

枸杞多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用

李贵荣(衡阳 421001 南华大学公共卫生学院)

摘要 目的: 研究枸杞多糖(LBP)的提取及其对活性氧自由基的清除作用。方法: LBP 提取采用水煮醇沉法粗提, Polyerde 滤柱膜吸附洗脱精制; 采用分光光度法测定枸杞多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 和 OH^{\cdot} 的抑制作用。结果: 粗品 LBP 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 OH^{\cdot} 清除率分别可达 58.6% 和 49.7%, 精品 LBP 对二者的清除率分别可达 40.7% 和 31.4%。结论: LBP 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 OH^{\cdot} 均有良好的清除能力。

关键词 枸杞多糖; 羟自由基; 超氧负离子自由基

Study on isolation of lycium barbarum polysaccharide and its effects on anti-active oxygen free radicals

Li Guirong (College of Public Health, Nanhua University, Hengyang, 421001)

ABSTRACT OBJECTIVE: Study on isolation of the lycium barbarum polysaccharide (LBP) and its effects on antrioxide oxygen free radical. **METHODS:** Isolation of LBP by hot water extracted and alcohol precipitation, and purified by absorbent with Polyerde column membrane and eluted with hot water; **RESULTS:** Scavenge rate to $O_2^{\cdot -}$ and OH^{\cdot} with the crude LBP were 58.6% and 49.7%, respectively; and with pure LBP were 40.7% and 31.4%, respectively; **CONCLUSION:** the LBP was shown with scavenging action to $O_2^{\cdot -}$ and OH^{\cdot} .

KEY WORDS: Lycium barbarum polysaccharide, hydroxyl free radical, superoxide anion free radical

枸杞子(Lycium barbarum L)是名贵中药,有滋补肝肾,益精明目之功效。其枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharide 简称 LBP)是其主要活性成分之一,具有增强免疫力,抗肿瘤,防衰老等多方面的药理作用^[1]。本文由枸杞子经提取并分离纯化后得到水溶性 LBP。采用邻苯三酚自身氧化反应为产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)模型^[2];采用 Fenton 反应为产生羟自由基(OH^{\cdot})模型^[3],用紫外和可见分光光度法试验观察了 LBP 对模型中产生的 $O_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 影响。结果表明: LBP 具有较强的清除活性氧自由基的能力。

1 仪器、材料与试剂

UV-VIS755B 型紫外可见分光光度计;红外光谱仪。

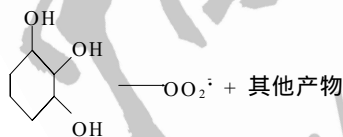
枸杞子(Lycium barbarum L)由衡阳市购得。

Polyerde 硅铝酸盐吸附剂(新乡新辉制药厂产品);邻苯三酚,水杨酸,过氧化氢,硫酸亚铁等试剂均为国产分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2 实验方法

2.1 $O_2^{\cdot -}$ 自由基产生体系模型^[2]

邻苯三酚在弱碱性(磷酸盐缓冲溶液 pH 8.2)环境中自身氧化分解产生 $O_2^{\cdot -}$ 的反应为:



该体系常用于测定 SOD 或类 SOD 活性物质对 $O_2^{\cdot -}$ 的歧化活性。随着反应的进行, $O_2^{\cdot -}$ 在体系中会不断积累,导致反应液的吸光度(325nm 波长)在反应开始后 5min 之内随时间变化而线性增大。因此在该时间内,于 325nm 处测定含被测物反应液的吸光度随时间的变化率,并与空白液比较便得出被测物抑制 $O_2^{\cdot -}$ 积累的作用能力。抑制率计算式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{F_0 - F_x}{F_0} \times 100$$

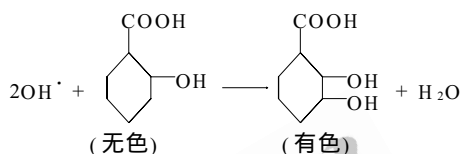
式中 F_0 和 F_x 分别表示空白溶液和被测液的吸光度随时间的变化率。

2.2 OH^{\cdot} 自由基产生体系模型^[3]

H_2O_2 与二价铁离子混合后产生 OH^{\cdot} 的 Fenton 反应为:



OH^{\cdot} 具有很高的反应活性,其存活时间短。但在反应体系中加入水杨酸,能有效地捕捉 OH^{\cdot} , 并产生有色产物



该有色产物在 510nm 处有强吸收。若在体系中加入具有清除 OH^{\cdot} 功能的被测物,能及时清除 OH^{\cdot} , 从而使有色产物的生成量减少导致吸光度减小。故采用固定反应时间法,在 510nm 处测量含被测物反应液的吸光度,并与空白液比较,便能测定被测物对 OH^{\cdot} 的清除作用。其清除率计算式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$$

3 LBP 的提取工艺

3.1 粗提:称取经 60℃ 干燥过的枸杞子 80g,粉碎。分别用氯仿: 甲醇(2: 1)混合溶剂和 95% 乙醇,于索氏提取器中先后抽取,均提取至提取液基本无色为止以脱脂。取出提取渣于空气中凉干,挥发干溶剂后,用 200ml 蒸馏水在 90℃ 水浴中提取,重复 3 次,每次提取后均趁热过滤。各次提取时间分别为 2.0、1.5、1.0h。合并三次滤液,冷却后为粗提液。

将粗提液减压浓缩至原体积的 1/6,冷却后在搅拌下加入 95% 乙醇至乙醇浓度达 80%,便有沉淀产生,静置过夜。过滤,收集沉淀。所得沉淀再用适量蒸馏水溶解,重复上述操作结晶一次。最后所得沉淀分别用 95% 乙醇、无水乙醇和丙酮淋洗,取出后真空干燥(50℃)得 LBP 粗品。

3.2 纯化:称取约 1/2 LBP 粗品溶于适量蒸馏水,滴加 10% 三氯乙酸溶液,见有片状沉淀下沉,继续滴加直到上面清液不产生沉淀为止。静置 2h 后,离心分离,弃去沉淀。清液中加入乙醇至乙醇浓度达到 70%,有沉淀产生,静置过夜。小心抽滤,所得沉淀用 70% 乙醇反复淋洗直到滤液中无三氯乙酸为止。取出沉淀经干燥后得 LBP 纯品。

3.3 精制:使用布氏漏斗制成厚度约为 8cm 的 Polyerde 渗透膜,将经纯化处理的 LBP 纯品溶于 20% 热乙醇中,冷却后缓慢通过 Polyerde 膜,使 LBP 充分吸附。再在负压下用 60℃ 热蒸馏水淋洗 Polyerde 膜,使 LBP 洗脱。收集洗脱液进行减压浓缩,冷却后加入乙醇至乙醇浓度达 70%,以沉淀 LBP,静置 24h 后即有白色絮状沉淀析出。离心分离,收集沉淀,洗涤后干燥得粉末状 LBP 精品。

4 结果与讨论

4.1 LBP 紫外光谱和红外光谱特征:经纯化精制后的 LBP 在紫外光谱(0.5mg/L 水溶液)中已无明显的 280nm 的蛋白

质特征吸收,也无 260nm 处的核酸特征吸收。在其红外光谱 (1% KBr) 中有 3374、2930、1610、1418、1060 cm^{-1} 等多糖的特征吸收。可见所得 LBP 精品纯度较高。

4.2 LBP 对活性氧自由基的清除作用

按实验方法分别对 LBP 粗品和 LBP 精品进行了清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 作用的试验,其试验结果见表 1:

表 1 LBP 清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 的试验结果

样品类型	LBP 浓度 (mg/ml)	$\text{O}_2^{\cdot -}$ 清除率 (%)	OH^{\cdot} 清除率 (%)
粗品	1.00	58.6	49.7
	0.50	36.5	30.8
	0.10	12.6	10.9
精品	1.00	40.7	31.4
	0.50	21.1	19.2
	0.10	11.5	9.8

4.3 讨论

试验结果表明 LBP 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 有清除作用,而且与 LBP 浓度成正相关性。本文采用的自由基模型体系所产生的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 自由基浓度远大于体内该两种自由基浓度^[4,5],体外实验表明 LBP 是良好的氧自由基清除剂,估计与枸杞

子具有良好保健功能有一定关系,此有待于体内试验证实。经纯化精制后的 LBP 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 的清除作用均小于其粗品 LBP,此结果提示纯化处理过程中许多原本与多糖相结合的成分被除去,而这些成分可能有一些具有较强的抗氧化性,如糖肽、结合蛋白等,这些成分的除去可能导致清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 的能力下降。

枸杞多糖具有清除活性氧自由基功能的试验结果将为其合理开发利用提供理论依据。

参考文献

- 1 李 泓. 枸杞及其有效成分的药理学研究进展. 中草药, 1995, 26(9): 490.
- 2 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法- 邻苯三酚自氧化法的改进. 生物化学与生物物理进展, 1986, (4): 71.
- 3 贾之慎. 比色法测定 Fenton 反应的羟自由基. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 184.
- 4 Barry alliwell. antioxidant Characterization (methodology and mechanism). Biochemical Pharmacology, 1995, 49(10): 1341.
- 5 杨俊林, 沈 恂. 生物系统中活泼中间体与脂质过氧化. 化学通报, 1997, (6): 5.

收稿日期: 2001- 01- 10