

不同制备方法对金樱子多糖体外抗氧化活性的影响

陈传平, 吴剑锋, 方士英, 彭成 (皖西卫生职业学院, 安徽六安 237005)

摘要 [目的]探讨不同制备方法提取的金樱子多糖体外抗氧化活性。[方法]采用 DPPH 自由基、羟自由基($\cdot\text{OH}$)及脂质氧化体系作为体外抗氧化模型,测定金樱子粗多糖、水溶性多糖、脂溶性多糖及混合多糖清除 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的清除率及脂质抗氧化能力。[结果]在一定浓度范围内,随着各组分溶液中多糖浓度的提高,清除 DPPH 自由基及 $\cdot\text{OH}$ 的能力逐步增强,其中混合多糖活性最高;在脂质抗氧化能力方面,脂溶性多糖活性最强。[结论]金樱子多糖具有良好的抗氧化能力,不同制备方法所得的金樱子多糖抗氧化活性不同。

关键词 金樱子;多糖;制备方法;体外抗氧化活性

中图分类号 R285 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)35-0116-03

Study on the Effect of Different Preparation Methods on *in vitro* Antioxidant Activity of *Rosa laevigata* Michx Polysaccharide
CHEN Chuan-ping, WU Jian-feng, FANG Shi-ying et al (West Anhui Health Vocational College, Lu'an, Anhui 237005)

Abstract [Objective] The research aimed to discuss the antioxidant activity *in vitro* of *Rosa laevigata* polysaccharides extracted by different preparation methods. [Method] Using DPPH radical, hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and lipid oxidation systems as *in vitro* antioxidant models, the DPPH radical and $\cdot\text{OH}$ scavenging antioxidant activity as well as lipid antioxidant capacity of crude polysaccharide, water-soluble polysaccharide, fat-soluble polysaccharide and mixed polysaccharides from *Rosa laevigata* were analyzed. [Result] In a certain concentration range, with the polysaccharides concentration increased, the DPPH radical and $\cdot\text{OH}$ scavenging capacity raised obviously, and the mixed polysaccharides group had the highest activity. The lipid-soluble polysaccharides showed the highest antioxidant capacity in lipid oxidation resistance. [Conclusion] *Rosa laevigata* polysaccharides have good anti-oxidant ability, the antioxidant activity of *Rosa laevigata* polysaccharides obtained by different preparation methods is different.

Key words *Rosa laevigata* Michx; Polysaccharide; Preparation methods; Antioxidant activity *in vitro*

金樱子(*Rosa laevigata* Michx)又称刺榆子、山石榴、金壶瓶等,为蔷薇科常绿攀缘植物金樱子的果实,在我国南方地区分布广泛^[1]。作为传统中药,《本草纲目》记载金樱子“性酸、涩、平、无毒;主治脾泻下痢、止小便利、涩精气,久服,令人耐寒轻身,补血益精,有奇效”^[2-3]。现代药理研究表明,金樱子多糖作为其主要活性成分之一,能显著清除超氧阴离子自由基及脂质过氧化产物的形成,有明显的抗氧化作用^[4-6],但报道主要围绕金樱子水溶性多糖而进行。李玲等^[7]研究表明金樱子乙醇提取物也有较强的抗氧化活性。笔者分别对金樱子水溶性多糖和脂溶性多糖进行提取、纯化,研究其清除 DPPH 自由基、羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力及脂质抗氧化作用,并对结果进行比较,为深入开发利用药用金樱子资源提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试材。试验材料金樱子于 2015 年 11 月采自安徽省霍山县,品种经皖西学院生物与制药工程学院相关专家鉴定为金樱子(*Rosa laevigata* Michx)。

1.1.2 主要仪器。TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HH-S6 型数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);TGL-20M 台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);GL-20G-II 电子分析天平(上海安亭科学仪器厂);202A-3 型数显电

热干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司);RE-2000 旋转蒸发器(上海洪旋实验仪器有限公司);SHB-III S 型循环水式多用真空泵(郑州长城料工贸有限公司);FD-I 型冷冻干燥机(北京博医康公司)。

1.1.3 主要试剂。三氯甲烷(衢州市西陇化工股份有限公司)、正丁醇(天津博迪化工股份有限公司)、硫酸(国药集团化学试剂有限公司)、无水乙醇(上海振兴化工一厂)、无水乙醚(上海振兴化工一厂)、丙酮(衢州市西陇化工厂有限公司)、DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼),所有试剂均为 AR。

1.2 方法

1.2.1 金樱子粗多糖的提取。金樱子原料洗净,去籽 90℃ 烘干至恒重,粉碎过 40 目筛后,置于索氏提取器中石油醚回流脱脂(60℃,2 h),挥干溶媒。精密称取脱脂金樱子粉末 3 份各 150 g,同时进行平行操作,分别加入适量蒸馏水,95℃ 回流提取 3 h,收集提取液得粗多糖液。

1.2.2 金樱子多糖的纯化分离。在水浴 70℃ 下,将多糖提取液用旋转蒸发器减压浓缩至原体积的 1/3 左右,可见有明显沉淀,冷却至室温后,按照浸提液:H₂O₂ = 5:1 的体积比加入 H₂O₂,并于 50℃ 保温 2 h 进行脱色,再经透析、Sevag 法脱蛋白^[8-9]、洗涤后得金樱子混合多糖液。

取混合金樱子多糖液按 1:4 体积比加入 95% 乙醇,放入冰箱内(4℃)静置 24 h 过夜,4 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀加适量的去离子水溶解得金樱子水溶性多糖;离心后上清醇溶液减压浓缩得脂溶性多糖。

1.2.3 多糖的定性鉴定。采用 Molish 反应方法,若在糖液和浓硫酸的液间形成紫环(Molish 反应),即定性鉴定金樱子多糖的存在。

基金项目 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2015A361);安徽省自然科学基金面上项目(1608085MH221)。

作者简介 陈传平(1972—),男,安徽庐江人,副教授,硕士,从事天然产物开发与利用研究。

收稿日期 2017-10-30

1.2.4 多糖含量的测定与待测溶液配制。采用蒽酮-硫酸比色法,利用回归方程求各样品溶液中葡萄糖浓度,折合并计算出金樱子粗多糖、混合多糖、水溶性多糖及脂溶性多糖的质量浓度,再配制相应不同浓度待测溶液^[10]。

1.3 金樱子多糖抗氧化性的测定

1.3.1 清除 DPPH 自由基的能力测定。根据文献[11],精密称取 0.007 9 g DPPH 用无水乙醇定容到 100 mL,即得 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液。在试管中分别加入 2 mL 不同质量浓度的(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)金樱子多糖溶液及等体积的 DPPH 乙醇溶液,混匀后于暗处静置 30 min,以无水乙醇为参比,在波长 517 nm 处测定其吸光度(A)。平行测定 3 次,取平均值。按下式计算清除率:

$$\text{清除率} = [(1 - A_2 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_0 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 无水乙醇测定的吸光度; A_1 为 2 mL 无水乙醇 + 2 mL 样品溶液测定的吸光度; A_2 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 样品溶液测定的吸光度。

1.3.2 ·OH 清除率的测定。分别配制 0.15 mmol/L FeSO_4 溶液、2 mmol/L 水杨酸溶液及 6 mmol/L H_2O_2 溶液各 100 mL;样品组试管中加入 FeSO_4 溶液、水杨酸溶液、 H_2O_2 溶液及上述不同浓度的多糖溶液各 1 mL,空白组用蒸馏水代替多糖溶液,对照组用蒸馏水代替水杨酸;设 3 份平行,结果取平均值。以上试管编号放入水浴锅中 37 °C 恒温水浴 30 min 后,取出冷却,在分光光度计 510 nm 处用蒸馏水调零,测定平均吸光度(A),用下式计算多糖对 ·OH 的清除率^[12]:

$$\text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.3.3 脂肪过氧化值(POV 值)的测定。精密称取 PG 50 mg,用适量 60% 乙醇溶解后,与 1.0 mg/mL 的各种金樱子多糖溶液混合,分别加入到装有 50 g 经融化处理猪油的碘量瓶中,在 65 °C 下搅拌 30 min,使其均匀分散在油样中。塞紧瓶塞,置于 65 °C 恒温箱中保存 5 d。每隔 24 h,将瓶中的油样搅拌均匀,测定其 POV 值(GB/T5009.37—1996 油脂卫生标准)^[13]。以抗氧化剂的油样为空白对照。平行 3 份,取平均值。计算公式如下:

$$\text{POV} = 1\,000 \times (V_1 - V_2) \times C / M$$

式中, V_1 为试样消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液的体积, V_2 为空白试验消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液的体积, C 为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液的摩尔浓度, M 为样品质量。

2 结果与分析

2.1 清除 DPPH 自由基的能力 从图 1 可看出,4 组多糖待测溶液中,清除 DPPH 自由基能力有所不同,其中混合多糖组最强,粗多糖组次之,脂溶性多糖组最弱。4 组多糖待测溶液浓度发生变化时,其清除 DPPH 自由基的能力也发生相应的变化,随着待测组分中多糖浓度的逐渐升高,清除 DPPH 自由基的能力也逐渐增强。基于图 1 中的数据,利用 SPSS 15.0 软件对其进行方差分析,结果表明(表 1),各组试验数据之间的差异具有统计学意义,表明不同浓度的各组多糖对清除 DPPH 自由基能力有显著差异,同时在一定范围内金樱子多糖清除 DPPH 自由基能力随着多糖浓度的升高而提高,

呈现线性相关,其中混合多糖组回归方程为 $y = 0.1443x + 0.4973$ ($R^2 = 0.9963$),半清除率浓度 EC_{50} 为 0.018 7 mg/mL,对方程进行 t 检验,得出 $t = 18.25 > t_{0.001,4} = 7.173$,可见回归方程在 0.001 水平上显著。

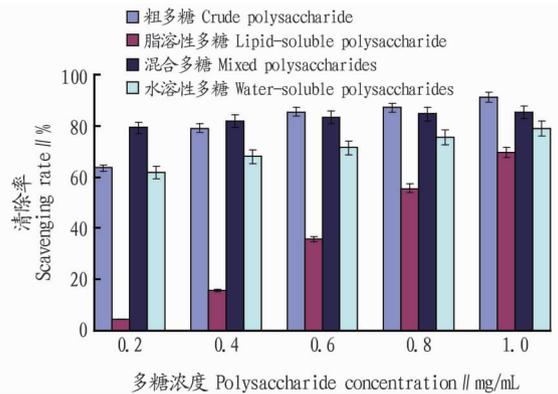


图 1 不同浓度金樱子多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 1 Scavenging activity of different concentrations of *Rosa laevigata* Michx polysaccharide on DPPH radical

表 1 不同浓度金樱子多糖对清除 DPPH 自由基能力影响的 SPSS 分析结果

Table 1 The SPSS analysis results of scavenging effect of different concentrations *Rosa laevigata* polysaccharide on DPPH radical

多糖浓度 Polysaccharide concentration mg/mL	均值差 Mean difference	标准误 Standard error	显著性 Significance
0.2	0.166 00	5.125 63	0.986
0.4	0.353 00	5.125 63	0.956
0.6	0.320 10	5.125 63	0.949
0.8	0.318 00	5.125 63	0.989
1.0	0.371 40	5.125 63	0.945

2.2 ·OH 清除率 从图 2 可看出,4 组多糖待测溶液在清除 ·OH 能力时,混合多糖组最强,水溶性多糖组次之,脂溶性多糖组最弱。同样,当待测溶液中多糖浓度逐渐提高时,清除率也呈逐渐增加趋势。利用 SPSS 15.0 软件进行方差分析,结果表明(表 2),各组试验数据之间的差异具有统计学

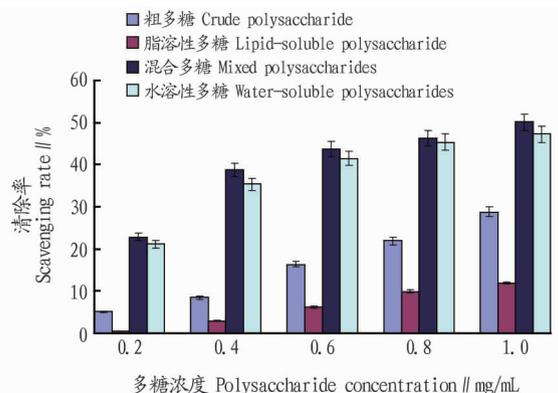


图 2 不同浓度金樱子多糖对 ·OH 的清除能力

Fig. 2 Scavenging ability of different concentrations *Rosa laevigata* polysaccharides on ·OH

意义,不同浓度的多糖对·OH清除率有显著差异;在试验范围内,各组金樱子多糖对·OH清除率都随着多糖浓度的升高而增加。其中混合多糖组回归方程为 $y=0.084x+0.4307$ ($R^2=0.9920$),半清除率浓度 EC_{50} 为0.825 mg/mL,对方程进行 t 检验, $t=12.14 > t_{0.001,4}=7.173$,可见回归方程在0.001水平上显著。

表2 不同浓度金樱子多糖对·OH清除率影响的SPSS分析结果

Table 2 The SPSS analysis results of scavenging effect of different concentrations *Rosa laevigata* polysaccharide on DPPH radical

多糖浓度 Polysaccharide concentration mg/mL	均值差 Mean difference	标准误 Standard error	显著性 Significance
0.2	0.178 00	5.125 63	0.988
0.4	0.343 00	5.125 63	0.946
0.6	0.300 10	5.125 63	0.945
0.8	0.312 00	5.125 63	0.987
1.0	0.375 10	5.125 63	0.947

2.3 多糖在猪油中的抗氧化活性 从图3可看出,4组多糖待测溶液在猪油中的抗氧化活性测试中,在试验时间范围内,随着时间的延长,脂溶性多糖组与PG抗氧化活性基本相同,表现出很强的抗氧化活性,混合多糖组次之,而水溶性多糖组最弱,与清除DPPH自由基及·OH试验相比,各组活性测定结果有所不同。

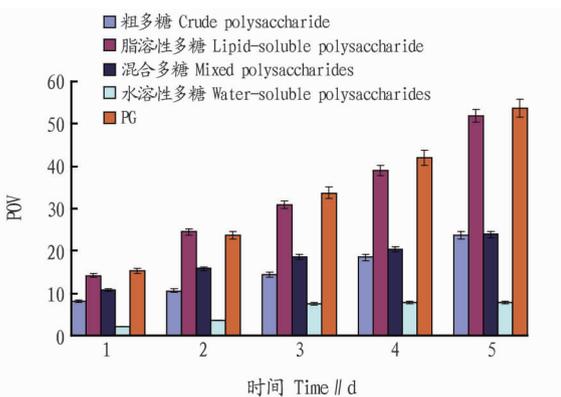


图3 不同金樱子多糖在猪油中的抗氧化作用比较

Fig.3 Comparison of antioxidant effect of different *Rosa laevigata* polysaccharides in lard

3 结论与讨论

生物机体正常代谢过程中会产生超氧阴离子、·OH等活性氧自由基,在正常情况下,机体产生的过多自由基会迅速被体内的清除剂所清除,因而机体自由基处于一种动态平衡之中。如果自由基过多能够氧化体内的生物膜、蛋白质及核酸等,导致人体正常细胞和组织的损伤,从而引起多种疾病,加速机体的衰老进程,并诱发炎症、恶性肿瘤、免疫失调等^[14]。因此,研究能够清除体内活性氧自由基的天然抗氧

剂和食品有重要意义。很多研究表明,具有药效作用的活性多糖在体外和体内都具有较强的抗氧化活性,不同种类的多糖化合物对不同反应体系的抗氧化作用效果不同,对所清除的自由基种类也有选择性^[15]。

该试验表明,金樱子多糖具有良好的抗氧化活性,其中在清除DPPH自由基、·OH活性方面,混合多糖(水溶性、脂溶性多糖未分开)组最强,其中对·OH的半清除率浓度(EC_{50})为0.825 mg/mL,与已有报道接近^[6]。猪油中的抗氧化活性测试中,脂溶性多糖组活性最强。研究证实,活性多糖大多为混合物,成分多样,结构复杂,其活性与多方面因素有关,尤其是多糖的一级结构与空间结构^[16]。多糖传统的提取方法有水提醇沉法、稀碱浸提法、稀酸浸提法和酶法等,分离多糖大都用多糖不溶于乙醇的特点而加入大量乙醇使之沉淀并析出水溶性多糖。该试验除了收集水溶性多糖外,还对乙醇上清液中多糖进行了收集,该部分多糖实际溶解于70%左右的乙醇,应该是极性小的一类多糖或多糖复合物,在POV试验中表现出较强的活性。不同提取工艺所得的金樱子多糖其分子结构可能有一定的差异,分子结构的差异决定了抗氧化活性的不同,该方面机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王晓静,张丽,陈莉华,等. 湘西野生金樱子多糖的抗氧化活性分析[J]. 药物分析杂志,2016,36(3):438-443.
- [2] 吴玉兰,曹运长. 中药金樱子的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2012,29(1):53-56.
- [3] 吴兴文,高品一,李玲芝,等. 中药金樱子的化学成分研究[J]. 药事实践杂志,2009,27(3):183-185.
- [4] 林芳花,彭永宏,蔡兰光,等. 金樱子体外抗氧化提取工艺的研究[J]. 惠州学院学报(自然科学版),2010,30(3):46-49.
- [5] 皮建辉,胡朝歌,郑仰,等. 金樱子多糖体外抗脂质过氧化和红细胞溶血作用研究[J]. 怀化学院学报,2012,31(5):11-15.
- [6] 韦玉兰,苏上贵,黄燕军,等. 金樱子多糖抗氧化作用的实验研究[J]. 广西中医药,2015,38(3):61-64.
- [7] 李玲,孟英才,肖水平,等. 金樱子乙醇提取物抗氧化和抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(12):14-17.
- [8] 方积年,丁侃. 天然药物——多糖的主要生物活性及分离纯化方法[J]. 中国天然药物,2007,5(5):338-347.
- [9] 朱晓霞,罗学刚. 多糖提取与纯化技术应用进展[J]. 食品研究与开发,2007,28(3):186-189.
- [10] 付学鹏,杨晓杰. 蒲公英多糖的提取及含量测定[J]. 现代食品科技,2007,23(5):37-39.
- [11] 皮朝琼,蔡珊兰,真义才,等. 金樱子多糖对小鼠急性药物肝损伤的保护作用[J]. 中国农学通报,2012,28(35):55-58.
- [12] 彭金龙,毛健,黄桂东,等. 黄酒多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(20):94-97.
- [13] 陈晓麟,丁小雯. 金樱子提取液对猪油自动氧化作用的影响[J]. 重庆教育学院学报,2002,15(3):53-55.
- [14] MARITIM A C, SANDERS R A, WATKINS J B III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2003, 17(1):24-38.
- [15] SHAO P, CHEN X X, SUN P L. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* [J]. Carbohydrate polymers, 2014, 105(1):260-269.
- [16] HONDA S, AKAO E, SUZUKI S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. Analytical biochemistry, 1989, 180(2):351-357.