

琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究

赵雪, 薛长湖, 徐强, 许加超, 李兆杰, 林洪

(青岛海洋大学水产学院, 山东青岛, 266003)

摘要:在不同条件下对琼胶进行酸水解, 得琼胶寡糖 A1(以二、四糖为主)和 A2(以己糖、辛糖为主)采用化学发光法和 DPPH 体系分别研究 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH 3 种自由基的清除作用。结果表明, A1、A2 对 3 种自由基都有较好的清除作用, 而且清除活性随糖浓度的增加而加强。在 $O_2^{\cdot-}$ 体系中, A2 的 IC_{50} 为 0.54 mg/mL, 效果要好于 A1(IC_{50} 为 0.8 mg/mL)。在 $\cdot OH$ 体系中, A2 对 $\cdot OH$ 的清除作用比 A1 效果好, IC_{50} 分别为 1.2 和 2.3 mg/mL。2 个体系比较发现 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用高于对 $\cdot OH$ 的清除作用。在 DPPH 体系中, A1、A2 对 DPPH 有一定的清除, 但 A1 较 A2 效果好, IC_{50} 分别为 4 和 6.4 mg/mL。由此可见, 琼胶寡糖在不同体系中清除自由基的活性不同。琼胶寡糖在抗氧化方面具有很好的应用价值。

关键词:琼胶寡糖; 超氧阴离子自由基; 羟基自由基; DPPH 自由基

中图分类号: Q539.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)03-0280-03

近几年, 海洋天然活性物质的研究取得了很多成果。研究发现, 鼠尾藻多糖^[1-3]、褐藻多糖^[4]、浒苔多糖^[5]、褐藻胶及其衍生物、甲壳质及其衍生物^[6]、海带岩藻聚糖硫酸酯低聚糖^[7-9]都具有较好的清除自由基活性或体内抗氧化活性。说明海藻多糖在抗氧化方面具有很好的研究价值, 琼胶在食品、医药卫生等方面有广泛的应用。但由于琼胶凝动性强, 不容易被吸收, 因此在应用方面受到很大限制。而琼胶经酸水解后主要形成由琼二糖的重复单位连接而成的寡糖, 水溶性好, 有利于人体吸收, 因此琼胶寡糖的研究成为新的热点。本文主要对琼胶酸水解后得到的 2 种不同聚合度的琼胶寡糖清除自由基的活性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

琼胶: 市售食品级, 购于青岛渔业公司冻粉厂。丙丁酚: 购于 SIGMA 公司(P-9672)。DPPH(1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl): 购于 Aldrich Chem. Co.。鲁米诺(5-Amino-1, 2, 3, 4-tetrahydro-phthalazin-1, 4-dione): 购于 MERCK 公司。肌肽: 购于 Wako 公司。其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2001-05-21。

基金项目: 山东省优秀中青年科学家奖励基金项目。

作者简介: 赵雪(1976-), 女, 硕士研究生, 从事水产化学方面研究。

通讯作者: 薛长湖, E-mail: xuech@mail.ouqd.edu.cn

WDD-2 型电脑发光测试仪; 北京瑞利分析仪器公司。
721 分光光度计; 上海第三分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 琼胶寡糖的制备和纯化 采用酸水解法制备琼胶寡糖。通过控制水解的条件可以得到不同分子质量的琼胶寡糖。琼胶配成 4% 的水溶液, 用 0.1 mol/L 盐酸在 100 °C 水解 60 min, 然后用凝胶柱进行分离, 冷冻干燥, 得到琼胶寡糖 A1。4% 的琼胶水溶液, 用 0.05 mol/L 盐酸在 90 °C 水解 30 min, 然后用凝胶柱进行分离, 冷冻干燥, 得到琼胶寡糖 A2。将 A1、A2 进行薄层层析和液相色谱分析, 发现 A1 是以二糖和四糖为主的琼胶寡糖, A2 是以己糖和辛糖为主的琼胶寡糖。

1.2.2 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 发光体系 $\cdot OH$ 发光体系采用抗坏血酸— Cu^{2+} —酵母悬浮液—鲁米诺— H_2O_2 体系^[1-2]。 $O_2^{\cdot-}$ 发光体系采用焦没食子酸—鲁米诺体系^[1-2]。为减小测量的误差, 每个浓度作 3 个平行, 测出发光值后算出平均发光值 A, 抑制率 = $(A_0 - A) / A_0$, 式中 A_0 为未加抗氧化剂时的吸光值。根据曲线可以得抑制率达 50% 时样品的浓度 IC_{50} 。

1.2.3 DPPH 清除能力体系^[10] 抗氧化剂用 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4)溶解、定容, 丙丁酚用无水乙醇溶解。取 2 mL DPPH(250 μ mol/L)于试管中, 加入不同浓度的抗氧化剂, 最后用 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4)定容至 4 mL。用力振荡, 然后室温下黑暗避光反应 20 min。用 721 分光光度计测溶液在 517 nm 下的吸收值 A。由加入

不同抗氧化剂后吸光值的下降可以看出抗氧化剂清除 DPPH 的能力。

2 结果

2.1 琼胶寡糖 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制作用

由图 1 可以看出,琼胶寡糖 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 有很好的抑制作用,而且随糖浓度的增加抑制作用提高。肌肽是 1 种常用的抗氧化剂。比较发现,A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果与肌肽作用相近, IC_{50} 为 0.54 mg/mL。而 A1 的效果较 A2 低, IC_{50} 为 0.8 mg/mL。

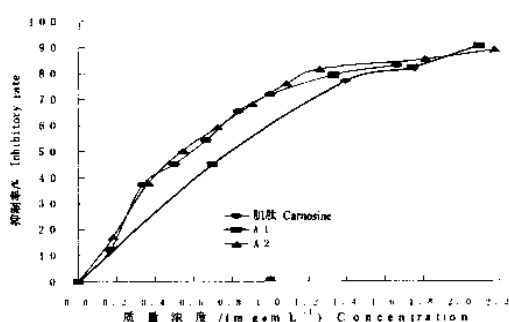


图 1 琼胶寡糖 A1、A2 对超氧阴离子的清除作用

Fig.1 Scavenging effects of agar oligosaccharides A1 and A2 on superoxide anion radicals

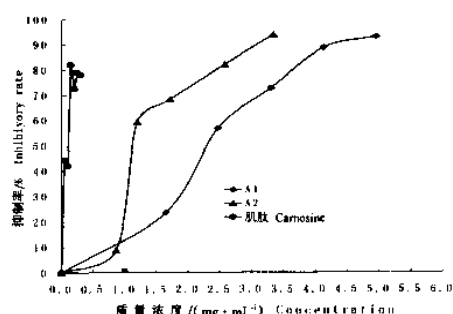


图 2 琼胶寡糖 A1、A2 对羟基自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging effects of agar oligosaccharides A1 and A2 on hydroxy radicals

2.2 琼胶寡糖 A1、A2 对 $\cdot OH$ 抑制作用

由图 2 可以看出,琼胶寡糖 A1、A2 对 $\cdot OH$ 有一定的清除作用,而且清除作用随糖浓度的增加而提高。比较可知,A2 对 $\cdot OH$ 的清除作用明显高于琼胶寡糖 A1, IC_{50} 分别为 1.2、2.3 mg/mL。但效果都明显低于肌肽(IC_{50} 为 0.11 mg/mL),2 个体系比较可以看出琼胶寡糖对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果较对 $\cdot OH$ 的效果好。

2.3 琼胶寡糖 A1、A2 对 DPPH 的清除作用

DPPH 是 1 种比较稳定的自由基,其 N 上有 1 个游离电

子,因此在 517 nm 处有最大的吸收峰,其乙醇溶液呈紫色。加入抗氧化剂以后,DPPH 捕捉 1 个电子与游离电子配对,在 517 nm 处的吸收消失,紫色褪去。因此通过测定加入抗氧化剂后,DPPH 在 517 nm 处吸收值的下降可以看出抗氧化剂对 DPPH 的清除作用。图 3 显示不同浓度 Vc 和丙丁酚对 DPPH 的清除能力。通过计算 Vc 和丙丁酚对 DPPH (22.015 mg/L) 清除达 100% 时的浓度为 25.84 mg/L 和 13.209 mg/L,图 4 显示琼胶寡糖 A1、A2 对 DPPH 清除作用,清除率为 50% 的质量浓度分别为 4.64 mg/mL。可见 A1 的清除能力高于 A2,但 2 种糖的效果明显低于 Vc 和丙丁酚。

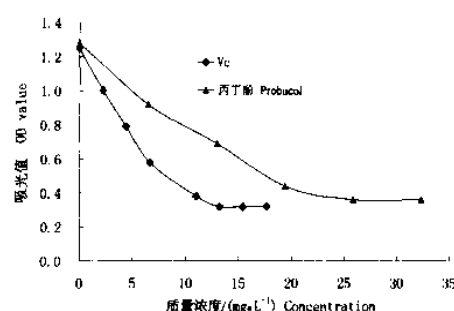


图 3 Vc 和丙丁酚对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.3 Scavenging effects of Vc and probucol on DPPH

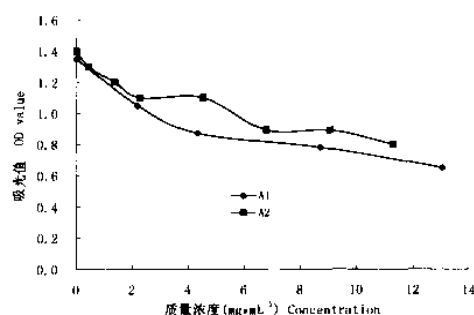


图 4 琼胶寡糖 A1、A2 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effects of agar oligosaccharides A1、A2 on DPPH

3 讨论

经检测,实验中所用的琼胶硫酸根质量分数较小,约 2.31%。水解以后琼胶寡糖 A1、A2 的硫酸根含量基本相同,因此着重研究了聚合度与抗氧化活性之间的关系。实验表明,琼胶寡糖 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 都有一定的抑制作用。肌肽是 1 种较好的自由基清除剂,琼胶寡糖 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用与肌肽接近,而对 $\cdot OH$ 的清除作用远远低于肌肽。说明琼胶寡糖对的 $O_2^{\cdot-}$ 清除效果较对 $\cdot OH$ 的清除

效果好。以己糖、辛糖为主的琼胶寡糖 A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 自由基的清除作用明显高于 A1。但在对 DPPH 清除作用的实验中, A1 的活性比 A2 要高。可见在不同的自由基环境中, 琼胶寡糖的抗氧化活性不同。 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 体系是水溶液体系, 琼胶寡糖通过与自由基反应消除自由基。而 DPPH 体系为醇溶液体系, 琼胶寡糖提供活泼氢与 DPPH 的游离电子配对, 从而清除 DPPH 自由基。

丙丁酚是 1 种脂溶性的抗氧化剂, 为 20 世纪 70 年代人工合成的调血脂药物, 通过降低 HDL 含量, 具有调血脂功能。丙丁酚有抗动脉粥样硬化的作用, 因为它既能阻滞病灶的发展, 也能促进动脉粥样硬化病变消退的效应。实验证明丙丁酚能提供活泼氢, 具有很好的清除 DPPH 作用; 而且丙丁酚是脂溶性抗氧化剂, 功能可能与其抗氧化活性有关。实验证明, 琼胶寡糖 A1、A2 对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH 都有一定的清除作用, 因此在抗氧化方面具有很好的应用价值, 可以用于清除自由基、防止皮肤衰老、抗辐射、预防动脉粥样硬化等与自由基氧化有关的疾病的预防和治疗。我国琼胶资源丰富, 琼胶经水解可开发成各种功能食品和药物原料, 从而提高海藻的价值, 扩大海藻的应用, 促进水产品高值化的发展。另外琼胶寡糖的降解产物以及不同降解片段所含硫酸根的量、位置对清除自由基活性的影响尚待进一步研究。

参考文献:

[1] 张尔贤, 俞丽君. 鼠尾藻多糖清除自由基作用的研究[J]. 中国

海洋药物, 1997, 3: 1-4.

- [2] 张尔贤, 俞丽君, 肖 湘, 等. 鼠尾藻多糖清除自由基作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1995, 1: 1-4.
- [3] 王学琦, 齐汝斌, 张尔贤, 等. 鼠尾藻多糖对人粒细胞超氧阴离子自由基释放的影响[J]. 中国海洋药物, 1992, 2: 4-6.
- [4] 田晓华, 丛建波, 施定基, 等. 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学 ESR 研究[J]. 营养学报, 1997, 1: 32-37.
- [5] 周惠萍, 蒋逸天, 王叔如, 等. 浙苔多糖的降血脂及其对 SOD 活力和 LPO 含量的影响[J]. 生物化学, 1995, 2: 161-164.
- [6] Xue C H, Yu G L, Takashi H, et al. Antioxidant activities of several marine polysaccharide evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents[J]. Biosci Biotech Biochem, 1998, 2: 206-209.
- [7] 薛长湖, 陈 磊, 李兆杰, 等. 岩藻聚糖硫酸酯体外抗氧化特性的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 4: 583-588.
- [8] 李兆杰, 薛长湖, 林 洪, 等. 低分子海带岩藻聚糖硫酸酯的清除活性氧自由基和体内抗氧化作用[J]. 水产学报, 2001, 25 (1): 64-68.
- [9] Manish S P, Sorgio O, Toensend B, et al. A revised structure of fucoidan may explain some of its biological activities[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 21 770-21 776.
- [10] Jae-Hak Moon, Junji Terso, et al. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 5 062-5 065.

Antioxidant abilities of agar oligosaccharides

ZHAO Xue, XUE Chang-hu, XU Qiang, XU Jia-chao, LI Zhao-jie, LIN Hong

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: The agar oligosaccharides A1 (mainly with disaccharidae and tetrasaccharide) and A2 (mainly with hexose and octoses) were prepared from agar under different acid hydrolysis conditions. Using the methods of Luminescence and DPPH system, the scavenging effects of A1 and A2 on $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ and DPPH are determined that A1 and A2 have strong scavenging effects on $O_2^{\cdot-}$ with the IC_{50} at 0.8 and 0.54 mg/mL. The scavenging activities of A1 and A2 on $\cdot OH$ are lower than those on $O_2^{\cdot-}$ and their IC_{50} on $\cdot OH$ are 2.3 and 1.2 mg/mL. A2 has better scavenging ability on $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ than A1. A1 and A2 have certain scavenging activities on DPPH and A1 shows higher scavenging ability than A2, which is quite different from the results in $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$. But their abilities are much lower than probucol and Vc, which have very active hydrogens and good scavenging activity on DPPH. It suggests that agar oligosaccharides A1 and A2 have different scavenging abilities in different free radical assays.

Key words: agar oligosaccharide; superoxide anion radical; hydroxy radical; DPPH radical

Corresponding author: XUE Chang-hu. E-mail: xuech@mail.ouqd.edu.cn