

香青兰多糖的提取、测定及其对活性氧自由基的清除作用

郭春梅 武荣兰 封 顺 王吉德

(新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐, 830046)

摘 要 建立了热水提取、乙醇沉淀、Sevag 法去蛋白、有机溶剂分离纯化提取香青兰多糖的方法,并用苯酚-硫酸比色法测定其含量;同时采用生物化学法测定了香青兰多糖对活性氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 的清除能力和还原能力,以枸杞多糖作为对照品。实验结果表明:香青兰中多糖含量为 6.38%,回收率为 93.6%~105.6%, $RSD=2.3\%$ ($n=4$)。香青兰多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 具有良好的清除能力,同时还有较强的还原能力,它们的活性大小与多糖的用量呈正相相关性,且均比枸杞多糖的活性强。

关键词 香青兰多糖,活性氧自由基,清除能力

氧自由基主要是超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)、单线态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)亦具有类似氧自由基的损伤作用^[1]。同时氧自由基可引起衰老,与癌症、糖尿病、心脏血管疾病、免疫力缺陷综合症、动脉粥样硬化等的发生有密切联系^[2,3]。外源性清除剂可清除体内过量的活性氧自由基,抑制氧自由基失衡时对机体造成的伤害^[4]。所以,从天然动植物尤其是从草药中寻找高效的氧自由基清除剂,已引起国内外学者的极大兴趣。

香青兰为唇形科一年生草本植物^[5],在维吾尔医药中主要用于治疗冠心病、心绞痛、动脉粥样硬化、高血压、心肌缺血等疾病。目前,国内外对此药的有机成分,药理试验及临床验证等做了一些工作,但对香青兰多糖的报道甚少^[6]。文中通过从香青兰中提取多糖,利用生物化学法体外实验,研究香青兰多糖对活性氧自由基的清除作用,同时以抗氧化剂 Vc 和传统名贵药材枸杞的多糖作为对照物进行比较,并初步探讨了香青兰多糖分子抗肿瘤、提高免疫力的机理。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

香青兰购于新疆维吾尔民族医院,枸杞多糖购于新疆药材公司,葡萄糖(105℃干燥恒重)、苯酚(AR)、硫酸(AR)等均为国产分析纯,试验用水均为高纯水。

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津),索氏提取器, HY-B II 回旋振荡器,超级恒温水浴,800B 离心机, SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器。

1.2 试验方法

1.2.1 总糖含量测定

采用苯酚-硫酸法,以葡萄糖为标准品^[8],测得多糖总含量为 6.38%。

1.2.2 香青兰多糖的提取与精制

称取干燥粉碎后的香青兰粉末 100 g,置索氏提取器中,依次用石油醚(60~90℃)、乙醚和体积分数 80% 乙醇提取,均至提取液无色为止,用于脱脂。残渣挥干溶剂后,加入 200 mL 高纯水回流提取 1h,趁热过滤,重复 3 次。合并滤液,减压浓缩至原体积 1/2。用 Sevag 法除去蛋白质,即氯仿:正丁醇(体积比 5:1)混合后,加入浓缩液,在振荡器中振荡 30 min,浓缩液中的蛋白质变性成不溶状态,存留在氯仿和水交界处,可离心除去,反复多次进行。再加入 1% 活性炭脱色 2 次,抽滤,随后滤液加入体积分数 95% 乙醇溶液使含醇量达 80%,静置过夜,抽滤,残渣依次用体积分数 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤,真空干燥,得到精制多糖。

1.2.3 香青兰多糖的紫外光谱和红外光谱特征

经纯化精制后的香青兰多糖在紫外光谱(水溶液)中已无明显的 280 nm 的蛋白质特征吸收峰,也无 260 nm 处的核酸特征吸收峰。在其红外光谱中,有 $3\,394\text{ cm}^{-1}$ (O—H 伸缩振动)、 $2\,929\text{ cm}^{-1}$ (C—H 伸缩振动)、 $1\,607\text{ cm}^{-1}$ 为酰胺羰基和 $1\,417\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,064\text{ cm}^{-1}$ 等多糖的特征吸收,可见香青兰多糖的纯度较高。

1.2.4 对 $O_2^{\cdot-}$ 清除试验

在 10 mL 具塞试管中加入 0.4 mL 样品和 4 mL Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol/L, pH 8.2)于 25℃ 恒温水浴中温育 20 min。加入 0.4 mL 邻苯三酚(2.5 mol/L,在 25℃ 下提前温育)启动反应。反应在 25℃ 下进行 4 min,每隔 30 s 于 319 nm 处记录一次 A 值,

第一作者:硕士研究生(王吉德教授为通讯作者)。

收稿时间:2004-11-24,改回时间:2005-01-17

用线性回归法得到反应速率 V , 计算清除率 $S = (V_0 - V)/V_0 \times 100\%$

式中, V_0 为无清除剂时的邻苯三酚自氧化反应速率; V 为有清除剂时的反应速率。

1.2.5 对 $\cdot\text{OH}$ 清除试验

在 10 mL 具塞试管中加入 2.3 mL 邻二氮菲 (0.75 mmol/L)、0.5 mL 磷酸缓冲溶液 (150 mmol/L, pH = 7.4)、0.9 mL FeSO_4 (0.75 mmol/L) 和 0.4 mL 样品溶液。随后加入 0.9 mL 质量分数 3% H_2O_2 启动反应, 于 37℃ 恒温水浴中放置 1 h。测定在 510 nm 处的 A 值, 以同浓度的样品溶液为对照品, 并计算清除率

$$S = (A_2 - A_0)/(A_1 - A_0) \times 100\%$$

式中, A_0 为不含样品, 但含有 H_2O_2 的吸光度值; A_1 为以高纯水代替 H_2O_2 的吸光度值; A_2 为含有样品的吸光度值。

1.2.6 对 H_2O_2 清除试验

在 10 mL 具塞试管中加入由 50 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH = 7.4) 配制的 0.5 mmol/L H_2O_2 溶液 2.8 mL, 再加入 0.4 mL 样品, 反应 10 min 后, 于 230 nm 处测定 A 值, 以同浓度的样品溶液为对照品, 并计算清除率:

$$S = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$$

其中, A_0 为不含样品的吸光度值; A_1 为含样品的吸光度值。

1.2.7 还原能力的测试

在 10 mL 具塞试管中加入 1 mL 样品, 2.5 mL 磷酸缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH = 6.6) 和 2.5 mL 质量分数 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 置恒温水浴中温育 20 min。随后加入 2.5 mL 质量分数 10% 的三氯乙酸, 混合后离心 10 min (3 000 r/min 处), 取上层液 2.5 mL, 然后加入 2.5 mL 高纯水和 0.5 mL 质量分数 0.1% 的 FeCl_3 溶液, 充分混合后, 于 700 nm 处测定 A 值。

2 结果与分析

2.1 香青兰多糖的回收实验

精确称取香青兰粉末 0.25 g, 加入 7 mg 的香青兰多糖, 按样品溶液的制备和含量测定的方法进行分, 测定回收率见表 1。测定结果在 93.6% ~ 105.6%, RSD 为 2.3% ($n = 4$)。

2.2 香青兰多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下易发生自身氧化, 产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和有色中间产物。且随着反应的发生, 在 4 min

表 1 回收试验结果

加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
7.0	6.82	97.4
	6.55	93.6
	7.24	103.4
	7.39	105.6

内, 319 nm 处的吸光度值与时间有明显的线性关系, 通过线性回归方程即可得到反应速率。由图 1 和表 2 可知, 香青兰多糖具有十分强的清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力, 且清除能力随多糖浓度的增加而增加。当浓度达到 19.2 mg/mL 时清除率达到 100%, 而 Vc 为 4 mg/mL 时清除率达 103.2%, 枸杞多糖为 22.4 mg/mL 时清除率达 103.5%。同时由表 2 可知, 虽然香青兰多糖的 IC_{50} 值比 Vc 的 IC_{50} 值高, 但是比枸杞多糖要低一些, 说明香青兰多糖仍是很好的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除剂。

表 2 香青兰多糖和 Vc、枸杞多糖清除活性氧

自由基的 IC_{50} 值的比较 ($n = 5$)

样 品	清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 IC_{50} 值	清除 $\cdot\text{OH}$ 的 IC_{50} 值	清除 H_2O_2 的 IC_{50} 值
Vc	1.31	4.61	4.83
香青兰多糖	4.29	21.85	22.01
枸杞多糖	4.69	23.51	23.33

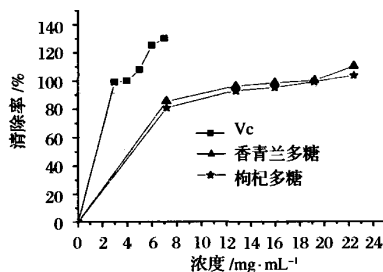


图 1 香青兰多糖和 Vc、枸杞多糖对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用的比较

2.3 香青兰多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

H_2O_2 与 Fe^{2+} 通过 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被 $\cdot\text{OH}$ 氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后, 其在 510 nm 处的最大吸收峰消失。当体系加入 $\cdot\text{OH}$ 清除剂后, 此氧化过程受到抑制, A_{510} 值将会增大, 从而可得到清除率。由图 2 可知, 香青兰多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力与浓度有明显的量效关系即随浓度增加而增加。当 Vc 浓度为 5 mg/mL 时清除率为 57.85%, 香青兰多糖和枸杞多糖的浓度为 22.4 mg/mL 时, 清除率分别为 52.05% 和 47.34%。表 2 中, 香青兰多糖和枸杞多糖的 IC_{50} 值比 Vc 的 IC_{50} 值要大很多, 但香青兰的清除能力比枸杞多糖的清除能力强。

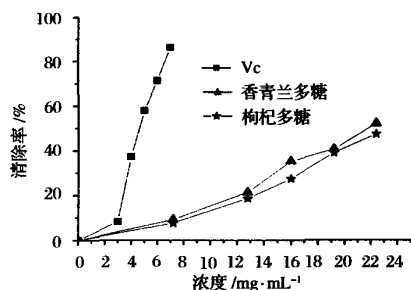


图2 香青兰多糖和 Vc、枸杞多糖对羟自由基
·OH⁻ 清除作用的比较

2.4 香青兰多糖对 H₂O₂ 的清除作用

H₂O₂ 自身没有什么活性,但它在细胞组织里可产生·OH,从而对细胞有毒副作用^[9]。因此,清除 H₂O₂ 对细胞和食物体系的抗氧化防御有十分重要的意义。由图 3 和表 2 可知,香青兰多糖有较好的清除 H₂O₂ 能力,且清除能力随浓度的增加而增加,清除能力与 Vc 相当,但比枸杞多糖的清除能力强。

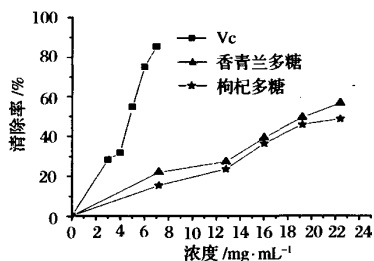


图3 香青兰多糖和 Vc、枸杞多糖对 H₂O₂
清除作用的比较

2.5 香青兰多糖的还原能力

试验采用 Oyaizu 法,通过观察在多糖存在时,Fe³⁺-Fe²⁺ 的转移来检测其还原能力。因为一种物质的还原能力与它潜在的抗氧化活性有十分密切的关系^[8]。由图 4 可看出,香青兰多糖有较强的还原能力,吸光度值随浓度的增加有显著的增加,是一种良好的抗氧化剂。

3 讨论

Vc 在人体内具有很好的生理功能,它有利于形成和维持胶原蛋白,使身体全部细胞结合起来,对伤口的愈合和骨骼有直接关系,能降低胆固醇和毛细血管的脆性,增强肝脏的解毒能力,还可以阻断亚硝酸胺在体内形成的作用。但它在水溶液中易被空气中的氧化,在碱性介质或受热情况下很不稳定,且在植物体内含量较低。

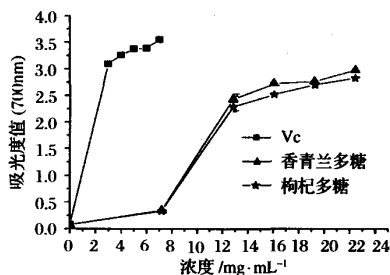


图4 香青兰多糖和 Vc、枸杞多糖的还原能力的比较

而多糖是生物体内普遍存在的一大类生物大分子,除有营养作用之外,还具有特殊的生物活性和药理特性。如可促进机体免疫力、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、肝炎、心血管病、糖代谢等方面具有独特活性,而且毒性极低,没有直接的细胞毒性^[9]。因此,虽然试验测得 Vc 的活性比多糖的活性要强,但从药理和病理学角度出发,多糖的生理作用要比 Vc 重要的多,因此研究植物多糖具有十分重要的实际应用价值。

本试验采用生物化学法在体外产生各种活性氧自由基,并把不同浓度的香青兰多糖加入各体系中,测定多糖的抗氧化性作用,并与枸杞多糖进行比较。试验结果表明,香青兰多糖对 O₂^{-·}、·OH 和 H₂O₂ 均有较好的清除作用,同时还具有较强的还原能力,这些能力均比枸杞多糖的清除能力强,并且清除作用和还原能力与其浓度呈正相关性。作用机理可能是多糖分子上具有还原性的半缩醛羟基,可与氧化剂即活性氧自由基发生氧化还原作用。在一系列测试中,对超氧阴离子(O₂^{-·})的清除能力最强,可能是香青兰多糖也可以自动氧化,产生新的有机自由基,使多糖本身产生的有机自由基与它清除的自由基达到平衡。在低浓度下,减少了多糖分子与自由基引发剂的反应概率^[10],从而充分发挥了香青兰多糖的抗氧化能力。对于·OH 而言,可快速地攫取多糖碳氢链上的氢原子结合成水,而多糖的碳原子上则留下一个成单电子,成为碳自由基,进一步氧化形成过氧自由基,最后分解成对机体无害的产物;对于单线态氧,可将激发能传递给多糖,使多糖处于激发态而本身回到基态(猝灭)^[12]。在机体中,外来多糖作为一种半抗原或完全抗原存在会刺激机体产生免疫反应。因此,香青兰多糖可作为人体血液系统中的抗氧化剂,它具有较强的清除活性氧自由基的能力,其中对 O₂^{-·} 的清除能力最强。同时可知,同一药物在不同的环境下会有不同的抗氧化效力,在使用时,宜让其处于最佳的反应

环境以发挥其最大的抗氧化效力。本试验研究了香青兰多糖强的清除氧自由基的能力,并初步探讨了香青兰多糖抗肿瘤、提高免疫力的主要作用机理,对此药的药理研究提供了一定的科学理论依据。

参 考 文 献

- 1 雷学军. 抗氧自由基的天然药物[J]. 日用化学工业, 1997, 5, 35~39
- 2 Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M. Oxidants, antioxidants, and the degeneration disease of the aging[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 7915~22
- 3 Diplock A T, Rice-Evans C A, Burdon R H. Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention[J]. Cancer Res, 1994, 54(4): 952~956
- 4 刘勇民主编, 维吾尔药志(上册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999. 405~407
- 5 迪力非嘎尔·阿不都热依木, 库里松·哈依尔别克. 新疆香青兰多糖含量测定[J]. 新疆师范大学学报(自然科学版), 2002, 21(1): 42~43
- 6 杨文远, 郭辉, 王天勇. 宁夏黄精多糖的提取、分离和测定[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 1997, 18(2): 156~158
- 7 Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease [J]. American Journal of Medicine, 1991, 91: 14~22
- 8 Meir S, Kanner J, Akiri B et al. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 1 813
- 9 尤新. 维生素 C 的生理功能和对食品工业的特殊功用[J]. 中国食品添加剂, 1996, 4: 15~18
- 10 周志刚, 刘思礼, 刘雪翔. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 77~78
- 11 周林珠, 杨祥良, 周井炎等. 多糖抗氧化作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(4): 210~212

Extraction and Determination of Dracocephalum Moldavica Polysaccharides and Its Effects on Reducing the Free Radical Oxygen

Guo Chunmei Wu Ronglan Feng Shun Wang Jide

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi, 830046, China)

ABSTRACT Dracocephalum Moldavica Polysaccharides (DMP) were obtained by hot water extraction, ethanol precipitation, Sevag method removing proteins and organic solvent purification. Polysaccharides content was determined by phenol-vitriolic colorimeter. Meanwhile, the reduced effects of DMP on free radical oxygen were measured using Lycium barbarum Polysaccharides as a control. Results showed that the polysaccharides content of DMP was 6.38%, the recovery was 93.6%~105.6%, the reducing effects of DMP on $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 were significant and were concentration dependent, better than Lycium barbarum Polysaccharides.

Key words dracocephalum moldavica polysaccharides, free radical oxygen, reducing effect

信 息 窗

墨西哥研究人员发明新型杀菌法为食品保鲜

墨西哥肉类食品加工部门近日采用一种新型高压低热灭菌技术杀菌。这种新方法可为食品保鲜,在确保冷冻食品和水果食用安全的同时不影响其口味。

报道说,墨西哥美资企业霍梅尔食品公司等几家公司的研究人员联合发明了这种将尚未包装的食品放入经冲压水罐中灭菌的新技术。该过程能杀死食品中的沙门氏菌、大肠杆菌和李斯特菌等细菌。

此方法不仅可以减少使用食品保鲜剂,还能延长火腿和半成品鸡肉等肉类食品的保质期。研究人员介绍说,他们现在生产的肉类食品可以保存 100 天不变质,其保鲜期是过去的 2 倍。

研究人员认为,这种高压技术使食品保鲜技术向前迈出一大步,并将对未来的食品灭菌产生重要影响。不过有食品商认为,此方法使肉类食品变得过于柔软,不如传统方法加工的产品口感好,而且成本较高。