

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.06.004

芡实多糖的分离纯化及抗氧化作用研究*

刘玉凤 王保国 李会娟 王洪升

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘要 目的 研究芡实多糖的分离纯化方法及其抗氧化作用。方法 用 AB-8 大孔树脂纯化芡实粗多糖, 用 Fenton 法和邻苯三酚自氧化法测定芡实多糖的体外抗氧化作用。结果 芡实粗多糖经大孔树脂纯化后多糖含量为 83.82%; 芡实多糖对羟自由基($\text{OH}\cdot$)和超氧阴离子(O_2^-)均有一定的清除作用, 且其作用强度随芡实多糖浓度增大而增加。结论 AB-8 大孔吸附树脂可以用来纯化芡实多糖, 芡实多糖具有一定的抗氧化作用, 本实验结果为芡实多糖的纯化及进一步开发提供了依据。

关键词 芡实; 多糖; 大孔树脂; 抗氧化

中图分类号: R932 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)12-392-03

Study on methods of purifying polysaccharides in semen eurylie and its antioxidant effect

LIU Yu-feng, WANG Bao-guo, LI Hui-juan, et al

(Pharmaceutical College, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To study the methods of purifying polysaccharides in Semen Eurylie and its antioxidant effect. **Methods** The polysaccharides were purified by AB-8 macroporous resin. And its antioxidant effect was determined with Fenton method and autoxidation of pyrogallol method. **Results** The content of polysaccharides was 83.82% after purified by macroporous resin. The purified polysaccharides had some effect on eliminating hydroxyl free radical and superoxide anion and their antioxidant capacity was dose-dependent with concentration. **Conclusion** AB-8 resin can be used to purify polysaccharides in Semen Eurylie and the purified polysaccharides had a certain antioxidant effect. Practically, the experimental results provide a basis for further development of Semen Eurylie.

Key words: Semen Eurylie; Polysaccharide; Macroporous resin; Antioxidant

芡实(Semen Eurylie)又名鸡头米、鸡头苞、鸡头莲等,为睡莲科芡属植物芡(*Euryale ferox* Salisb.)的成熟种仁,是一种常用传统中药。其味甘,涩,平,有益肾固精、补脾止泻、祛湿止带之功能,用于梦遗滑精、遗尿尿频、脾虚久泻、白浊、带下等,民间以其作为一种食疗养生的佳品。芡实含有丰富的营养物质如碳水化合物、蛋白质、矿物质等,其中碳水化合物包括淀粉、糖类和粗纤维。植物多糖在提高人体免疫力、抗肿瘤活性、防治动脉硬化、抗病毒、抗氧化、抗辐射等方面均有作用^[1]。有关芡实多糖的提取工艺及纯化方法已有报道^[2-3],传统的多糖纯化方法有过氧化氢、活性炭等脱色法及 Sevag 法、三氯乙酸法等脱蛋白方法,但均会造成多糖一定量的损失。近年来有文献报道利用不同

型号大孔树脂纯化多糖^[4-6],其吸附量大,纯化效果好,多糖损失少。本文初步研究了大孔树脂 AB-8 对芡实多糖的纯化效果。赵翊^[7]等报道了芡实多糖粗提物的抗氧化作用,本文对纯化后芡实多糖的体外抗氧化作用进行了研究,旨在为芡实药材的进一步开发提供依据。

1 方法与结果

1.1 仪器、试剂与材料

仪器:FW135 型中草药粉碎机(天津市斯特仪器有限公司)、FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)、RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、H-1650 高速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)、电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、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

* [基金项目] 济宁医学院 2008 年青年基金项目

任公司)。

试剂与材料:95%乙醇、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、水杨酸、硫酸亚铁、三(羟甲基)氨基甲烷、30%过氧化氢、磷酸等均为分析纯;AB-8 型大孔吸附树脂(上海摩速科学器材有限公司);芡实药材采于微山湖。

1.2 方法与结果

1.2.1 AB-8 大孔树脂纯化芡实多糖

1.2.1.1 芡实多糖的提取 取芡实药材粉碎,低温干燥,称取 100g 于 1000ml 圆底烧瓶中,用 95%乙醇 500ml 回流提取 2h,提取两次。药渣挥干乙醇,加入水 1000ml,于 75℃ 水浴提取 2h,过滤,提取两次,合并滤液,将提取液减压浓缩至 150ml,离心得多糖提取液。提取液用无水乙醇调至含醇量 80%,静置过夜,离心,沉淀用无水乙醇洗涤,冷冻干燥,得芡实粗多糖。

1.2.1.2 大孔树脂的预处理 大孔树脂一般含有未聚合的单体、致孔剂、引发剂及其分解物、分散剂和防腐剂等脂溶性杂质,使用前先用无水乙醇浸泡 2h,充分溶胀,用无水乙醇淋洗至洗出液加适量水无白色浑浊现象止,再用蒸馏水洗至无醇味,备用。

1.2.1.3 芡实多糖的纯化 取 20ml 经预处理的 AB-8 树脂装柱,将浓度为 0.8mg/ml 的芡实粗多糖溶液 200ml 通过大孔树脂柱,以 40%乙醇洗脱,控制流速 0.8ml/min,洗脱液经减压回收溶剂后,冷冻干燥,得白色粉末。

1.2.2 多糖的含量测定

1.2.2.1 对照品母液的配制 精密称取干燥至恒重的葡萄糖 100.15mg 置于 100ml 容量瓶中,蒸馏水定容,得浓度为 1.0015mg/ml 的对照品母液,备用。

1.2.2.2 标准曲线的制作 分别精密吸取对照品母液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0ml 于 100ml 容量瓶中,以蒸馏水定容,即得系列对照品溶液。分别精密吸取以上对照品溶液 2.0ml 于 10ml 具塞试管中,加入 1ml 5%苯酚溶液,5ml 浓硫酸,迅速塞上塞子摇匀放入冷水冷却 5min 后,放入沸水浴中,准确计时 15min,取出冷却至室温,用紫外-可见分光光度计在 485nm 处测吸光度,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $A = 0.0107C - 0.0073$ ($R^2 = 0.998$),表明对照品浓度在 10.015μg/ml ~ 90.135μg/ml 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

1.2.2.3 多糖含量测定 精密称取冷冻干燥后的芡实多糖粉末 50.00mg,置于 100ml 容量瓶中,蒸馏水溶解并定容,然后精密吸取 10.0ml 于 100ml

容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,取 2ml 按照“1.2.2.2”项下方法测定吸光度,代入标准曲线方程计算多糖浓度,并进一步计算多糖含量,多糖含量 = $(C \times D / W) \times 100\%$ (C = 样品溶液多糖浓度, D = 稀释倍数, W = 称取芡实多糖的质量)。经测算,芡实多糖粗品未经纯化时多糖含量为 50.52%,经 AB-8 大孔树脂纯化后多糖含量为 83.82%。

1.2.3 芡实粗多糖抗氧化作用的研究

1.2.3.1 供试溶液的配制 称取纯化后芡实粗多糖 100.00mg 于 100ml 容量瓶中,加蒸馏水溶解,定容至刻度。分别精密吸取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 于 10ml 容量瓶中,蒸馏水定容,备用。

称取 Vc 926.15mg 于 100ml 容量瓶中,加蒸馏水溶解,定容至刻度。分别精密吸取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 于 100ml 容量瓶中,蒸馏水定容,作为对照溶液,备用。

1.2.3.2 芡实粗多糖对羟自由基的清除作用^[8]

在试管中依次加入 9mmol/L $FeSO_4$ 溶液 2ml、不同浓度供试溶液 2ml、8.8mmol/L H_2O_2 溶液 2ml,摇匀,静置 10min,再加入 9mmol/L 水杨酸溶液 2ml,摇匀,静置 30min 后于 510nm 处测得不同浓度下供试液的吸光度 A_i ,用水代替 H_2O_2 时测得某浓度供试液的本底吸光度 A_j ,用水代替抗氧化剂时测得空白对照 A_o 。清除率按下式计算,清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_o] \times 100\%$,实验结果见表 1,图 1。

表 1 芡实粗多糖及 Vc 对羟自由基的清除率

芡实粗多糖		Vc	
浓度(μg/ml)	清除率(%)	浓度(μg/ml)	清除率(%)
100.00	7.96	92.615	5.78
200.00	13.50	185.23	29.18
400.00	21.51	370.46	56.64
600.00	26.99	555.69	69.38
800.00	30.09	740.92	69.54
1000.00	30.39	926.15	88.54

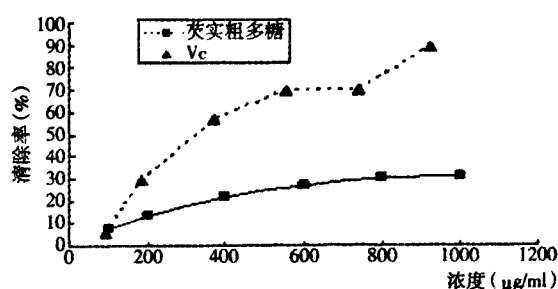


图 1 芡实粗多糖及 Vc 对羟自由基的清除作用比较

1.2.3.3 芡实粗多糖对超氧阴离子的清除作用^[9]

取 pH 为 8.2、0.05mol / L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.6 ml 于试管中,置 25℃ 水浴预热 20 min 后,加不同浓度的供试液 1 ml,10 mmol/ L 邻苯三酚 0.4 ml,混匀后 25℃ 水浴 4 min,立即用 8 mol/ L HCl 0.1 ml 终止反应,以 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液调零点,并在 325 nm 测定吸光度(Ai),用水代替邻苯三酚时测得某浓度供试液的本底吸光度 Aj,用水代替抗氧化剂时测得空白对照 Ao。清除率计算方法同 1.2.3.2。实验结果见表 2,图 2。

表 2 芡实粗多糖及 Vc 对超氧阴离子的清除率

芡实粗多糖		Vc	
浓度(μg/ml)	清除率(%)	浓度(μg/ml)	清除率(%)
100.00	10.47	92.615	39.64
200.00	10.69	185.23	56.73
400.00	11.91	370.46	78.13
600.00	14.47	555.69	84.91
800.00	16.04	740.92	87.97
1000.00	22.83	926.15	94.27

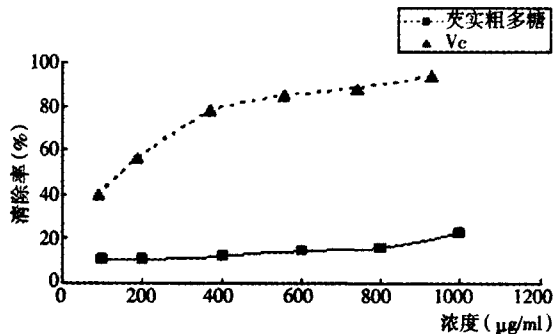


图 2 芡实粗多糖及 Vc 对超氧阴离子的清除作用比较

2 讨论

芡实为淀粉含量比较多的中药材,用水提取时容易糊化,因此提取温度不宜过高,若条件允许,建议使用超声或微波提取。多糖水提液中常含有较多淀粉,可在浓缩一定程度后放置冰箱过夜,然后高速离心除去。

利用大孔树脂纯化多糖时,文献报道有多种洗

脱剂,常用的有水,NaCl 溶液及不同浓度的乙醇等,大孔树脂型号不同、多糖性质不同,可选用的洗脱剂可能不同。我们实验发现,芡实多糖经 AB-8 树脂吸附后,40%乙醇洗脱效率较高,因此选用 40%乙醇做洗脱剂。AB-8 树脂大孔树脂对芡实多糖的吸附动力学有待于进一步研究。

纯化后的芡实多糖对羟自由基和超氧阴离子均有一定的清除作用,且其作用强度随芡实多糖浓度增大而增加;除浓度为 100μg/ml 时,芡实多糖对羟自由基的清除作用略强于 Vc 外,在给定的浓度范围内芡实多糖的抗氧化能力弱于相应浓度的 Vc。

3 结论

AB-8 大孔吸附树脂对芡实多糖具有比较好的纯化效果,可使多糖浓度由 50.52% 提高到 83.82%。经纯化的芡实多糖对羟自由基和超氧阴离子均有一定的清除作用,且其作用强度随芡实多糖浓度增大而增加。本实验结果为芡实多糖的纯化及进一步开发提供了一定依据。

参考文献:

[1] 朱欣婷. 植物多糖的生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008,36(28):12076-12077.

[2] 金峰. 芡实多糖的提取工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2009,(5):50-51.

[3] 刘玉凤,王保国,孟凡余,等. 芡实多糖的提取纯化及含量测定[J]. 济宁医学院学报,2010,33(5):313-315.

[4] 钟运翠,杨宏志,阎福林. 大孔树脂纯化沙棘果渣多糖的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(10):231-233.

[5] 李赞阳,刘红,李炳奇,等. 大孔树脂分离纯化中药复方多糖的工艺研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2010,28(6):713-716.

[6] 仰榴青,徐佐旗,茹广华,等. 大孔吸附树脂纯化银杏外种皮多糖的研究[J]. 中药材,2006,29(10):1098-1100.

[7] 赵翔,李红良,叶倩雯. 芡实多糖的粗提取及其对羟自由基的清除效果[J]. 食品与发酵工业,2010,36(11):177-182.

[8] 邵佳,郝建平,胡美忠. 草珊瑚水溶性粗多糖提取及抗氧化性能研究[J]. 食品科学,2007,28(11):283-286.

[9] 王德才,高丽君,高艳霞,等. 泰山四叶参多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(2):104-106.

(收稿日期 2011-11-05)