

柚肉多糖的提取及其降血脂作用研究

陈传平, 张庭廷, 曹承和, 齐元, 聂刘旺*

(安徽师范大学生命科学学院/安徽省重要生物资源保护与利用研究重点实验室, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的: 研究柚肉多糖(GPs)对实验性高血脂小鼠血脂含量的影响。方法: 采用水提醇沉法提取 GPs, 葡聚糖凝胶柱层析测定其分子量。以不同剂量 GPs 液 ig 高脂模型小鼠, 两周后断头取血测定正常及各高脂模型小鼠的血清脂质含量, 计算其动脉硬化指数(AI)。结果: 柚肉中含有分子量为 27 000 和 12 000 两种多糖组分。与高脂模型组比较, GPs 组血清中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)含量和 AI 均有显著降低($P < 0.01$), 高密度脂蛋白(HDL-C)含量则显著升高($P < 0.01$)。结论: GPs 有显著降脂效果, 对动脉粥样硬化有一定的预防作用。

[关键词] 柚子; 多糖; 高血脂症; 降脂作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0029-03

Study on the Separation and Lipid-decreasing Effect of Polysaccharides in the Grapefruit

CHEN Chuan-ping, ZHANG Ting-ting, CAO Chen-he, QI Yuan, NIE Liu-wang*
(Key Lab. of Biological Resources Conservation and Utilization of Anhui Province,
College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of polysaccharides in the grapefruit(GPs) on experimental mice with hyperlipidemia. **Method:** The water soluble polysaccharides of grapefruit were extracted in hot water, and isolated by ethanol. GPs were purified with Sephadex-50 column chromatography. The hyperlipidemia mice were fed with different doses of GPs to determine the mice serum lipids of control, GPs and model groups after two weeks feeding and to figure out atherosclerosis index(AI). **Result:** The molecular weight of GPs were estimated to be 27 000 and 12 000 respectively. Compared with the model group, the concentrations of total cholesterol(TC), total triglyceride(TG), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) and AI in serum of GPs groups were decreased significantly($P < 0.01$), and the concentration of high density lipoprotein cholesterol(HDL-C) in serum was obviously increased in the meantime($P < 0.01$). **Conclusion:** The results implicate that the GPs have significantly effects in decreasing the blood lipid of hyperlipidemia and in preventing atherosclerosis.

[Key words] Grapefruit; Polysaccharides; Hyperlipidemia; Lipid-decreasing

柚子营养丰富, 含有糖类、维生素 A, B₁, B₂, C,

钙, 磷等。中医认为, 柚肉味甘酸、性寒, 有健脾胃、除痰咳、解酒毒、降血脂血糖诸功^[1]。近年的国外医学研究也表明, 柚肉提取物可以通过干扰小肠对低密度脂蛋白的吸收而降低血液中的胆固醇, 进而预防冠心病的发生^[2,3]。

活性多糖具有多种多样的生物学功能, 包括抗肿瘤、免疫增强、降血糖血脂等^[4], 迄今柚肉多糖(GPs)的相关研究尚未见报道, 本实验通过对柚肉多

[收稿日期] 2006-07-10

[基金项目] “生物环境与生态安全”安徽省重点实验室基金及安徽省科学与技术后备人才选基金项目(2006-5)

[通讯作者] * 聂刘旺, Tel: (0553) 3869571; E-mail: lwnie@mail.ahnu.edu.cn

糖的提取并研究其降血脂活性, 以进一步阐明柚子的保健功能, 为其深加工和应用提供科学依据。

1 材料

1.1 供试品 原材料: 甜柚 (*Citrus grandis* (L.) OSB.), 福建梅州产, 九月中旬采收的自然成熟果。柚肉多糖 (GPs), 其提取产物为鲜果肉的 0.75%, 给药剂量为(按提取物中所含多糖计): 125、250 和 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2 试剂 葡聚糖 Sephadex G-50, 标准品葡聚糖 T-10, T-40, T-70, T-500, Pharmacia Biosharp 公司生产; 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)测定试剂盒南京建成生物制品研究所生产; 其余药品皆为分析纯。

1.3 仪器与设备 组织捣碎匀浆机 JJ-2, 常州国华电器有限公司; 旋转蒸发器: RE-52, 上海青浦沪西仪器厂; 721 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 透析袋 20/32, FARCO 公司; 冷冻干燥机 FD-1、层析冷柜 YC-1, 北京博医康公司; 柱层析装置(HL-2 型恒流泵, BSZ-100 型自动部分收集器), 上海青浦沪西仪器厂; Hitachi 全自动生化分析仪, 苏州日立公司。

1.4 实验动物 昆明种小鼠 40 只, 3 月龄, 体重 $20 \pm 2\text{g}$, 雌雄各半, 检疫证号 SCXK(苏)2005-0018, 由皖南医学院实验动物中心提供。

2 方法

2.1 柚肉多糖 (GPs) 的分离纯化 提取分离: 将新鲜柚子去皮称重, 置匀浆机中中速匀浆 10 min, 浆液移至大烧杯, 添加等体积的蒸馏水, 搅匀, 在 95 °C 水浴锅中水浴保温 3 h 后, 用布氏漏斗抽滤浸出液。滤渣同前述条件浸提 1 次。合并两次提取液, 减压浓缩至一定浓度, 离心, 取上清液, Sevag 法脱蛋白后, 用透析袋流水透析 48 h, 加入浓缩液 3 倍量的 95% 乙醇, 低温静置过夜, 离心收集沉淀, 依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 冷冻干燥, 得柚肉多糖 (GPs)。多糖含量测定: 参照文献, 用改进的硫酸-苯酚法测定^[5]。多糖分子量的测定^[6]: 葡聚糖 Sephadex G-50 凝胶柱层析, 用已知分子量的葡聚糖 T-10, T-40, T-70, T-500 作标准曲线, 再按洗脱体积(V_e) 计算样品的分子量。层析条件: 上样量 2 mg, 上样体积 0.2 mL, 用蒸馏水洗脱, 流速 2.5 mL/h, 每管 0.8 mL 分部收集。用硫酸-苯酚法跟踪检测, 依吸光度对洗脱液体积作图。

2.2 柚肉多糖 (GPs) 的降血脂实验 高脂饲料的配

制^[7]: 1.5% 胆固醇、15% 甘油三酯、83.5% 基础饲料混合均匀, 烘干备用。

小鼠饲喂与给药: 小鼠经实验室适应性喂养 1 周后, 按体重随机分为 5 组: 正常对照组、高脂模型对照组、GPs 低剂量组、GPs 中剂量组、GPs 高剂量组, 每组 8 只, 雌雄各半。分组后正常对照组喂以基础饲料, 其余各组喂以高脂饲料, 自由饮水。每天下午 2 点给药组按低、中、高剂量 ig 不同浓度药物, 对照组和模型对照组 ig 等体积蒸馏水, 连续 2 周。

血脂测定: 测定前均禁食不禁水 12 h, 断头取血, 离心分离血清, 用全自动生化分析仪测定 TC、TG、HDL-C、LDL-C, 由 Friedwald WT 公式^[8] $\text{LDL-C} = \text{TC} - (1/5\text{TG} + \text{HDL-C})$ 计算, 动脉硬化指数 (AI) 由公式^[9] $\text{AI} = (\text{TC} - \text{HDL-C}) / \text{HDL-C}$ 计算。

2.3 统计处理 所有数据用 SPSS11.0 for Windows 数据包处理, 组间经方差分析和 t 检验。

3 结果与分析

3.1 柚肉多糖 (GPs) 含量测定结果 该法所得多糖为白色块状。图 1 是测定多糖含量的标准曲线, 按同样操作测定多糖硫酸-苯酚反应的吸光度, 代入曲线方程, 再乘以校正系数 0.9, 得原材料中多糖含量为 0.52%, 所提多糖粉末中多糖含量为 69.32%, 达到实验所需含量标准。

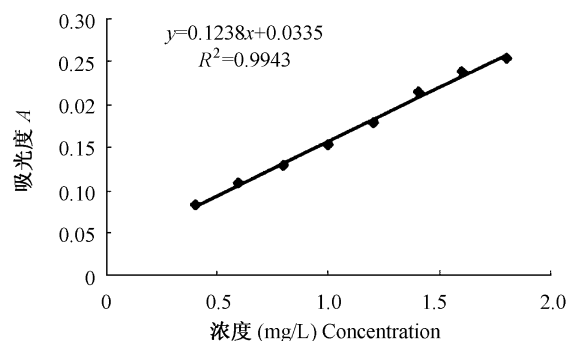


图 1 葡萄糖标准曲线

3.2 柚肉多糖 (GPs) 分子量的测定结果 图 2 是 4 种标准葡聚糖及柚肉多糖分别通过同一葡聚糖凝胶柱层析体系的洗脱曲线, 根据标准品的洗脱峰对应的洗脱体积 V_e , 用其分子量对数 ($\log M_r$) 作线性回归, 得曲线方程 $V_e = -13.9 \log M_r + 98.6$, $R^2 = 0.9952$ 。从图中可以看出, 柚肉多糖有两个主要组分, 根据其洗脱体积 V_e , 代入方程, 得两个组分的平均分子量分别约为 27 000 和 12 000。

3.3 柚肉多糖 (GPs) 的降血脂作用 从表 1 可以看出, GPs 低、中、高剂量组与高脂模型组相比, 血清中

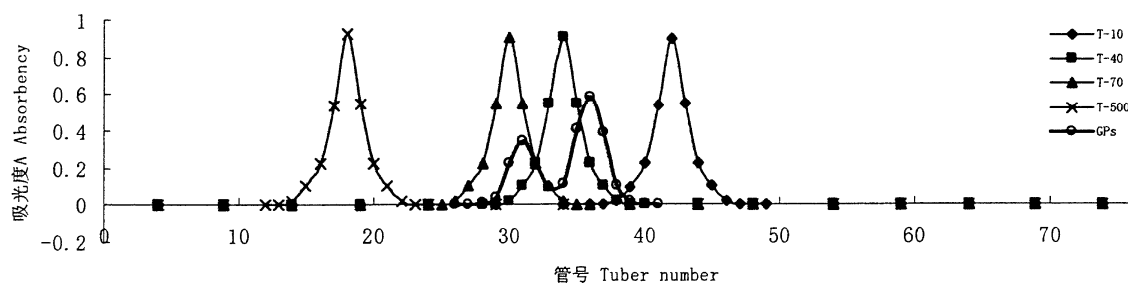


图 2 标准葡聚糖及 GPs 在 Sephadex G-50 凝胶柱上的洗脱曲线

表 1 柚肉多糖对实验性高血脂小鼠血清脂质水平及 AI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	给药天数 (d)	检测结果				
			TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	AI
正常对照组	—	0	3.27 ± 0.58 ²⁾	1.06 ± 0.09 ²⁾	1.44 ± 0.09 ²⁾	1.58 ± 0.15 ²⁾	1.28 ± 0.25 ²⁾
高血脂模型组	—	0	6.03 ± 0.39	2.16 ± 0.20	1.49 ± 0.12	4.11 ± 0.21	3.01 ± 0.22
GPs	125	14	3.92 ± 0.06 ²⁾	1.01 ± 0.13 ²⁾	1.53 ± 0.04 ¹⁾	2.17 ± 0.09 ²⁾	1.56 ± 0.07 ²⁾
GPs	250	14	3.31 ± 0.21 ²⁾	0.85 ± 0.11 ²⁾	1.67 ± 0.16 ²⁾	1.51 ± 0.17 ²⁾	0.98 ± 0.19 ²⁾
GPs	500	14	2.44 ± 0.33 ²⁾	0.74 ± 0.08 ²⁾	2.05 ± 0.32 ²⁾	0.26 ± 0.14 ²⁾	0.19 ± 0.13 ²⁾

注:与高血脂模型对照组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

TC TG LDL-C 含量显著降低 ($P < 0.01$), 有的甚至低于正常对照组, HDL-C 含量明显升高 ($P < 0.01$), 说明 GPs 降血脂作用效果明显。给药低、中、高剂量组之间血清的各项指标也有显著性差异 ($P < 0.05$), 呈现出一定的剂量效应关系。另外, 喂药组对高血脂小鼠的动脉硬化指数 AI 有明显的降低效果, 提示 (GPs) 对动脉硬化有一定的预防作用。

4 讨论

多糖的相对分子质量测定较为重要, 因为多糖的性质往往与它的相对分子质量大小有关^[10]。本实验所得 GPs 的两个组分相对分子量都较大, 可能是其药理作用的一个重要因素。

近 20 年来临床研究方面的结果显示, 降低胆固醇水平, 改善血脂异常, 可显著降低冠心病的发病率和死亡率, 是冠心病一级预防和二级预防的有力措施^[11]。本研究的结果表明, GPs 能显著降低高血脂小鼠血清 TC 和 TG 水平, 并能升高 HDL-C 及降低 LDL-C, 对 AI 也有一定的降低作用, 证明其对高血脂症的治疗有一定的效果, 很可能成为一种有效的血脂调整药源。

[参考文献]

[1] 顾海昌. 吃柚子为何能防心脏病[J]. 中国食品, 2000, 21(1): 16.

[2] J. Juskiewicz, Z. Zdunczyk, M. Wroblewska, et al. The Response of Rats to Feeding with Diets Containing Grapefruit Flavonoid Extract [J]. Food Research, 2002, 35 (4): 201-205.

[3] E.M. Kurowska Ph. D., N. M. Borradaile M. S., J. D. Spence M. D., et al. Hypocholesterolemic Effects of Dietary Citrus Juices in Rabbits [J]. Nutrition Research, 2000, 20 (1): 121-129.

[4] 辛娟, 王远亮, 郭莉霞, 等. 多糖的生物活性及其应用 [J]. 生物医学工程研究, 2004, 23(10): 179-182.

[5] 徐光域, 颜军, 郭小强, 等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用 [J]. 食品科学, 2005, 26(8): 342-346.

[6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 116-123.

[7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1201-1205.

[8] Friedwald WT. Estimation of Concentration of Low Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma without Use of the Reparatve Ultracentrifuge [J]. Chin Chen, 1992, 18 (3): 499.

[9] 饶颖竹, 陈蓉, 莫锦坚, 等. 仙人掌对小鼠实验性高血脂症的降脂作用 [J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(7): 523-525.

[10] 韦巍, 李雪华. 多糖的研究进展 [J]. 国外医学(药学分册), 2005, 32(3): 179-284.

[11] 叶平. 血脂基础与临床 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 255-262.