

3种鹿源鹿茸多糖含量、红外谱图、抗氧化活性比较

何源¹, 王露露², 张晶^{1,2*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 长春科技学院医药学院, 吉林 长春 130600)

摘要:目的 比较梅花鹿鹿茸、马鹿鹿茸、驯鹿鹿茸多糖含量、红外谱图、抗氧化活性。方法 采用浓硫酸苯酚法测定鹿茸多糖含量, 傅里叶变换红外光谱法对鹿茸多糖的官能团组成进行分析, 红外二阶导数对3种鹿源鹿茸多糖红外谱图的差异比较, 测定它们对DPPH、ABTS、羟基自由基的清除能力及铁离子总还原力。结果 梅花鹿鹿茸多糖含量最高, 抗氧化活性最强。3种鹿茸多糖均具有典型的多糖结构, 并含有硫酸根基团, 属糖胺聚糖; 其官能团组成基本相似, 但马鹿鹿茸多糖、驯鹿鹿茸多糖在 $1\ 634\ \text{cm}^{-1}$ 处有较强的吸收峰, 而梅花鹿鹿茸多糖在 $1\ 618\ \text{cm}^{-1}$ 处有1个特征吸收峰, 驯鹿鹿茸多糖在 $1\ 498\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收带无肩峰, 峰型较宽。结论 本研究可为筛选鹿茸多糖作为天然抗氧化剂提供理论依据。

关键词: 梅花鹿; 马鹿; 驯鹿; 鹿茸多糖; 含量; 红外谱图; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-1028-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.064

鹿茸为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck、马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 雄鹿头上的未骨化密生茸毛的幼角, 是具有悠久历史的名贵传统中药。具有壮肾阳、益精血、强筋骨等功效, 用于肾阳不足、精血亏虚、阳痿滑精、宫冷不孕等^[1]。驯鹿 *Cervus rangifer* Tarandus 的雌雄鹿头上均有角, 其主要分布于北半球的环北极地区, 在中国多生长于大兴安岭地区, 驯鹿鹿茸与梅花鹿鹿茸、马鹿鹿茸一样, 均具有较高且相似的药用价值^[2]。鹿茸中活性成分包括脂类、多糖类、氨基酸类等, 这些成分具有抗炎、抗溃疡、抗衰老等多种药理作用^[3]。

傅立叶变换红外光谱法是分析中药中有效成分结构和官能团的常用方法^[4], 其原理是来自连续非相干光源的红外辐射穿过迈克尔逊干涉仪, 同时记录干涉图随光程差的变化, 并通过使用傅立叶变换过程从干涉图中解码频谱信息^[5]。红外二阶导数光谱可很好的分辨出红外谱图中肉眼观察不到的重叠吸收峰, 增强谱图的特征性, 提高分辨率, 能有效的辨别出相同种类不同来源的药材^[6]。

鹿茸多糖是鹿茸中主要的活性成分, 近年来不断有学者对鹿茸多糖的提取工艺做出优化, 崔长生等^[7]利用热水提取法提取鹿茸多糖。宋佳等^[8]利用超声辅助提取马鹿茸多糖。鹿茸多糖具有多种药理活性, 其中鹿茸多糖的抗氧化活性一直是研究的重点, 赵玉红等^[9]用阴离子交换和葡聚糖凝胶层析对鹿茸多糖进行分离纯化, 结果表明鹿茸多糖及其各组分对DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基均有清除效果, 且具有一定的还原能力。尽管鹿茸多糖的体外抗氧化活性已有研究, 但对3种鹿源鹿茸多糖

体外抗氧化活性的比较研究较少, 因此本文对3种鹿源鹿茸多糖的体外抗氧化活性进行分析比较, 为筛选出效果最佳的天然抗氧化剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 药材 梅花鹿鹿茸、马鹿鹿茸、驯鹿鹿茸于2019年采购于吉林双阳鹿场, 将其进行割绒去皮处理, 锯成片状, 高速万能粉碎机粉碎, 过80目筛, 在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 下保存。

1.2 试剂与仪器 乙醚、乙醇、氯仿、苯酚、浓硫酸、无水葡萄糖、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 FeSO_4 、 H_2O_2 、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、三氯乙酸、三氯化铁等(北京化工厂); DPPH、ABTS标准品(德国Aldrich公司)。傅里叶变换红外光谱仪 L1600400, 扫描范围 $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$, 分辨率 $4\ \text{cm}^{-1}$ (美国Perkin Elmer公司); T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); FLB-250型万能高速粉碎机(上海菲力博食品机械有限公司); XB120A电子天平(普利赛斯国际贸易上海有限公司); LYOQUEST-55西班牙泰事达冻干机(北京昊诺斯科技有限公司); SPECTROstar Nano高通量紫外酶标仪(伯齐科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 多糖提取 取过筛干燥后的鹿茸粉末各10 g, 乙醚回流提取3 h脱脂过滤, 残渣挥净乙醚后加水煎煮(料液比为1:10)3次, 1 h/次, 煎煮滤液, $4\ 500\ \text{r/min}$ 离心5 min, 取上清液, 加乙醇至80%以上, $4\ ^\circ\text{C}$ 静置过夜, $8\ 000\ \text{r/min}$ 离心, 沉淀加水溶解, 采用Sevage法^[10]除去溶液中杂质蛋白, 30% H_2O_2 脱色, 透析, 浓缩, 真空冷冻干燥24 h。

收稿日期: 2020-06-18

基金项目: 吉林省科技发展规划项目(20180414071GH, 20200404023YY)

作者简介: 何源(1996—), 男, 硕士生, 研究方向为天然产物化学。Tel: 17833125147, E-mail: 2833440573@qq.com

*通信作者: 张晶(1971—), 女, 博士生导师, 研究方向为天然产物化学。E-mail: zhjing0701@163.com

1.3.2 多糖含量测定 采用苯酚-浓硫酸法^[11]。精密称取 10 mg 葡萄糖粉末,加水定容至 100 mL 量瓶中,得到 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液,分别精密吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 至试管中,加水使其终体积为 1 mL,再加入 5% 苯酚 1.0 mL,混匀,沿管壁缓慢加入浓硫酸 5 mL,摇匀,沸水浴 20 min 后冷却静置 10 min,在 490 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标 (A)、多糖质量浓度为横坐标 (X) 进行回归,得方程为 $A=0.005\,9X+0.000\,7$ ($R^2=0.999\,6$),在 10~100 μg 范围内线性关系良好。精密称取多糖粉末 10 mg,制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液,测定含量,公式为含量 = (多糖质量浓度/100) $\times$ (粗多糖产量/鹿茸粉末质量)。

1.3.3 红外光谱分析 将多糖粉末在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干后过 80 目筛,取一定量平铺于 FT-IR 光谱的 ATR 测定窗口,调整旋钮使模具压平待测样品,待测力计数值稳定后观察红外光谱^[12],设定光谱扫描范围 4 000~400 cm^{-1} ,累计扫描 4 次,分辨率 5 cm^{-1} ,得到的红外原始谱图通过 Spectrum 软件进行平滑及基线校正进行优化处理,再作红外二阶导数分析。

1.3.4 抗氧化活性测定 将多糖配制成 1、2、4、6、8、10 mg/mL 溶液,同法处理维生素 C (阳性对照)。

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力 称取 DPPH 粉末 8.00 mg 至 100 mL 量瓶中,无水乙醇定容至刻度,避光保存。取多糖溶液 40 μL ,加入 160 μL DPPH 溶液后置于 96 孔板中,混匀,避光反应 1 h,在 517 nm 波长处测定吸光度,平行 3 次,取平均值,同法测定维生素 C 吸光度,计算 DPPH 自由基清除率,公式为清除率 = $[1 - (A-C)/B] \times 100\%$,其中 A 为多糖溶液+DPPH 吸光度, B 为水+DPPH 吸光度, C 为多糖溶液+无水乙醇吸光度。

1.3.4.2 ABTS 自由基清除能力 称取 20.40 mg ABTS 粉末至 10 mL 量瓶中,依次加入 5 mL 蒸馏水、5 mL 2.6 mmol/mL $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液,室温避光反应 16 h,无水乙醇稀释,使其在 734 nm 处的吸光度为 0.7 ± 0.05 。取多糖溶液 80 μL ,加入 ABTS 溶液 140 μL 后置于 96 孔板中,室温避光反应 30 min,在 734 nm 波长处测定吸光度,计算 ABTS 自由基清除率,公式为清除率 = $(1 - A/B) \times 100\%$,其中 A 为多糖溶液+ABTS 吸光度, B 为 ABTS 吸光度。

1.3.4.3 羟基自由基清除能力 准确吸取 10 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 10 μL 、蒸馏水 70 μL 、多糖溶液 10 μL 、10 mmol/L FeSO_4 溶液 10 μL 、100 mmol/L H_2O_2 100 μL ,置于 96 孔板中混匀,在 510 nm 波长处测定吸光度 A ;准确吸取 10 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 10 μL 、蒸馏水 80 μL 、多糖溶液 10 μL 、100 mmol/L H_2O_2 100 μL ,置于 96 孔板中混匀,在 510 nm 波长处测定吸光度 B ;准确吸取 10 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 10 μL 、蒸馏水 80 μL 、10 mmol/L FeSO_4 溶液 10 μL 、100 mmol/L H_2O_2 100 μL ,置于 96 孔板中混匀,在 510 nm 波长处测定吸光度 C ,计算羟基自由基清除率,公式为清除率 = $[1 - (A-B)/C] \times 100\%$ 。

1.3.4.4 铁离子总还原能力 取多糖溶液、1% 铁氰化钾、

磷酸盐缓冲液 ($\text{pH}=6.6$) 各 0.25 mL,置于 1.5 mL 小离心管中,混合均匀后 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min 后迅速取出,冷却至室温,加 0.25 mL 10% 三氯乙酸溶液,混匀,3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 100 μL ,加入 1% FeCl_3 溶液 20 μL 、蒸馏水 100 μL 至 96 孔板中,混匀静置 20 min 后在 700 nm 波长处测定吸光度 A 。取上清液 100 μL ,加入 120 μL 蒸馏水后置于 96 孔板中,混匀静置 20 min,在 700 nm 波长处测定吸光度 B ,计算铁离子总还原能力,公式为总还原能力 = $A-B$ 。

1.4 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理,计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐性时组间比较采用 LSD- t 检验,方差不齐时组间比较采用 Dunnett's 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多糖含量 由表 1 可知,梅花鹿、马鹿鹿茸多糖含量高于驯鹿鹿茸多糖含量 ($P < 0.05$)。

表 1 3 种鹿源鹿茸多糖含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

品种	含量/%
梅花鹿鹿茸	3.38 ± 0.17^A
马鹿鹿茸	3.24 ± 0.16^A
驯鹿鹿茸	3.01 ± 0.21^B

注:不同字母表示差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 红外光谱 图 1、表 2 显示,在 3 500~3 000 cm^{-1} 处是 O-H、N-H 伸缩振动的吸收带,驯鹿鹿茸多糖在 3 287 cm^{-1} 处的吸收峰略窄与其他两种鹿茸多糖;2 930 cm^{-1} 附近的 C-H 的拉伸和弯曲振动吸收峰是多糖的特征吸收峰,次峰出现在 2 854 cm^{-1} 处,表明存在亚甲基;3 种鹿茸多糖在 1 634 cm^{-1} 处的相对较强的吸收峰是由 C=O 伸缩振动引起的;1 547 cm^{-1} 附近是 N-H 的面内弯曲振动^[13];1 455、1 402 cm^{-1} 处是 C-H 的弯曲振动;1 337 cm^{-1} 附近是 C-N 的伸缩振动吸收峰,表明存在酰胺基团;1 240 cm^{-1} 附近是硫酸根中的 S=O 吸收峰^[14],表明 3 种鹿茸多糖均存在硫酸根基团;1 200~1 000 cm^{-1} 处吸收峰表示 C-O 伸缩的吡喃环振动^[15]。另外,梅花鹿鹿茸多糖的强度最大,峰型较宽,其次是驯鹿鹿茸多糖,峰型较尖锐,新西兰马鹿鹿茸多糖在此处的强度较小。综上所述,3 种鹿茸多糖均具有典型的多糖结构,并含有酰胺和硫酸根基团。

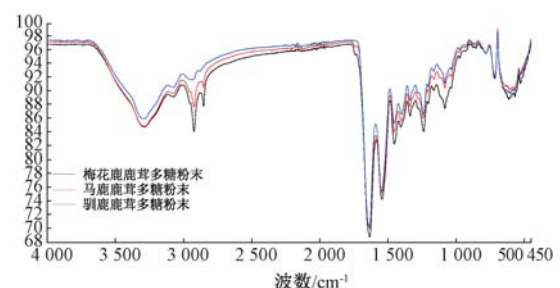


图 1 3 种鹿源鹿茸多糖红外光谱

表 3 显示,吸收峰强度依次为梅花鹿鹿茸多糖>马鹿鹿茸多糖>驯鹿鹿茸多糖,含量排序亦然。

表 2 共有峰官能团及振动方式

波数/cm ⁻¹	基团	振动方式
3 287	缔合羟基 O-H、N-H	伸缩振动
2 923、2 853	亚甲基 C-H	不对称伸缩振动
1 634	羰基 C=O	伸缩振动
1 547	N-H	面内弯曲振动
1 455、1 402	C-H	弯曲振动
1 337	C-N	伸缩振动
1 238	S=O	反对称伸缩振动
1 081	C-O	伸缩振动

表 3 共有峰吸收强度

波数/cm ⁻¹	3 287	2 923	2 853	1 634	1 547	1 455	1 402	1 337	1 238	1 081
梅花鹿鹿茸多糖	0.072 2	0.075 7	0.057 0	0.163 1	0.129 2	0.085 0	0.072 2	0.064 0	0.075 6	0.058 5
马鹿鹿茸多糖	0.071 8	0.057 2	0.043 4	0.154 7	0.124 3	0.076 2	0.067 8	0.057 0	0.065 8	0.043 8
驯鹿鹿茸多糖	0.066 1	0.038 2	0.032 2	0.154 9	0.122 6	0.069 7	0.062 8	0.052 8	0.062 9	0.040 5

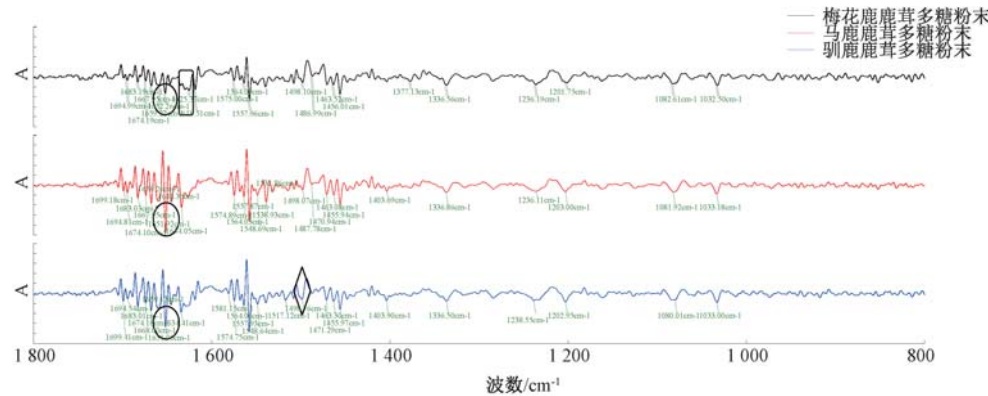


图 2 鹿茸多糖红外二阶导数谱图

2.4 抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 DPPH 自由基是一种稳定的自由基，其单电子可与抗氧化剂相互配对，使其吸光度减小，颜色从紫色变为淡黄色，被广泛用于评估食品、药品抗氧化能力^[16]。图 3 显示，DPPH 自由基清除能力依次为梅花鹿鹿茸多糖>驯鹿鹿茸多糖>马鹿鹿茸多糖，并呈现剂量依赖性，但弱于维生素 C。

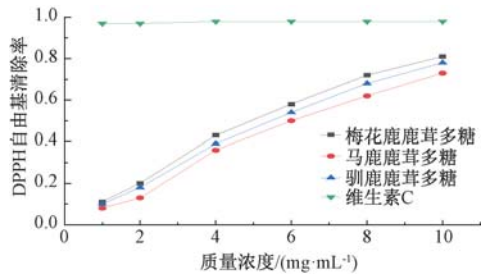


图 3 鹿茸多糖对 DPPH 自由基的清除作用

2.4.2 ABTS 自由基清除能力 ABTS 可与过硫酸钾发生氧化反应，生成稳定的蓝绿色阳离子自由基，被广泛应用于亲水性物质的抗氧化能力的测定^[17]。图 4 显示，ABTS 自由基清除能力依次为梅花鹿鹿茸多糖>驯鹿鹿茸多糖>马鹿鹿茸多糖，并呈现剂量依赖性，但弱于维生素 C。

2.3 红外二阶导数分析 在鹿茸多糖红外光谱图上出现多个吸收峰，但谱峰重叠现象严重，给谱图解析带来困难，故本实验在 1 800~800 cm⁻¹的光谱区间对其红外光谱进行了二阶导数处理。图 2 显示，鹿茸多糖在 1 694、1 683、1 667、1 652、1 575、1 564、1 557、1 498、1 463、1 455、1 336 cm⁻¹等位置有明显的共有吸收峰，表明存在芳环骨架振动；马鹿、驯鹿鹿茸多糖在 1 634 cm⁻¹处有 1 个较强的吸收峰，而梅花鹿鹿茸多糖在 1 618 cm⁻¹处有 1 个特征吸收峰，驯鹿鹿茸多糖在 1 498 cm⁻¹处的吸收带无肩峰，峰型较宽，由此可将 3 种鹿茸多糖区分开来。

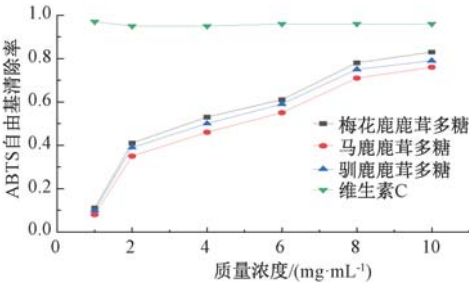


图 4 鹿茸多糖对 ABTS 自由基的清除作用

2.4.3 羟基自由基清除能力 羟基自由基被证明是一种最活泼的氧自由基，具有很高的反应速率常数，可使 DNA、蛋白质、脂质发生氧化损伤，被广泛应用于反映抗氧化能力强弱^[18]。图 5 显示，羟基自由基清除能力依次为梅花鹿鹿茸多糖>驯鹿鹿茸多糖>马鹿鹿茸多糖，并呈现剂量依赖性，但弱于维生素 C。

2.4.4 铁离子总还原能力 多糖的总还原力是测量其抗氧化活性的潜在指标，它通过给出电子发挥总还原力，进而达到清除自由基的目的，总还原力越强，抗氧化能力就越强^[19]。图 6 显示，总还原力依次为梅花鹿鹿茸多糖>驯鹿鹿茸多糖>马鹿鹿茸多糖，并呈现剂量依赖性，但弱于维生素 C。

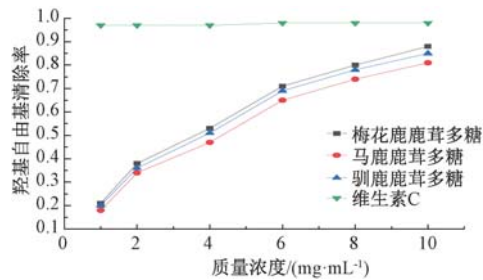


图5 鹿茸多糖对羟基自由基的清除作用

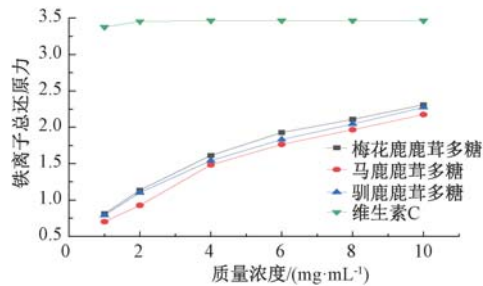


图6 鹿茸多糖对铁离子的总还原力

2.4.5 IC_{50} 将鹿茸多糖对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基的抗氧化曲线进行拟合, 得到 IC_{50} , 结果见表 4。由此可知, 梅花鹿鹿茸多糖 IC_{50} 最低, 马鹿鹿茸多糖 IC_{50} 最高, 即梅花鹿鹿茸多糖抗氧化活性最强, 马鹿鹿茸多糖抗氧化活性最弱。

表 4 鹿茸多糖 IC_{50} 测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	DPPH 自由基	ABTS 自由基	羟基自由基
梅花鹿鹿茸多糖	4.93±0.08 ^a	1.75±0.23 ^a	3.60±0.15 ^a
马鹿鹿茸多糖	6.00±0.15 ^c	2.89±0.09 ^c	4.33±0.19 ^c
驯鹿鹿茸多糖	5.47±0.14 ^b	2.00±0.06 ^b	3.87±0.17 ^b

注: 不同字母表示差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 结论

本实验从 3 种鹿源鹿茸中提取鹿茸多糖, 其优势在于可大量提取。结果, 梅花鹿鹿茸多糖的含量要高于驯鹿鹿茸多糖和马鹿鹿茸多糖; 从红外光谱中看出, 它们均具有典型的多糖结构, 且含有酰胺和硫酸根基团, 峰型与峰位置大致相似, 但峰强度有所差异, 说明 3 种鹿源中多糖类型相似但含量有所差异。红外的二阶导数谱图结果表明, 3 种鹿茸多糖在峰型上大致相似, 但也存在差异。梅花鹿鹿茸多糖在 1618 cm^{-1} 处有 1 个特征吸收峰, 马鹿鹿茸多糖、驯鹿鹿茸多糖在 1634 cm^{-1} 处有较强的吸收峰, 而梅花鹿鹿茸多糖则无此峰, 驯鹿鹿茸多糖在 1498 cm^{-1} 处的吸收带无肩峰且峰型较宽, 以此可进行辨别。另外, 3 种鹿源鹿茸多糖均具有体外抗氧化活性, 梅花鹿鹿茸多糖清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基的效果及铁离子还原力要高于驯鹿和马鹿鹿茸多糖。

综上所述, 本实验比较 3 种鹿源鹿茸多糖的抗氧化能力, 为该成分在天然抗氧化剂筛选方面提供了较强的理论依据, 并且其差异可能与多糖的含量、结构等因素有关, 后续还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 中药医药科技出版社, 2015: 323.
- [2] 张艳梅. 驯鹿的饲养与文化[J]. 中国畜牧业, 2016(21): 85-86.
- [3] 胡太超, 刘玉敏, 陶荣珊, 等. 鹿茸的化学成分及药理作用研究概述[J]. 经济动物学报, 2015, 19(3): 156-162.
- [4] 孙仁爽, 金哲雄, 张哲鹤, 等. 老鹤草中药材红外光谱的分析与鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(1): 81-84.
- [5] Guo X G, Jiang X L, Zhu Y M, et al. Unified description on principles of fourier transform infrared spectroscopy and terahertz time-domain spectroscopy [J]. *Infrared Phys Techn*, 2019, 101: 105-109.
- [6] 马天翔, 顾志荣, 马转霞, 等. 不同产地锁阳近红外光谱鉴别分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(4): 66-69.
- [7] 崔长升, 于 森, 王任晶, 等. 梅花鹿鹿茸多糖的提取工艺优化及抗衰老的作用[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(8): 1697-1701.
- [8] 宋 佳, 张振秋, 李 峰. 马鹿茸多糖超声提取工艺研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 346-347.
- [9] 赵玉红, 金秀明, 韩 睿. 鹿茸多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 155-158.
- [10] 刘晓茵, 赵 帅, 路 芳, 等. 半枝莲多糖的 Savege 法除蛋白工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(3): 56-58.
- [11] 张居作, 徐巧玲, 徐君飞, 等. 苦瓜多糖含量的苯酚硫酸法测量研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(5): 82-85.
- [12] 何晓凤. 鹿茸品质系统评价方法的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [13] 林建原, 王 杰, 张盼盼, 等. 蛭子糖胺聚糖的提取及纯化[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 121-128.
- [14] Chen S H, Huang H L, Huang G L, et al. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide [J]. *Int J of Biol Macromol*, 2019, 140: 1047-1053.
- [15] Cheng H, Huang H L, Huang G L, et al. The antioxidant activities of garlic polysaccharide and its derivatives[J]. *Int J of Biol Macromol*, 2019, 114: 1452-1459.
- [16] Su Y, Li L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 145: 141-144.
- [17] Yuan B, Han J N, Cheng Y L, et al. Identification and characterization of antioxidant and immune-stimulatory polysaccharides in flaxseed hull[J]. *Food Chem*, 2020, 315: 126-133.
- [18] Duan G L, Yu X B. Isolation, purification, characterization, and antioxidant activity of low-molecular-weight polysaccharides from *Sparassis latifolia*[J]. *Int J of Biol Macromol*, 2019, 137: 1112-1120.
- [19] Wang P P, Wang W D, Chen C, et al. Effect of Fructus Mori bioactive polysaccharide conjugation on improving functional and antioxidant activity of whey protein[J]. *Int J of Biol Macromol*, 2020, 148: 761-767.