

决明子水溶性多糖的纯化及抗氧化活性研究

郭晓强¹, 颜 军², 郭晓勇², 徐光域¹, 范春华¹, 苟小军^{2,*}

(1. 成都大学中药化学实验室, 四川 成都 610106

2. 成都大学药用微生物重点实验室, 四川 成都 610106)

摘 要: 本研究采用水提醇沉法提取决明子粗多糖, 并通过二次醇析和 H₂O₂ 氧化脱色对其进行了精制, H₂O₂ 氧化脱色能有效地去除决明子粗多糖中的蛋白性杂质。决明子多糖抗氧化实验表明: 决明子多糖清除 Smirnoff 反应产生羟自由基($\cdot\text{OH}$)具有一定的清除作用; 决明子多糖体系浓度达到 0.022mg/ml 时对邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)产生明显抑制作用。

关键词: 决明子多糖; 纯化; 抗氧化

Study on Purification and Antioxidation of Water-soluble Polysaccharide Isolated from *Semen Cassia*

GUO Xiao-qiang¹, YAN Jun², WU Xiao-yong², XU Guang-yu¹, FAN Chun-hua¹, GOU Xiao-jun^{2,*}

(1. Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. Key Laboratory of Medical Microbial Resources, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: In this paper, *Semen Cassia* crude polysaccharide is got by water-extracting and alcohol precipitating, then being refined on the two methods of H₂O₂ bleaching and secondary alcohol precipitation, H₂O₂ bleaching can effectively remove protein impurities among *Semen Cassia* crude polysaccharide. *Semen Cassia* polysaccharide antioxidant experiments show: It is certain to eliminate hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) by *Semen Cassia* polysaccharide; and *Semen Cassia* polysaccharide inhibit effectively superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) by pyrogallol autoxidation with concentration of 0.022 mg/ml.

Key words *Semen Cassia* polysaccharide; purification; anti-oxidation

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0205-04

决明子(*Semen Cassiae*)是豆科植物决明的干燥成熟种子, 国家卫生部颁布的药食同源植物。始载于《神农本草经》, 决明子被列为上品, 其味甘、苦, 微寒, 入肝、肾经, 具有降压、降脂、保肝、明目、润肠和抗菌等作用。在民间决明子有着悠久的历史, 或泡茶饮, 或炒后与其它药物配伍^[1]。决明子含有丰富的必需营养素如含有蒽醌类、萘并吡咯酮类、脂肪酸类、氨基酸和无机元素等^[2]。

决明子多糖是决明子中具有医疗保健作用的主要成分之一, 因此对决明子多糖的研究具有很高的价值, 研究其生理活性可为深入研究决明子多糖奠定基础。

本实验对预处理的决明子采用水提醇沉法提取决明子粗多糖, 利用经 H₂O₂ 氧化脱色法精制的决明子多糖进行清除 Smirnoff 反应产生羟自由基($\cdot\text{OH}$)和邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)抗氧化活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

决明子(市售)、无水乙醇、乙醚、氨水、浓硫酸、苯酚、双氧水、FeSO₄、水杨酸、Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)、邻苯三酚, 所用试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器

FZ-102 植物粉碎机、DB-210SCB 型电热鼓风恒温干燥箱、GL-21M 高速冷冻离心机、pHS-25 型酸度计、UV/VIS2802PC 紫外扫描分光光度计、SHZ-D(III)循环水式真空泵。

1.2 方法

1.2.1 决明子的预处理^[3]

决明子置于 70~80℃烘干 2~3h, 再经 140℃下烘焙 10min, 趁热粉碎并分级。用乙醇和乙醚(1:1)混合溶剂回流除脂, 备用。

1.2.2 决明子多糖的提取^[3-4]

收稿日期: 2007-06-12

*通讯作者

基金项目: 四川省中医药管理局重点及专项项目(2003A001, 2003C001); 成都大学校基金项目

作者简介: 郭晓强(1972-), 男, 实验师, 研究方向为保健食品的研究与开发。

采用水浸提法提取水溶性多糖。以1:30固液比, 80℃下浸提2.5h, 经10000r/min、10℃、10min离心后残渣以相同条件再浸提一次。合并上清液, 浓缩至一定体积后, 加入5倍体积的无水乙醇, 离心出多糖, 烘干、研磨得决明子粗多糖。

1.2.3 二次醇析精制粗多糖

定量称取2.5g决明子粗多糖加入蒸馏水, 加热溶解, 并离心去除微量的不溶物, 再经浓缩、二次醇析、干燥及研磨得决明子二次醇析多糖。

1.2.4 H₂O₂氧化脱色精制粗多糖

定量称取1.0g决明子二次醇析多糖溶解, 滴加氨水将pH调至8.0左右, 再滴加H₂O₂, 置于37℃水浴中保温2.0h, 加入适量无水乙醇沉淀多糖。离心出多糖, 烘干、研磨得决明子氧化脱色多糖。

1.2.5 决明子多糖溶液紫外扫描

决明子粗多糖、决明子二次醇析多糖和决明子氧化脱色多糖分别进行紫外扫描。

1.2.6 多糖含量的测定

采用改进的硫酸-苯酚法^[5]测定多糖含量。

1.2.6.1 标准工作曲线的绘制

标准葡萄糖在烘箱中以105℃条件干燥2h, 放入干燥器中冷却。待其完全冷却后, 精确称取葡萄糖0.2000g, 定容至100ml。再分别稀释、定容使其浓度依次为0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14mg/ml。分别移取的标准葡萄糖溶液各1.00ml, 加入5.00ml显色液, 振荡混匀。移取1.00ml蒸馏水, 并加入5.00ml显色液, 振荡混匀作为空白。

将样品管与空白管同时置于沸水浴中保温30~35min后取出, 放在冷水浴中冷却至室温, 于490nm处测定其吸光度值, 并绘制标准工作曲线。

1.2.6.2 多糖含量的测定

分别移取决明子粗多糖、决明子二次醇析多糖和决明子氧化脱色多糖待测溶液5ml, 用蒸馏水定容至50ml。采用标准曲线相同的实验方法和条件测定各多糖待测液在490nm处吸光度平均值, 通过回归方程计算出三种多糖样品的百分含量。

1.2.7 决明子多糖对羟自由基的清除作用

参照Smirnoff反应的方法建立反应体系模型^[6], 反应体系中含4mmol/L双氧水1ml, 9mmol/L FeSO₄ 1ml(水:乙醇=1:2), 9mmol/L水杨酸/乙醇溶液1ml, 决明子多糖溶液1ml。测定决明子多糖吸光度值, 并计算清除率。同时以VC作为阳性对照, 比较决明子多糖和VC清除羟自由基的能力。

实验条件: 37℃水浴保温30min, 以蒸馏水为参

比, 在510nm下测量决明子多糖的吸光度值, 并通过清除率计算公式得出各浓度水平下清除率。为了消除决明子多糖本身的色泽对实验结果的影响, 实验过程中逐个对多糖样品管扣除背景。

清除率计算公式:

$$E(\%) = [A_0 - A_x] / A_0 \times 100$$

式中, A₀为空白对照液的吸光度; A_x为加入多糖溶液后的吸光度; A₀为不加显色剂H₂O₂本底的吸光度。

1.2.8 决明子多糖对超氧阴离子的抑制作用

采用邻苯三酚自氧化法^[7], 测定决明子多糖的吸光度值, 依据吸光度值计算平均速率, 并按抑制率计算公式算出决明子多糖对超氧阴离子的平均抑制率。决明子多糖消除超氧阴离子体系配制及操作要求见表1。

表1 决明子多糖消除超氧阴离子自由基体系配制及操作要求
Table 1 Preparation and operation requirements of Semen Cassia polysaccharide eliminating superoxide anion

编号	Tris(ml)	水(ml)	多糖(ml)	酚(ml)
对照	(A)管	1.00	5.00	0
	(B)管	0	4.00	0
样品	(A)管	1.00	3.00	2.00
	(B)管	0	4.00	0

混合、转移至比色皿的操作要迅速, 从混合后30s开始读数记录; 230s内每间隔10s记录一次。

抑制率计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = (\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 \times 100$$

式中, ΔA₀为邻苯三酚的自氧化速率; ΔA为加入决明子多糖后邻苯三酚的自氧化速率。单位均为吸光度每分钟的增值。

2 结果与分析

2.1 原料预处理

经分级处理40目以下粉碎物料占60%以上有利于决明子多糖的最大溶出率。原料的粒度对决明子多糖的溶出率有较大影响, 在一定范围内原料粒度越小越有利于其多糖含量的溶出, 而粒度过小又将导致离心时上清液和残渣的分离难度。

2.2 决明子多糖的提取

经1.2.2所述方法提取的决明子粗多糖产率为9.17%, 粗多糖呈深棕色。

2.3 决明子多糖的二次醇析

2.5g决明子粗多糖经二次醇析处理后获得灰褐色粉末状二次醇析多糖1.81g, 得率为73.0%。

2.4 决明子粗多糖的氧化脱色

按1.2.4所述方法对决明子二次醇析多糖1.0g采用

H₂O₂ 氧化脱色, 经处理得淡黄色粉末状固体 0.45 g, 产品得率为 45.0%。

经过氧化脱色后, 决明子粗多糖颜色有明显改善, 多糖粘度大大降低; 同时经过二次醇析的多糖, 颜色和粘度相比粗多糖都有所降低, 但是多糖的颜色还是较氧化脱色多糖深。

2.5 决明子多糖溶液紫外扫描

对本实验制取的决明子粗多糖、决明子二次醇析多糖和决明子氧化脱色多糖分别在 200~700nm 进行紫外扫描, 其扫描结果分别见图 1~3。

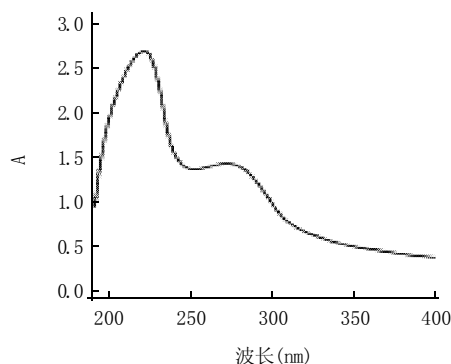


图1 决明子粗多糖

Fig.1 Semen Cassia crude polysaccharide

由图 1 可知, 决明子粗多糖溶液在 280nm 处有明显的吸收峰, 说明决明子粗多糖含有部分蛋白性杂质, 同时决明子多糖含量相对较少。

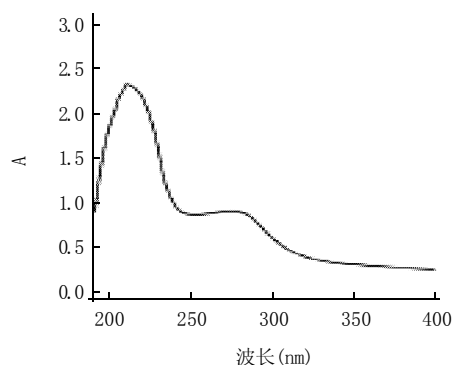


图2 决明子二次醇析多糖

Fig.2 Semen Cassia polysaccharide by secondary alcohol precipitating

由图 2 可知, 决明子二次醇析多糖溶液在 280nm 处仍有明显的吸收峰, 但较决明子粗多糖其杂质含量有所降低, 可能是由于决明子粗多糖经过二次醇析后去掉了部分蛋白性杂质。

在图 3 中 280nm 处没有明显的吸收峰, 可初步判断决明子氧化脱色多糖溶液几乎没有蛋白性杂质。

由上述实验结果我们推测决明子粗多糖和二次醇析

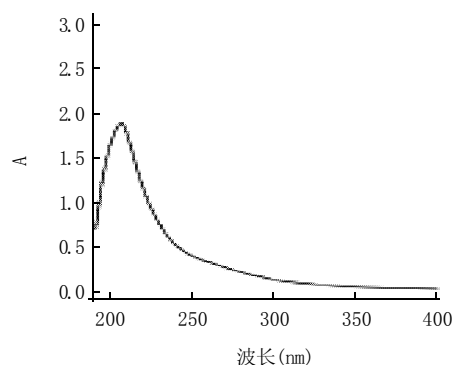


图3 决明子氧化脱色多糖

Fig.3 Semen Cassia polysaccharide by oxidation bleaching

多糖中具有紫外吸收的蛋白性杂质与多糖之间以化学键的形式存在一定程度的结合, 采用 H₂O₂ 氧化脱色可能对蛋白性杂质与多糖之间的结合键进行了有效切除。因此 H₂O₂ 氧化脱色可作为决明子粗多糖其纯化的有效方法, 但其作用机制有待进一步研究。

2.6 多糖含量的测定

决明子多糖吸光度和百分含量见表 2。

表2 决明子多糖吸光度和百分含量

Table 2 Absorbency and percentage of Semen Cassia polysaccharide

样品	粗多糖	二次醇析多糖	氧化脱色多糖
吸光度平均值	0.244	0.331	0.424
百分含量(%)	45.72	62.24	95.00

决明子氧化脱色多糖百分含量远远高于决明子粗多糖和决明子二次醇析多糖, 结合紫外扫描结果可判断决明子氧化脱色多糖具有较高纯度。

2.7 决明子多糖抗氧化活性

本实验采用具有较高纯度的决明子氧化脱色多糖研究决明子多糖抗氧化活性。

2.7.1 决明子多糖对羟自由基的清除作用

决明子多糖对羟自由基清除率及 VC 对羟自由基清

表3 决明子多糖对羟自由基清除率

Table 3 Rate of Semen Cassia polysaccharide and VC eliminateing hydroxyl radical

编号	决明子多糖 (mg)			VC (mg)		
	浓度	A	清除率 (%)	浓度	A	清除率 (%)
0	0	0	本底	0	0	本底
0#	0	0.605	空白	0	0.638	空白
1	0.04	0.587	2.98	0.125	0.453	29.00
2	0.08	0.564	6.78	0.25	0.374	41.38
3	0.15	0.547	9.59	0.5	0.059	90.75
4	0.31	0.535	11.57			
5	0.62	0.505	16.53			
6	1.2	0.469	22.48			
7	3.1	0.280	42.27			

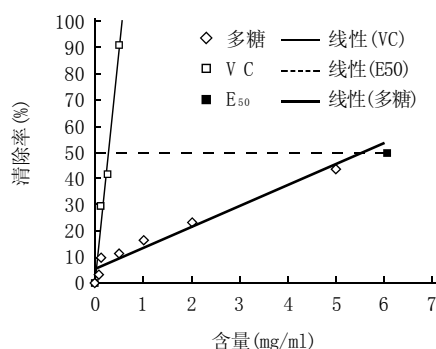


图4 决明子多糖清除羟自由基曲线

Fig.4 Curves of *Semen Cassia* polysaccharide eliminating hydroxyl radical

除率见表3, 分别以决明子多糖和VC含量(mg/ml)为横坐标, 清除率为纵坐标作决明子多糖清除羟自由基曲线图4。

实验结果表明: 决明子多糖对羟自由基具有一定的清除作用, 随着多糖浓度的增加, 清除率上升, E_{50} 为 0.83mg/ml (体系浓度)。VC 对羟自由基的清除率高, E_{50} 为 0.07mg/ml (体系浓度)。

2.7.2 决明子多糖对超氧阴离子自由基的清除

决明子多糖和对照清除邻苯三酚自氧化产生的超氧阴离子吸光度随时间变化的曲线见图5。实验采用

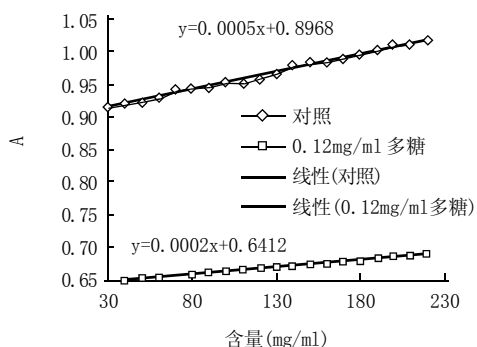


图5 决明子多糖和对照清除超氧阴离子的吸光度随时间变化曲线

Fig.5 Absorbency curves of *Semen Cassia* polysaccharide and control eliminating superoxide anion with time changing

0.12mg/ml 决明子氧化脱色多糖样品。

由图5可知, 邻苯三酚的自氧化即实验对照随着时间变化, 线性范围内每10s吸光度随着增加, 0.12mg/ml 决明子多糖样品随着时间变化在线性范围内也有增加的趋势, 但其曲线斜率明显低于实验对照。

决明子多糖对邻苯三酚自氧化产生的 $O_2^{\cdot -}$ 抑制率变化幅度大, 当体系浓度达到0.022mg/ml时产生明显抑制作用。0.12mg/ml 决明子多糖样品对 $O_2^{\cdot -}$ 的生成抑制率为60%。

3 结论

3.1 本实验采用水提醇沉法提取决明子粗多糖, 并建立了先经二次醇析再 H_2O_2 氧化脱色的体系对决明子粗多糖进行精制, 紫外扫描结合多糖含量测定表明该方法体系精制的决明子多糖具有较高的纯度, 可作为决明子多糖纯化的有效方法。

3.2 决明子多糖对羟基自由基($\cdot OH$)具有一定的清除作用, 并随决明子多糖浓度的增加而增强, 50%清除量时决明子多糖体系浓度为0.83mg/ml。

3.3 决明子多糖体系浓度达到0.022mg/ml时对超氧阴离子产生明显抑制作用。

参考文献:

- [1] 于守洋, 崔洪斌. 中国保健食品的进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [2] 吕翠婷, 黎海彬, 李续娥. 中药决明子的研究进展[J]. 食品科技, 2006 (8): 295-297.
- [3] 刘娟, 邓泽元, 刘晶晶, 等. 决明子水溶性多糖的分离纯化[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 67-69.
- [4] 邓泽元, 刘娟, 余迎利. 决明子水溶性多糖提取的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 72-75.
- [5] 徐光域, 颜军, 郭晓强, 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] 贾之慎, 郭建敏, 唐孟成. 比色法测定Fenton反应产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 184-187.
- [7] 范晓, 严小军, 房国明, 等. 高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 494-499.