

沙棘叶水溶性多糖分级组分抗氧化活性的研究

李芳亮¹,王 锐¹,高 杨²,刘 莹¹,赵立冬²

(1. 辽宁工程技术大学 理学院,辽宁 阜新 123000;2. 辽宁省阜新市科技局,辽宁 阜新 123000)

摘要:为了研究沙棘叶水溶性多糖分级组分的体外抗氧化活性,采用热水浸提、乙醇分级沉淀,得到沙棘叶水溶性多糖分级组分:WPFH60、WPFH70、WPFH80,经 Sevag 法脱蛋白,透析,冷冻干燥后备用。通过还原力、清除超氧阴离子、清除羟基自由基和抑制 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血试验来评价 3 个组分的体外抗氧化能力,并与 BTH 进行比较。结果表明:WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 均具有一定的抗氧化活性,且呈显著的量效关系。其中,WPFH70 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 OH 具有较强的清除作用, IC_{50} 分别为:311.1 和 179.9 $\mu g \cdot mL^{-1}$;对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血及 MDA 生成有很强的抑制作用, IC_{50} 分别为:194.3 和 174.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 。WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 在一定浓度范围内都具有抗氧化性,是一种天然的抗氧化剂。

关键词:沙棘;多糖;抗氧化;红细胞溶血

中图分类号:Q946.3;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)06-0063-04

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.),又名酸刺、醋柳,系胡颓子科沙棘属植物,为落叶灌木,主要分布在欧亚大陆温带地区^[1]。沙棘植株的所有部分(包括果实、叶、皮)都是有利用价值的生物活性物质资源^[2],除部分供药用外,大量用于多种保健饮料的配制^[3]。近年来,活性氧攻击生物大分

子引起机体衰老和疾病,以及清除自由基的抗氧化物质的研究普遍受到关注^[4-5]。但关于沙棘叶中多糖的研究报道很少,现以日常使用的抗氧化剂 BTH 为对照对沙棘叶水溶性多糖分级组分的体外抗氧化能力进行研究,为开发天然抗氧化剂,更加合理利用沙棘资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试沙棘叶于 10 月份采于辽宁省阜新市阜新蒙古族自治县阜新镇同乃北沟。昆明种小鼠,体重为(25±2) g(中国医科大学实验动物中心),

收稿日期:2011-03-06

基金项目:辽宁工程技术大学优秀青年科学研究基金(07-127)

第一作者简介:李芳亮(1974-),男,山东省临沭县人,硕士,讲师,从事生物活性多糖研究。E-mail:asdzzzz@126.com。

Effect of Light and Temperature on Seed Germination of *Speirantha gardenii*

WEI Zong-xian, SONG Man-zhen

(Lushan Botanical Garden of Jiangxi Province and Chinese Academy of Science, Jiujiang, Jiangxi 332900)

Abstract: Taking the seed of *Speirantha gardenia* as experiment material, the effects of light and temperature on seed germination of *Speirantha gardenii* were studied. The results showed that seed germination of *Speirantha gardenii* under the light of 500 lx, 2 500 lx and 5 000 lx in the 24 h illumination were 84.0%, 86.7% and 86.7%, respectively. In the conditions of 15 h illumination and 9 h dark, seed germination of *Speirantha gardenii* under the light of 500 lx and 5 000 lx were 85.9% and 85.2%, and was 89.1% under the light of 2 500 lx. The optimum temperature to *Speirantha gardenii* seed germination was 25°C in the dark treatment, its seed germination rate was 94.7%, dark obviously improved the seed germination, shortened seed germination duration and enhanced the percentage of its germination. The percentage of *Speirantha gardenii* seed germination decreased with the change of temperature.

Key words: *Speirantha gardenii*; seed germination; light; temperature

MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),铁氰化钾等试剂均为国产分析纯。

供试仪器有 752N 型紫外可见光光度计(上海欣茂仪器有限公司),Scientz-12N 型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司),UV23150 型紫外可见分光光度计(日本岛津),KDC-16HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

1.2 方法

1.2.1 沙棘叶水溶性多糖分级组分的制备 称取 100 g 沙棘叶,粉碎,加入 2 000 mL 蒸馏水,于 80℃ 水浴提取 2 h,提取 3 次合并滤液,旋转蒸发浓缩至 200 mL,用 Sevag 法脱蛋白后^[6],加入无水乙醇使其终浓度依次达到 60%、70% 和 80%,分别离心,所得沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚分别离心洗涤 3 次。自然风干后,分别配置成 100 mL 溶液,然后用蒸馏水透析 48 h,透析液浓缩后冷冻干燥得沙棘叶水溶性多糖分级组分分别为:WPFH60、WPFH70 和 WPFH80。各取 1 g 分别溶解于 100 mL 蒸馏水中,稀释 10 倍后备用。

1.2.2 还原力试验 抗氧化剂是通过自身的还原作用使自由基转变成稳定的分子,从而失去活性。还原力越大,抗氧化能力就越强,因此可以通过测定还原力来评价抗氧化活性的强弱。该试验采用普鲁士兰法来检测沙棘叶水溶性多糖分级组分的还原力。以普鲁士兰的生成量作为指标,在 700 nm 处比色,吸光值越大表明样品的还原力越大^[7]。

1.2.3 $O_2^{\cdot-}$ 清除率的测定 采用邻苯三酚自氧化法。

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

式中 $A_{\text{空白}}$ 为未加多糖邻苯三酚自氧化速率; $A_{\text{样品}}$ 为加入多糖后邻苯三酚自氧化速率。

邻苯三酚在碱性条件下迅速氧化产生 $O_2^{\cdot-}$ 和有色中间产物, $O_2^{\cdot-}$ 能加速邻苯三酚氧化速率和有色中间产物的生成。有色中间产物在 299 nm 处有强烈的光吸收。加入抗氧化物质可以清除 $O_2^{\cdot-}$,从而能抑制邻苯三酚的自氧化反应,阻止有色中间产物的积累。所以在 299 nm 处比色,可以评价受试物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力^[8]。

1.2.4 OH^{\cdot} 清除率的测定 采用 Smimoff 等的改良方法。

$$\text{清除率} / \% = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

式中 $A_{\text{空白}}$ 为未加 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 的吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为加入 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 后的吸光值。

H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生 OH^{\cdot} ,在反应体系中加入水杨酸能有效地捕捉 OH^{\cdot} ,从而生成 2,3-二羟基苯甲酸,在 510 nm 处该产物有强吸收,若有抗氧化性物质加入,便会与水杨酸竞争使有色产物的生成量减少。因此在 510 nm 处比色,可以评价受试物清除 OH^{\cdot} 的能力^[9]。

1.2.5 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血(MEH)和 MDA 生成抑制率的影响测定 将小鼠断头取血,肝素钠抗凝,离心得红细胞,冰冷生理盐水离心洗涤 3 次,制成 0.5% 红细胞悬浮液。取红细胞悬浮液 3.0 mL 分别与 1.0 mL 不同浓度的 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 溶液混合,再加入 0.2 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ 于 37℃ 水浴中孵育 1 h。其中,基础对照组不加 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80,不加 H_2O_2 ,用生理盐水补到 4.2 mL;空白对照组不加 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80T,加 0.2 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$,补生理盐水至 4.2 mL。然后 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液,于 540 nm 处测吸光度值。并取上清液 3 mL 溶液,按试剂盒说明书的测定方法测定其 MDA 含量为 X。

$$\text{溶血抑制率} / \% = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}} - A_{\text{基础}}} \times 100$$

$$\text{MDA 抑制率} / \% = \frac{X_{\text{空白}} - X_{\text{样品}}}{X_{\text{空白}} - X_{\text{基础}}} \times 100$$

临床发现红细胞膜的氧化损伤是溶血的重要原因。 H_2O_2 可以于红细胞内的 Fe^{2+} 反应产生 OH^{\cdot} ,造成细胞膜脂质过氧化,产生 MDA,膜的流动性下降,通透性增加,从而造成膜内外物质的外泄和内流,膜形成小孔,细胞破裂,发生溶血^[5]。亚铁血红素被氧化成高铁血红素流出,高铁血红素在 540 nm 处有强吸收;加入受试物,在 540 nm 处比色和测定 MDA 的含量,可以评价受试物的抗氧化能力。

2 结果与分析

2.1 沙棘叶水溶性多糖含量

用硫酸-蒽酮法,以葡萄糖为标准品测得沙棘叶水溶性多糖含量分别为:84.1%、75.0% 和 81.5%

2.2 还原力测定

由图 1 可知,WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 的还原力随浓度的增加而增加。在 10~

$800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 的还原力表现出一定的量效关系。同浓度的还原力由高到低依次是 BHT、WPFH70、WPFH60、WPFH80。

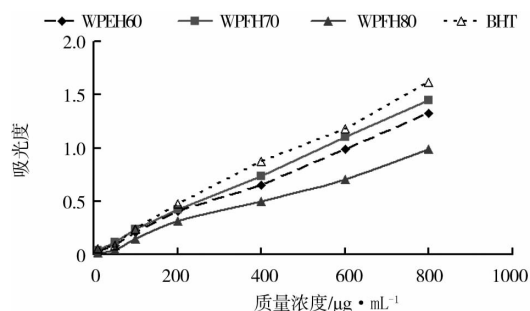


图1 WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 的还原力

2.3 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 清除率的测定

由图 2 可知, WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率随浓度的增加而增加。同浓度对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率 BHT 稍高于 WPFH70, 明显高于 WPFH60 和 WPFH80。WPFH60 与 WPFH80 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率相比, WPFH60 要大一些。使用 Microcal Origin 软件对曲线进行拟合, 经计算 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 的 IC_{50} 为 727.1, 311.1 和 740.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; BHT 的 IC_{50} 为 305.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 所以在同样的试验条件下, 清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的能力 WPFH70 与 BHT 相当; WPFH60 与 WPFH80 相当。

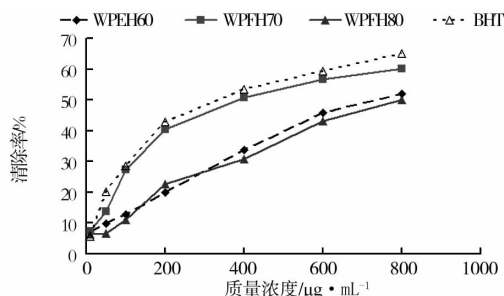


图2 WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 清除作用

2.4 OH 清除率的测定

由图 3 可知, WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 对 OH 的清除率都随其浓度的增大而增加。在 $10 \sim 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 OH 的清除率 WPFH70 稍高于 BHT, 但明显高于 WPFH60 与 WPFH80; 而 WPFH60 稍高于 WPFH80。用 Microcal Origin 软件对曲线进行拟合, 经计算 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 的 IC_{50} 为 292.2、179.9 和 321.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; BHT 的 IC_{50} 为 189.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 所以在同样的试验条件下, 清除 OH 的能力最强的是 WPFH70。同

浓度的 WPFHs 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 清除率比对 OH 清除率小, 这可能因为多糖链上的氢原子可以与 OH 结合生成水, 而达到清除 OH 的目的; 而对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 而言, 多糖氢原子不能与其结合, 但可与其发生氧化反应, 达到清除的目的。

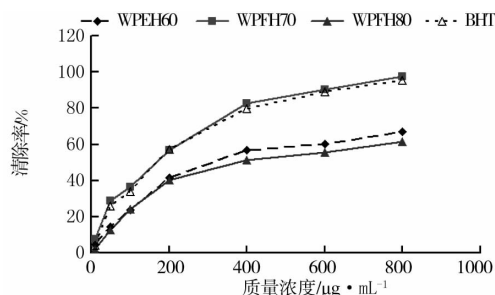


图3 WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 对 OH 的清除作用

2.5 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血 (MEH) 和 MDA 的影响

由图 4 和图 5 可知, 在 $10 \sim 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 的浓度与小鼠红细胞溶血和 MDA 生成的抑制率有明显量效关系。即红细胞溶血和 MDA 生成抑制率随着

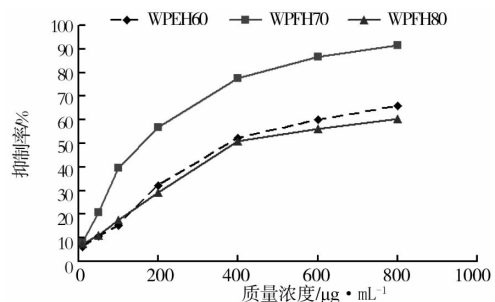


图4 WPFH60、WPFH70、WPFH80 对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血的影响

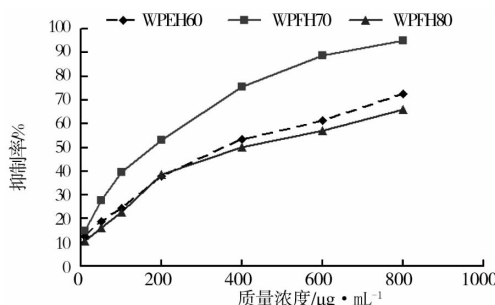


图5 WPFH60、WPFH70、WPFH80 对 H_2O_2 诱导 MDA 的影响

WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 浓度的增加而增大。并且二者随 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 浓度的变化趋势较为相似。同浓度下

WPFH70 红细胞溶血和 MDA 生成抑制率均高于 WPFH60 和 WPFH80。说明沙棘叶水溶性多糖各组分均能抑制 OH⁻ 引起的细胞膜脂质的氧化,从而保护膜系统的流动性,维持正常的生理功能;使用 Microcal Origin 软件对曲线进行拟合,经计算 WPFH70 溶血抑制率和 MDA 抑制率的 IC₅₀ 分别为:194.3 和 174.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3 结论与讨论

衰老的自由基学说认为,自由基和脂质过氧化物引起的细胞衰老是导致衰老的重要原因^[10]。活性氧是一种氧化能力很强的自由基,与机体的衰老、肿瘤和辐射损伤等多种疾病有关,而多糖能够减少甚至避免活性氧对有机体的损伤。随着人们生活水平的提高,无毒无害具有保健作用的天然抗氧化剂必将取代人工合成的抗氧化剂,成为食品和药品工业发展的趋势。该研究表明:WPFH60、WPFH70、WPFH80 和 BHT 在一定浓度内均具有一定的还原力,对 O²⁻ 和 OH⁻ 有明显的清除作用,其中 WPFH70 对 O²⁻ 和 OH⁻ 的清除率,接近于 BHT,明显高于 WPFH60 与 WPFH80。WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 对红细胞溶血和 MDA 生成有较强的抑制作用。并且二者随 WPFH60、WPFH70 和 WPFH80 浓度的变化趋势较为相似。同浓度下 WPFH70 红细胞溶血和 MDA 生成抑制率均高于 WPFH60 和

WPFH80。说明沙棘叶水溶性多糖分级组分均具有一定的抗氧化活性,其中 WPFH70 抗氧化活性最强,与日常使用的抗氧化剂 BHT 相当,作为天然抗氧化剂有很好的开发前景。

参考文献:

- [1] 杨建华,刘丹赤,邵长明.沙棘研究与开发的进展[J].沙棘,2007,20(3):19-21.
- [2] 徐响.超临界二氧化碳萃取沙棘全果油及主要功效成分分析的研究[D].北京:中国农业大学,2007.
- [3] 熊丙全,余东,袁军,等.中国沙棘属植物资源及其开发利用现状[J].中国野生植物资源,2004,23(2):25-26.
- [4] Gramza A, Pawlak-Lemanska K, Korczak J, et al. Tea extracts as free radical scavengers[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2005, 14(6): 861-867.
- [5] 李芳亮,王锐,张红梅.沙棘茶水溶性多糖抗氧化活性的研究[J].天然产物研究与开发,2010,22:671-673.
- [6] Staub A M. Removal of proteins; Sevag[J]. Methods in Carbohydrate Chemistry, 1965, 5: 5-6.
- [7] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [8] 邹国林,桂兴芳,钟晓凌,等.一种 SOD 测活法——邻苯三酚自氧化法的改进[J].生物化学与生物物理学进展,1986(4):71-73.
- [9] 张燕平,张虹,洪泳平,等.羊栖菜提取物体外自由基清除能力的研究[J].郑州工程学院学报,2003,24(1):50-54.
- [10] Harman D. Free radical theory of aging: Nutritional implications[J]. Age, 1978, 1(4): 145-53.

Study on the Antioxidation Activities of Rating Water Soluble Polysaccharides by Alcohol from Foliage of *Hippophae Rhamnoides* L.

LI Fang-liang¹, WANG Rui¹, GAO Yang², LIU Ying¹, ZHAO Li-dong²

(1. Science College of Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000; 2. Fuxin Science and Technology Bureau, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: In order to study the antioxidant activities of rating water soluble polysaccharides by alcohol from foliage of *Hippophae Rhamnoides* L. (WPFH), the water soluble polysaccharides were extracted from foliage of *Hippophae rhamnoides* L. by hot water and purified by fractional precipitation with ethanol (60%, 70%, 80%). The fractional precipitation was named WPFH60, WPFH70 and WPFH80, respectively. They were deproteinized by Sevag method, then dialyzed and freeze drying. The antioxidant effects of WPFH60, WPFH70 and WPFH80 were evaluated *in vitro* by four different experiments: measuring reducing power, eliminating superoxide anion free radical experiment, eliminating hydroxyl free radical experiment, inhibiting mice erythrocyte hemolysis and lipid peroxidation MDA induced by H₂O₂ experiment. The results showed that the data obtained in the *in vitro* models clearly established the antioxidant potency of the WPFH60, WPFH70 and WPFH80 in a dose dependent manner, among which, the WPFH70 was found to be most strongly scavenge the superoxide anion free radical and hydroxyl free radical, where the IC₅₀ value of WPFH70 was found to be 311.1 and 179.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively. The WPFH was found to be most strongly inhibit the mice erythrocyte hemolysis and lipid peroxidation MDA induced by H₂O₂ experiment, where the IC₅₀ value of WPFH70 was found to be 194.3 and 174.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively. The WPFH60, WPFH70 and WPFH80 could be a natural antioxidant.

Key words: *Hippophae rhamnoides* L.; polysaccharides; antioxidation; erythrocyte hemolysis