

不同相对分子质量猪牙皂多糖的体外抗氧化活性

李时琪¹, 陈朝银², 赵声兰^{1*}, 帅友霞¹, 罗立梅¹, 刘芳²

(1. 云南中医学院, 昆明 650500; 2. 昆明理工大学, 昆明 650500)

[摘要] **目的:** 研究水溶性猪牙皂多糖的抗氧化活性。**方法:** 用水提醇分级沉降法和中空纤维素膜分离法制备不同相对分子质量的猪牙皂多糖。采用体外化学体系, 以维生素 C (Vit C) 为阳性对照, 测定猪牙皂多糖对羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧自由基 ($\text{O}_2^- \cdot$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 的清除作用。**结果:** 50% 醇沉且相对分子质量在 5 000 ~ 100 000 的猪牙皂多糖对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除活性高于 Vit C。30% 醇沉且相对分子质量大于 10 000 的猪牙皂多糖、50% 醇沉且相对分子质量 5 000 ~ 10 000 的猪牙皂多糖、74% 醇沉且相对分子质量大于 5 000 的猪牙皂多糖以及 88% 醇沉得到的猪牙皂多糖在 0 ~ 1.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 随浓度的增加对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用逐渐增强, 最大清除作用都可超过 90%。不同醇沉不同浓度得到的猪牙皂多糖对 H_2O_2 有一定的清除活性, 74% 醇沉且相对分子质量大于 5 000 的猪牙皂多糖在 0.07 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 H_2O_2 的清除率为 20.18%。**结论:** 猪牙皂多糖具有良好的对 $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^- \cdot$ 和 H_2O_2 清除活性, 猪牙皂多糖的抗氧化活性与醇沉浓度及其相对分子质量相关。

[关键词] 猪牙皂; 多糖; 抗氧化; 活性

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0145-04

Studies on Antioxidant *in vitro* of Polysaccharide from Different Molecular Weight Fructus Gleditsiae Abnormalis

LI Shi-qi¹, CHEN Chao-yin², ZHAO Sheng-lan^{1*}, SHUAI You-xia¹, LUO Li-mei¹, LIU Fang²

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidation of polysaccharide extracted from Fructus Gleditsiae abnormalis. **Method:** The scavenging activities of the polysaccharide *in vitro* on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide radical ($\text{O}_2^- \cdot$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were investigated by modified chemical systems. **Result:** The polysaccharide with 50% alcohol precipitation of the relative molecular mass of 5 000-100 000 performed the scavenging activities on superoxide radical higher than Vit C. Polysaccharide with 30% alcohol precipitation of the relative molecular mass more than 10 000, polysaccharide with 50% alcohol precipitation of the relative molecular mass 5 000-10 000, polysaccharide with 74% alcohol precipitation of the relative molecular mass more than 5 000 and polysaccharide with 88% alcohol precipitation presented hydroxyl radicals scavenging increasing with concentration increasing in 0.00-1.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ range. Also the largest scavenging rates were all more than 90%. The polysaccharides from Fructus gleditsiae abnormalis also showed certain scavenging activities on hydrogen peroxide, 74% alcohol precipitation polysaccharide with relative molecular mass more than 5 000 scavenged 20.18% of hydrogen peroxide at 0.07 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The polysaccharide extracted from Fructus Gleditsiae abnormalis can scavenge $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^- \cdot$ and H_2O_2 effectively. The antioxidant potential of polysaccharides from Fructus Gleditsiae abnormalis is presumably related to their relative molecular mass.

[Key words] Fructus Gleditsiae abnormalis; polysaccharide; antioxidant; activity

[收稿日期] 20111020(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30760304); 云南省科学研究基金项目(2006C0046M)

[第一作者] 李时琪, 硕士研究生, 从事中药资源开发与利用的研究, Tel:0871-5918137, E-mail:leeqiqi-ooqlsq@163.com

[通讯作者] * 赵声兰, 教授, 从事中药资源开发与利用的研究, Tel:0871-5918137, E-mail:zhaoshenglan@163.com

皂荚在不同发育条件下可形成两种果实,成熟肥大者为大皂角(*Fructus Gleditsiae Sinensis*),发育不完全瘦小者为猪牙皂(*Fructus Gleditsiae Abnormalis*)^[1]。猪牙皂被《中国药典》2010 年版收载为常用中药之一^[2],是我国传统中药,具有祛痰开窍、消肿散结之功效^[3]。猪牙皂具有抗炎、抗过敏、抗肿瘤、抗病毒、祛痰、改善心肌缺血等药理作用^[4]。前期研究表明猪牙皂多糖具有较强的清除超氧自由基和羟自由基的作用^[5]。本文研究用不同体积分数乙醇分级沉降、中空纤维素膜分离制备的猪牙皂多糖的抗氧化活性,为猪牙皂的进一步开发利用奠定基础。

1 材料

猪牙皂购于昆明市中药材市场,由云南中医学院赵荣华教授鉴定为豆科苏木亚科皂荚属植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥不育果实^[1]。药材经去籽、粉碎、干燥备用。邻二氮菲、邻苯三酚、过氧化氢等化学试剂为国产市售分析纯,购于上海化学试剂有限公司。

先行者 OHAUS 型电子分析天平,Gold-SIM 型冷冻干燥机,Ultrospec 2 000 型紫外-可见分光仪,Hollow Fiber Cartridge 型号为 UFP-5-E-4MA-5000NMWC、UFP-5-E-4MA-100000NMWC 等。

2 方法

2.1 不同相对分子质量猪牙皂多糖的制备 将干燥的猪牙皂粉用 95% 的乙醇回流提取 3 次,除去脂溶性杂质。按料液比 1:25、温度 90 ℃、时间 60 min 水提 3 次,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液浓缩至 1/6,用 Sevage 法脱蛋白,控制乙醇体积分数分别为 30%,50%,74%,88% 进行分级沉淀,4 ℃ 醇沉过夜,次日 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,得 30%,50%,74%,88% 乙醇沉淀的猪牙皂多糖粗品。猪牙皂多糖粗品分别用截流相对分子质量为 5 000,1 万,10 万的中空纤维素膜进行分离,浓缩,真空冷冻干燥,制得不同相对分子质量的猪牙皂多糖,见表 1。

2.2 不同相对分子质量猪牙皂多糖的体外抗氧化活性^[5]

2.2.1 不同相对分子质量猪牙皂多糖对羟自由基(·OH)的清除率^[6-8] 采用 H₂O₂/Fe 体系法。Fenton 反应产生羟自由基(·OH)体系中,邻二氮菲与 Fe²⁺ 反应生成 Fe²⁺-邻二氮菲配合物,该配合物在 536 nm 有最大吸收。当·OH 氧化 Fe²⁺-邻二氮菲成 Fe³⁺-邻二氮菲时,使 536 nm 处的吸收减小。若反应体系中存在·OH 清除剂,氧化过程受到抑

表 1 猪牙皂多糖样品

No.	名称
30x10k	30% 醇沉且浓度 <1 万的猪牙皂多糖
30d10k	30% 醇沉且浓度 >1 万的猪牙皂多糖
50x5k	50% 醇沉且浓度 <5 000 的猪牙皂多糖
50/5-100k	50% 醇沉浓度 >5 000 且 <10 万的猪牙皂多糖
50d100k	50% 醇沉且浓度 >10 万的猪牙皂多糖
74x5k	74% 醇沉且浓度 <5 000 的猪牙皂多糖
74d5k	74% 醇沉且浓度 >5 000 的猪牙皂多糖
88% 醇沉	88% 醇沉得到的猪牙皂多糖

制,536 nm 处的吸收减小不明显,通过 536 nm 处吸收值的比较,可测定待测样品清除·OH 的活性。在 10 mL 比色管中依次加入不同浓度的多糖溶液(或 Vit C 溶液)1 mL,0.75 mmol·L⁻¹ 的 FeSO₄ 1 mL,0.75 mmol·L⁻¹ 邻二氮菲 1 mL,0.01% H₂O₂ 1 mL,37 ℃ 保温 1 h,测定 536 nm 处的吸光度(A),同时设置损伤管和未损伤管,含 1 mL 的 H₂O₂ 为损伤管,用 1 mL 蒸馏水代替 H₂O₂ 为未损伤管,羟自由基(·OH)清除率的测定体系见表 2。

表 2 羟自由基(·OH)清除率的测定体系 mL

溶液	调零管	试剂未损伤管	试剂损伤管	样品损伤管	样品未损伤管
硫酸亚铁	-	1	1	1	1
邻二氮菲	-	1	1	1	1
过氧化氢	-	-	1	1	-
蒸馏水	4	2	1	-	1
不同浓度的 Vit C (或多糖)溶液	-	-	-	1	1

$$\text{羟自由基清除率} = 1 - \frac{(A_2 - A_3)}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

式中:A₀ 为试剂未损伤管的吸光度;A₁ 为试剂损伤管的吸光度;A₂ 为样品未损伤管的吸光度;A₃ 为样品损伤管的吸光度。

2.2.2 不同相对分子质量猪牙皂多糖对超氧自由基(O₂^{-·})的清除率 以 V_c 为阳性对照,采用邻苯三酚自氧化法^[5],测定不同相对分子质量猪牙皂多糖对超氧自由基的清除率。邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化,释放出超氧阴离子自由基(O₂^{-·})与中间物,中间物与超氧阴离子自由基(O₂^{-·})反应形成在 325 nm 波长下有特征吸收的中间产物。邻苯三酚的氧化速率依赖于自氧化产生的 O₂^{-·} 浓度,当有抑制剂存在时,可清除超氧阴离子,阻止中间产物的积累,使 325 nm 波长处吸光值的增量减少,根据吸光度的变化可求出待测样品的抗氧化活性。取 1.5 mL 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2),1.5 mL

蒸馏水,混匀,25 ℃水浴保温 20 min,取出,立即加入 25 ℃预热的 3 mmol·L⁻¹邻苯三酚 0.3 mL(以 10 mmol·L⁻¹HCl 配制,空白管为 10 mmol·L⁻¹ HCl 溶液),迅速摇匀后倒入比色杯,在波长 325 nm 处每隔 30 s 测定 A,计算线性范围内每 1 min 吸光度的增加值,即邻苯三酚的自氧化速率 $\Delta A_{\text{对照}}$ 。测定待测样品的抗氧化活性时,加入邻苯三酚前,先加入一定量的待测样品溶液,同时减少同体积的蒸馏水,其余操作同上,测出 $\Delta A_{\text{样品}}$ 。

$$\text{超氧阴离子清除率} = \frac{\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

式中: $\Delta A_{\text{对照}}$ 为 1 min 内对照管吸光度的变化值。 $\Delta A_{\text{样品}}$ 为 1 min 内样品管吸光度的变化值。

2.2.3 不同相对分子质量猪牙皂多糖对过氧化氢(H₂O₂)清除率的测定^[9] 中性条件下 H₂O₂ 比较稳定,pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液的 H₂O₂ 溶液,在 230 nm 处有一特征吸收峰。当加入对过氧化氢有抑制作用的物质时,溶液在 230 nm 处的吸光度减小,通过测定 A₂₃₀ 可以计算出对 H₂O₂ 的清除率。用纯净水调零,分别取用 pH 7.4 的 50 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液配制 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.10 g·L⁻¹的 Vit C 溶液和同浓度的多糖溶液 3 mL,分别加入用 pH 7.4 的 50 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液配制的 40 mmol·L⁻¹的 H₂O₂ 溶液 0.5 mL,室温放置 200 min,在 230 nm 波长处测定其 A。

过氧化氢清除率 =

$$\frac{(A_{\text{阳性}} - A_{\text{空白}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{(A_{\text{阳性}} - A_{\text{空白}})} \times 100\%$$

3 结果与讨论

3.1 不同相对分子质量猪牙皂多糖对羟自由基(·OH)的清除活性 不同相对分子质量猪牙皂多糖对·OH 的清除活性见图 1。Vit C 清除·OH 作用较猪牙皂多糖强,但随猪牙皂多糖浓度的不断增加,在 0

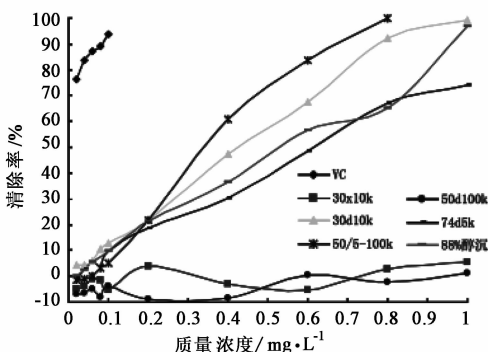


图 1 猪牙皂多糖对·OH 的清除作用

~1.00 g·L⁻¹30% 醇沉且相对分子质量大于 10 000

的猪牙皂多糖、50% 醇沉且相对分子质量大于 5 000 小于 10 000 的猪牙皂多糖、74% 醇沉且相对分子质量大于 5 000 的猪牙皂多糖以及 88% 醇沉得到的猪牙皂多糖对·OH 的清除作用逐渐增强。50% 醇沉且相对分子质量在 5 000 ~ 10 000 的猪牙皂多糖样品在 0.8 g·L⁻¹, 88% 醇沉及 30 d 10 k 样品在 1.0 g·L⁻¹时,对·OH 的清除作用均 >96%,具有良好的清除·OH 作用,30x10 k 及 50 d 100 k 猪牙皂多糖样品没有清除·OH 的作用。

3.2 不同相对分子质量猪牙皂多糖对超氧自由基(O₂^{-·})的清除活性 不同相对分子质量猪牙皂多糖对 O₂^{-·} 的清除活性见图 2。在所选浓度范围内,随着浓度增大,Vit C 清除 O₂^{-·} 作用显著增强,猪牙皂多糖清除 O₂^{-·} 的能力差别较大。50% 醇沉且相对分子质量在 5 000 ~ 100 000 的猪牙皂多糖对 O₂^{-·} 有明显清除作用,且清除作用超过 Vit C,在 2 mg·L⁻¹,对 O₂^{-·} 清除率达到 68.92%,质量浓度 6 mg·L⁻¹时,对 O₂^{-·} 清除率达到 73.54%,其余多糖样品对 O₂^{-·} 没有清除作用。

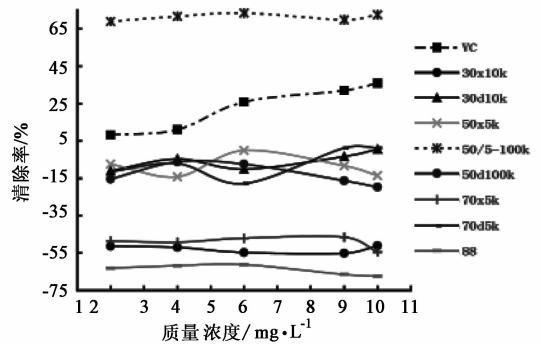


图 2 猪牙皂多糖对 O₂^{-·} 的清除作用

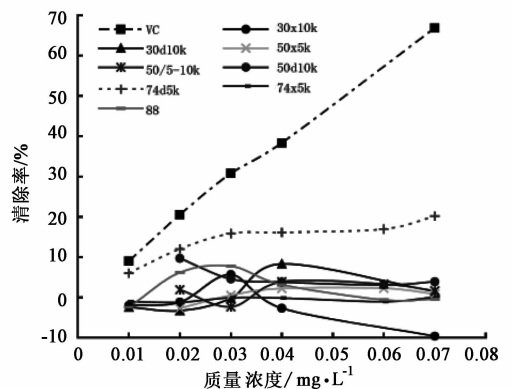


图 3 猪牙皂多糖抗超氧自由基的活性

3.3 不同相对分子质量猪牙皂多糖对 H₂O₂ 清除活性 不同相对分子质量猪牙皂多糖对 H₂O₂ 的清除活性见图 3。在所选浓度范围内,随浓度增大,Vit C

姜黄素预处理对体外循环大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护与抗氧化作用

郑芳¹, 巩红岩^{1*}, 秦元旭¹, 王更富², 王庆志², 邱庆成², 付庆林²

(1. 新乡医学院第一附属医院临床麻醉教研室, 河南 新乡 453100; 2. 新乡医学院, 河南 新乡 453100)

[摘要] 目的:探讨姜黄素预处理对体外循环期间大鼠心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤的保护作用。方法:将 90 只 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 15 只,分别为假手术组,缺血再灌注损伤(MIR)组,溶剂组,姜黄素低、中、高(10,20,40 mg·kg⁻¹)剂量组。建立心肌缺血再灌注模型。用不同剂量姜黄素在人为制造大鼠心肌缺血模型前 30 min 分别做预处理。再灌注结束后采血,测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶(LDH1),并测量心肌梗死面积。结果:姜黄素预处理能明显降低血浆中 AST,LDH,LDH1,MDA 的含量,MIR 组血浆中各种心肌酶均明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),MIR 组与溶剂组比较差异无统计学意义,姜黄素组血浆各心肌酶均明显低于 MIR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提高 SOD 活性,减少心肌梗死面积。结论:姜黄素对体外循环期大鼠心肌缺血再灌注引起的氧化应激损伤有保护作用。

[关键词] 姜黄素; 心肌缺血; 心肌再灌注损伤; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0148-04

Protective Effects of Curcumin on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats in Cardz Pulmonary Bypass

ZHENG Fang¹, GONG Hong-yan^{1*}, QIN Yuan-xu¹, WANG Geng-fu²,
WANG Qing-zhi², QIU Qing-cheng², FU Qing-lin²

(1. Department of Anesthesia First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China;
2. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China)

[收稿日期] 20111011(001)

[基金项目] 国家博士后基金项目(57068)

[第一作者] 郑芳,硕士,住院医师,从事医学影像研究,E-mail:ghyzf@sohu.com

[通讯作者] * 巩红岩,硕士,主治医师,E-mail:ghy20100228@yahoo.com

清除 H₂O₂ 作用显著增强,74% 醇沉且相对分子质量大于 5 000 的猪牙皂多糖对 H₂O₂ 有清除作用,质量浓度为 0.07 g·L⁻¹ 时清除率为 20.18%,但其清除作用没有 Vit C 强。其余猪牙皂多糖对 H₂O₂ 基本没有清除作用。

[参考文献]

- [1] 刘来正,赵桂珍.皂角子、皂荚与猪牙皂粉末显微鉴定的比较研究[J].山西中医学院学报,2009,10(2):24.
- [2] 中国药典.一部[S].2010:298.
- [3] 谢宗万,范崔生,朱兆仪.全国中草药汇编[M].北京:人民卫生出版社,1996:821.
- [4] 高峥贞,夏玉凤,王强,等.猪牙皂的化学成分和药理活性研究进展[J].中国野生植物资源,2008,27

(1):1.

- [5] 赵声兰,陈进伟,刘芳,等.猪牙皂多糖提取工艺及体外抗氧化活性的研究[J].云南中医学院学报,2010,33(4):15.
- [6] 聂波,何国荣,刘勇,等.地笋抗氧化活性的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):176.
- [7] 周向军,高义霞,袁毅君,等.乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):36.
- [8] 折改梅,孙芳芳,吕海宁,等.多叶棘豆清除自由基活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):91.
- [9] 何玲玲,王新,刘彬,等.板栗多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J].营养与功能,2010,26(2):72.

[责任编辑 邹晓翠]