

# 美味牛肝菌多糖的抗氧化性\*

李志洲

(陕西理工学院化学与环境科学学院, 陕西汉中, 723000)

**摘要** 采用超氧阴离子自由基体系、羟基自由基体系,研究了美味牛肝菌多糖的抗氧化活性,并与 Vc 进行了比较。结果表明,美味牛肝菌多糖具有强的清除自由基能力,且随着浓度的增大其抗氧化作用亦增大。美味牛肝菌多糖浓度约为 0.04 mg/mL 时,其清除  $\cdot\text{OH}$  的能力与 0.02 mg/mL Vc 的能力相当;对浓度为 0.1 mg/mL 的多糖溶液,其清除率达到 71.78%。对于  $\text{O}_2^{\cdot-}$  自由基,在浓度为 0.04 mg/mL 时,抑制率达到 79.34%。

**关键词** 美味牛肝菌多糖,抗氧化,自由基

人体内产生的自由基,只有在抗氧化剂或体内有抗氧化作用的物质作用下,才能不断地被清除。现代研究发现,黄酮类化合物、植物多酚、多糖等天然有机化合物均具有抗氧化作用<sup>[1]</sup>。

美味牛肝菌(*Boletus edulis* Bull)又名大脚菇、白牛肝菌;牛肝菌科;菌盖直径 4~15 cm,呈扁半球形或稍平展,不粘、光滑、边缘钝,黄褐色,土褐色,赤褐色。我国各省均有分布,西南地区产量较高。美味牛肝菌味道鲜美,营养丰富。它不仅有一定的营养价值,而且具有较高的药用价值,是“疏筋丸”的成分之一,可治腰腿疼痛、手足麻木、盘骨不舒、四肢抽搐等症。该菌子实体的水体物对小白鼠肉瘤 180 的抑制率为 100%,对艾氏腹水癌的抑制率为 90%<sup>[2]</sup>。实验就美味牛肝菌多糖的抗氧化作用进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

市售美味牛肝菌,产于陕西镇巴。

### 1.2 试剂

胰蛋白酶 Tkypsin 1:250(上海化学试剂购供应站)、葡萄糖、苯酚、浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、NaOH、Vc、Tris 试剂、硫酸亚铁铵、邻二氮菲、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、邻苯三酚、HCl、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250 等均为分析纯试剂。

### 1.3 主要仪器

722E 可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂),GR-200 电子天平(A&D Company, Limited. Made in Japan)等。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 多糖的测定<sup>[3,4]</sup>

作者:学士,副教授。

\* 陕西理工学院科研基金资助项目(SLG0432)

收稿日期:2006-09-27,改回日期 2006-12-26

#### 1.4.1.1 对照品溶液的制备

精密称取经 80℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖 0.1 g,于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,浓度为 1 mg/mL,备用。

#### 1.4.1.2 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,分别置 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。各精密吸取 1.0 mL 置于 7 支具塞试管中,分别加 8% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀。再依次快速加入浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5.0 mL,摇匀。置水浴中加热 15 min,取出冷至室温。用 722E 分光光度计于 490 nm 波长处测定吸收度,以糖的含量为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程为:

$$A = 9.36C - 0.00175 (C: \text{mg/mL}) \quad r = 0.9907.$$

#### 1.4.2 蛋白质含量的测定<sup>[2]</sup>

考马斯亮蓝 G-250 法。以牛血清蛋白作标准曲线。精密称取牛血清蛋白 0.1 g,配制浓度为 1 mg/mL 的溶液 100 mL。分别吸取牛血清蛋白标准溶液(1 mg/mL)0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,加入蒸馏水,定容至 5 mL。充分振荡。准确吸取所配各管溶液 0.2 mL,放入具塞试管中,加入考马斯亮蓝 G-250 蛋白染色剂 10 mL,将试管中溶液混合后静置 2 min,用 1 cm 厚的比色皿在 595 nm 下读取吸光度。以浓度为横坐标, A 为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程为:

$$A = 0.028 + 0.592C (C: \text{mg/mL}) \quad r = 0.9989$$

### 1.5 多糖的提取和纯化<sup>[2~5]</sup>

#### 1.5.1 多糖的提取

称取 20 g 美味牛肝菌粉末,于烧杯中(料液比 1:20)加入 400 mL 蒸馏水,pH 至 8,80℃ 水浴加热 1 h,趁热过滤,滤液离心,收集上清液,减压浓缩,然后加入 2 倍浓缩液体积的无水乙醇进行醇析、过夜,离心,弃去上清液,将沉淀烘干,即得粗多糖。

## 1.5.2 三氯乙酸-正丁醇法脱蛋白

称取 0.600 0 g 粗多糖溶解于 100 mL 水中,加入 2 倍多糖溶液体积的  $V(\text{三氯乙酸}):V(\text{正丁醇混})=1:20$ ,振荡 30 min,静置 1.5 h。取下层多糖层测定蛋白含量,依含量变化重复此操作过程,至蛋白完全去除为止。

后将下层多糖溶液,加入 3 倍体积的无水乙醇进行醇析。离心,烘干,得到纯多糖。

## 1.6 美味牛肝菌多糖抗氧化性研究

1.6.1 清除羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )活性试验

Fenton 反应。利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  与  $\text{Fe}^{2+}$  混合产生  $\cdot\text{OH}$ ,邻二氮菲- $\text{Fe}^{2+}$  水溶液经  $\cdot\text{OH}$  氧化为邻二氮菲- $\text{Fe}^{3+}$  后,其最大吸收峰消失,然后测定其吸光度的变化<sup>[6~8]</sup>。

取 8 支 10 mL 比色管,均依次加入 1 mL pH8.20 的 Tris-HCL 溶液、0.3 mL 7.5 mmol/L 硫酸亚铁铵溶液和 0.3 mL 7.5 mmol/L 的邻二氮菲溶液,1 号为空白,3~7 号分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 1 mg/mL 牛肝菌多糖溶液,8 号加入 1 mL 0.2 mg/mL 的 Vc 溶液,最后往 2~8 号分别加入 1 mL 7.5 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,定容至刻度。在 37℃ 水浴中反应 1 h,在 510 nm 下测吸光度  $A$ ,计算对  $\cdot\text{OH}$  的清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{(A_3 - A_2)}{(A_1 - A_2)} \times 100$$

式中, $A_1$  和  $A_2$  分别为体系不加  $\text{H}_2\text{O}_2$  和加  $\text{H}_2\text{O}_2$  时的吸光度, $A_3$  为加入多糖溶液后的吸光度。

1.6.2 抑制超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )活性试验

邻苯三酚在碱性条件下自氧化形成中间产物  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,此自由基能促进邻苯三酚的自氧化<sup>[7~9]</sup>,因此通过测定某物质对邻苯三酚自氧化的抑制作用,即可表征其对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除作用。

取 5 支 10 mL 试管,各加入 0.05 mol/L Tris-HCL 缓冲液 4.5 mL,置于 25℃ 水浴中预热 25 min,分别加入 0.1 mL 不同浓度的多糖溶液和 0.4 mL 0.5 mmol/L 邻苯三酚溶液,混匀后于 25℃ 水浴中反应 4 min,加入 8 mol/L HCL 2 滴终止反应,320 nm 处测定吸光度 ( $A_i$ ),空白对照组以相同体积的蒸馏水代替。清除率计算公式为:

$$P/\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

式中, $A_0$  为空白的吸光度; $A_i$  为多糖的吸光度。

## 2 结果与分析

美味牛肝菌多糖为棕色固体,经测定计算得出多

糖第 1 次的提取率为 7.29%。

利用考马斯亮蓝 G-250 法初测美味牛肝菌的蛋白含量为 19.01%,经 4 次脱蛋白后,其蛋白含量为 1.39%,蛋白清除率为 92.69%。蛋白含量与脱蛋白的次数的关系见图 1。

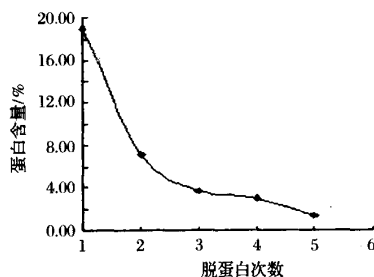


图 1 蛋白含量与脱蛋白率的关系

通过图 1 可以得出,用三氯乙酸-正丁醇法脱蛋白,因第 4 次的蛋白含量与第 3 次相差较小,考虑到经济因素,进行 3 次就可以了。

2.1 美味牛肝菌多糖对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用

利用 Fenton 反应,测定美味牛肝菌多糖对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力,其结果如图 2 所示。同时,用 Vc 对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用进行对比,结果见表 1。

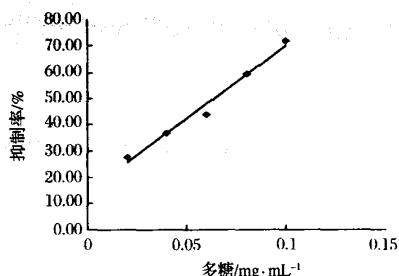


图 2 牛肝菌多糖对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用

由图 2 和表 1 中的数据可看出,在所选质量浓度范围内,随着质量浓度的增大,美味牛肝菌多糖对  $\cdot\text{OH}$  的作用显著,美味牛肝菌多糖浓度约为 0.04 mg/mL 时,其清除  $\cdot\text{OH}$  的能力与 0.02 mg/mL Vc 的清除能力相当,当美味牛肝菌多糖浓度大于 0.04 mg/mL 后,其清除能力远优于 Vc,这说明,美味牛肝菌多糖对  $\cdot\text{OH}$  有较强的清除作用。

表 1 不同量牛肝菌多糖和 Vc 对  $\cdot\text{OH}$  的清除率

多糖/ Vc(mg/mL)	清除率/%
0.02/0.01	27.69/23.76
0.04/0.02	36.71/36.70
0.06/0.04	43.74/39.69
0.08/0.06	59.64/52.31
0.10/0.06	71.78/64.42

2.2 美味牛肝菌多糖对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除作用

配制不同浓度的美味牛肝菌多糖溶液,测定其对 $O_2^- \cdot$ 的清除作用,清除率变化见图3;同时,与不同浓度的Vc溶液进行对比,结果见表2。

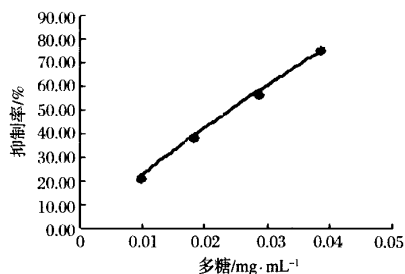


图3 牛肝菌多糖对 $O_2^- \cdot$ 的清除作用

表2 不同量牛肝菌多糖和Vc对 $\cdot OH$ 的清除率

多糖/ Vc(浓度:mg/mL)	清除率/%
0.01/0.01	20.69/23.76
0.02/0.02	39.81/40.70
0.03/0.03	59.74/52.69
0.04/0.04	79.34/63.31

结果表明,多糖浓度为0.04 mg/mL时对 $O_2^- \cdot$ 的抑制率达到79.34%,浓度为0.02 mg/mL时,其抗氧化活性与相同浓度的Vc相当。由于 $O_2^- \cdot$ 是机体代谢过程中产生中的一种活性氧自由基,在人体内大量积聚会导致机体免疫活性减弱,而实验数据显示,美味牛肝菌多糖对 $O_2^- \cdot$ 具有高的抑制活性。而且,美味牛肝菌多糖的清除 $O_2^- \cdot$ 活性能力随着浓度升高而升高。

### 3 结论

(1)实验采用热水浸提提取,80%乙醇沉淀的方法从美味牛肝菌中得到美味牛肝菌多糖,提取率为

7.29%。美味牛肝菌多糖的蛋白初始含量为19.01%,经4次脱蛋白后,其蛋白含量为1.39%,蛋白清除率为92.70%。未脱除的蛋白可能与多糖结合牢固,形成复合物。

(2)抗氧化实验表明,牛肝菌多糖对 $\cdot OH$ 具有强的抑制作用,在浓度0.1 mg/mL时抑制率达到71.78%。对 $O_2^- \cdot$ 也有强的抑制生成作用,在浓度为0.04 mg/mL时对 $O_2^- \cdot$ 的抑制率达到79.34%。且均随着浓度的增大其抗氧化作用亦增强。

### 参 考 文 献

- 1 郑德勇,安鑫南.植物抗氧化剂的研究概况与发展趋势[J].林产化学与工业,2004(3):113~118
- 2 李志洲,邓百万,杨海涛,等.美味牛肝菌多糖的最佳提取工艺研究[J].氨基酸和生物资源,2003(3):27~29
- 3 李淑惠,纪耀华,崔玉辉,等.白鲜皮粗多糖提取与总糖含量测定[J].时珍国医国药 2000(1):14
- 4 张青,张天民.苯酚-硫酸比色法测多糖含量[J].山东食品科技,2004(7):17~18
- 5 王丽华.姬松茸多糖脱蛋白方法研究[J].食品科技,2003(1):18~19
- 6 曹艳萍.苦荞叶提取物抗氧化性及其协同效应的研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005(8):144~148
- 7 孟庆繁,于笑坤,徐睦芸,等.刺五加多糖的提取及其抗氧化性[J].吉林大学学报(理学版),2005(5):683~686
- 8 高春燕,田呈瑞,周默.枸杞多糖体清除自由基活性研究[J].三峡大学学报(自然科学版),2005(5):456~458
- 9 范智超,张志琪.川芎多糖的提取、纯化及抗氧化活性的研究[J].天然产物研究开发,2005(5):561~567

## Study on the Antioxidative Activity of *Boletus edulis* Bull Polysaccharide

Li Zhizhou

(School of Chemistry and Environmental Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

**ABSTRACT** The antioxidative activity of *Boletus edulis* Bull polysaccharide was studied and compared with Vc by using the superoxide anion free radical system, hydroxyl radical system in this paper. The results showed that the *Boletus edulis* Bull polysaccharide can clear out the radicals effectively, and the function of antioxidative become stronger with the increase of the polysaccharide concentration. When the concentration of boletus *Edulis* Bull polysaccharide is about 0.04 mg/mL, the ability of scavenging hydroxyl radical is close to 0.02 mg/mL Vc, and the scavenging ability can reaches to 71.78% at the concentration of 0.10mg/mL. The ability of scavenging superoxide anion free radical is 79.34% when the concentration of *Boletus edulis* Bull polysaccharide is about 0.04 mg/mL.

**Key words** *Boletus edulis* Bull polysaccharide, antioxidative activity, free radical