

# 油茶饼粕多糖的 分级及其抗氧化性评价

石浩<sup>1,2</sup>, 何小娥<sup>1</sup>, 黄卫文<sup>1</sup>, 胡玉玲<sup>1</sup>, 樊绍刚<sup>1</sup>, 王文龙<sup>1,\*</sup>

(1. 湖南应用技术学院农林科技学院, 湖南常德 415100;

2. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:**为探究油茶饼粕多糖的抗氧化活性,以12年生油茶果(饼粕)为试材提取油茶饼粕多糖,采用纤维素柱层析和葡聚糖凝胶柱层析方法分离多糖,并对各组分多糖进行抗氧化分析,选出抗氧化活性最佳的多糖,并将其与 $V_C$ 、 $V_E$ 进行复配,分析复配物的抗氧化活性。结果表明:在分离得到 $DT_A$ 、 $DT_B$ 、 $DT_{C1}$ 、 $DT_{C2}$ 、 $DT_D$ 5个多糖组分中, $DT_{C1}$ 的分子量在10万Dal左右,且综合抗氧化能力最强。当其浓度为2.0 mg/mL时,DPPH自由基清除率可达80%以上。由Isobologram分析图可知,多糖( $DT_{C1}$ )与 $V_C$ (1:0.162)、 $V_E$ (1:0.319)复配后,对DPPH自由基清除率的3个效应点都在相加线及95%可信限的左侧,理论 $IC_{50add}$ 值与实验 $IC_{50mix}$ 值有显著性差异,并且相互作用指数都小于1,证实多糖( $DT_{C1}$ )与 $V_C$ 、 $V_E$ 之间存在协同抗氧化效应,且两者均在1:1时复配效果最好。

**关键词:**油茶饼粕,多糖,分级,抗氧化评价

## Classification and Antioxidant Activity of Polysaccharide from *Camellia* Cake

SHI Hao<sup>1,2</sup>, HE Xiao-e<sup>1</sup>, HUANG Wei-wen<sup>1</sup>, HU Yu-ling<sup>1</sup>, FAN Shao-gang<sup>1</sup>, WANG Wen-long<sup>1,\*</sup>

(1. College of Agriculture and Forestry, Hunan Applied Technology University, Changde 415100, China;

2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:**To explore the antioxidant activity of polysaccharide from *Camellia* cake, 12 years old *Camellia* fruit (cake) was used to extract *Camellia* cake polysaccharides. Cellulose column chromatography and sephadex column chromatography were used to separate polysaccharides, and analyzed the antioxidant of polysaccharides in each component. Selecting the polysaccharide with the best antioxidant activity, and mix with  $V_C$ ,  $V_E$  to analyze the antioxidant activity of the compounds. The results showed that 5 polysaccharides component were obtained, which named respectively:  $DT_A$ ,  $DT_B$ ,  $DT_{C1}$ ,  $DT_{C2}$  and  $DT_D$ . In these components, the molecular weight of  $DT_{C1}$  was about 100 thousand Da, and its comprehensive antioxidant capacity was the strongest. When the concentration of  $DT_{C1}$  was 2.0 mg/mL, the scavenging rate of DPPH radical was over 80%. The Isobologram analysis was showed that 3 effect-response points (DPPH radical scavenging rate) of polysaccharide ( $DT_{C1}$ ) combined with  $V_C$  (1:0.162)/ $V_E$  (1:0.319) were all on the left side of addition line and 95% confidence limit. There was significant difference between  $IC_{50add}$  value and  $IC_{50mix}$  value, and the interaction index was less than 1. It was confirmed that there had synergistic antioxidant effect between  $DT_{C1}$  and  $V_C$ ,  $V_E$ , and both of them had the best combination effect at 1:1.

**Key words:** *Camellia* cake; polysaccharide; classification; antioxidant evaluation

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)14-0065-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.14.013

引文格式: 石浩, 何小娥, 黄卫文, 等. 油茶饼粕多糖的分级及其抗氧化性评价[J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 65-70, 86.

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)属油茶属茶科,常绿小乔木<sup>[1-2]</sup>,主要种植在湖南、江西两省,占据全国总种植面积的60%以上<sup>[3]</sup>。在获取茶油的同时,每

年油茶饼粕的产量也十分巨大,目前年产量已高达40万吨以上,多年来它被作为一种“废弃物”,而常常被人忽视<sup>[4-5]</sup>。目前国内油茶饼粕大部分被用作

收稿日期:2017-10-30

作者简介:石浩(1988-),男,硕士,助教,研究方向:植物资源高值化利用技术,E-mail:411863216@qq.com。

\*通讯作者:王文龙(1956-),男,学士,教授,研究方向:植物生理生化,E-mail:1137293462@qq.com。

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(16B188);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(201713809004);湖南省科技厅重点研发计划(2015CK3005)。

物肥料及动物饲料的原材料中,很少有做进一步的开发利用,油茶饼粕中含有一定量的代谢产物,其中多糖类含量高达30%以上。多糖作为油茶饼粕中的主要物质,具有一定的保健作用,如提高免疫力<sup>[6]</sup>、抗氧化、抗衰老<sup>[7-9]</sup>、降血糖<sup>[10]</sup>、抗肿瘤等<sup>[7,11]</sup>。因此,对油茶饼粕中多糖类物质的利用与活性研究是非常具有必要性的。

生态环境日益严重的污染以及人类精神、物质生活压力的增加,都将直接或间接导致人体内自由基含量的增加。由于自由基属于体内的一种高能分子,也破坏细胞膜,降低细胞活性,加速细胞内沉积物的生成,常会引发一些心脑血管病、癌症等高发的慢性疾病<sup>[12-13]</sup>,因此对油茶饼粕多糖清除自由基活性方面的研究,以及开发相应清除自由基的保健品尤为重要。近年来,国内外在多糖清除自由基方面的研究比较多<sup>[14]</sup>,但对其纯化多糖与其他物质协同抗氧化作用的研究较少。有相关报道称<sup>[15]</sup>,有些复合剂活性相比单一药剂,具有活性高、成本低等优点,为避免高剂量带来的食品安全问题,有很好的应用前景。

本文首次以不同分子量油茶饼粕多糖为研究对象,通过测定其还原性、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和DPPH自由基的清除率,并采用Isobologram分析<sup>[16]</sup>法对多糖(DT<sub>Cl</sub>)与V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>复配后的抗氧化性能进行了全面分析,为进一步促进工业油茶籽粕的充分利用和多糖抗氧化性能产品的开发提供了有力依据。目前油茶为我国南方地区分布及栽培的主要经济林产业之一,其资源的开发与油茶果的综合利用成为油茶产业持续高效发展的重要保证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

油茶饼粕 湖南省常德市丁家港镇油茶果经榨取茶油后所得副产物;DEAE-52纤维素、Sephadex G-100葡聚糖凝胶、DPPH自由基、木瓜蛋白酶(酶活 $\geq 60$ 万U/g) Sigma公司;Dextran T-10、T-40、T-100、T-200、T-500系列标准多糖 Solarbio公司;V<sub>E</sub>、V<sub>C</sub>、氯化钠、无水乙醇、丙酮、正丁醇、氯仿、葡萄糖、98%浓硫酸、苯酚、氢氧化钠、铁氰化钾、三氯化铁、邻苯三酚、盐酸、水杨酸、硫酸亚铁、双氧水、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 国药集团化学试剂有限公司;有机试剂 均为分析纯。

THZ-92B型可调速控温摇床 上海浦东物理仪器厂;ZW1105051705型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;SB-3200D型超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司;AUW220D型电子天平 日本shimadzu公司;DR-1001型旋转蒸发器 郑州长城科工贸有限公司;TG16型台式高速离心机 长沙英泰仪器有限责任公司;DK-98-IIA型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;Thermo Savznt冷冻干燥仪 上海智岩科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 多糖供试液的制备 取10g油茶饼粕粉末经

3.0%木瓜蛋白酶反应3.0h后,75℃热水(1:30(g:mL))、1000W超声提取,提取3次,每次45min<sup>[17]</sup>。抽滤弃去渣,合并滤液,提取液经浓缩至30mL左右,加入1/3体积的Sevag试剂[氯仿:正丁醇=4:1(V:V)],混合振荡15min后,静置10min,除去水层与溶剂交界处的变性蛋白质。滤液经60℃减压蒸馏浓缩至15mL体积后,加入最终浓度为75%的乙醇,沉淀得粗多糖。粗多糖用20mL丙酮洗涤多次,得到初步纯化多糖溶液,将其浓缩至浸膏状后,-80℃冷冻干燥成粉末,称重约0.76g,4℃条件下保存备用。

1.2.2 多糖组分的分离纯化 取约50mg/mL的多糖水溶液10mL,分别相继上样于DEAE-52纤维素柱和Sephadex G-100葡聚糖柱进行柱层析,用0.05、0.1、0.3、0.5mol/L NaCl进行分段梯度洗脱,每个浓度的洗脱体积为90mL;洗脱流速为1.0mL/min,收集洗脱液,5mL/管,采用硫酸-苯酚法显色跟踪测定,共分离出5个对称性较好、纯度较高的多糖组分,依次命名为:DT<sub>A</sub>、DT<sub>B</sub>、DT<sub>C1</sub>、DT<sub>C2</sub>、DT<sub>D</sub>。合并各多糖组分的洗脱液,采用旋转蒸发仪浓缩,经60℃减压浓缩至浸膏状;浓缩液经-80℃冷冻干燥至粉末状,测定其含量、纯度备用。

1.2.3 多糖含量及纯度的测定

1.2.3.1 葡萄糖标准曲线的绘制 移液枪分别精密移取浓度为100μg/mL的葡萄糖对照品溶液0.15、0.30、0.45、0.60、0.75、1.00mL于6支20mL玻璃试管中,加入5.0%苯酚溶液1mL,并迅速加入浓硫酸5mL,摇匀,常温静置20min后沸水浴3min,取出后迅速冷却至室温,各试管中加蒸馏水补至10mL,在490nm处测定吸光值。精密量取蒸馏水1mL同上述操作,作为空白对照,以糖浓度为横坐标(x),吸光值为纵坐标(y)得回归方程: $y = 0.0095x + 0.0045$  ( $R^2 = 0.9993$ )。

1.2.3.2 多糖含量的测定 取上述所得多糖粉末0.05g,用蒸馏水溶解至1000倍体积后,取1mL稀释液采用硫酸-苯酚法测定多糖含量,经换算得总多糖为0.511g,其计算公式如下。

$$\text{多糖含量}(\text{mg}) = C_1 \times V \times N \times 10^{-3}$$

其中, $C_1$ 为样品测定吸光度在标准曲线中对应浓度(μg/mL); $V$ 为样品测定时体积(1mL); $N$ 为样品稀释倍数(1000)。

1.2.3.3 多糖纯度的测定 粗多糖经层析柱分离后,收集合并含相同组分的洗脱液,浓缩至浸膏状后,-80℃冷冻干燥至粉末,分别称量和测定各组分多糖的质量,计算纯度。

$$\text{多糖纯度}(\%) = \frac{A_i}{A_j} \times 100$$

其中, $A_i$ 为多糖样品测定质量(mg); $A_j$ 为多糖样品称量质量(mg)

1.2.4 多糖分子量范围的确定 采用葡聚糖柱层析法。将浓度为5mg/mL的Dextran T-10、T-40、T-100、T-200、T-500系列标准多糖0.1mL分别相继上样,用双蒸水洗脱,每5mL一管收集流出液,苯酚-硫酸法显色,收集合并洗脱液,求得洗脱体积

( $V_e$ ),用 Dextran T-2000 同法测得柱床体积  $V_0$ ,以  $V_e/V_0$  为横坐标,相对分子质量对数 ( $\lg M$ ) 为纵坐标,求得回归方程:  $y = -0.194x + 5.9377$  ( $R^2 = 0.9991$ )。各组分多糖均采用同法上柱得体积  $V_e'$ ,根据  $V_e'/V_0$  值代入到标准曲线方程中,求得其相应多糖组分的分子量。

### 1.2.5 多糖组分抗氧化能力的测定

**1.2.5.1 还原能力测定** 参照郝旭梅等<sup>[18]</sup>方法并稍作修改。用移液枪移取 1.0 mL 不同浓度、不同组分多糖溶液于 10 mL 玻璃试管中,同时加入 1.5 mL 浓度为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 ( $\text{pH} = 6.6$ ) 以及 1.5 mL 浓度为 1.0% 的  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液,混匀,在 55 °C 的水浴锅中反应 25 min 后冷水浴冷却,再加入 1.5 mL 浓度为 10% 的三氯乙酸溶液,摇匀振荡 3 min 后加入 4 mL 蒸馏水和 0.20% 的  $\text{FeCl}_3$  溶液 0.5 mL,摇匀,充分反应 10 min 后测定吸光值  $A_{700\text{nm}}$ ,每个样品测三次平行,以蒸馏水作为样品空白对照。

**1.2.5.2 羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除力测定** 参照景永帅等<sup>[19]</sup>方法并稍作修改。用移液枪移取 1.0 mL 不同浓度、不同组分多糖溶液于 10 mL 玻璃试管中,同时加入 1.0 mL 浓度为 15 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液以及 1.0 mL 浓度为 15 mmol/L 的双氧水溶液,混匀,常温下反应 10 min 后加入 1.0 mL 浓度为 15 mmol/L 的水杨酸溶液,摇匀,常温下反应 30 min 后补加蒸馏水 1.0 mL,在 510 nm 处测定样品组吸光值  $A_i$ ,样品背景吸光值  $A_j$ ,以及蒸馏水作为样品空白对照吸光值  $A_0$ ,每个样品测三次平行。

$$\text{清除率}(S, \%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100$$

**1.2.5.3 超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 清除力测定** 参照李斐菲等<sup>[20]</sup>方法并稍作修改。用移液枪移取 0.1 mL 邻苯三酚于 10 mL 试管中,依次加入 6.0 mL PBS 缓冲溶液 ( $\text{pH} = 8.2$ ) 和不同浓度、不同组分多糖溶液 1.0 mL,迅速混匀,在 25 °C 恒温水浴中反应 4 min,在 320 nm 处测定样品组吸光值  $A_i$ ,样品背景吸光值  $A_j$ ,以及蒸馏水作为样品空白对照吸光值  $A_0$ ,每个样品测三次平行。计算公式同 1.2.5.2。

**1.2.5.4 DPPH 自由基清除力测定** 参照刘军军等<sup>[21]</sup>方法并稍作修改。称取适量粗多糖、不同组分多糖及  $V_c$  与  $V_e$ ,配成不同浓度的溶液。分别取不同浓度溶液 1.0 mL,用 50% 乙醇补加至 4.0 mL,再加 0.5 mg/mL 的 DPPH 溶液 1.0 mL,摇匀,在室温避光反应 30 min 后在 517 nm 波长处测其吸光度  $A_i$ ;样品背景吸光值  $A_j$ ;对照组以等体积 50% 乙醇代替样品溶液,测定吸光度  $A_0$ ,计算公式同 1.2.5.2。

**1.2.6 Isobologram 分析法研究多糖与  $V_c$ 、 $V_e$  的相互作用** 以多糖、 $V_c$ 、 $V_e$  单独作用的  $\text{IC}_{50}$  值的比值作为参考,选择多糖与  $V_e$  的固定比例(质量浓度比)为 1:1、3:1、9:1,多糖与  $V_c$  的固定比例为 1:1、6:1、36:1,按固定比例混合后,以同样的方法测定其对 DPPH 自由基的清除能力,计算清除率及复合组的  $\text{IC}_{50}$  值。

对药物之间相互作用关系进行统计学分析<sup>[22-23]</sup>。

按如下公式计算  $\text{IC}_{50\text{add}}$ :

$$\text{IC}_{50\text{add}} = \frac{\text{IC}_{50\text{A}}}{P_1 + R \times P_2}$$

式中:R 为 A、B 两种抗氧化剂单独应用时的效价比,即  $R = \text{IC}_{50\text{A}}/\text{IC}_{50\text{B}}$ ;  $P_1$  为抗氧化剂 A 在复配组中所占的比例;  $P_2$  为抗氧化剂 B 在复配组中所占的比例,  $P_2 = 1 - P_1$ 。由实验可以得到复配组实际的  $\text{IC}_{50\text{mix}}$  值,比较理论上的  $\text{IC}_{50\text{add}}$  和实验得到的  $\text{IC}_{50\text{mix}}$ ,确定是否存在显著性差异,若  $\text{IC}_{50\text{mix}}$  值小于  $\text{IC}_{50\text{add}}$  值,表示相互作用为协同作用。

再计算相互作用指数 ( $\gamma$ ),常用其来评价协同或拮抗作用的程度。

$$\gamma = \frac{\text{IC}_{50\text{Amix}}}{\text{IC}_{50\text{A}}} + \frac{\text{IC}_{50\text{Bmix}}}{\text{IC}_{50\text{B}}}$$

式中: $\text{IC}_{50\text{Amix}}$ 、 $\text{IC}_{50\text{Bmix}}$  分别为复配组中 A、B 两种抗氧化剂的  $\text{IC}_{50}$  值;  $\text{IC}_{50\text{A}}$ 、 $\text{IC}_{50\text{B}}$  分别为 A、B 两种抗氧化剂单独作用时的  $\text{IC}_{50}$  值。若  $\gamma < 1$ ,表示相互作用为协同作用, $\gamma$  值越小说明协同作用越强;若  $\gamma > 1$ ,表示相互作用为拮抗作用;若  $\gamma = 1$ ,表示相互作用为相加<sup>[24]</sup>。

## 1.3 数据处理

数据采用 Origin 制图,各抗氧化指标实验数据采用 SAS 9.0 统计软件进行显著性分析。图表中不同小写字母表示  $\alpha = 0.05$  显著性水平,  $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖柱层析洗脱图谱

取约 50 mg/mL 的多糖水溶液 10 mL,依次上样于已经预处理好的纤维素柱和葡聚糖凝胶柱,实验结果由图 1 可知,共得到 5 个对称性好,无重叠,纯度较高的多糖组分,分别命名为  $\text{DT}_A$ 、 $\text{DT}_B$ 、 $\text{DT}_C$ 、 $\text{DT}_D$ 、 $\text{DT}_E$ (其中  $\text{DT}_C$  在葡聚糖凝胶柱中得到进一步分离纯化出 3 个组分)。由此图 1 可知油茶饼粕多糖经 DEAE-52 纤维素和 SephadexG-100 葡聚糖凝胶柱层析后可得到纯度较高的不同多糖组分。

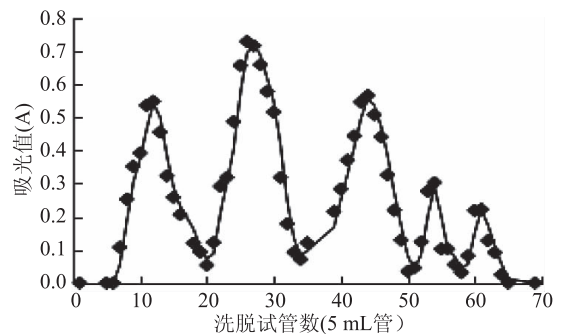


图 1 多糖洗脱曲线图谱

Fig.1 Curve of polysaccharide elution

### 2.2 多糖组分含量、纯度及分子量的确定

各组分多糖的分子量大小均不一样,且有较大差别;通过柱分离所得多糖组分,计算各组分的含量及纯度。实验结果如表 1 所示,可看出随着多糖洗脱体积的增加,多糖的分子量不断的减小;  $\text{DT}_A$  最先被洗脱出来,分子质量最大,在 50 万左右,其后组分

表1 不同组分多糖的确定( $n \geq 3$ )Table 1 Determination of different components of polysaccharide( $n \geq 3$ )

No	洗脱体积(mL)	lgM	分子量(Da)	含量(%)	纯度(%)
DT <sub>A</sub>	60	5.68	612084~321062	22.86 ± 1.45 <sup>b</sup>	82.36 ± 2.61 <sup>bc</sup>
DT <sub>B</sub>	130	5.38	305516~160255	27.52 ± 2.31 <sup>c</sup>	80.12 ± 3.28 <sup>ab</sup>
DT <sub>C1</sub>	220	4.99	152495~72431	24.42 ± 1.21 <sup>b</sup>	78.94 ± 1.73 <sup>a</sup>
DT <sub>C2</sub>	270	4.77	68923~46336	12.12 ± 0.98 <sup>a</sup>	79.35 ± 2.11 <sup>a</sup>
DT <sub>D</sub>	305	4.62	44093~36153	10.97 ± 0.57 <sup>a</sup>	84.51 ± 3.79 <sup>c</sup>

注:图中不同小写字母表示 $p < 0.05$ ,具显著性差异。

DT<sub>B</sub>、DT<sub>C1</sub>、DT<sub>C2</sub>分别被洗脱出来,分子量依次为20万、10万、5万左右,DT<sub>D</sub>最后被洗脱出来,分子量最小,在4万左右。各组分多糖的纯度差别不大,在80%左右;含量有一定的差异,DT<sub>A</sub>、DT<sub>B</sub>、DT<sub>C1</sub>的含量在25%左右,其余两个组分在10%左右。

### 2.3 多糖抗氧化能力的测定

2.3.1 还原能力的测定 不同组分及不同浓度下多糖还原能力的大小有较大的差别,其测定结果如图2所示,各组分多糖随着其浓度的增加,还原能力逐渐增强,具有一定的正相关性,在0.2~1.0 mg/mL浓度范围内,还原力增加了4.3~11.5倍。在(1.0 mg/mL浓度下)不同多糖组分间还原力的大小依次为:DT<sub>C1</sub> > DT<sub>C2</sub> > DT<sub>A</sub> > DT<sub>D</sub> > DT<sub>B</sub>,DT<sub>C1</sub>(0.527)相对于DT<sub>B</sub>的还原力提高了1.7倍,说明各组分多糖由于其结构以及分子量的不一样,最终导致其自身还原力也相差较大。因此,在今后对油茶饼粕多糖类抗氧化产品开发时可选择10万左右分子量的多糖。

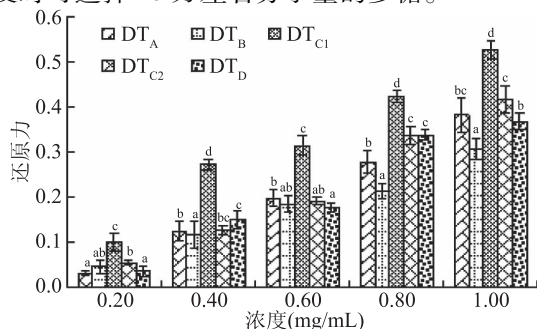


图2 不同组分多糖的还原力

Fig.2 Reducing power of polysaccharides from different components

注:图中不同字母表明差异显著( $p < 0.05$ );图3~图6同。

2.3.2  $\cdot\text{OH}$  自由基清除力测定结果 不同组分及不同浓度下多糖对 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除力的大小也具有一定的差异,其测定结果如图3所示,随着各组分多糖底物浓度的增加, $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力逐渐增强,在0.1~0.5 mg/mL浓度范围内, $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力增加迅速,如DT<sub>C1</sub>在0.5 mg/mL时清除率增加了60.50%;0.5~1.5 mg/mL浓度范围内, $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力增加也较为迅速,但当浓度 $\geq 1.5$  mg/mL时, $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力逐渐趋于平稳。在2.0 mg/mL浓度下,不同多糖组分间 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力的大小依次为:DT<sub>C1</sub> > DT<sub>A</sub> > DT<sub>C2</sub> > DT<sub>D</sub> > DT<sub>B</sub>,DT<sub>C1</sub>(78.92%)相对于DT<sub>B</sub>提高了31.00%。

2.3.3  $\text{O}_2^-$  自由基清除力测定结果 各组分多糖在

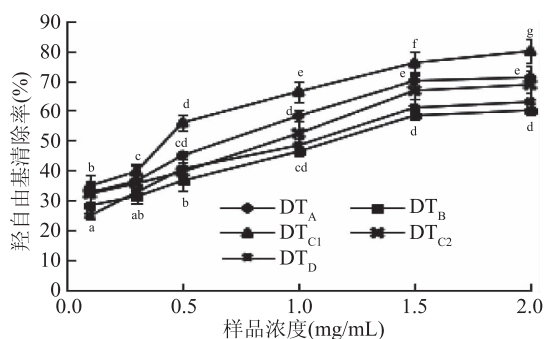


图3 不同组分多糖的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率  
Fig.3 Scavenging rate of  $\cdot\text{OH}$  radical in different fractions of polysaccharides

不同浓度下对 $\text{O}_2^-$ 自由基清除力的大小不一样,其测定结果如图4所示,随着各组分多糖底物浓度的增加, $\text{O}_2^-$ 自由基清除能力逐渐增强,0.1~0.5 mg/mL时对 $\text{O}_2^-$ 自由基清除能力增加缓慢,0.5~1.5 mg/mL浓度范围内 $\text{O}_2^-$ 自由基清除能力增加也较为迅速。在浓度 $\geq 1.5$  mg/mL时趋于平稳。在2.0 mg/mL浓度下,不同多糖组分间 $\text{O}_2^-$ 自由基清除能力的大小依次为:DT<sub>C2</sub> > DT<sub>C1</sub> > DT<sub>A</sub> > DT<sub>D</sub> > DT<sub>B</sub>,DT<sub>C2</sub>(76.68%)相对于DT<sub>B</sub>提高了25.50%,说明不同多糖组分间对 $\text{O}_2^-$ 自由基清除力具有较大的差别,因此为后期多糖抗氧化资源的开发利用奠定了一定理论基础。

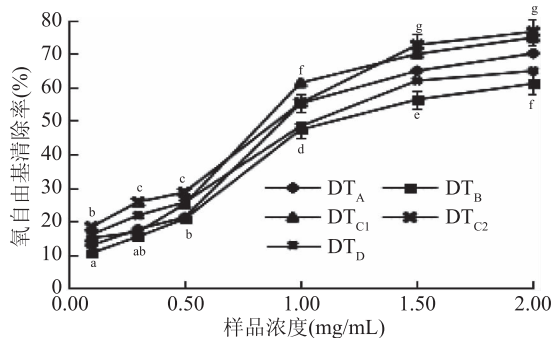


图4 不同组分多糖的超氧阴离子自由基清除率  
Fig.4 Scavenging rate of superoxide anion radical in different fractions of polysaccharides

### 2.4 多糖、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>清除DPPH自由基能力的比较

在一定浓度范围之内,各组分多糖、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>对DPPH自由基的清除能力与浓度呈量效关系,后均逐渐趋于稳定。由图5、图6可知,多糖具有较强清除自由基的能力,其中DT<sub>C1</sub>抑制效果最佳,当其质量浓

度达到 2.0 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率可达到 80% 以上。多糖 (DT<sub>Cl</sub>)、V<sub>E</sub>、V<sub>C</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.833、0.266、0.135 mg/mL,即清除 DPPH 自由基的能力依次为 V<sub>C</sub> > V<sub>E</sub> > 多糖。DT<sub>Cl</sub> 与 V<sub>C</sub> 及 V<sub>E</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值比率分别为 1:0.162、1:0.319,后续选择 3 组固定比例做复配物抗氧化测定。

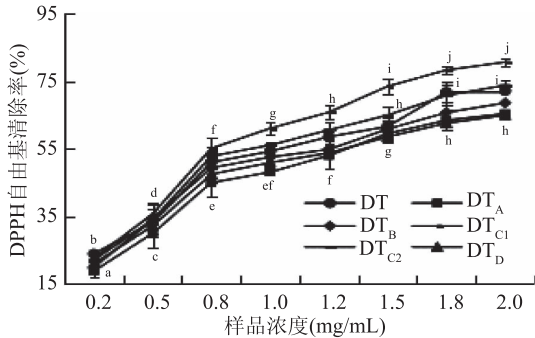


图5 不同组分多糖的 DPPH 自由基清除率  
Fig.5 Scavenging rate of DPPH radical in different fractions of polysaccharides

## 2.5 Isobologram 分析法评价多糖与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 的相互作用

2.5.1 DT<sub>Cl</sub> 与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 复配后清除 DPPH 自由基能力的测定 多糖 (DT<sub>Cl</sub>) 和 V<sub>C</sub> 的固定比例均定为 1:1、6:1、36:1,DT<sub>Cl</sub> 和 V<sub>E</sub> 的固定比例均定为 1:1、3:1、9:1,V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 固定比例中的质量浓度选择 0.01 ~ 0.50 mg/L,DT<sub>Cl</sub> 固定比例中的质量浓度选择 0.01 ~ 2.50 mg/L 较为适宜。以同样的方法测定复合抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除作用 (表 2);再由表 2 计算出多糖与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 组成的复配抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除作用的 IC<sub>50</sub> 值 (表 3)。

表 2 DT<sub>Cl</sub> 与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 复配后对 DPPH 自由基的清除能力 (n ≥ 3)

Table 2 DPPH radical scavenging capacity of DT<sub>Cl</sub> combined with V<sub>C</sub> or V<sub>E</sub> (n ≥ 3)

V <sub>C</sub> :DT <sub>Cl</sub>	V <sub>C</sub> 质量浓度 (mg/mL)	DT <sub>Cl</sub> 质量浓度 (mg/mL)	清除率 (%)	V <sub>E</sub> :DT <sub>Cl</sub>	V <sub>E</sub> 质量浓度 (mg/mL)	DT <sub>Cl</sub> 质量浓度 (mg/mL)	清除率 (%)
1:1	0.01	0.01	12.73 ± 0.02	1:1	0.05	0.05	28.44 ± 0.04
	0.03	0.03	24.32 ± 0.06		0.10	0.10	36.50 ± 0.08
	0.05	0.05	37.65 ± 0.18		0.15	0.15	49.68 ± 0.34
	0.10	0.10	55.18 ± 0.07		0.20	0.20	54.35 ± 0.22
	0.15	0.15	65.66 ± 0.22		0.25	0.25	62.42 ± 0.38
	0.20	0.20	80.34 ± 0.28		0.30	0.30	70.34 ± 0.30
1:6	0.01	0.06	18.63 ± 0.11	1:3	0.01	0.03	12.26 ± 0.21
	0.03	0.18	35.81 ± 0.19		0.05	0.15	31.59 ± 0.14
	0.05	0.30	53.62 ± 0.31		0.10	0.30	50.68 ± 0.22
	0.10	0.60	70.67 ± 0.30		0.15	0.450	61.65 ± 0.77
	0.15	0.90	80.76 ± 0.18		0.20	0.60	71.73 ± 0.43
	0.20	1.20	85.82 ± 0.12		0.25	0.75	77.34 ± 0.50
1:36	0.01	0.36	35.33 ± 0.33	1:9	0.04	0.36	35.12 ± 0.08
	0.02	0.72	59.95 ± 0.21		0.08	0.72	61.05 ± 0.12
	0.03	1.08	65.80 ± 0.07		0.12	1.08	69.77 ± 0.51
	0.04	1.44	77.46 ± 0.09		0.16	1.44	75.56 ± 0.20
	0.05	1.80	85.68 ± 0.26		0.20	1.80	81.45 ± 0.19
	0.06	2.16	90.25 ± 0.45		0.24	2.16	87.03 ± 0.18

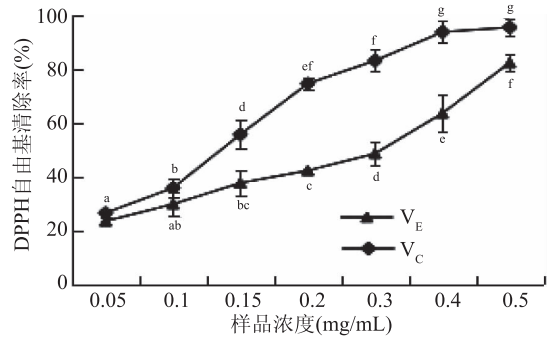


图 6 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 的 DPPH 自由基清除率

Fig.6 Scavenging rate of DPPH radical in V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>

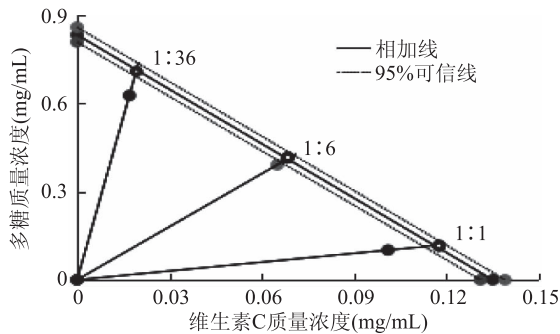
2.5.2 DT<sub>Cl</sub> 与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 复配后的统计学分析 按 1.2.6 所述方法及相应公式计算复配组 (表 2) 理论上的 IC<sub>50add</sub> 值和相互作用指数  $\gamma$ , 结果见表 3。由表 3 可出,各种组合的 IC<sub>50 mix</sub> 值均小于 IC<sub>50add</sub> 值,经过 t 检验证明两者之间有一定差异性,且相互作用指数  $\gamma$  都小于 1,表明多糖与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 的相互作用为协同作用。 $\gamma$  值越小说明协同作用越强,由此可得多糖与 V<sub>C</sub> 复配组的协同作用略弱于多糖与 V<sub>E</sub> 复配组,两组均是 1:1 配比的协同作用效果最好,其次是多糖与 V<sub>E</sub> (1:36) 复配组。

2.5.3 DT<sub>Cl</sub> 与 V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 复配后的 Isobologram 分析图 根据图 5、图 6、表 3 所测得 IC<sub>50</sub> 值标绘在 Isobologram 分析图上 (图 7、图 8)。将 DPPH 自由基清除实验中得到的 DT<sub>Cl</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值和 95% 可信限标绘在纵轴上,V<sub>C</sub> 和 V<sub>E</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值和 95% 可信限标绘在横轴上,将两 IC<sub>50</sub> 值相连后构成相加线,将两可信限分别相连后作出相加线 95% 可信限。若复合多糖 (DT<sub>Cl</sub>) 效应 (复配点 IC<sub>50</sub>) 落在相加效应线上或可信

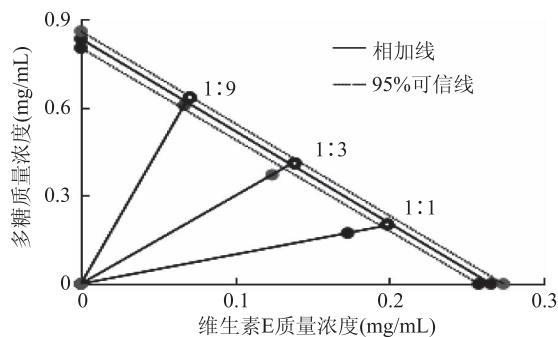
表3 DT<sub>Cl</sub>与V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>复配后清除DPPH自由基的IC<sub>50</sub>值及统计学分析结果Table 3 IC<sub>50</sub> value and statistical analysis of DPPH radical scavenging by DT<sub>Cl</sub> and V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>

组合	复配比例	DT <sub>Cl</sub>	V <sub>C</sub> (或V <sub>E</sub> )	IC <sub>50 mix</sub>	IC <sub>50 add</sub>	相互作用指数 ( $\gamma$ )
		IC <sub>50</sub> (mg/mL)				
V <sub>C</sub> :DT <sub>Cl</sub>	1:1	0.101	0.101	0.202	0.232	0.869
	1:6	0.391	0.065	0.456	0.479	0.951
	1:36	0.627	0.017	0.644	0.731	0.879
V <sub>E</sub> :DT <sub>Cl</sub>	1:1	0.173	0.173	0.354	0.403	0.858
	1:3	0.371	0.124	0.495	0.543	0.912
	1:9	0.579	0.064	0.643	0.687	0.936

限内,则表示两药作用为相加;如落在相加效应线的可信限左侧,则代表协同作用;如落于右侧,则为拮抗作用。由图7、图8可知,复配组的效应点均落在相加线和95%可信限的左侧,表明DT<sub>Cl</sub>与V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>复配后存在协同抗氧化作用。

图7 DT<sub>Cl</sub>与V<sub>C</sub>复配的Isobologram分析图Fig.7 Isobolographic plot of DT<sub>Cl</sub> from *Camellia* cakes combined with V<sub>C</sub>

注:相加线上的空心点(○)代表理论IC<sub>50 add</sub>值,实心点(●)代表实验IC<sub>50 mix</sub>值;图8同。

图8 DT<sub>Cl</sub>与V<sub>E</sub>复配的Isobologram分析图Fig.8 Isobolographic plot of DT<sub>Cl</sub> from *Camellia* cakes combined with V<sub>E</sub>

### 3 结论

对粗多糖分级纯化得到了5个纯度在80%以上的多糖组分,确定各组分分子量的范围在4、5、10、20、50万Dal左右,促进了对油茶饼粕多糖分子量的了解,为后续不同组分多糖活性分析奠定了基础,为多糖功能性产品的进一步开发与利用提供了方向。在对不同组分多糖抗氧化活性指标测定实验中,五个组分多糖的还原力、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·、·OH和DPPH自由基

清除能力的大小均有较大的差别,综合分析DT<sub>Cl</sub>抗氧化能力最强、其次是DT<sub>C2</sub>,说明分子量在5万~10万Da的油茶饼粕多糖具有较强的抗氧化能力。通过对DPPH清除实验比较了多糖(DT<sub>Cl</sub>)、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>的抗氧化活性,并通过Isobologram分析图对多糖纯化物与V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>复配清除DPPH的相互关系进行评价。结果表明,多糖对DPPH清除能力最强,但弱于V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>;多糖与V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>复配后具有一定的协同抗氧化作用,且多糖与V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>的最佳配比均为1:1。该研究为促进工业油茶籽粕的充分利用和多糖抗氧化活性产品的开发提供了依据,具有一定的理论意义和应用价值。

### 4 讨论

多糖组分得到柱分离,以及不同组分多糖抗氧化性差异可能是由于各组分多糖的单糖组成、极性大小、质量大小、黏度大小、空间构象等一些因素不一样所导致<sup>[25-26]</sup>,在后期实验中可进一步对不同组分多糖结构的测定,探讨其结构、组成与抗氧化能力大小的关系。目前抗氧化剂复配在一起发挥协同作用的机理主要有修复再生或新生、偶联氧化、吸收氧气、改变酶的活性、络合金属离子等<sup>[27-29]</sup>,影响协同作用强弱的因素主要有两种物质的平衡浓度及其配比等。今后可在本文的基础上进行进一步实验,研究多糖协同抗氧化的具体机理及其发挥最佳协同作用的平衡浓度,从而最大程度上节约成本,更好地指导生产与实践。

### 参考文献

- [1] 吕翠萍,罗正伟,刘虹,等.我国油茶研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(26):16177-16179.
- [2] Han X, Zhang D Q, Wang Z P, et al. SRAP-based molecular identification of elite cultivars of *Camellia oleifera* south Jiangxi province[J]. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 2012, 32(3): 147-151.
- [3] 郑剑,仲山民.响应面法优化水酶法提取油茶饼粕多糖[J].粮食与油脂,2016,29(12):14-17.
- [4] 范东斌,莫弦丰,陈玉竹,等.响应曲面法优化油茶饼粕蛋白的超声辅助提取工艺研究[J].食品工业科技,2014,35(3):199-202.
- [5] Wang J. Research progress in *Camellia oleifera* polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry,

(下转第86页)

pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good enzymatic hydrolysis and sugar yields [ J ] . *Bioresource Technology*, 2010, 101 ( 20 ) : 7827-7833.

[ 8 ] Pérez J A, Ballesteros I, Ballesteros M, et al. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production [ J ] . *Fuel*, 2008, 87 ( 17/18 ) : 3640-3647.

[ 9 ] Mosier N, Hendrickson R, H0 N, et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover [ J ] . *Bioresource Technology*, 2005, 96 ( 18 ) : 1986-1993.

[ 10 ] 许凤, 张逊, 周霞, 等. 农林生物质预处理过程中细胞壁主要组分溶解机理研究进展 [ J ] . *林业工程学报*, 2016, 1 ( 4 ) : 1-9.

[ 11 ] 张美云, 徐永建, 蒲文娟. 非木材纤维自催化乙醇制浆的研究进展 [ J ] . *中华纸业*, 2007, 28 ( 6 ) : 77-79.

[ 12 ] Gao Y S, Xu J L, Zhang Y, et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis [ J ] . *Bioresource Technology*, 2013, 144 : 396-400.

[ 13 ] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [ J ] . *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59 ( 2 ) : 257-268.

[ 14 ] Bjorkman A. Studies on finely divided wood. Part I. Extraction

of lignin with neutral solvents [ J ] . *Svensk Papperstiding*, 1956, 59 : 477-485.

[ 15 ] Ma H, Liu W W, Chen X, et al. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment [ J ] . *Bioresource Technology*, 2009, 100 ( 3 ) : 1279-1284.

[ 16 ] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples—laboratory analytical procedure ( LAP ) [ G ] . *National Renewable Energy Laboratory*, 2006-08-12.

[ 17 ] Marton R, Granzow S. Ethanol-alkali pulping [ J ] . *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 1982, 65 : 103-106.

[ 18 ] Zhao X, Cheng K, Liu D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis [ J ] . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82 ( 5 ) : 815-827.

[ 19 ] 詹怀宇. 制浆原理与工程 [ M ] . 北京: 中国轻工业出版社, 2008 : 38-78.

[ 20 ] 林伟生, 赵汉强, 常凤眉, 等. 甘蔗渣乙醇法制浆-添加剂对脱木素作用的影响 [ J ] . *化学通讯*, 1985 : 12-18.

[ 21 ] Boeriu C G, Bravo D, Gosselink R J A, et al. Characterisation of structure - dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy [ J ] . *Indian Crop Product*, 2004, 20 ( 2 ) : 205-218.

(上接第 70 页)

2016, 37 ( 17 ) : 372-380

[ 6 ] 汪名春, 聂陈志鹏, 朱培蕾, 等. 莴苣茎水溶性多糖的单糖组成及免疫调节活性研究 [ J ] . *食品与机械*, 2016 ( 5 ) : 148-151.

[ 7 ] 刘影, 丁祥, 刘露, 等. 松乳菇多糖对人喉癌 Hep-2 细胞肿瘤相关基因转录的影响 [ J ] . *食品工业科技*, 2017, 38 ( 6 ) : 174-178.

[ 8 ] 刘存芳, 史娟, 张强. 橘皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [ J ] . *食品与机械*, 2016 ( 8 ) : 147-150.

[ 9 ] 姜艳红, 张玲帆, 吕瑛, 等. 杏鲍菇多糖 PEP-2 的结构表征及其对肝癌细胞 HepG-2 抑制作用的研究 [ J ] . *食品工业科技*, 2016, 37 ( 19 ) : 111-116.

[ 10 ] 唐华丽, 孙桂菊, 陈忱. 枸杞多糖的化学分析与降血糖作用研究进展 [ J ] . *食品与机械*, 2013 ( 6 ) : 244-247.

[ 11 ] 康海权. 油茶蒲多糖的制备、组分分析及抗肿瘤活性初步研究 [ D ] . 杭州: 浙江大学, 2010.

[ 12 ] Valko M, Leibfriz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [ J ] . *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 39 ( 1 ) : 44-84.

[ 13 ] Pompella A, Comporti M. XENOBOTICS, free radicals and cell membranes [ J ] . *Pathophysiology*, 1998 ( 98 ) : 93-93.

[ 14 ] 王标诗, 吴艺华, 周泽捷, 等. 超声波辅助提取菠萝皮渣多糖及其抗氧化活性研究 [ J ] . *食品工业科技*, 2017, 38 ( 15 ) : 207-211.

[ 15 ] 尤玲玲, 王尚, 何庆峰, 等. 荷叶黄酮与 V<sub>C</sub> 的协同抗氧化作用 [ J ] . *食品与发酵工业*, 2012, 38 ( 11 ) : 92-95.

[ 16 ] 周玮婧. 天然抗氧化剂协同增效作用的研究进展 [ J ] . *中国食品工业*, 2011 ( 12 ) : 66-67.

[ 17 ] 石浩, 何小斌, 樊绍刚, 等. 超声协同酶法对油茶饼粕多糖提取工艺的研究 [ J ] . *食品工业科技*, 2017, 38 ( 20 ) :

197-203.

[ 18 ] 郝旭梅, 鲍建才, 杨智慧, 等. 无梗五加叶体外抗氧化活性研究 [ J ] . *包装与食品机械*, 2011, 29 ( 4 ) : 1-5.

[ 19 ] 景永帅, 吴兰芳, 王乾, 等. 远志多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [ J ] . *食品与机械*, 2016 ( 5 ) : 152-156.

[ 20 ] 李斐斐, 吴拥军, 屈凌波, 等. 中药巴戟天抗自由基活性的研究 [ J ] . *光谱实验室*, 2005, 22 ( 3 ) : 553-555.

[ 21 ] Liu J J, Liu J L, Shuai L I, et al. Study on Synergistic Antioxidant Activities of Flavonoids from Polygonum Bistorta L. with V<sub>C</sub> or Rutin [ J ] . *Chemistry and Bioengineering*, 2014 ( 6 ) : 34-37.

[ 22 ] 刘瑾, 邱海霞, 梅兴国. 等高线图解析法: 评价药物相互作用的方法 [ J ] . *国际药学研究杂志*, 2006, 33 ( 6 ) : 459-461.

[ 23 ] 李帅, 刘军军, 安红钢, 等. 黑柴胡黄酮纯化及其与维生素 C、芦丁协同抗氧化作用 [ J ] . *中成药*, 2015, 37 ( 6 ) : 1370-1374.

[ 24 ] Zhou W J, Sui Y, Sun Z D, et al. Synergistic Antioxidant Effects of Procyanidins from Litchi chinensis Pericarp and V<sub>C</sub> or V<sub>E</sub> [ J ] . *Food Science*, 2012, 33 ( 3 ) : 5-8.

[ 25 ] 何余堂, 潘孝明. 植物多糖的结构与活性研究进展 [ J ] . *食品科学*, 2010, 31 ( 17 ) : 493-496.

[ 26 ] 赵谋明, 刘敏, 林恋竹, 等. 山苦茶多糖结构表征及抗氧化活性研究 [ J ] . *现代食品科技*, 2015 ( 7 ) : 61-66.

[ 27 ] Gong Y Z, Ya - Jian X U, Liu H W, et al. Progress of synergistic antioxidant effects of natural antioxidants [ J ] . *Food Science and Technology*, 2012 ( 6 ) : 264-267.

[ 28 ] Liu L, Chen F S, Xue J Y. Research progress on complex antioxidants [ J ] . *China Food Additives*, 2012 ( 2 ) : 172-176.

[ 29 ] 黄盛蓝, 何航, 周玲. 复配天然抗氧化剂在肉类制品中的应用现状 [ J ] . *肉类工业*, 2015 ( 2 ) : 43-46.