c 对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用试验结果。

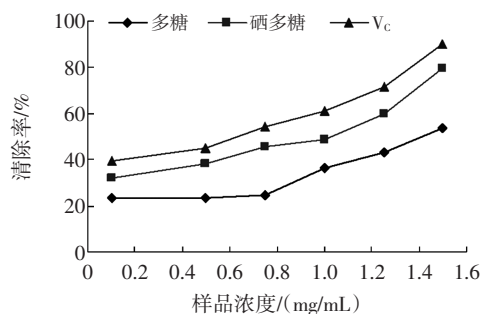
图2 多糖样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除Fig.2 Scavenging effect on $\cdot\text{OH}$ of polysaccharide samples

结果表明,在所选定的浓度范围内,多糖与其硒多糖对 $\cdot\text{OH}$ 都具有一定的清除作用,作用结果与多糖

样品的浓度呈量效关系,清除率随着 CSPL 及 Se-CSPL 样品浓度的提高而增加,当 CSPL 与 Se-CSPL 样品的浓度达到 1.5 mg/mL 时,多糖的清除率为 74.1 %,玉米须硒多糖的清除率为 82.0 %。

2.4 对超氧阴离子自由基的清除

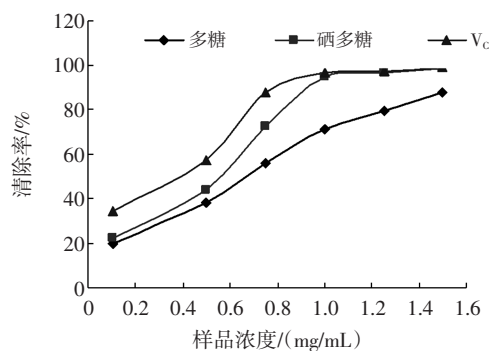
超氧阴离子是通过机体代谢产生的一种活性自由基,由于多糖及硒多糖分子均具有还原性的半缩醛羟基。因此,能够与超氧阴离子自由基发生氧化还原反应,从而终止自由链式反应。图 3 为玉米须多糖、玉米须硒多糖及 V_c 对超氧阴离子清除作用的结果。

图3 样品对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除Fig.3 Scavenging effect on $\text{O}_2\cdot^-$ of polysaccharide samples

由图 3 可知:硒多糖明显强于多糖且低于 V_c 的清除作用,且对超氧阴离子自由基的清除率都随着浓度的增大而增加。当多糖样品浓度达到 1.5 mg/mL 时,多糖对自由基的清除率为 53.6 %,硒多糖为 79.6 %。

2.5 对 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基其化学结构简单、性质稳定、反应容易控制,是未来自由基清除活性抗氧化剂筛选的首选试剂。本试验测定 CSPL、Se-CSPL 和 V_c 对 DPPH $\cdot$ 的清除率(%)的结果,见图 4。

图4 多糖样品对 DPPH $\cdot$ 的清除Fig.4 Scavenging effect on DPPH $\cdot$ of polysaccharide samples

可知 Se-CSPL 的清除能力随着浓度的增大而增加,当浓度达到 1.0 mg/mL 时,Se-CSPL 的清除率为 94.9 %与 V_c 96.2 %相近。

3 结论

急毒实验表明:本试验制备的 Se-CSPL 低毒,且 Se-CSPL 对超氧阴离子自由基和羟自由基均具有一定的清除能力,且强于 CSPL 本身。采用 HPLC 法,检测 DPPH 自由基的浓度,克服了用分光光度法测定抗氧化剂清除 DPPH·时,干扰物质多、易受 pH 等因素影响的缺点,使试验结果更加精准。而且在试验中发现,玉米须硒多糖在浓度适当高的情况下,其清除 DPPH·的能力与 V_C 相当。有望开发成一种新的补硒和抗氧化剂,提高玉米须的经济与利用价值,提高广大人民群众的健康水平、减少各种疾病的发生与发展。

参考文献:

- [1] 赵镭,高海燕,吴继红,等.富硒灵芝不同提取物清除自由基活性的 ESR 研究[J].中国食品学报,2007,7(2):11-15
- [2] 蔡志强,赵希岳,李亮,等.三种天然抗氧化剂清除自由基作用的研究[J].中国医科大学学报,2004,35(2):190-192
- [3] 田云,卢向阳,何小解.天然植物抗氧化剂清除氧自由基特性研究[J].食品科学,2005,26(6):123-125
- [4] 周晔,李一峻,陈强,等.覆盆子等 8 味中药的抗超氧阴离子自由基作用研究[J].时珍国医国药,2004,15(2):68-69
- [5] 孙海涛,信儒,夏光辉,等.超声辅助酶法提取玉米须多[J].食品研究与开发,2010,31(2):1-4
- [6] 周鸿立,张艳,金海甲,等.玉米须多糖药理作用及提取纯化研究进展[J].吉林化工学院学报,2009(2):23-26
- [7] 匡轩,匡芮,朱海涛.玉米须的化学成分及药理保健功能[J].中国食物与营养,2007(4):46-48
- [8] Dong Y, Ganther H E. New concepts in selenium chemoprevention[J]. Cancer Metals Rev., 2002, 21(3): 281-289
- [9] Tan J A, Zhu W Y, Wang W y, et al. Selenium in soil and endemic diseases in China[J]. Sci. Total Environment, 2002, 284(1): 227-235
- [10] 李玉华,王凤山,贺艳丽.多糖化学修饰方法研究概况[J].中国生化药物杂志,2007,28(1):62-65
- [11] 王永伟,向纪明.有机硒化合物的合成研究进[J].广州化工,2012,40(5):25-27,30
- [12] 赵燕燕,许城燕,梁淑轩,等.硒化枸杞多糖硫酸酯的制备及其抗氧化活性对子宫癌 Hela 细胞生长的体外抑制作用[J].中国药理学杂志,2012,47(6):423-426
- [13] 刘捷,张体祥,于立芹,等.硒化红薯叶多糖的制备及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2009,30(8):8-11
- [14] 刘振锋,东方,季宇彬,等.硒多糖药理活性研究进[J].北京联合大学学报(自然科学版),2011,25(4):36-40
- [15] 侯巍,朱小庆,楚婧,等.硒化玉米须多糖的工艺条件及硒含量测定研[J].中国现代应用药学,2012,29(7):621-624
- [16] 陈爽,侯振中,管延杰,等.亚硒酸钠对小鼠的半数致死量测定[J].东北农业大学学报,2012,43(3):91-94
- [17] 卿艳.硒毒性研究进展[J].预防医学情报杂志,2012,28(3):216-218

收稿日期:2015-01-16

欢迎订阅 2016 年《食品研究与开发》

《食品研究与开发》是由天津市食品研究所有限公司和天津市食品工业生产力促进中心主办,国内外公开发行的食品专业科技期刊,于 1980 年创刊,现为半月刊,采用国际流行开本大 16 开。其专业突出,内容丰富,印刷精美,是一本既有基础理论研究,又包括实用技术的刊物。本刊已被“万方数据库”、“中文科技期刊数据库”、《乌利希期刊指南》、美国《化学文摘》、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)等知名媒体收录,并被列入“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、RCCSE 中国核心学术期刊(A)。主要栏目有:基础研究、分离提取、食品研发、工艺技术、天然产物、检测分析、生物工程、营养保健、贮藏保鲜、质量安全、专题论述、食品机械等。

本刊国内统一刊号 CN 12-1231/TS;国际刊号 ISSN 1005-6521;邮发代号:6-197。全国各地邮局及本编辑部均可订阅。从本编辑部订阅全年刊物享八折优惠。2016 年定价:30 元/册,全年 720 元。

本编辑部常年办理邮购,订阅办法如下:

(1)邮局汇款。地址:天津市静海县静海经济开发区南区科技路 9 号;收款人:《食品研究与开发》编辑部;邮政编码:301600。

(2)银行汇款。开户银行:工商银行静海支行

账号:0302095119300204171;单位:天津市食品研究所有限公司。

《食品研究与开发》编辑部

E-mail: tjfood@vip.163.com

电话(传真):022-59525671