

文章编号 :1673-1689(2007)01-0043-03

关白附多糖体外抗氧化性研究

郭憬憬, 职润, 张娜, 王迪, 滕利荣

(吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012)

摘 要: 利用水提分级醇沉法从关白附中提取可溶性多糖, 采用邻苯三酚自氧化、Fenton 体系和 H_2O_2 致鼠肝脏脂质过氧化的方法, 观察体外加入关白附多糖对这些氧化反应的影响。研究结果表明: 关白附多糖对 $\cdot O_2^-$ 抑制作用较好, 最大抑制率为 51.80%, 对 $\cdot OH$ 抑制作用显著, 最大抑制率为 90.88%, 对肝脂质过氧化的抑制率可达 100%。

关键词: 关白附多糖; 抗氧化性; 自由基

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Study on the Antioxidative Effect of *Aconitum coreanum* Polysaccharides

GUO Jing-jing, ZHI Run, ZHANG Na, WANG Di, TENG Li-rong

(College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract Polysaccharides were extracted from *Aconitum coreanum* by method of boiling water and ethanol deposition. The anti-oxidation was measured by the self oxidation method of pyrogallol, Fenton system and lipid peroxidation in rat liver tissue. The results shown that the highest inhibition rate of polysaccharide to O_2^- , $\cdot OH$, and lipid peroxidation could arrived at 51.80%, 90.88% and 100%, respectively.

Key words: *Aconitum coreanum* polysaccharides; antioxidation effect; radical

自由基是生物体氧化过程中产生的中间代谢产物, 机体不断产生自由基的同时也在及时清除着自由基。当机体清除自由基的能力下降或体内自由基生成过多时, 过剩的自由基在体内堆积, 作用于生物膜多不饱和脂肪酸, 使之发生脂质过氧化而引起膜结构和功能的紊乱, 攻击蛋白质引起蛋白质交联、酶活性改变, 损伤 DNA 引起突变等^[1]。适当补充外源性抗氧化剂, 可清除自由基、阻断脂质过氧化反应。现在常用的抗氧化剂 BHT、BHA 及 PG

绝大多数为合成品, 其安全性已引起人们的质疑。因此, 天然抗氧化剂逐渐得到了广泛的关注。

关白附系毛茛科乌头属植物黄花乌头 *Aconitum coreanum* (Lèvl.) Rapaics 的块根, 又名白附子、竹节白附, 为中医临床常用中药之一^[2]。现代药理研究表明, 关白附有良好的抗心血管疾病的作用, 从块根中提取生物碱可制成治疗心血管疾病的药物^[3]。关白附中另一种有效成分多糖含量较高, 但国内外对其提取工艺和活性的研究目前尚未见报道。为

收稿日期: 2006-05-15.

基金项目: 吉林省科技发展基金项目(20020503-2).

作者简介: 郭憬憬(1983-), 男, 江西吉安人, 微生物与生化药学硕士研究生. Email: guojingjing66@gmail.com.

通讯作者: 滕利荣(1954-), 男, 吉林扶余人, 教授, 博导, 主要从事生物技术制药研究. Email: tengla@jlu.edu.cn

此 ,作者首次利用邻苯三酚、Fenton 和肝脏脂质过氧化 3 个体系测定该多糖的抗氧化活性 ,为关白附多糖在保健食品、药品领域中的开发利用提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

关白附 :吉林马应龙制药有限公司提供 ;乙醇、三氯甲烷、正丁醇、邻苯三酚、浓盐酸、浓硫酸、Fe-SO₄ · 7H₂O、H₂O₂、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、萘酮、番红、葡萄糖等 均为分析纯 ,Tris 为生化试剂。

UV-2401 型紫外可见分光光度计 :日本岛津公司产品 ;3-18K 型高速冷冻离心机 :德国 Sigma 公司产品 ;组织捣碎机 :常州国华电器有限公司产品 ;电热鼓风干燥箱 :上海实验仪器厂产品 ;GSY-II 型恒温水浴箱 :北京市医疗设备厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖提取 称取研磨过的关白附粉末 50 g ,以 1 250 mL 水为溶剂 ,在 80 ℃ 恒温水浴锅内浸提 4 h 5 000 r/min 4 ℃ ,15 min 离心除去不溶物。将上清液 37 ℃ 水浴并加入活力单位为 1 250 U 的胰蛋白酶 120 mg ,反应 6 h 除蛋白 ,再用 V(三氯甲烷) : V(正丁醇) = 4 : 1 的 Seavage 试剂除蛋白^[4] ,其中 V(糖液) : V(Seavage 液) = 5 : 1。取上清液 ,分别用 0.4、1、2、4、6 倍体积的体积分数 95% 乙醇沉淀出多糖 ,5 000 r/min 4 ℃ ,10 min 离心 ,取出沉淀用少量水溶解放入透析袋(相对分子质量 10 000)中透析 6 d ,每天换水 1 次 ,除去相对分子质量较小的单糖 ,待测多糖质量分数。

1.2.2 多糖质量分数测定 采用萘酮 - 硫酸法测定各级多糖质量分数。

1.2.3 多糖对 · O₂⁻ 抑制作用 采用邻苯三酚自氧化法 ,取 pH 为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 6 mL ,加入不同的样品 0.5 mL ,37 ℃ 水浴 10 min ,最后加入 37 ℃ 预热过的 7 mmol/L PR(邻苯三酚盐酸溶液) 1 mL ,混匀后精确反应 4 min ,用 0.5 mL 浓盐酸终止反应 ,测 320 nm 处吸光度值。以等体积 pH 值为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液作为空白。抑制率(E)计算公式如下 :

$E = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$
式中 :A_{空白} 为空白组吸光度值 ;A_{对照} 为对照组吸光度值 ;A_{样品} 为关白附多糖液吸光度值 ,以下均同。

1.2.4 多糖对 · OH 的抑制作用 采用 Fenton 体系测定关白附多糖对 · OH 的抑制作用。每支试管分别加入 0.15 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液 1.5

mL ,260 μg/mL 番红花红 0.2 mL ,1% H₂O₂ 0.8 mL ,再分别加入不同质量浓度的各级多糖 0.8 mL ,0.56 mmol/L EDTA-Na₂-Fe²⁺ 0.7 mL ,混匀后于 37 ℃ 水浴保温 30 min。以蒸馏水代替试样作为空白 ,以蒸馏水代替试样和 EDTA-Na₂-Fe²⁺ 作为对照 ,测 520 nm 处吸光度值。

1.2.5 多糖对 Fe²⁺—H₂O₂ 诱导鼠肝脂质过氧化的抑制作用 处死大鼠 ,迅速取出肝脏 ,在 0 ~ 4 ℃ 下用生理盐水制成质量分数 20% 的肝匀浆。取肝匀浆各 1 mL 加入各管中 ,分别加入不同质量浓度的多糖溶液、6 mmol/L FeSO₄ 溶液 100 μL 和 12 mmol/L H₂O₂ 溶液 0.2 mL ,混匀后于 37 ℃ 水浴 1 h 并不时振荡 ,最后加入 1 mL 质量分数 15% 的三氯乙酸 (TCA) 溶液终止反应。4 500 r/min 4 ℃ ,15 min 离心取上清液 ,再加入 1 mL 质量分数 1.2% 的硫代巴比妥酸(TBA) ,沸水浴 15 min。冷却后 ,测定 532 nm 处吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

以葡萄糖为标准品 ,得回归方程 :
 $y = 0.0079x + 0.0083$, $r = 0.9978$
式中 :x 为多糖质量浓度(μg/mL) ;y 为 A₆₂₀。

2.2 各级醇沉多糖质量分数

用萘酮 - 硫酸法测得 0.4、1、2、4、6 倍体积分数 95% 乙醇溶液沉淀出的多糖占总多糖的质量分数 ,结果见表 1。

表 1 各级醇沉多糖质量分数
Tab.1 The contents of ethanol deposition polysaccharides

醇沉倍数	多糖质量分数/%
0.4	1.76
1	1.75
2	27.98
4	57.28
6	11.23

由表 1 可以看出 ,各级多糖质量分数差异明显 ,用 2 倍和 4 倍体积分数 95% 乙醇溶液沉淀出的多糖质量合计占总多糖的 80% 以上。

用乙醇使多糖沉淀是因为乙醇能破坏多糖分子表面的水化层并可降低介电常数而增加电离质点间的相互作用 ,而多糖有多种组分 ,这些组分的水化层及带电状况有所不同 ,因而可在不同体积分

数的乙醇中发生沉淀 ,这些产物不仅在量上有所差异 ,而且在结构上及功能也有所不同。

2.3 各级醇沉多糖对 ·O₂⁻ 的抑制作用

由表 2 可知 ,乙醇分级沉淀的各级多糖对 O₂⁻ 的抑制作用有所差异 ,其中 2 倍醇沉多糖对 ·O₂⁻ 的抑制率随多糖质量浓度的增大而增大 ,其余各级多糖对 ·O₂⁻ 的抑制率的多糖质量浓度 0.1 ~ 0.2 μg/mL 间出现最大值。2 倍体积乙醇沉淀的多糖抑制率最大 ,在质量浓度为 0.4 μg/mL 时 ,对 ·O₂⁻ 的抑制率可达 51.80% ,说明关白附多糖对 ·O₂⁻ 有较好的抑制作用。

表 2 各级醇沉多糖对 ·O₂⁻ 的抑制率
Tab.2 The inhibition rate of the polysaccharides to ·O₂⁻ %

多糖质量浓度/ (μg/mL)	醇沉倍数				
	0.4 倍	1 倍	2 倍	4 倍	6 倍
0.025	25.96	36.24	19.67	39.39	30.27
0.05	28.44	39.3	26.89	40.61	37.06
0.1	33.18	47.6	31.15	45.15	42.86
0.2	43.34	38.86	32.46	39.09	47.82
0.3	34.31	37.97	49.84	33.93	32.29
0.4	27.31	33.41	51.80	20.30	32.91

2.4 各级醇沉多糖对 ·OH 的抑制作用

由表 3 可以看出 ,当多糖质量浓度在 3 mg/mL 以上时 ,各级醇沉多糖对 ·OH 的抑制率均大于 50% ,且随多糖质量浓度的增大而增大。6 倍醇沉多糖的质量浓度为 6 mg/mL 时 ,对 ·OH 的抑制率可达 90.88%。由此说明关白附多糖对 ·OH 有显著的抑制作用。

2.5 各级醇沉多糖对鼠肝脂质过氧化的抑制作用

由表 4 可看出 ,在误差允许范围内 0.4 倍、1 倍、4 倍醇沉多糖对鼠肝脂质过氧化的抑制率可达到 100% ,2 倍、6 倍体积醇沉多糖对鼠肝脂质过氧化的抑制率也已经接近 100% ,且抑制率随多糖质量浓度的增大而增大。

参考文献(References):

[1] 方允中 ,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京 :科学出版社 ,1989 244.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草(精选本):上册[M]. 上海 :上海科学技术出版社 ,1996.
[3] 董月丽 ,陈维洲 ,顾培. 关附甲素对实验性心律失常和心肌收缩性的影响[J]. 药学报 ,1995 ,30 577 - 582.
Dong Yue-li ,Chen Wei-zhou ,Gu Pei. Effects of Guan-Fu Base A on Experimental ventricular arrhythmias and myocardium constriction[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica* ,1995 ,30 577 - 582.(in Chinese)
[4] 吴可 ,于宙. 金针菇子实体多糖分离最佳工艺研究[J]. 食品与发酵工业 ,1998 24(4) 5 - 8.
Wu Ke ,Yu zhou. Study on optimum extracting conditions of *Flammulina velutipes* Polysaccharides[J]. *Food and Fermentation Industries* ,1998 24(4) 5 - 8.(in Chinese)

表 3 各级醇沉多糖对 ·OH 的抑制率
Tab.3 The inhibition rate of the polysaccharides to ·OH %

多糖质量浓度/ (μg/mL)	醇沉倍数				
	0.4 倍	1 倍	2 倍	4 倍	6 倍
0.5	27.82	18.73	16.98	29.47	30.68
1	43.34	37.83	44.52	44.93	42.88
2	56.66	45.62	60.13	61.03	60.16
3	60.41	51.89	70.92	71.88	78.72
4	62.29	62.16	75.65	76.81	77.44
6	56.48	61.62	89.86	84.06	90.88

表 4 各级醇沉多糖对鼠肝脂质过氧化的抑制率
Tab.4 The inhibition rate of the polysaccharides to lipid peroxidation %

多糖质量浓度/ (μg/mL)	醇沉倍数				
	0.4 倍	1 倍	2 倍	4 倍	6 倍
0.05	10.10	13.40	5.40	2.80	8.50
0.1	15.20	19.80	13.20	9.60	11.70
0.2	38.70	42.30	34.30	32.50	28.40
0.3	72.30	74.80	75.40	79.10	69.20
0.4	97.10	98.30	95.30	98.50	91.10
0.6	107.00	106.30	99.20	102.40	98.20

3 结 论

综上所述 ,生物体内产生的氧自由基和羟基自由基等是强氧化剂 ,它与生物大分子相互作用 ,产生生物分子自由基 ,从而对机体产生损伤或致突变作用。测定结果表明 :关白附多糖对氧自由基和羟基自由基均有明显抑制作用 ,且对羟基自由基抑制作用更大 ,它对鼠肝脂质过氧化的抑制率甚至达到 100% ,可减少强氧化剂对有机体的损伤 ,从而起到延缓衰老等多方面的功效。另外 ,关白附多糖属天然提取物 ,毒副作用小 ,因此关白附多糖具有研制开发抗自由基保健食品的良好前景。