

火棘果多糖抗油脂氧化酸败分析

王晓静,陈莉华*,向明芳

(吉首大学 化学化工学院,湖南 吉首,416000)

摘要 超声波辅助水提火棘果中的多糖,醇沉、分离得到3种多糖 PS1、PS2、PS3,以葡萄糖为对照品测定其含量,分析其光谱特征,考察其对油脂的抗氧化酸败水解效果并与 V_E 作比较。结果表明:PS1、PS2、PS3 得率分别为 0.68%、0.82%、1.25%,3种多糖均为吡喃糖链构型。当质量浓度均为 0.3g/L 时,PS3 对各种油脂的抗氧化活性最好,对菜籽油、橄榄油、鹅油、鸡油、牛油、猪油的抗氧化保护率分别为 69.38%、59.19%、56.55%、66.52%、53.72%、66.42%,酸价降低值分别为 0.96、0.89、0.84、0.95、0.81、0.91。一定质量浓度范围内,3种多糖对各类油脂的抗氧化酸败水解能力均与其浓度呈现剂量效应关系。

关键词 火棘果;多糖;抗油脂氧化酸败;分析

火棘果为蔷薇科苹果亚科 (Maloideae) 火棘属 (*Pyracantha roeme*) 的常绿野生木火棘的果实,在临床药用上,主治脾胃虚弱,消化不良、泻泄、痢疾、疝积等病症^[1]。火棘果中含有多种有效成分,如原花青素^[2]、多酚^[3]、黄酮^[4]以及多糖等,具有抗氧化、抗病毒、抗细菌、抑制肿瘤、增强免疫力、利胆、助消化、促进血凝等多种功效,在医疗、保健方面有广阔的开发前景。多糖是植物中起抗氧化作用的活性成分之一,已有从节节草^[5]、牛蒡子^[6]、甜菜废粕^[7]等提取多糖化合物并研究其抗氧化活性。火棘果中含有丰富的多糖^[8-9],该类多糖对油脂氧化的抑制作用的研究有待深入。本实验以超声波辅助水热法提取火棘果多糖,采用无水乙醇及三氯乙酸沉淀法分离出粗提物中的多糖,用不同醇沉浓度制备多糖。探讨不同醇浓度制备的多糖对植物油、家禽油及动物油三大类共6种油脂氧化体系的抗氧化性能,并与油脂常用的抗氧化剂 V_E 进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

火棘果于12月采于吉首大学(经吉首大学生物资源与环境科学学院植物教研室鉴定为蔷薇科植物

火棘 (*Pyracantha fortuneana* (Maxim) Li) 的成熟果实)。菜籽油、橄榄油、鹅油、鸡油、猪板油、牛油市购,体积分数 95% 乙醇、浓 HCl、NaOH、无水乙醚、冰醋酸、三氯甲烷、酚酞、KI、淀粉、丙酮、乙醚、三氯乙酸、苯酚、浓 H_2SO_4 等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

723 可见分光光度计,上海菁华分析仪器有限公司;UV-2450 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;Nicolet iS10 型傅里叶红外,美国 Nicolet 公司;KQ250-E 型超声波发生器,昆山市超声仪器有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;GZX-9070MBE 数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;K-201B-II 旋转蒸发器,郑州长城科工贸有限公司;HH-S 恒温水浴锅,郑州长城科工贸有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 火棘果多糖的提取

准确称取 90 g 的火棘果干果均分成 3 份,用去离子水清洗干净,转移到 250 mL 带塞锥形瓶中,按料液比 1:10 (g:mL) 热水超声提取 (80℃, 6 h, 浸泡过夜),过滤,滤液减压浓缩 (80℃),合并 3 次浓缩液,加入无水乙醇使醇浓度达到 90%,4℃ 放置 12 h。过滤,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤。加入适量去离子水使沉淀溶解,过滤,除去少量不溶物,滤液加入 1/5 体积的 10% 三氯乙酸,磁力搅拌 30 min,4℃ 放置 12 h,重复操作直至不产生沉淀为止。离心,取上清液用 1 mol/L 的 NaOH 中和后三等分,分别加入去离子水使醇浓度为 40%、60%、80%,4℃ 放置过夜

第一作者:硕士研究生(陈莉华教授为通讯作者,E-mail:chenlihua99@163.com)。

基金项目:科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(10C26214302421, 11C26214305373);吉首大学武陵山区特色植物资源开发与应用湖南省研究生培养创新基地开放项目(2014KFXM01);湖南省科技厅科技计划资助项目(2013FJ3026)

收稿日期:2015-09-14,改回日期:2015-10-31

后离心,取沉淀烘干,称重,依次得 PS1、PS2、PS3 三种不同分子质量段的多糖。

1.3.2 不同分子质量段多糖含量测定

以葡萄糖为对照品采用苯酚—硫酸法^[9]测定上述各分子质量段的多糖含量,即配制葡萄糖水溶液的标准系列,吸取质量浓度分别为 0.0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 g/L 的葡萄糖溶液 1 mL 于 10 mL 试管中,加入 1 mL 6% 苯酚溶液,再缓慢加入 3 mL 浓 H₂SO₄,摇匀,水浴 100℃ 条件下反应 10 min 后,室温冷却后于 λ_{490 nm} 处测定吸光度,空白对照以水代替。以质量浓度对吸光度进行回归得标准曲线方程: $Y = 0.0117X + 0.0113$ ($r = 0.9959$),且总多糖浓度在 0 ~ 0.10 g/L 时,吸收曲线呈现良好的线性关系。将 1.3.1 得到的 3 种多糖在超声波辅助的条件下均用 100 mL 去离子水溶解,吸取各样液 1 mL,按照标准曲线绘制方法分别测定不同分子质量段的多糖的吸光值 A ,由回归曲线方程求出各分子质量段多糖中的葡萄糖含量。火棘果多糖得率的计算公式如下:

$$y/\% = \frac{m}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

式中: m , 多糖质量, g; m_1 , 火棘果质量, g。

1.3.3 紫外光谱分析

将样液用去离子水稀释 8 ~ 10 倍,以去离子水作为空白对照,在紫外光谱仪上进行紫外扫描(200 ~ 600 nm)。

1.3.4 红外光谱分析

采用溴化钾压片法。将 KBr 与 PS1、PS2、PS3 粉末混合均匀后置于玛瑙研钵中充分研磨烘干,制备成红外光谱样品,然后用傅立叶红外光谱仪分析。扫描波数范围设定为 500 ~ 4 000 cm⁻¹,扫描频率为 32 Hz,分辨率为 4 cm⁻¹。

1.3.5 火棘果多糖抗油脂氧化

在无水酸性条件下,油脂中的过氧化物使 I⁻ 定量氧化成 I₂, I₂ 与 I⁻ 结合生成易溶于水的 I₃⁻, 利用 I₃⁻ 的颜色与标准碘液进行比较定量。采用国际通用的烘箱储藏法使油脂氧化酸败变质并测定过氧化值(POV)。

参照文献^[5]的方法略作改动,称取 2 g 各种类型(即菜籽油、橄榄油、鹅油、鸡油、猪油、牛油)的油脂加入 1.00 mL 不同质量浓度的 PS1、PS2、PS3 纯化液及对照品 V_E(丙酮作溶剂)溶液,然后在烘箱温度 70℃ 强化 1 h,比较不同提取液加入前后油脂的过氧化值,计算出各种多糖对油脂的保护率,进而考察

PS1、PS2、PS3 作为抗氧化剂对植物油、家禽油、动物油 3 类油脂的氧化体系的抑制作用,并与 V_E 抗氧化作用进行比较。

碘量 M (μmol) 与吸光度 (A) 在 0.0 ~ 0.96 μmol 间有良好的线性关系,回归方程为 $M = 4.0153A + 0.0039$, $R^2 = 0.9986$ 。

按式(2)和式(3)计算油脂过氧化值(POV)及提取液对油脂的保护率(η):

$$\text{POV}/(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{M}{m} \quad (2)$$

$$\eta/\% = \left(1 - \frac{\text{POV}_{\text{未}1} - \text{POV}_{\text{初}}}{\text{POV}_{\text{未}2} - \text{POV}_{\text{初}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中: M , 碘生成物质的量, mmol; m , 油脂质量, kg; η , 提取液对油脂的保护率; POV_初, 未对油脂进行强化氧化时的过氧化值, mmol/kg; POV_{未1}, 添加提取液的油脂强化氧化后的过氧化值, mmol/kg; POV_{未2}, 未添加提取液的油脂强化氧化后的过氧化值, mmol/kg。

1.3.6 火棘果多糖抗油脂酸败水解

采用烘箱储藏法使油脂发生水解酸败变质,酸价的测定参照食用植物油卫生标准即 GB/T 5009.37—2003 略加改动(国标采用 KOH 测定酸价,本文用 NaOH)。分别称取 2 g 菜籽油、橄榄油、鹅油、鸡油、猪油、牛油加入 1.00 mL 不同质量浓度的 PS1、PS2、PS3 纯化液及对照品 V_E(丙酮作溶剂)溶液后在烘箱温度 70℃ 强化 1 h,测定 PS1、PS2、PS3 纯化液及对照品 V_E 加入前后油脂的酸值,用于衡量其抗油脂酸败水解能力。

按公式(4)和公式(5)计算酸价(AV)及酸价降低值(ΔAV):

$$\text{AV}/(\text{mgNaOH} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{1000 \times \rho_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}} \times 40}{m} \quad (4)$$

$$\Delta \text{AV}/(\text{mgNaOH} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{AV}_2 - \text{AV}_1 \quad (5)$$

式中: AV, 酸值, mg/g; m , 油脂的质量, g; ρ_{NaOH} , NaOH 物质的量浓度, 0.1 mol/L; V_{NaOH} 消耗 NaOH 的体积, L; AV₁, 添加提取液的油脂强化氧化后的酸值, mg/g; AV₂, 未添加提取液的油脂强化氧化后的酸值, mg/g; ΔAV , 酸值降低值, mg/g。

以上测定均平行进行 3 次,结果为 3 次测定结果的平均值。

2 结果与分析

2.1 火棘果多糖的含量测定

测定火棘果多糖中多糖的质量,依据火棘果质量、火棘果多糖质量计算得到 PS1、PS2、PS3 多糖的得率分

别为0.68%、0.82%、1.25%。当以葡萄糖为对照品测定含量时,质量浓度均为0.20 g/L的PS1、PS2、PS3中葡萄糖质量浓度分别为0.059、0.075、0.080 g/L。

2.2 火棘果多糖的紫外光谱分析

火棘果多糖的紫外光谱分析结果见图1。

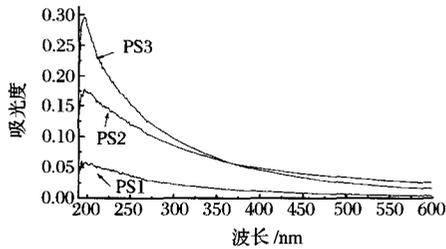


图1 火棘果多糖的紫外光谱

Fig. 1 UV spectrum of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana*

图1结果显示,PS1、PS2和PS3在200 nm波长附近出现较强的吸收峰,这与文献^[6]报道的195 nm处为多糖的特征吸收峰一致;在260 nm和280 nm波长附近曲线平坦,无明显的核酸、蛋白质特征吸收峰,说明样品中的蛋白质含量很低。

2.3 火棘果多糖的红外光谱分析

火棘果多糖的红外光谱分析结果见图2。

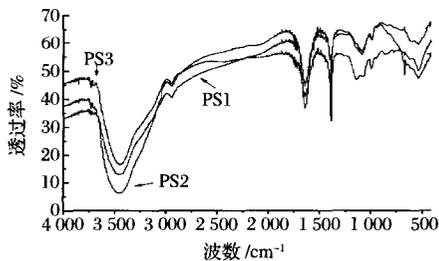


图2 火棘果多糖的红外光谱

Fig. 2 IR spectrum of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana*

图2结果显示,PS1、PS2和PS3具有多糖类物质的特征吸收峰。从图2谱中可推测:3455 cm⁻¹左右出现的强吸收峰是由于O—H键伸缩振动引起的,表明PS1、PS2、PS3中存在分子内和分子间氢键;2933 cm⁻¹处的小肩峰和1384 cm⁻¹处的吸收峰为次甲基或甲基的C—H伸缩振动和弯曲振动的特征峰。以上2个吸收峰均为多糖的特征吸收峰。1636 cm⁻¹明显吸收峰是羧基的C=O对称伸缩振动所引起的,加之1085 cm⁻¹的C—O伸缩振动,表明这3种多糖组分可能含有糖醛酸结构^[7],说明PS1、PS2、

PS3是一种酸性杂多糖。1085、993 cm⁻¹为碳水化合物的C—O和糖环C—O—C醚键的非对称振动引起的吸收,因此推断多糖为吡喃糖链构型^[7]。537 cm⁻¹吸收峰是C—CO变形振动引起。综上所述,采用不同醇沉浓度制备的多糖提取物均为典型的多糖类物质,且它们的基团无显著性差异。

2.4 火棘果多糖对油脂氧化的抑制效果

不同质量浓度的PS1、PS2、PS3及对照品V_E对油脂氧化抑制作用结果见图3。

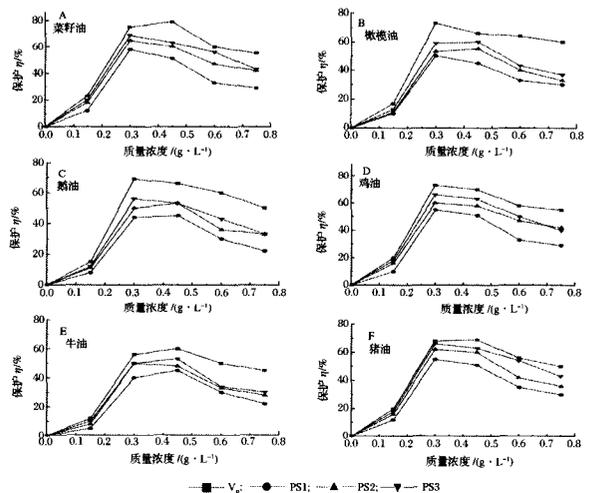


图3 火棘果多糖对油脂氧化的保护作用

Fig. 3 Protection effect of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana* on oils and fats

由图3可知,在所探讨的质量浓度内,火棘果多糖对各油脂的保护率与浓度呈现出一定的规律。当质量浓度低于0.3 g/L时,保护率随着PS1、PS2、PS3及对照品V_E的质量浓度的增大而增大;随后当质量浓度的增大时,各抗氧化剂的保护率缓慢下降,这与龙进国^[10]的研究颇有相似之处。当质量浓度为0.3 g/L时,PS1、PS2、PS3及对照品V_E对菜籽油的保护率分别为58.05%、65.15%、69.38%、75.24%,对橄榄油的保护率分别为50.71%、53.56%、59.19%、73.32%。这2种植物油中,火棘果多糖对菜籽油的保护率较大。在相同的质量浓度下,PS1、PS2、PS3及对照品V_E对鹅油的保护率分别为44.15%、50.03%、56.55%、69.23%,对鸡油的保护率分别为55.97%、60.37%、66.52%、73.45%。这2种家禽油中,多糖对鸡油氧化的抑制效果比对鹅油的好。PS1、PS2、PS3及对照品V_E在该浓度下,对牛油的保护率分别为40.13%、50.17%、53.72%、56.45%,对猪油的保护率分别为55.82%、62.02%、66.42%、68.05%。

对于这2种动物油,PS1、PS2、PS3对猪油的抗氧化效果比牛油的好。

火棘果多糖PS1、PS2、PS3对各类油脂的抗氧化活性变化趋势大体相同,抗氧化能力先随浓度成正相关,达到一定浓度后抗氧化能力随浓度增加而降低,但它们也有一定的差别。在相同质量浓度下,同一种抗氧化剂对各油脂的保护率顺序为: $\eta_{\text{菜籽油}} > \eta_{\text{猪油}} > \eta_{\text{鸡油}} > \eta_{\text{橄榄油}} > \eta_{\text{鹅油}} > \eta_{\text{牛油}}$ 。结果表明,在相同的氧化条件下,由于不同油脂的不饱和程度、脂肪酸的组成及脂肪酸双键的位置和数量的不同,从而有氧化产物的种类和数量的差别,进而导致抗氧化剂抗氧化效果的不同。另一方面,各油的黏度不同使得火棘果多糖在不同的油脂里溶解度和分散程度不同,也导致了火棘果多糖对各类油脂抗氧化活性的差异。有关多糖抗油脂氧化的机理研究正在进行中。

2.5 火棘果多糖抗油脂酸败水解

油脂氧化反应所生成的过氧化物,是油脂氧化酸败的关键产物。因此,测定油脂POV值,可判定其氧化变质的程度。当过氧化值明显升高时,表明油脂的氧化稳定性下降,酸败即将开始。但由于氢过氧化物容易分解而进一步酸败水解,所以仅用代表其含量的POV值未能全面反映油脂酸败的真实情况。因此,还要把代表游离脂肪酸含量的AV值作为辅助指标来衡量油脂酸败的程度。

以酸价降低值为指标,考察了不同质量浓度的PS1、PS2及PS3对油脂酸败水解的影响,结果见图4。

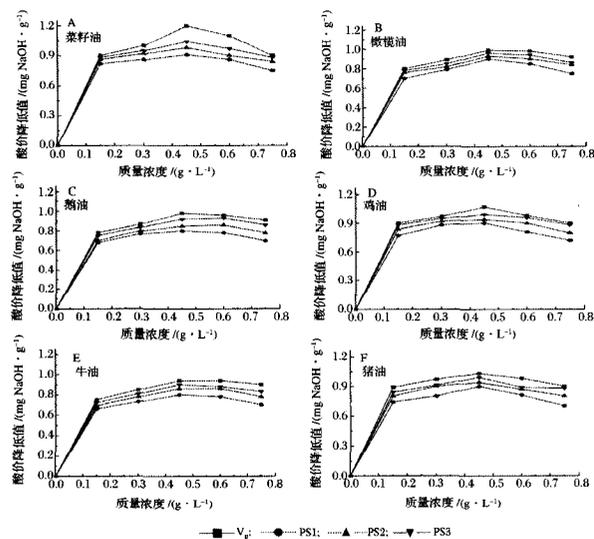


图4 火棘果多糖抗油脂酸败水解效果

Fig. 4 Inhibitory effect of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana* on oils and fats

由图4可知,6种油脂氧化体系的酸价降低值与4种抗氧化剂(PS1、PS2、PS3、 V_E)的质量浓度存在一定的剂量正相关效应,说明这几种抗氧化剂对这6种油脂的酸败水解均具有一定抑制作用。同时由6个图可以得到,虽然PS1、PS2、PS3对各油脂具有一定的抗酸败水解能力,但它们抗油脂酸败水解效果不及 V_E 。当质量浓度均为0.3g/L时,图4-A中PS1、PS2、PS3及对对照品 V_E 的酸价降低值分别为0.89、0.94、0.96、0.98;图4-B中四者的酸价降低值分别为0.8、0.86、0.89、0.9;而图4-C中降低值分别为0.78、0.8、0.84、0.87;图4-D中酸价降低值分别为0.88、0.92、0.95、0.97;图4-E中酸价降低值分别为0.73、0.78、0.81、0.85;图4-F中酸价降低值分别为0.80、0.90、0.91、0.97。由此得出, V_E 对各类油脂酸败水解的抑制作用最好,PS2、PS3抗油脂酸败水解能力与 V_E 相当。由图4可以总结出PS2、PS3是很好的油脂酸败水解的抑制剂。

PS2、PS3抗油脂酸败水解能力与 V_E 相当,均良好,而PS1的抗酸败水解能力稍微弱一点,这表明,采用不同醇沉浓度制备的多糖对不同种类油脂的抗氧化能力不同,即不同醇沉浓度制备的多糖的活性不同。而植物多糖的活性与其分子质量、溶解度、黏度和化学结构有关^[5]。

3 结论

从火棘果中提取分离出的PS1、PS2、PS3三种多糖的得率分别为0.68%、0.82%、1.25%。紫外光谱分析出火棘果多糖样品中几乎不含蛋白质。红外光谱分析出采用不同醇沉浓度制备的火棘果多糖为典型的多糖类物质,多糖组分中可能含有糖醛酸结构,初步鉴定该多糖为吡喃糖链构型。火棘果多糖对油脂具有一定的抗氧化活性,其中多糖含量较高的PS2、PS3对各类油脂的抗氧化活性较优异。研究结果表明,不同醇沉浓度制备的多糖对不同种类油脂的抗氧化能力有差异。

火棘果多糖是一种优良的油脂抗氧化剂,作为一种新的天然、保健的绿色食品抗氧化剂具有良好的开发前景。

参 考 文 献

- [1] 刘世彪,易浪波,李宽,等. 湘西自治州不同产地火棘果实的营养成分[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(3):58-60.

- [2] 鄢又玉, 沈丹华, 王红娟, 等. 火棘原花青素制备及抗氧化功效研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(4): 35 - 39, 148.
- [3] 翁文江, 高雪. 火棘果不同极性部位多酚体外抗氧化研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1): 77 - 80, 96.
- [4] 李伟, 田成, 汪满, 等. 火棘果黄酮提取工艺优化及其抗氧化作用[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2013, 31(2): 145 - 148.
- [5] 张俊生, 陈莉华, 朱士龙, 等. 节节草多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(05): 86 - 89.
- [6] 喻俊, 王涛, 贾春红, 等. 响应面优化牛蒡子多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(6): 207 - 212.
- [7] 赵亚红, 王文侠, 张显斌, 等. 高温高压提取甜菜废粕多糖的工艺及其抗氧化性研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 230 - 235.
- [8] 赵杰, 孙设宗, 官守涛, 等. 火棘多糖清除氧自由基及抗脂质过氧化作用[J]. 湖北医药学院学报, 2012, 31(6): 464 - 467.
- [9] 赵宏, 张宇, 柴桂芳, 等. 沙棘多糖的闪式提取工艺条件的优化[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(2): 364 - 366.
- [10] 陈莉华, 龙进国, 谭林艳, 等. 红果参多糖的提取纯化及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 170 - 173.

Analysis for lipid antioxidant activity of polysaccharides from *Pyracantha fortuneana*

WANG Xiao-jing, CHEN Li-hua^{*}, XIANG Ming-fang

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

ABSTRACT The polysaccharides were extracted from *Pyracantha fortuneana* with ultrasonic-assisted. The product were precipitated with ethanol, then PS1、PS2、PS3 were obtained, respectively. The content of extracts were determined using glucose as index. The polysaccharides were analyzed with spectrum. The inhibitory effect to oxidation rancidity of oils and fats were investigated, and compared with V_E . The results showed that the yield rate of PS1, PS2, PS3 were 0.68%, 0.82%, 1.25%, respectively. Spectrum analysis showed that these polysaccharides were pyranose chain configuration. When the polysaccharides concentration was 0.3g/L, the antioxidant activity of PS3 was prominent than others. The protection rates of PS3 for rapeseed oil, olive oil, goose grease, chicken grease, beef tallow, lard fat were 69.38%, 59.19%, 56.55%, 66.52%, 53.72% and 66.42%, respectively. The acid value reduction for rapeseed oil, olive oil, goose grease, chicken grease, beef tallow, lard fat were 0.96, 0.89, 0.84, 0.95, 0.81 and 0.91, respectively. The results showed that these polysaccharides exhibited excellent ability to protect oils and fats. Furthermore, the antioxidant activity increased with the increasing of the concentration of polysaccharides.

Key words *Pyracantha fortuneana*; polysaccharides; anti-oxidative rancidity; analysis