

苦丁茶多糖抗氧化活性研究*

吴晓鹏, 王一飞, 刘秋英, 杨珂

(暨南大学生物医药研究开发基地, 广东广州, 510632)

摘 要 采用清除超氧阴离子自由基、清除羟自由基、清除 DPPH 自由基、双氧水诱导红细胞氧化溶血、红细胞自氧化溶血实验, 对 A、K₁、K₃ 三个苦丁茶多糖组分的抗氧化活性进行了研究, 并与 Vc 进行了比较, 结果表明: 苦丁茶多糖对羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH 自由基具有一定的清除作用; 对 H₂O₂ 诱导红细胞氧化溶血反应、对红细胞自氧化溶血反应都有显著的抑制作用。

关键词 苦丁茶, 多糖, 自由基, 抗氧化活性

经现代科学研究证明, 苦丁茶中主要含有三萜皂苷成分, 其他成分有甾醇、茶多酚、黄酮、生物碱、氨基酸、维生素、苦味素以及对人体有益的多种微量元素等^[1]。近年来大量研究表明, 多糖除了具有抗衰老、降血糖、刺激造血功能等作用外, 还具有抗氧化的作用。实验对苦丁茶水提取、分离、纯化过程中得到的 3 个苦丁茶多糖组分进行了抗氧化活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦丁茶购于广东省大埔县西岩茶叶集团有限公司, 经暨南生物医药研究基地鉴定为冬青科冬青属苦丁茶 (*Ilex Kudingcha* C. J. Tseng)。

昆明种小鼠, 雌性, 体重 (20±2) g, 由广东省医学实验动物中心提供。二乙胺基乙基纤维素 (DEAE-52, Whatman)、二苯代苦味肼基自由基 (DPPH, Sigma), 其余试剂均为国产分析纯。

核酸蛋白分析仪 (DU-640), Beckman 公司; 电热恒温水槽 (DK-8D 型), 上海森信实验仪器有限公司; 台式冷冻离心机 (D-78532 Tuttlingen, universal32R) 德国; Alpha- 型真空冻干机, 德国 christ 公司; 自动收样器, 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苦丁茶多糖的制备

将苦丁茶磨碎, 过 50 目筛, 热水浸提 3 次, 过滤, 合并滤液, 加热浓缩至初始体积的 1/4, 用体积分数 95% 的乙醇沉淀多糖, 用 乙醚-丙酮-无水乙醇溶剂系

统反复冲洗, 真空低温干燥, 得到褐色苦丁茶粗多糖样品 (A)。加水复溶, 用 Sevag 法去蛋白质, 然后分级醇沉: 加 95% 乙醇至醇含量为 20%, 静置 24 h, 离心去沉淀, 上清液继续加 95% 乙醇至醇含量为 60%, 离心得沉淀, 用 乙醚-丙酮-无水乙醇溶剂系统反复冲洗, 真空低温干燥得到浅褐色苦丁茶粗多糖半纯品 K。然后将多糖 K 过 DEAE-52 离子交换柱, 依次用蒸馏水、0.1、0.3、0.5、1.0 mol/L NaCl 水溶液洗脱, 得到 2 个 DEAE-52 纤维素柱分离物 K₁、K₂, 继续将 K₁ 过葡聚糖凝胶 G-100, 用 0.05 mol/L NaCl 水溶液洗脱, 得到 1 个主要产物 K₃。选用 A、K₁、K₃ 三个苦丁茶多糖组分进行了抗氧化活性研究。

1.2.2 清除超氧阴离子自由基实验^[2]

取 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.2) 4.5 mL, 置于 25℃ 水浴中预热 20 min, 分别加入 1 mL 试样和 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀于 25℃ 水浴中反应 4 min, 加入 8 mol/L HCl 终止反应, 299 nm 处测定吸光度。空白对照组以相同体积的蒸馏水代替样品。清除率计算公式: $P/\% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$, 其中 A₀ 空白对照组的吸光度, A₁ 试样组吸光度。

1.2.3 清除羟自由基实验

采用南京建成羟自由基测定试剂盒方法进行。将配制好的应用液 (试剂盒里备), 先在 37℃ 水浴中预温 3 min。以下操作在 37℃ 水浴中进行, 对照管: 0.1 mL 蒸馏水 + 0.1 mL 底物应用液 (试剂盒里备) + 0.2 mL 试剂三应用液 (试剂盒里备); 测定管: 0.1 mL 底物应用液 (试剂盒里备) + 0.1 mL 样品液 + 0.2 mL 试剂三应用液。混匀, 37℃ 水浴反应 1 min, 从加完试剂三开始到 1 min 结束, 立即加入显色剂 1 mL 终止反应, 1 次只能做 1 只管子, 混匀, 室温放置

第一作者: 硕士研究生。

* 国家自然科学基金重点项目 (U0632010)

收稿日期: 2007-10-22, 改回日期: 2007-12-27

20 min,蒸馏水调 0.550 nm,测定各管吸光度值。计算清除率: $P/\% = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$ 其中 A_0 对照管的吸光度, A_i 测定管吸光度。

1.2.4 清除 DPPH 自由基实验^[3]

取 2 mL 浓度为 50 mg/L DPPH 有机溶液,加入 2 mL 一定浓度的样品液,充分混匀,于 30 min 后,在 517 nm 处测定吸光度。计算 DPPH 自由基清除率: $P/\% = A_0 - (A_i - A_j) / A_0 \times 100$

其中: A_0 , 2 mL DPPH 有机溶液 + 2 mL 配样品溶剂的吸光度; A_i , 2 mL DPPH 有机溶液 + 2 mL 样品溶液的吸光度; A_j , 2 mL 样品溶液 + 2 mL 溶剂的吸光度。

1.2.5 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血的抑制作用^[4]

小鼠摘眼球取血,制成抗凝血,以 4 000 r/min 离心 5 min,得红细胞,用冰冷的生理盐水洗 3 次,制成 0.5% 的红细胞悬浮液。取红细胞悬浮液 1 mL,加入供试品溶液 0.2 mL,最后加入 0.1 mol/L 的 H_2O_2 0.1 mL,混匀,于 37℃ 水浴中温浴 60 min,然后 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用生理盐水稀释 5 倍,于 415 nm 处测定吸光度(以红细胞在蒸馏水中的溶血率为 100% 计算)。抑制率计算公式:

$$P/\% = (A_0 - A_i) / (A_0 - A_j) \times 100$$

其中: A_0 , H_2O_2 诱导对照组吸光度; A_i , 试样组吸光度; A_j , 正常组吸光度。

1.2.6 对红细胞自氧化溶血的影响实验^[5]

取 1.2.5 红细胞悬浮液 1.0 mL 与 0.04 mL 样品液混合,于 37℃ 温育 24 h(对照管以 0.04 mL 蒸馏水替代样品液)。3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用生理盐水稀释 5 倍,于 540 nm 处比色测定吸光度,计算抑制率: $P/\% = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$ 。其中: A_0 , 空白对照组的吸光度; A_i , 试样组吸光度。另取上清液 0.3 mL,按硫代巴比妥酸(TBA)法^[6],在 540 nm 波长处测定上清液中 MDA 的含量,以衡量样品对红细胞自氧化过程中脂质过氧化反应的影响。

1.2.7 统计学处理

数据均为 3 个平行实验管,用 $\bar{x} \pm s$ 表示经 SPSS13.0 统计软件进行 One-Way ANOVA 分析处理, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

采用邻苯三酚自氧化法测定。邻苯三酚在碱性条件下自氧化形成中间产物超氧阴离子自由基,此自

由基能促进邻苯三酚的自氧化,因此通过测定某物质对邻苯三酚的抑制作用,即可表征对其超氧阴离子自由基的清除作用。苦丁茶多糖、 V_c 对超氧阴离子自由基的清除作用如图 1 所示。由图 1 可知,苦丁茶多糖 A, K_1 , K_3 三个成分对超氧阴离子自由基都有一定的抑制作用,在所给浓度范围内,其抑制作用随着浓度的增高而加强,呈量效关系,在低浓度时,苦丁茶多糖对超氧阴离子自由基的清除作用远小于 V_c ,而在高浓度时,其清除作用与 V_c 接近。

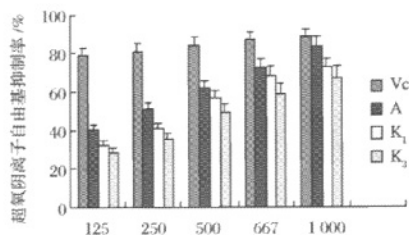


图 1 苦丁茶多糖对超氧阴离子自由基的抑制作用

2.2 苦丁茶多糖对羟自由基的清除作用

采用南京建成羟自由基测定试剂盒测定。利用 Fenton 反应,检测苦丁茶多糖、 V_c 对羟自由基的清除作用,如图 2 所示。由图 2 可知,苦丁茶多糖 A, K_1 , K_3 三个成分对羟自由基的清除作用显著,在所给浓度范围内,随着浓度的升高,对羟自由基的清除作用也逐渐增强,呈量效关系,其清除作用与阳性对照物 V_c 接近。

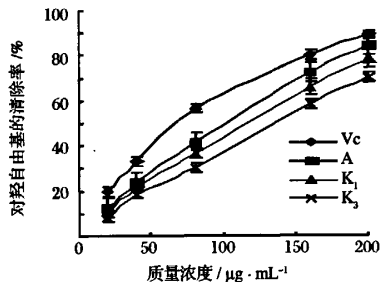


图 2 苦丁茶多糖对羟自由基的清除作用

2.3 苦丁茶多糖对 DPPH 自由基的清除作用

苦丁茶多糖、 V_c 对 DPPH 自由基的清除作用如图 3 所示。由图 3 可知。在实验所给浓度范围内,对照品 V_c 对 DPPH 自由基的抑制率变化不大,都大于 80%。苦丁茶多糖 A 对 DPPH 自由基有较强的抑制作用,与对照品 V_c 接近,而苦丁茶多糖 K_1 , K_3 对 DPPH 自由基的抑制作用比较小。

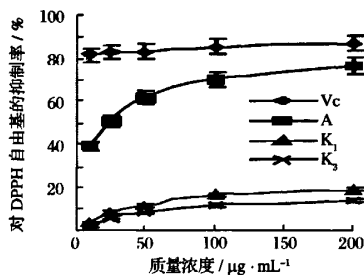


图3 苦丁茶多糖对DPPH自由基的清除作用

2.4 苦丁茶多糖对双氧水诱导红细胞氧化溶血的抑制作用

苦丁茶多糖、Vc对双氧水诱导红细胞氧化溶血的抑制作用如表1所示。由表1可知,苦丁茶多糖对双氧水诱导红细胞氧化溶血有明显的抑制作用($P < 0.05$),可见苦丁茶多糖可抑制氧化损伤,保护红细胞膜,但是其作用都要弱于对照品Vc的抑制作用。

表1 苦丁茶多糖对双氧水诱导红细胞氧化溶血的抑制作用

样品	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸光度 (A_{415})	抑制率 /%
生理盐水组	0	0.4921 ± 0.001	—
蒸馏水对照组	0	1.112 ± 0.007	—
A	153.8	$0.8504 \pm 0.004^{**}$	42.2
	307.7	$0.7876 \pm 0.005^{**}$	52.3
K ₁	153.8	$0.8416 \pm 0.008^{**}$	43.6
	307.7	$0.7741 \pm 0.003^{**}$	54.5
K ₃	153.8	$0.8720 \pm 0.005^{*}$	38.7
	307.7	$0.8012 \pm 0.001^{**}$	50.1
Vc	153.8	$0.6785 \pm 0.003^{**}$	69.9
	307.7	$0.5519 \pm 0.0015^{**}$	90.3

注: $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ 。

2.5 苦丁茶多糖对红细胞自氧化溶血的抑制作用

苦丁茶多糖、Vc对红细胞自氧化溶血的影响如表2所示。由表2可知,苦丁茶多糖对红细胞体外溶血过程中的氧化溶血反应有明显的抑制作用($P < 0.05$),而且能不同程度地减少红细胞温浴过程中形成的MDA(丙二醛)含量,说明苦丁茶多糖对红细胞溶血有一定的保护作用。

Study on the Antioxidation Activities of Polysaccharides from *Ilex Kudingcha* C. J. Tseng

Wu Xiaopeng, Wang Yifei, Liu Qiuying, Yang Ke

(Biomedicine Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT The antioxidant effects of three polysaccharides A, K₁, K₃ from *Ilex Kudingcha* were studied from five different experiments: eliminating superoxide anion free radical experiment, eliminating hydroxyl free radical experiment, scavenging DPPH free radical experiment, inhibiting red cells hemolysis induced by H₂O₂ experiment and inhibiting red cells self-hemolysis experiment. The experiments results showed that Compared with Vc, three polysaccharides can eliminate superoxide anion free radical, hydroxyl free radical and DPPH free radical to some extent, and obviously inhibited red cells hemolysis induced by H₂O₂ reaction and red cells self-hemolysis reaction.

Key words *Ilex Kudingcha* C. J. Tseng, polysaccharides, free radical, antioxidation activities

表2 苦丁茶多糖对红细胞自氧化溶血的影响

样品	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	吸光度 (A_{540})	抑制率 /%	丙二醛吸光度 (A_{532})
蒸馏水对照组	0	0.2670 ± 0.0009	—	0.1049 ± 0.001
A	192.3	$0.2321 \pm 0.0003^{**}$	13.07	$0.0892 \pm 0.0006^{**}$
	384.6	$0.2213 \pm 0.0006^{**}$	17.12	$0.0811 \pm 0.0002^{**}$
K ₁	192.3	$0.2349 \pm 0.0003^{**}$	12.02	$0.0912 \pm 0.0004^{**}$
	384.6	$0.2239 \pm 0.0002^{**}$	16.14	$0.0845 \pm 0.0004^{**}$
K ₃	192.3	$0.2323 \pm 0.0005^{**}$	13.0	$0.0930 \pm 0.0002^{**}$
	384.6	$0.2212 \pm 0.001^{**}$	17.15	$0.0903 \pm 0.0005^{**}$
Vc	192.3	$0.2145 \pm 0.0005^{**}$	19.66	$0.072 \pm 0.0006^{**}$
	384.6	$0.1977 \pm 0.001^{**}$	25.96	$0.0673 \pm 0.0009^{**}$

注: $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ 。

3 结 论

苦丁茶多糖对羟自由基、超氧阴离子自由基、对DPPH自由基都具有一定的清除作用;对双氧水诱导红细胞氧化溶血反应、对红细胞自氧化溶血反应都有显著的抑制作用。苦丁茶粗多糖的抗氧化活性要大于分级后苦丁茶多糖的活性,特别是在对DPPH自由基抑制实验的活性中,表现尤为明显;当多糖浓度均为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,粗多糖A的抑制率达到76.6%,而分级后的多糖K₁, K₃的抑制率分别只有19.1%, 13.6%,这可能是因为粗多糖中多糖与其他成分之间有协同作用,有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘祖生. 苦丁茶化学成分研究[J]. 浙江农业大学学报, 1992, 18 (5): 66~69
- 2 王春波, 贺孟泉, 秦守哲. 海洋肽的体外抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物, 1998, 67(3): 15~17
- 3 孟 洁, 杭 瑚. 诃子抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(2): 9~12
- 4 刘洁勋, 高小荣, 徐文清, 等. 银耳碱提多糖抗氧化活性的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(3): 169~170
- 5 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 77~153
- 6 欧 荣, 邹国林. 维生素C或H₂O₂系统中·OH对DNA的损伤作用[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1997, 43 (2): 238~242