

平贝母多糖的分离纯化及抗氧化活性研究

刘春红¹, 马 宇², 何忠梅³, 韩宝瑞^{2,*}

(1. 长春大学特殊教育学院, 吉林 长春 130022; 2. 吉林农业大学发展学院, 吉林 长春 130600;

3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130116)

摘 要: 采用乙醇沉淀、DEAE-纤维素离子交换层析和 Sepharose CL-6B 凝胶过滤层析法, 从平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim)水提取液中分离纯化得到水溶性多糖, 命名为 FUP-1。通过红外光谱和高效液相色谱对其结构和单糖组成进行初步分析, 分子筛层析法测定其分子质量。结果表明, FUP-1 为均一组分的杂多糖, 主要由木糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其物质的量比为 5:1:1, 平均分子质量为 4.1×10^4 D。体外抗氧化活性分析表明, FUP-1 具有较强的清除羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基的能力。

关键词: 平贝母; 多糖; 单糖组成; 抗氧化

Partial Characterization and Antioxidant Activity of Water-soluble Polysaccharide Isolated from *Bulbus Fritillariae ussuriensis*

LIU Chun-hong¹, MA Yu², HE Zhong-mei³, HAN Bao-rui^{2,*}

(1. Special Education College, Changchun University, Changchun 130022, China;

2. Development College, Jilin Agricultural University, Changchun 130600, China;

3. College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130116, China)

Abstract: A water-soluble polysaccharide was isolated from *Bulbus Fritillariae ussuriensis* (dried bulbs of *Fritillaria ussuriensis* Maxim) sequentially through water extraction, ethanol precipitation, ion exchange chromatography and gel permeation chromatography. The molecular mass of FUP-1 was determined by gel filtration chromatography, and its structure was characterized by HPLC and FTIR spectroscopy. The results showed that FUP-1 was a heteropolysaccharide, of which the monosaccharide composition was composed of xylose, glucose and galactose with a molar ratio of 5:1:1. The average molecular weight of FUP-1 was determined to be 4.1×10^4 D. Bioactivity tests *in vitro* showed that FUP-1 displayed strong antioxidant effect and scavenging capacity against hydroxyl, DPPH, and superoxide anion free radicals. Therefore, FUP-1 may be a potent antioxidant agent.

Key words: *Fritillaria ussuriensis*; polysaccharide; monosaccharide composition; antioxidant activity

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0029-05

生命活动的氧化代谢过程不断产生各种活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基, 如羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)等。这些活性氧自由基除参与细胞的生理代谢过程外, 还会引起细胞膜和 DNA 的损伤, 导致生物膜脂质过氧化和通透性降低^[1], 引发多种疾病如癌症、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)和帕金森氏病(Parkinson's disease)等^[2]。尽管机体存在氧化防御和修复机制, 但并不能完全有效的阻止过量自由基造成的机体损伤, 因此补充外源抗氧化剂就显得十分必要。然

而许多合成抗氧化剂存在诸多的安全问题, 所以天然抗氧化剂的研究与开发引起人们的广泛关注。

多糖是自然界分布极为广泛的一类生物大分子。大量研究表明, 多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、降血糖和抗衰老等作用^[3]。而这些作用与多糖的抗氧化活性密不可分。抗氧化是多糖最重要的生物活性之一。近年来国内外学者关于多糖抗氧化活性作了大量的研究工作^[4-5]。

平贝母为百合科贝母属多年生草本植物平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim)的干燥鳞茎, 又名平贝,

收稿日期: 2011-01-26

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字 2011 第 210 号)

作者简介: 刘春红(1976—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为中药活性成分。E-mail: liuch@ccu.edu.cn

* 通信作者: 韩宝瑞(1950—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为中药活性成分筛选及构效关系。E-mail: hbaorui@gmail.com

是药用贝母的一种,为《中国药典》2005年版收载品种,是我国东北,尤其是吉林、黑龙江的特产药材之一。平贝母记载始见于《神农本草经》,将其列为中品,具有清热润肺、化痰止咳之功效。主治痰热燥咳,痰多胸闷,咳痰带血等症。现代药理研究表明平贝母具有镇咳祛痰、平喘、抗溃疡和抗血小板聚集等多方面生物活性^[6-7]。多糖是平贝母重要的活性成分之一,但迄今为止,关于平贝母中多糖的研究报道甚少。为了更好地开发平贝母,探讨平贝母多糖成分的结构和生物活性,本实验对平贝母多糖进行提取分离纯化,分析多糖的结构并研究其抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

平贝母采于吉林省通化市,经鉴定为百合科(Liliaceae)贝母属平贝母(*F. ussuriensis* Maxim)的干燥鳞茎。

DEAE-纤维素 上海恒信化学试剂有限公司; Sepharose CL-6B 瑞典 Pharmacia 公司; 单糖标准品 加拿大 Bio Basic Inc. 公司; 不同分子质量标准葡聚糖标准品 法国 Fluka 公司; 3500D 透析袋 美国联合碳化公司; 乙腈、甲醇(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

NICOLET380 红外分光光度计、3K30 台式冷冻离心机 美国 Thermo 公司; DU800 紫外-可见分光光度计 美国 Beckman Coulter 公司; Agilent1100 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; ALPHA2-4 LSC 真空冷冻干燥机 德国 Christ 公司。

1.3 平贝母多糖的提取

平贝母粗粉(20目)100g,加入1000mL水,80℃水浴提取3次,每次1h,离心(8000r/min, 15min, 4℃),上清液加入两倍体积冷无水乙醇沉淀多糖,4℃放置过夜,离心(8000r/min, 15min, 4℃),沉淀加水溶解,离心(8000r/min, 15min, 4℃),冻干,得粗多糖。

1.4 平贝母多糖的分离纯化

称取平贝母粗多糖样品500mg,蒸馏水(10mL)溶解,离心(8000r/min, 15min, 4℃),上清液上DEAE-纤维素柱(2.6cm × 30cm)。依次以0~1mol/L NaCl溶液洗脱。流速0.5mL/min,自动部分收集器收集洗脱液,每管7mL,采用苯酚-硫酸法^[8]检测糖分布,按照吸收峰收集样品,透析,冻干。经Sepharose CL-6B分子筛层析柱(2.6cm × 100cm)进一步纯化。以0.9g/100mL NaCl溶液洗脱,流速为0.4mL/min,根据糖分布收集洗脱液,透析,冻干。

1.5 单糖组成分析^[9]

平贝母多糖样品1mg,加入2mol/L的三氟乙酸溶液

0.5mL,密封,于120℃水解2h后,冻干,制备水解平贝母多糖。

单糖衍生物制备:分别称取各标准单糖1mg及多糖水解样品,各加入0.3mol/L NaOH溶液1mL,加入0.5mol/L的1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)甲醇溶液100μL,密闭。于70℃水浴30min后,冷却至室温,加入0.3mol/L盐酸100μL,充分混匀,再加入1mL氯仿,混匀,离心(10000r/min, 5min, 4℃)分层,上层经过0.45μm滤膜过滤,加超纯水至1mL,供HPLC分析用。

HPLC分析条件:Agilent 1100系统。DAD检测器,检测波长:250nm,柱温:30℃,流速:1.0mL/min, Ecilipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6mm × 150mm, 5μm),流动相:82.20% PBS缓冲液(0.1mol/L, pH7.0)和17.80%乙腈,进样量10μL。

1.6 分子量测定

多糖的平均分子量测定采用Sepharose CL-6B凝胶柱(1.6cm × 100cm)层析法^[10],以0.9g/100mL NaCl洗脱,流速0.2mL/min。以各标准葡聚糖分子质量的对数为横坐标(lgM),洗脱体积为纵坐标(t),绘制标准曲线。多糖样品5mg同样条件上柱洗脱,根据洗脱体积计算样品的分子量。

1.7 红外光谱分析

红外光谱测定以2mg多糖样品KBr压片,在4000~400cm⁻¹区间扫描红外吸收光谱。

1.8 体外抗氧化活性分析

1.8.1 清除羟自由基作用测定

采用Fenton法检测平贝母多糖对羟自由基的清除作用^[11]。向含有1mL亮绿(0.435mmol/L),2mL硫酸亚铁(0.5mmol/L),1.5mL过氧化氢(3g/100mL)的Fenton反应体系中分别加入1mL不同质量浓度的多糖样品溶液或VC溶液(0.5~4mg/mL),混合均匀后,37℃恒温水浴20min,波长624nm处测定吸光度。按式(1)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_s - A_0}{A - A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:A为不含Fenton试剂和多糖样品、含有亮绿的吸光度;A₀为含Fenton试剂和亮绿,不含多糖样品的吸光度;A_s为含有Fenton试剂、样品和亮绿的吸光度。

1.8.2 清除超氧阴离子自由基作用测定

采用改良的邻苯三酚自氧化法^[12]。取50mmol/L pH8.2的Tris-HCl缓冲液2.8mL和0.1mL不同质量浓度多糖样品溶液或VC溶液(0.5~4mg/mL)混匀,25℃保温20min,取出后立即加入6mmol/L邻苯三酚0.2mL,迅速摇匀于325nm波长处,每隔30s测定吸光度,共测定4min,以蒸馏水代替样品液为对照溶液。作吸光度随

时间变化曲线的回归方程,其斜率为邻苯三酚的自氧化速率,按式(2)计算清除超氧阴离子自由基能力。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率/\%} = \frac{\Delta I_0 - \Delta I_1}{\Delta I_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: ΔI_0 为对照溶液邻苯三酚的自氧化速率; ΔI_1 为多糖样品液或 VC 溶液邻苯三酚的自氧化速率。

1.8.3 清除 DPPH 自由基能力测定

根据 Kao 等^[13]的方法检测平贝母多糖对 DPPH 自由基的清除能力。1mL 不同质量浓度的多糖样品溶液或 VC 溶液(0.5~4mg/mL)加入 2mL DPPH 甲醇溶液(0.5mmol/L),混合均匀后室温下避光反应 30min,离心(8000r/min, 10min, 4℃),取上清液于波长 517nm 处测定吸光度,无菌水空白调零。以等体积甲醇代替 DPPH 溶液为空白,以等体积无菌水代替多糖溶液为对照。按式(3)计算清除率。

$$\text{清除率/\%} = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 多糖的分离纯化

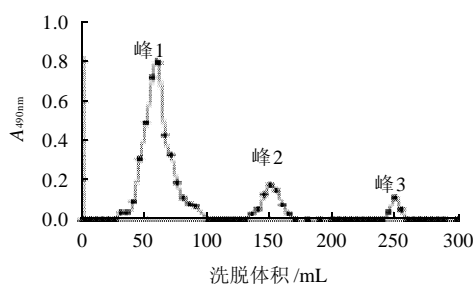


图1 平贝母粗多糖 DEAE-纤维素离子交换柱层析
Fig.1 DEAE-cellulose column chromatogram of crude polysaccharides from *F. ussuriensis* Maxim

平贝母经热水提取,乙醇沉淀获得粗多糖,提取率为 4.5%。粗多糖经 DEAE-纤维素离子交换层析柱层析,依次以 0~1.0mol/L NaCl 洗脱,分离得到 3 个洗脱峰(图 1),其中蒸馏水洗脱部分的量最多(峰 1),不同浓度氯化钠梯度洗脱获得两个低的洗脱峰(峰 2 和峰 3),说明平贝母多糖以中性糖为主。峰 1 部分经 Sepharose CL-6B 凝胶过滤层析进一步纯化,洗脱峰为单一对称峰,表明其组分均一(图 2)。洗脱液经透析、冻干后得纯化多糖,命名为 FUP-1。FUP-1 为白色纤维状疏松固体,易溶于水,不溶于丙酮、乙醇等有机溶剂。峰 2 和峰 3 部分因糖含量较低,未作进一步纯化。

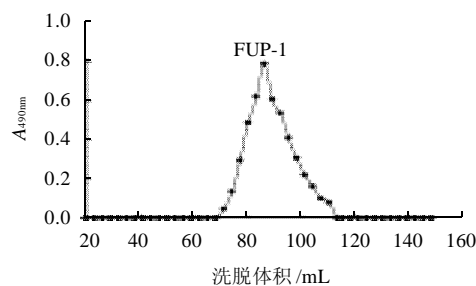


图2 平贝母多糖 Sepharose CL-6B 分子筛层析
Fig.2 Sepharose CL-6B column chromatogram of polysaccharide fraction 1 obtained by DEAE-cellulose column chromatography

2.2 结构分析

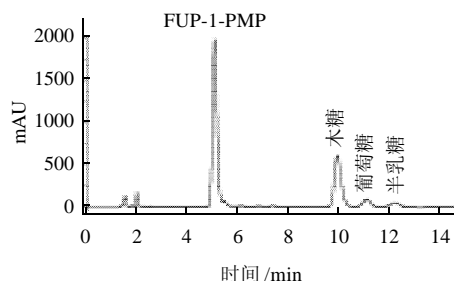


图3 平贝母 FUP-1 多糖的 PMP 衍生物高效液相色谱图
Fig.3 HPLC profile of PMP derivatives of FUP-1

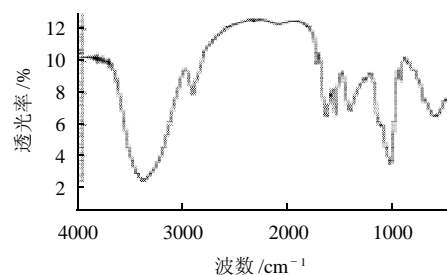


图4 平贝母多糖 FUP-1 红外光谱图
Fig.4 IR spectrum of FUP-1

根据葡聚糖分子质量标准曲线($\lg M = -22.594t + 209.120$, $R^2 = 0.9963$),确定平贝母多糖 FUP-1 的平均分子质量为 4.1×10^4 D。采用 HPLC 柱前衍生化法分析了平贝母多糖的单糖组成。水解多糖样品与标准单糖 HPLC 色谱比对分析结果确定平贝母多糖 FUP-1 由木糖(Xyl)组成,同时含有少量葡萄糖(Glu)和半乳糖(Gal)组成(图 3)。根据峰面积比计算物质的量比,结果测得 FUP-1 的单糖组分中木糖、葡萄糖和半乳糖的物质的量比为 5:1:1,说明平贝母多糖 FUP-1 为杂多糖。红外光谱分析表明(图 4),在 3416.26cm^{-1} 出现的宽峰为糖类物质中分子内和分子间氢键的 O—H 伸缩振动;在 2931.97cm^{-1}

附近一小尖峰为 C—H 伸缩振动; 在 1644.57cm^{-1} 左右有多糖的水合振动峰; 以及 1025.36cm^{-1} 处有多糖的特征吸收峰; 以上数据证明 FUP-1 的主要成分是多糖。1240~ 930cm^{-1} 间比较大的吸收峰是由两种 C—O 的伸缩振动引起的, 一种是属于 C—O—H 的, 另一种是吡喃糖环的 C—O—C; 而在 890cm^{-1} 附近无吸收峰, 提示 FUP-1 多糖分子结构中存在 α 型糖苷键。

2.3 抗氧化活性

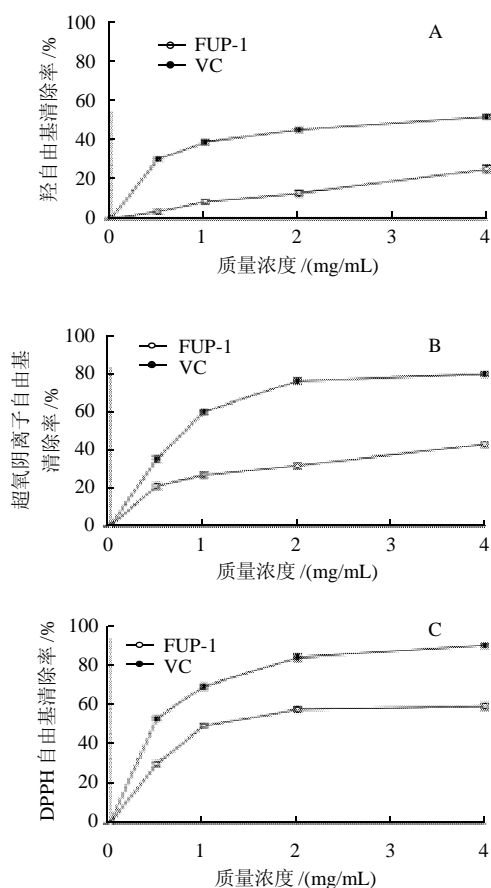


图5 平贝母多糖 FUP-1 和 VC 对羟自由基(A)、超氧阴离子自由基(B)和 DPPH 自由基(C)的清除作用

Fig.5 Scavenging activities of FUP-1 and ascorbic acid on hydroxyl radical, superoxide anion radical and DPPH free radicals

如图 5 所示, 平贝母多糖 FUP-1 对 3 种自由基的清除能力随质量浓度增加而增强, 在检测多糖质量浓度范围内, 多糖质量浓度与清除率呈明显的剂量依赖关系。在相同质量浓度下, 平贝母多糖 FUP-1 对羟自由基的清除率低于超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基, 说明 FUP-1 对自由基的清除作用具有一定的选择性。在 0.5~4mg/mL 质量浓度范围内, FUP-1 对 3 种自由基的清除能力较相同质量浓度的抗坏血酸弱。在 4mg/mL 时, FUP-1 对羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由

基的清除率分别为 25.36%、43.51% 和 59.74%, 而 VC 的清除率分别为 52.34%、81.23% 和 91.11%。

羟自由基是机体新陈代谢过程中产生对生物体毒性强、危害大的一种自由基, 它能与活细胞生物膜发生反应, 引起氧化性损伤和破坏, 导致细胞坏死或突变; 衰老、肿瘤等疾病均与羟自由基密切相关。所以, 筛选清除羟自由基的天然抗氧化剂具有重要的实际意义。一些研究表明, 天然多糖并不能直接清除羟自由基, 而是利用其多羟基结构能螯合金属离子(如 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 等)的性质, 抑制羟自由基的产生^[14-15], 从而抑制细胞膜的脂质过氧化, 减少膜结构的破坏和细胞损伤。金属螯合能力可能是多糖清除羟自由基的重要机制。所以, 本研究采用 Fenton 反应体系, 来评价平贝母多糖 FUP-1 对亚铁离子催化过氧化氢产生的羟自由基的清除能力。FUP-1 对羟自由基有一定的清除作用, 但清除率较相同质量浓度的 VC 弱(图 5A)。

超氧阴离子自由基活性强, 可直接导致细胞内的 DNA 损伤, 还是很多活性游离基的前体, 例如能转化为氧化性更强的羟自由基、单线态氧和过氧化氢等^[16]。超氧阴离子自由基可通过邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化产生, 并生成有色中间产物, 多糖能够抑制超氧阴离子自由基的形成, 通过检测有色中间物的生成量, 测定多糖的清除能力。多糖能够与超氧阴离子自由基结合形成稳态自由基, 终止自由基链反应, 而发挥抗氧化作用^[17]。本研究结果表明平贝母多糖 FUP-1 对超氧阴离子自由基有较强的清除作用(图 5B)。

DPPH 自由基分析方法是目前广泛使用的评价和筛选抗氧化剂的常用方法。本研究评价了不同质量浓度平贝母多糖 FUP-1 对 DPPH 自由基的清除作用。由图 5C 可知, FUP-1 对 DPPH 自由基的清除作用强, 在 4mg/mL 时, 清除率达到 59.74%。多糖的结构与活性的关系十分密切, 多糖抗氧化活性受其单糖组成、分子质量和空间构象等的影响^[18-19]。有研究表明, 低分子质量的多糖具有更强的抗氧化活性^[20]。一株双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis* RH)产低分子质量($2.31 \times 10^4\text{D}$)胞外多糖具有较强抗脂质过氧化和清除羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基能力^[21]。而本研究分离的 FUP-1 同样为低分子质量($4.1 \times 10^4\text{D}$)的多糖, 对 DPPH 自由基也有较强的清除作用。

3 讨论

多糖是药用植物最重要的活性成分之一。植物多糖以其广泛的治疗作用和极低的细胞毒性, 在医药、食品、化妆品和环境治理等领域具有广阔的应用前景。近年来, 一些天然植物多糖的抗氧化活性引起人们的广泛关注。从天然植物中寻找新的清除体内自由基的抗氧化

剂,是现代医药和功能食品行业发展的新方向。研究多糖及其衍生物的抗氧化作用,开发新的天然抗氧化剂,对于逐步取代化学合成抗氧化剂,具有重要的现实意义。本研究提取了平贝母多糖,采用离子交换和分子筛层析纯化得到一种水溶性多糖 FUP-1,利用红外光谱和 HPLC 色谱对其结构和单糖组成进行了初步分析,确定了多糖的分子质量,所获得的多糖为低分子质量的杂多糖。通过体外分析法研究了 FUP-1 多糖对自由基的清除能力和抗氧化活性。本研究可为平贝母多糖在抗氧化和抗衰老功能性食品中的应用开发提供参考。

参考文献:

- [1] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidant, oxidative stress and biology of ageing[J]. *Nature*, 2000, 408: 239-247.
- [2] RAOUF O, PATRICE A R, ANDRE B, et al. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2[J]. *Life Science*, 2000, 68(4): 387-399.
- [3] LIU Zonghua, JIAO Yanpeng, WANG Yifei, et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems review article[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(15): 1650-1662.
- [4] CUI Junjian, YUAN Jiangfeng, ZHANG Zhiqi. Anti-oxidation activity of the crude polysaccharides isolated from *Polygonum cillinerve* (Nakai) Ohwi in immunosuppressed mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 132(2): 512-517.
- [5] LUO Dianhui, FANG Baishan. Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72(3): 376-381.
- [6] 刘宁. 平贝母的研究进展[J]. *黑龙江医药*, 2006, 19(6): 496-497.
- [7] 李兴斌, 高燕飞, 李古良. 平贝母化学成分及药理活性研究进展[J]. *中医药信息*, 2004, 21(4): 28-29.
- [8] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [9] YANG Xingbin, ZHAO Yan, WANG Qingwei, et al. Analysis of the monosaccharide components in angelica polysaccharides by high performance liquid chromatography[J]. *Analytical Sciences*, 2005, 21(10): 1177-1180.
- [10] YANG Zhennai, LI Shengyu, ZHANG Xue, et al. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: potential application in fermented milk products[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(1): 53-57.
- [11] 何战胜, 罗虹, 曹朝辉, 等. 灿烂绿光度法检测 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. *美国中华临床医学杂志*, 2004, 6(3): 236-237.
- [12] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3): 469-474.
- [13] KAO T H, CHEN B H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7544-7555.
- [14] KE Chunlin, QIAO Deliang, GAN Dan, et al. Antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75(4): 677-682.
- [15] SIMIC M G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis[J]. *Mutation Research*, 1988, 202(2): 377-386.
- [16] WICKENS A P. Aging and the free radical theory[J]. *Respiration Physiology*, 2001, 128(3): 379-391.
- [17] PAN Daodong, MEI Xiuming. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(3): 908-914.
- [18] JINYong, ZHANG Lina, ZHANG Mei, et al. Antitumor activities of heteropolysaccharides of *Poria cocos* mycelia from different strains and culture media[J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(14): 1517-1521.
- [19] CHEN Haixia, LU Xueming, QU Zhishuang, et al. Glycosidase inhibitory activity and antioxidant properties of a polysaccharide from the mushroom *Inonotus obliquus*[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2010, 34(1): 179-191.
- [20] CHEN Haixia, ZHANG Min, QU Zhishuang, et al. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 559-563.
- [21] XU Ruihua, SHEN Qian, DING Xuelong, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 232(2): 231-240.