

文章编号:1673-1689(2009)02-0177-05

## 葡-半乳低聚糖体外抗氧化活性研究

王海松<sup>1</sup>, 乐国伟<sup>1,2</sup>, 丁苏<sup>2</sup>, 鲍洋<sup>2</sup>, 袁欣<sup>2</sup>, 陈皇女<sup>2</sup>, 施用晖<sup>\*1,2</sup>  
(1. 江南大 学 院 食品科学与 技术 国家重 点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 作者研究了高、中、低 3 种不同聚合度葡-半乳低聚糖在 DPPH 体系和羟自由基体系中清除自由基的能力。结果表明:高聚合度葡-半乳低聚糖对 DPPH 自由基的清除能力较中、低聚合度葡-半乳低聚糖强,  $IC_{50}$  为  $13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;而对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力,中聚合度葡-半乳低聚糖较强,其  $IC_{50}$  为  $21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。高、中聚合度的葡-半乳低聚糖在两种体系中均有较好的清除作用,聚合度大小影响葡-半乳低聚糖清除自由基的活性。

**关键词:** 葡-半乳低聚糖;DPPH;羟自由基

**中图分类号:** TS 201.2

**文献标识码:** A

### Anti-Oxidative Activities of Glucogalactane in Vitro

WANG Hai-Song<sup>1</sup>, LE Guo-Wei<sup>1,2</sup>, DING Su<sup>2</sup>, BAO Yang<sup>2</sup>, YUAN Xin<sup>2</sup>,  
CHEN Huang-nv<sup>2</sup>, SHI Yong-hui<sup>\*1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The free radical scavenging ability of different molecular weight glucogalactane were carefully determined by the method of DPPH assay and hydroxy radical assay in vitro. The scavenging ability of hight molecular weight glucogalactane is stronger than that of middle molecular weight and low molecular weight glucogalactane in DPPH assay, and its  $IC_{50}$  was  $13 \text{ mg mL}^{-1}$ . Among of three molecular weight glucogalactane the middle molecular weight glucogalactane plays a strong ability of scavenge radicals,  $IC_{50}$  was  $21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The results showed that molecule weight of the glucogalactane was contribute to the ability of scavenging.

**Key words:** glucogalactane, DPPH, hydroxyl radical

对自由基清除剂的研究已引起了广泛关注。据报道,琼胶寡糖、阿魏酰低聚糖、甲壳低聚糖等均对自由基具有清除作用<sup>[1-4]</sup>。邢荣娥等<sup>[5]</sup>报道,壳聚糖相对分子质量影响清除超氧阴离子的活性,水溶性低分子( $MW=9 \times 10^3$ )部分清除率高于高分子壳聚糖( $MW=7.6 \times 10^5$ );孙丽萍等<sup>[6]</sup>研究了水解

度不同的褐藻胶寡糖抗氧化能力,发现较低聚合度褐藻胶寡糖清除自由基能力较强。但对于低聚糖聚合度大小对清除自由基能力的影响尚缺乏研究。作者研究了葡-半乳低聚糖相对分子质量对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力。

收稿日期:2008-02-21

基金项目:国家自然科学基金项目(30571347);国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD27B06)。

\* 通讯作者:施用晖(1955-),女,上海人,教授,主要从事食品营养与安全研究。Email:yhshi@jiangnan.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

乳糖:AR,中国医药集团上海化学试剂公司产品;1,1-二苯基- $\beta$ -苦味酰自由基(DPPH):Aldich Chem公司产品;邻二氮菲:中国医药集团上海化学试剂公司产品;Panasonic NN-S563JF型变频微波炉:松下公司产品;UV-2102PC分光光度计:美国Unico公司产品;高压液相色谱仪(HPLC):美国Waters公司产品。

### 1.2 制备

采用微波固相合成法<sup>[7]</sup>合成不同聚合度的高分子葡-半乳低聚糖(HL)、中分子葡-半乳低聚糖(ML)、低分子葡-半乳低聚糖(LL)。

### 1.3 产物分析

高效液相色谱法:Waters400E;色谱柱:Sugar-pak1,  $D$  6.5 mm $\times$ 300 mm;流动相:纯水;流量:0.4 mL/min;进样量:10  $\mu$ L;温度:80  $^{\circ}$ C。

### 1.4 自由基清除率的测定

**1.4.1 自由基清除体系** DPPH自由基清除体系<sup>[8-9]</sup>:低聚糖溶解于Tris-HCl(0.05 mol/L, pH=7.4)中,取2 mL低聚糖的Tris-HCl溶液,加入等体积0.2 mmol/L DPPH的无水乙醇溶液,充分混匀,室温下避光反应20 min,在517 nm条件下测定液体吸光值 $A$ ;羟自由基( $\cdot$ OH)清除体系<sup>[10-11]</sup>:邻二氮菲无水乙醇溶液-磷酸盐缓冲溶液-硫酸亚铁溶液-过氧化氢体系。

**1.4.2 紫外扫描分析葡-半乳低聚糖对DPPH自由基的清除作用** 根据葡-半乳低聚糖和DPPH的乙醇溶液在200~600 nm波段扫描时282 nm和517 nm峰值的变化及波形的移动,判断葡-半乳低聚糖对DPPH自由基是否具有清除作用。

**1.4.3 葡-半乳低聚糖对DPPH自由基的清除效果** 取低聚糖ML进行两种体系中清除自由基能力实验,DPPH自由基体系的清除效果与VC比较。 $IC_{50}$ 为清除50%自由基时低聚糖浓度。

**1.4.4 聚合度对葡-半乳低聚糖清除DPPH自由基、羟自由基能力影响** 取LL、ML、HL样品做清除DPPH自由基、羟自由基实验,考察聚合度分别为2.36、3.01、4.47时对清除作用的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产物低聚糖高效液相色谱分析

作者对实验室合成的3种低聚糖进行高效液相色谱分析。3种低聚糖产物中三糖及其以上部分

所占质量分数分别为52.59%、63.3%、73.72%,聚合度分别为LL(2.36)、ML(3.01)、HL(4.47)。以乳糖( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )相对分子质量342为标准,按平均聚合度计算,LL、ML、HL平均相对分子质量分别为807、1029、1528,分别示为低分子葡-半乳低聚糖(LL),中分子葡-半乳低聚糖(ML),高分子葡-半乳低聚糖(HL),分析结果见图1。

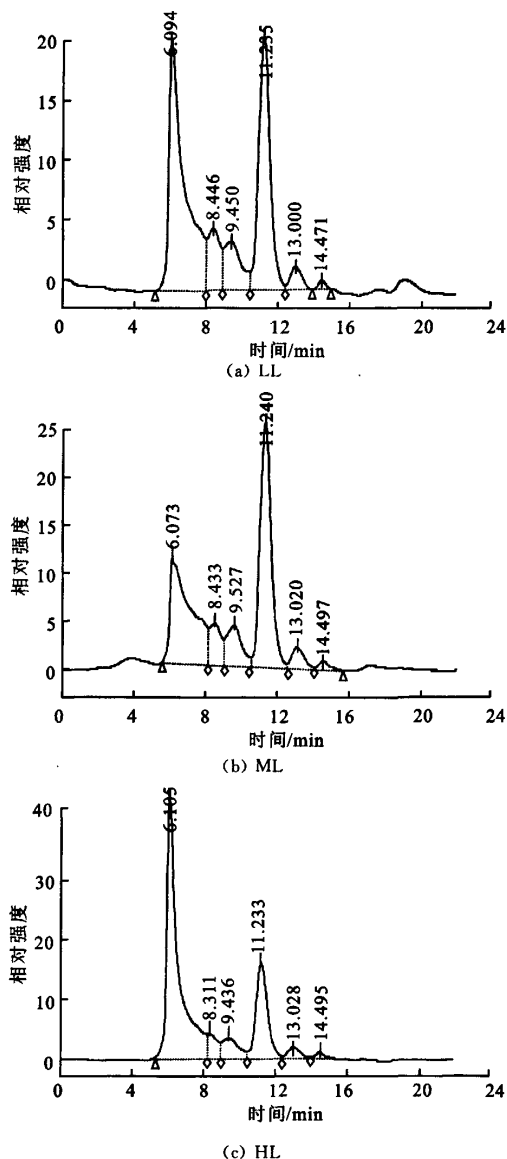


图1 合成产物高效液相色谱图

Fig. 1 The HPLC of different polymer of the product

### 2.2 葡-半乳低聚糖清除DPPH自由基的紫外扫描分析

DPPH是一种较稳定的自由基,其乙醇溶液呈现紫色,其N上有一个游离电子,因此,在517nm处有最大吸收峰。当加入自由基清除剂后,DPPH

捕捉一个电子与游离基配对,在517nm处的吸收消失,紫色退去。因此,可以通过测定加入自由基清除剂后DPPH在517nm处吸收值的下降,检测其对DPPH的清除作用。

图2(a)为DPPH、DPPH+葡-半乳低聚糖(HL)、葡-半乳低聚糖(HL)、以及乳糖的紫外扫描分析图谱,图2(b)为DPPH溶液中添加不同浓度的葡-半乳低聚糖(HL)和乳糖后,534nm下溶液吸光值的变化曲线。

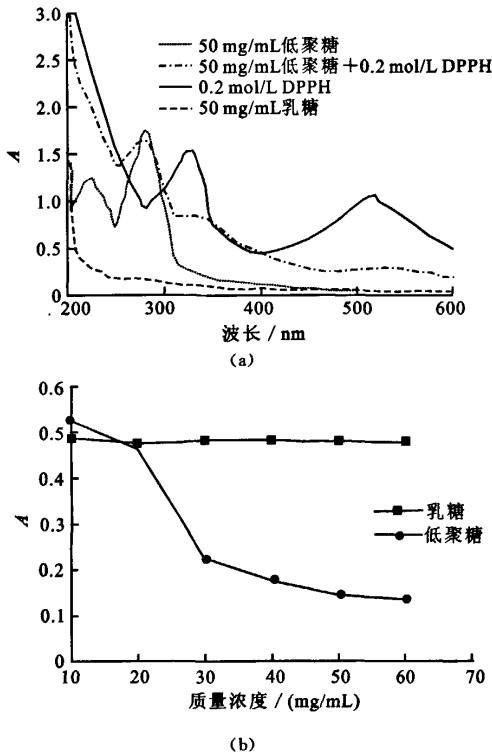


图2 紫外扫描分析图

Fig. 2 The analysis of UV scanning

以图2(a) DPPH和DPPH+葡-半乳低聚糖曲线可以看出,DPPH在517nm处有较大的吸收峰,当加入50mg/mL葡-半乳低聚糖后,DPPH在517nm处的吸收峰显著下降,并且产生红移现象,红移距离为17nm,同时327nm处吸光值降低0.7019。这表明DPPH自由基在反应体系中能够捕捉到电子与游离基配对,从而降低DPPH活性。分析葡-半乳低聚糖和DPPH+葡-半乳低聚糖的紫外扫描曲线可知:葡-半乳低聚糖在282nm处OD值降低,并发生蓝移,蓝移距离为4nm,表明葡-半乳低聚糖参与了对DPPH自由基的清除反应;同时葡-半乳低聚糖和DPPH+葡-半乳低聚糖在282nm处的吸收峰表明,葡-半乳低聚糖在合成过程中可能有糖醛类物质产生,但具体物质尚需进一步分析检

测;由图2(b)可以看出:随着葡-半乳低聚糖浓度的增加,DPPH红移后在534nm处的吸光值呈下降趋势,但添加乳糖后DPPH在534nm处的吸光值保持不变,表明葡-半乳低聚糖能够清除DPPH自由基,而乳糖不起作用。

### 2.3 葡-半乳低聚糖对DPPH自由基的清除效果

图3(a)显示了不同浓度的VC对DPPH的清除能力,IC<sub>50</sub>约为5μg/mL(约A=0.23);图3(b)显示葡-半乳低聚糖ML对DPPH的清除作用。由图可知,在质量浓度高于VC1000倍的情况下,随着低聚糖质量浓度的增加,吸光值下降,但降幅较缓,当吸光值降幅达到VC降幅一半(约A=0.23)时达到IC<sub>50</sub>,此时ML葡-半乳低聚糖的质量浓度约为28mg/mL。实验证明:在清除DPPH自由基体系中,葡-半乳低聚糖的清除能力远远低于VC。

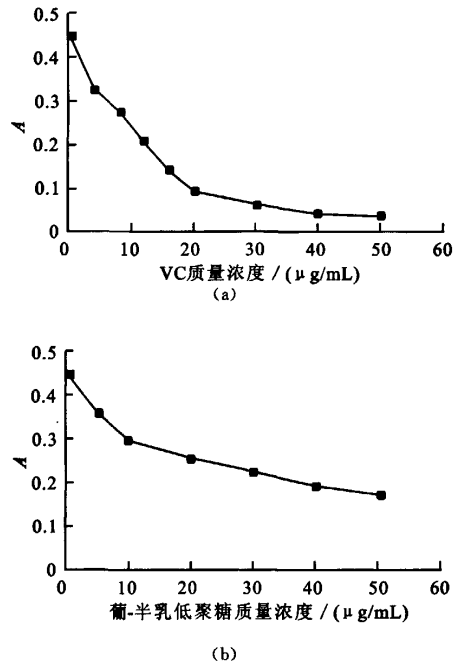


图3 VC和葡-半乳低聚糖对DPPH自由基的清除作用

Fig. 3 Effect on the scavenging rates of VC and glucogalactane to DPPH · in vitro

### 2.4 聚合度对葡-半乳低聚糖清除DPPH自由基、羟自由基能力影响

葡-半乳低聚糖属于多羟基类化合物,各链上连接着大量的“-OH”基团,羟基是活泼的氢供体,且随着各单糖数目的增加“-OH”基团数增加,其抗氧化活性的强弱与分子中质子氢的提供能力有关。在葡-半乳低聚糖众多的羟基中,存在活泼的氢供体,氢质子可直接参与自由基的清除作用,母核上活性“-OH”基团数越多,提供氢质子能力越强,清除自由

基能力越强<sup>[12-13]</sup>。

图4(a)显示了不同聚合度的葡-半乳低聚糖 HL、ML、LL 对 DPPH 自由基的清除作用。随着 3 种糖质量浓度的增加,清除率也逐渐增加,但增幅逐渐趋于平缓,最大抑制率约为 94%。在 10 mg/mL 以下的质量浓度,3 种糖对 DPPH 自由基的清除率关系是 ML>HL>LL,而 10 mg/mL 以上的质量浓度清除率关系是 HL>ML>LL。总的来看,HL 和 ML 的葡-半乳低聚糖对 DPPH 自由基的清除作用高于 LL 的葡-半乳低聚糖,HL 的葡-半乳低聚糖清除率曲线在低质量浓度时清除率增长很快,在 13 mg/mL 时达到 IC<sub>50</sub>,随后增长率趋于平缓,但清除率仍高于 ML 和 LL;ML 的葡-半乳低聚糖在 10 mg/mL 以下的质量浓度清除率保持最高,而高于 10 mg/mL 的质量浓度时,其清除率位于 HL 和 LL 之间,其 IC<sub>50</sub> 值约为 18 mg/mL;LL 葡-半乳低聚糖的清除率曲线一直保持较平均的增长率,并且其清除率增长缓慢,各个质量浓度下其对 DPPH 自由基的清除作用均最低,IC<sub>50</sub> 值约为 48 mg/mL。分析结果表明:多羟基化合物葡-半乳低聚糖能够为 DPPH 自由基提供氢质子,氢质子与 DPPH 自由基配对起到清除作用。

图4(b)为不同聚合度的葡-半乳低聚糖 HL、ML、LL 对 ·OH 自由基的抑制作用。由图中可以看出,3 种不同聚合度的葡-半乳低聚糖对 ·OH 自由基的抑制率曲线增长均比较缓慢,在 10 mg/mL 以下的质量浓度,HL 和 ML 葡-半乳低聚糖对 ·OH 自由基的抑制率差别不显著,但均显著高于 LL 葡-半乳低聚糖。ML 葡-半乳低聚糖对 ·OH 自由基的抑制率曲线保持平均增长率,各质量浓度下抑制率均高于 HL 和 LL 葡-半乳低聚糖,其 IC<sub>50</sub> 值约为 21 mg/mL;HL 葡-半乳低聚糖对 ·OH 自由基的抑制率在 36 mg/mL 以下的浓度显著高于 LL 葡-半乳低聚糖,但当其质量浓度高于 36 mg/mL 时,其对 ·OH 自由基的抑制率反而低于 LL 葡-半乳低聚糖,其 IC<sub>50</sub> 值约为 25 mg/mL;LL 葡-半乳低聚糖在质量浓度高于 20 mg/mL 时对 ·OH 自由基抑制率曲线的增长率与 ML 葡-半乳低聚糖的抑制率曲线增长率基本相同,其 IC<sub>50</sub> 值约为 28 mg/mL。葡-半乳低聚糖属多羟基类化合物,其对 ·OH 的抑制能力很可能与分子结构中大量的活性羟基数目有关。羟基的氢原子与羟自由基作用,从而达到清除目的。也可能是葡-半乳低聚糖与 Fenton 反应中的 Fe<sup>2+</sup> 螯合,从而影响了 ·OH 自由基的产生。具体反应机理尚需进一步研究。

万方数据

## 2.5 相对分子质量对葡-半乳低聚糖清除 DPPH 自由基能力的影响

由图5可以看出:随着葡-半乳低聚糖平均相对分子质量增加,IC<sub>50</sub> 值呈下降趋势,即清除能力增加。说明平均相对分子质量影响葡-半乳低聚糖对 DPPH 自由基的清除能力。

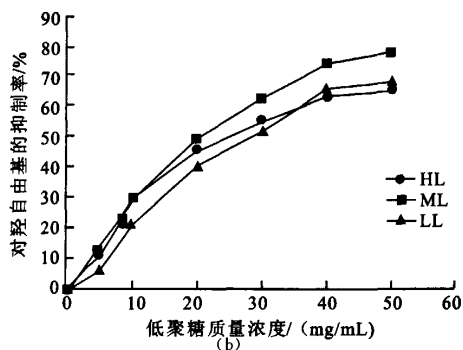
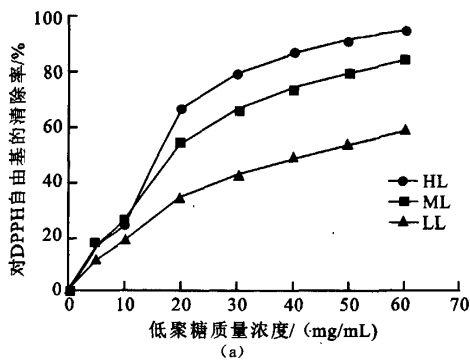


图4 不同聚合度葡-半乳低聚糖清除 DPPH 自由基与羟自由基能力

Fig. 4. Effect on the scavenging rates of different polymer glucagalactane to DPPH and ·OH in vitro

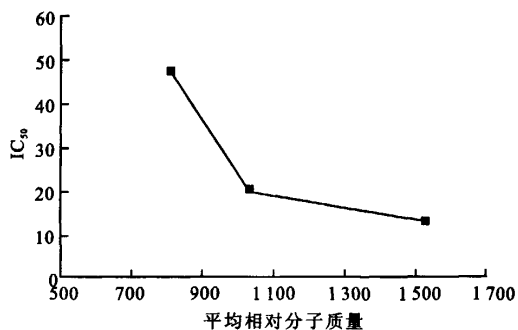


图5 平均相对分子质量与 IC<sub>50</sub> 关系

Fig. 5. Effect on IC<sub>50</sub> of average molecular weight

## 3 结语

在体外 DPPH 体系和羟自由基体系中,葡-半

乳低聚糖( $1000 < MW < 2000$ )能较好的清除·OH和DPPH自由基,乳糖不具有清除DPPH自由基能力。不同聚合度的葡-半乳低聚糖对DPPH自由基的清除能力不同,高聚合度(HL)葡-半乳低聚糖清除能力较强, $IC_{50}$ 约为13 mg/mL。而3种不同聚合度葡-半乳低聚糖中,中聚合度(ML)葡-半乳低聚

糖对·OH的清除能力较强,其 $IC_{50}$ 为21 mg/mL;与VC相比要达到同样的清除效果,葡-半乳低聚糖的质量浓度约为VC质量浓度的1 000倍;相对分子质量( $500 < MW < 2000$ )大小影响葡-半乳低聚糖清除自由基能力,随着相对分子质量的增加葡-半乳低聚糖清除自由基能力增强。

## 参考文献(References):

- [1] 房征宇,沈文梅. 自由基损伤与血糖、血脂及年龄关系的研究[J]. 老年学杂志,1992,12(1):20-22.  
FANG Zhang-yu, SHEN Wen-mei. Injuries induced by free radicals and its relationship with blood-sugar and lipids in the aging patients[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 1992,12(1):20-22. (in Chinese)
- [2] 赵雪,薛长湖. 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J]. 中国水产学报,2002,9(3):280-282.  
ZHAO Xue, XUE Chang-hu. Antioxidant abilities of agar oligosaccharides[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3):280-282. (in Chinese)
- [3] 袁小平,王静,姚惠源. 小麦麸皮阿魏酰低聚糖对红细胞氧化性溶血抑制作用的研究[J]. 中国粮油学报,2005,20(1):13-16.  
YUAN Xiao-ping, WANG Jing, YAO Hui-yuan. Inhibition of erythrocyte hemolysis by feruloylated oligosaccharides from wheat bran[J]. *Chinese Cereals and Oil Association*, 2005,20(1):13-16. (in Chinese)
- [4] 徐桂云,崔庆荣. 甲壳低聚糖清除羟自由基性能的研究[J]. 山东轻工业学院学报,2001,15(2):40-41.  
XU Gui-yun, CUI Qing-rong. The hydroxyl radical scavenge effect of Chitooligosaccharides [J]. *Journal of Shandong Institute of Light Industry*, 2001,15(2):40-41. (in Chinese)
- [5] 邢荣娥,刘松. 不同分子量壳聚糖和壳聚糖硫酸酯的抗氧化活性[J]. 应用化学,2005,22(9):959-961.  
XING Rong-e, LIU Song. Antioxidant activity of chitosans with different molecular weight and chitosan sulfates[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2005,22(9):959-961. (in Chinese)
- [6] 孙丽萍,薛长湖. 褐藻胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J]. 中国海洋大学学报,2005,35(3):812-814.  
SUN Li-ping, XUE Chang-hu. A study of antioxidant abilities of alginate oligosaccharides[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2005,35(3):812-814. (in Chinese)
- [7] 程景雄,施用晖. 微波合成寡糖新工艺的研究[J]. 河南工业大学学报,2005,26(1):47-49.  
CHENG Jing-xiong, SHI Yong-hui. A new synthetic technics of bioactive oligosaccharide with microwave irradiation[J]. *Journal of Henan University of Technology(Natural Science Edition)*, 2005,26(1):47-49. (in Chinese)
- [8] Moon J H, Terao J J. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein [J]. *Agric Food Chem*, 1998, (46):5062-5065.
- [9] 徐清萍,陶文沂. 食醋醇沉上清液的生物活性[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):77-80.  
XU Qing-ping, TAO Wen-yi. Bioactivity of ethanol supernate of vinegar[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005,24(4):77-80. (in Chinese)
- [10] 金鸣,蔡亚欣. 邻二氮菲- $Fe^{2+}$ 氧化法检测产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553-555.  
JIN Ming, CAI Ya-xin. 1, 10-Phenanthroline- $Fe^{(2+)}$  oxidative assay of hydroxyl radical produced by  $H_2O_2/Fe^{(2+)}$  [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1996, 23(6): 553-555.
- [11] Daxian Zhang, Tatsun Yasuda, Yingyan Yu, et al. Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(1):145-150.
- [12] 郭清泉,周立清. 采用量子化学计算法探讨二氢杨梅素抗氧化机制[J]. 食品研究与开发,2006,27(2):131-133.  
GUO Qing-quan, ZHOU Li-qing. The mechanism of antioxidant of dihydromyricetin by quantum chemistry[J]. *Food Research and Development*, 2006,27(2):131-133. (in Chinese)
- [13] Catherine A Rice-Evans, Nicholas J Milier, George Paganga. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996,20(7):933-956.

(责任编辑:朱明)