

浒苔多糖对羟自由基的清除作用研究

薛 萍¹, 魏玉西¹, 刘 淇², 刘 蕾¹

(1. 青岛大学 生物系, 山东 青岛 266071; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 研究确定了 Fenton(水杨酸法)反应所需水杨酸、 H_2O_2 和 Fe^{2+} 的浓度, 并用水杨酸法对浒苔 (*Enteromorpha prolifera*) 水提多糖及其酸提多糖对羟自由基的清除能力进行了测定, 同时, 与合成抗氧化剂 BHT 和 TBHQ 进行对比。结果表明, 浒苔水提多糖及酸提多糖对羟自由基均有| 定的清除效果, 且清除率与浓度存在剂量依赖关系, 酸提多糖对羟自由基的清除能力大于水提多糖。在较高质量浓度($> 1.2 \text{ g/L}$) 时酸提多糖对羟自由基的清除能力是水提多糖的 2 倍。

关键词: 浒苔 (*Enteromorpha prolifera*); 多糖; 羟自由基; 清除率

中图分类号: R151

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)01-0044-04

浒苔 (*Enteromorpha prolifera*) 属于绿藻门 (Chlorophyta)、绿藻纲 (Chlorophyceae)、石莼目 (Ulvales)、石莼科 (Ulvaceae)、浒苔属 (*Enteromorpha*), 浒苔属主要有条浒苔 (*Enteromorpha clathrata* (Roth) Greville)、肠浒苔 (*Enteromorpha intestinalis* Grer)、扁浒苔 (*Enteromorpha compressa* (L.) Grev)、浒苔 (*Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Ag.) 和管浒苔 (*Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. [*Ulva linza* L.]) 等 5 种, 均为大型经济藻类^[1-5]。其自然繁殖能力特别强, 产量巨大。中国海域特别是东海海域的绿藻(主要是浒苔)资源十分丰富, 仅福建沿海每年天然产量(鲜质量)达 10 万 t 以上。

资料显示, 浒苔含有许多人体必需的营养成分^[6], 自古以来即作为食用和药用植物。《本草纲目》记载浒苔可“烧末吹鼻止鼻血, 汤浸捣敷手背肿痛”; 中国《食物营养成分表》上记载有浒苔含铁量为中国食物中之最。近年来又有研究表明浒苔多糖可降低血糖、血胆固醇以及血清和心脏的脂过氧化物酶 (LPO) 含量, 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 活力; 浒苔还对 Ehrlich 癌和皮肤癌有显著的抑制活性^[7-9]。除食用及药用外, 浒苔还广泛地应用于化工、饲料、纺织和国防工业^[10]。

羟自由基 ($\cdot OH$) 是一种氧化能力很强的自由基, 可以使机体因糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等发生氧化而遭受损伤与破坏。因此, $\cdot OH$ 与机体的衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关^[11, 12]。为了给浒苔多糖的高值化利用提供基础数据资料, 作者研究了浒苔多糖对羟自由基的清除作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

浒苔, 采集于 2008 年 6 月青岛麦岛海滨, 经清洗、暴晒、粉碎后, 过 40 目筛备用。特丁基对苯二酚 (TBHQ) 标准样品和 2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT) 均购自美国 Merck 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

双列四孔水浴锅, 北京科伟永鑫实验仪器设备厂; FW80 型万能粉碎机, 河北省黄邳市新兴电器厂; RE-52A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; S54 型紫外-可见分光光度计, 上海棱光有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备

将晒干的浒苔研磨成细小粉末, 按 1: 10 (W/V) 加水, 50℃水浴搅拌 3 h 提取多糖, 过滤, 将滤渣同法提取 2 次, 合并滤液, Sevag 法^[13] 除去其中蛋白组分, 高速离心后真空浓缩。用 95% 的乙醇沉淀其中多糖组分, 沉淀经干燥得浒苔水提多糖; 取适量浒苔粉末按 1: 10 (W/V) 比例加入 pH 为 2 盐酸溶液,

收稿日期: 2009-03-05; 修回日期: 2009-06-06

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2008BAC49B04); 青岛市科技计划项目 (08-1-7-6-hy)

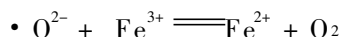
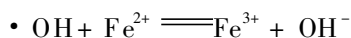
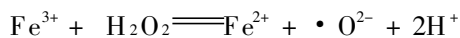
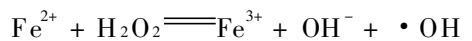
作者简介: 薛丁萍 (1987), 女, 山东临沂人, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: wawaxdp@126.com; 刘淇, 通信作者, 电话: 0532-85830760, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

在 50℃ 搅拌 3 h, 同上述方法获得酸提取多糖。

以无水乙醇配制 BHT、TBHQ 溶液; 用纯水配制两种糖样品溶液。

1.2.2 Fenton 反应体系中各成分的浓度对羟自由基产生的影响

参照文献[14]方法进行。利用 H_2O_2 和 Fe^{2+} 混合发生 Fenton 反应, 生成具有高反应活性的 $\cdot\text{OH}$, 在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质, 该物质在 510 nm 下有最大吸收。但若加入具有 $\cdot\text{OH}$ 清除作用的物质, 便会与水杨酸竞争, 从而使有色产物生成量减少。其反应机理如下:



净反应: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

为了确定 Fenton 反应所需水杨酸、 H_2O_2 和 Fe^{2+} 浓度, 取 9 mmol/L FeSO_4 , 配制成浓度梯度为 1.8, 3.6, 5.4, 7.2, 9 mmol/L 的溶液。反应体系: A = 双蒸水 + 水杨酸 + Fe^{2+} + H_2O_2 , 于相同的条件下测得各个 FeSO_4 浓度下的吸光度。同理测得 H_2O_2 、水杨酸最适浓度下的吸光度。

1.2.3 浒苔多糖对羟自由基的清除能力

参照文献[15]方法进行。具体方法为: 向不同试管中加入 7 mL 质量浓度分别为 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 g/L 的样品溶液和 9 mmol/L 水杨酸、9 mmol/L FeSO_4 、8.8 mmol/L H_2O_2 各 1 mL; 测定浒苔多糖吸光度值, 并计算清除率。

实验条件: 37℃ 水浴保温 30 min, 以蒸馏水为参比, 分别在 λ 为 510 nm 处测两种多糖吸光值, 并通过清除率计算公式得出各浓度水平下清除率。

$$\text{清除率 } E(\%) = [1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_0 为空白对照液的吸光度; A_x 为加入多糖溶液后的吸光度; A_{x_0} 为不加显色剂 H_2O_2 本底的吸光度。

同法测定合成抗氧化剂 TBHQ 和 BHT 对羟自由基清除率。

2 结果与讨论

2.1 Fenton 反应体系中各成分浓度对羟自由基产生的影响

图 1 为水杨酸、铁离子对羟自由基产生的影响。从图 1 可以看出, 当 FeSO_4 的浓度为零时, 吸光度为

零。这表明没有痕量 Fe^{2+} 存在, 就不能启动 Fenton 反应来产生 $\cdot\text{OH}$ 。随着 FeSO_4 浓度增大, 吸光度增大。当 FeSO_4 的浓度达到 5.4 mmol/L 后, 羟自由基浓度几乎不再变化。水杨酸能够捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质, 在一定范围内随着水杨酸浓度升高, 有色物质越来越多, 羟自由基浓度增大, 当其浓度达到 7.2 mmol/L 时, 吸光度几乎不再变化。

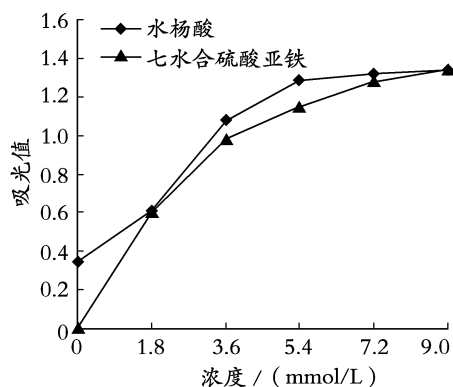


图 1 水杨酸、铁离子对羟自由基吸光度的影响

Fig. 1 Effects of salicylic acid and Fe^{2+} on the production of $\cdot\text{OH}$

图 2 为双氧水浓度对羟自由基产生的影响。从图 2 可以看出, 当双氧水的浓度为零时羟自由基的吸光度为零, 即没有双氧水该反应无法进行。一旦反应启动后, 一定范围内吸光度随着 H_2O_2 浓度的增大而增大, 这表明 H_2O_2 的量和 $\cdot\text{OH}$ 的产率成正比。

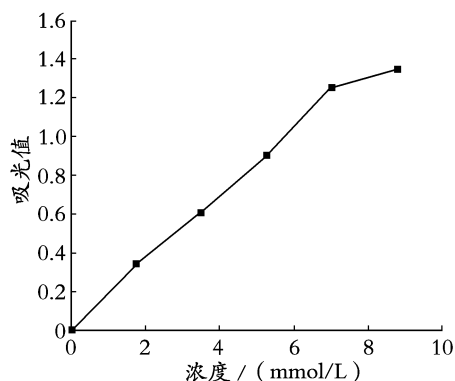


图 2 双氧水浓度对羟自由基产生的影响

Fig. 2 Effects of hydrogen peroxide concentration on the production of $\cdot\text{OH}$

2.2 浒苔多糖对羟自由基的清除效果

图 3 是浒苔多糖对羟自由基的清除效果。可见, 浒苔水提多糖和酸提多糖均对羟自由基有一定的清除能力, 且随着样品浓度的升高, 其对羟自由基的清除率也相应升高, 而且在相同质量浓度 (> 1.2 g/L) 下, 酸提多糖对羟自由基的清除率约为水提多糖的两倍, 前者在质量浓度为 2 g/L 时清除率高达

86.39%, 从而显示其良好的清除效果。

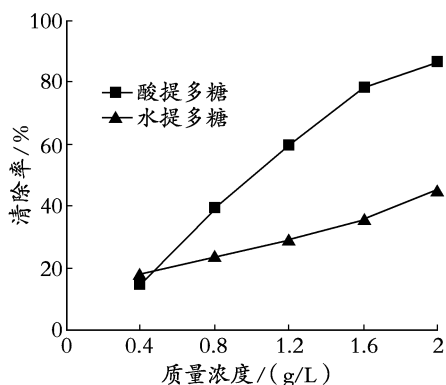


图3 两种多糖对羟自由基的清除效果的影响

Fig. 3 Effects of two samples from *Enteromorpha* on the scavenging rate to $\cdot\text{OH}$

图4 为人工合成抗氧化剂TBHQ与BHT对羟自由基的清除能力。由图4可见TBHQ与BHT对羟自由基的清除能力在一定范围内与浓度呈正相关,在相同质量浓度(>175 mg/L)时,两者对羟自由基的清除率相近并均大于70%,对比可知,TBHQ与BHT在对羟自由基的清除效果上要优于浒苔的两种多糖。

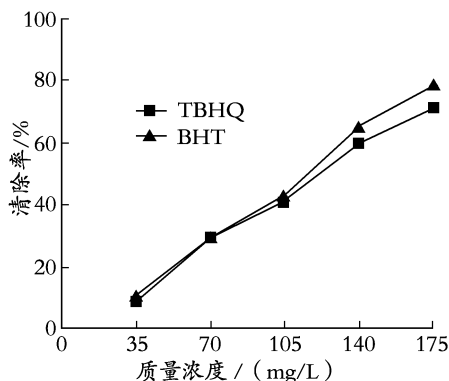


图4 BHT和TBHQ对羟自由基的清除效果

Fig. 4 Effects of BHT and TBHQ on the scavenging rate to $\cdot\text{OH}$

机体的有害产物往往具有强氧化性,在氧化过程产生的所有自由基中,羟自由基毒性最大,对人体的危害也最严重。羟自由基不但通过脂质过氧化反应直接损害细胞膜,而且还可以使许多人体重要的酶活性降低或失活。更重要的是羟自由基能够直接破坏细胞核中的DNA和RNA,导致细胞的死亡,从而引发人类的许多疾病,如心脏病、老年痴呆症、帕金森病和肿瘤等^[16]。虽然上述实验结果表明人工合成抗氧化剂TBHQ与BHT显示了其良好的抗氧化效果,但作为化学合成抗氧化剂,其使用剂量有严格限制。而浒苔多糖作为海藻中天然产物尚具备无毒

害、无剂量限制等优点,作为强羟自由基清除剂和功能性食品活性成分显示了其广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 王建伟, 阎斌伦, 林阿朋, 等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生长及孢子释放的生态因子研究[J]. 海洋通报, 2007, 26(2): 60-65.
- [2] Pandery R S, Ohno M. An Ecological study of cultivated *Enteromorpha* [J]. *Usamar biol inst Kochi Univ*, 1985, 7: 21-31.
- [3] Kapraun D F. Field and cultural studies of *Ulva* and *Enteromorpha* in the vicinity of Port Aransas [J]. *Texas Contributions in Marine Science*, 1970, 15: 205-285.
- [4] Hiraoaka M, Dan A, Shimada S, et al. Different life histories of *Enteromorpha prolifera* (Ulvales, Chlorophyta) from four rivers on Shikoku Island, Japan [J]. *Phycologia*, 2003, 42(3): 275-284.
- [5] Wang S, Jiang X M, Han X X, et al. Fusion characteristic study on seaweed biomass Ash [J]. *Energy & Fuels*, 2008, 22(4): 2229-2235.
- [6] 徐大伦, 黄晓春, 杨文鸽, 等. 浒苔营养成分分析[J]. 浙江海洋大学学报, 2008, 22(4): 318-320.
- [7] 马丽华. 新型海洋食品海藻[J]. 山东食品科技, 2004, 7: 19-20.
- [8] 周月蝉, 胡怡秀, 臧雪冰, 等. 某品牌绿藻茶保健功能研究[J]. 实用预防医学, 1999, 6(1): 78-79.
- [9] 杨志娟. 新型绿藻汤料的开发[J]. 食品工业, 2003, 3: 42-43.
- [10] 常巧玲, 孙建义. 海藻饲料资源及其在水产养殖中应用研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(2): 62-64.
- [11] 高承贤, 丁志山, 康文英. 羟自由基对培养心肌细胞损伤作用的研究[J]. 沃兴德浙江中医学院学报, 2002, 26(3): 52-54.
- [12] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉素甫, 阿布都艾尼·阿布力米提. 羟自由基引发的DNA氧化损伤机理的研究进展[J]. 新疆医科大学学报, 2000, 23(3): 273-275.
- [13] 齐慧玲, 魏绍云, 王继伦, 等. Sevag法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000, 3: 20-21.
- [14] 刘海英, 山成龙. 药用植物大黄对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用的研究[J]. 光谱实验室, 2008, 25(4): 614-617.
- [15] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学), 2006, 36(8): 213-217.
- [16] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法主编. 生物化学(第三版)(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 96-103.

Study on the scavenging activity of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* to hydroxyl radical

XUE Ding-ping¹, WEI Yuxi¹, LIU Qi², LIU Lei¹

(1. Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Mar. , 5, 2009

Key words: *Enteromorpha*; polysaccharide; $\cdot\text{OH}$; scavenging ratio

Abstract: The concentrations of salicylic acid, H_2O_2 and Fe^{2+} needed in Fenton reaction model were examined firstly in this paper. Polysaccharides extracted by water (PW) and acid (PA) from *Enteromorpha* were prepared, and then their anti-oxidative activities were evaluated by radicals scavenging ratio to $\cdot\text{OH}$ and compared with synthesized antioxidants BHT and TBHQ. The results showed that PW and PA all had certain activities to scavenge $\cdot\text{OH}$ and in a dose-dependent manner, and PA presented higher scavenging ratio to $\cdot\text{OH}$ than PW. At the sample concentration of more than 1.2 g/L for PA, the scavenging ratio to $\cdot\text{OH}$ doubled compared with PW. Therefore, it was suggested that polysaccharide by acid extraction from *Enteromorpha* should be a strong $\cdot\text{OH}$ scavenger and thus has a bright future in food industry.

(本文编辑: 康亦兼)