

# 葛根抗氧化肽的分离及清除自由基活性研究

赵艳景, 张 岩

(淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

**摘 要:** 目的: 分离纯化葛根抗氧化肽并对其进行体外清除自由基活性的研究。方法: 以野生葛根为实验材料, 经 30% 的乙醇浸提、透析、冷冻干燥, 进一步采用 DEAE 阴离子交换层析, 反相高效液相色谱的方法, 对葛根抗氧化肽进行纯化, 对不同组分进行还原能力的测定, 还原能力最强的命名为 PE1。对 PE1 进行茚三酮反应和分子质量测定。采用邻苯三酚自氧化法、DPPH 法、Fenton 反应法检测 PE1 体外对超氧阴离子自由基、DPPH 自由基、羟自由基的清除作用。结果: 反相高效液相色谱检测 PE1 纯度, 显示为单一峰, PE1 与茚三酮反应呈阳性, 分子质量约为 746D, PE1 在体外可以有效清除以上 3 种自由基。在质量浓度为 0.652mg/mL 时, 羟自由基清除率可达到 80.01%; 在 5mg/mL 质量浓度条件下, 对超氧阴离子自由基的清除率高达 97.35%; 在 3.5mg/mL 质量浓度条件下, 对 DPPH 自由基的清除率达到 75.02%, 其  $IC_{50}$  为 2.83mg/mL。结论: PE1 具有较强的清除自由基活性。

**关键词:** 葛根; DEAE 层析; 抗氧化肽; 自由基

## Separation and Free Radical Scavenging Activity of Antioxidant Peptide from *Radix Puerariae*

ZHAO Yan-jing, ZHANG Yan

(Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

**Abstracts:** Objective: To separate, purify and biologically characterize antioxidant peptides from *Radix Puerariae*. Methods: Widely grown *Radix Puerariae* was extracted with 30% ethanol aqueous solution, dialyzed, lyophilized, purified by DEAE anion exchange chromatography and reversed-phase HPLC to obtain an antioxidant peptide fraction with the highest reducing power, named as PE1. PE1 was tested by ninhydrin reaction and its molecular weight was measured. Moreover, the scavenging effects *in vitro* on superoxide anion (by pyrogallol autoxidation method), DPPH and hydroxyl radicals (by Fenton reaction method) were evaluated. Results: A single peak was observed in the reversed-phase HPLC pattern of PE1. The reaction between PE1 and ninhydrin was positive, and the molecular weight of PE1 was approximately 746 D. PE1 was effective in scavenging superoxide anion, DPPH and hydroxyl radicals. The scavenging rate was 80.01% at 0.652 mg/mL against hydroxyl radicals, 97.35% at 5 mg/mL against superoxide anion radicals and 75.02% at 3.5 mg/mL against DPPH radicals with an  $IC_{50}$  of 2.83 mg/mL. Conclusion: PE1 has strong radical scavenging activity.

**Key words:** *Radix Puerariae*; DEAE ion-exchange chromatography; antioxidant peptide; free radical

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0112-04

葛(*Pueraria lobata* Ohwi)是豆科属植物, 是常用传统中药。由于地域的不同, 葛有许多别名: 葛根、野葛、葛藤、干葛、粉葛、苦葛等。一般生于丘陵、山坡、川谷和路旁, 性喜温暖湿润的气候和深厚疏松, 富含腐殖质的沙质土壤。葛作为中草药, 始载于《神农本草经》, 列为中品; 历代本草均有记载, 今为常用中药。现代药理表明: 葛根素、葛根素木糖苷、金雀异

黄素、大豆苷、大豆苷元等异黄酮类化合物是葛根的主要有效成分<sup>[1-2]</sup>。它们具有促进血流、降血脂、降血糖、抗疲劳、抗衰老、抗癌、增强机体免疫力等多种生理功能<sup>[3-5]</sup>。葛作为功能性食品的优质基料, 经过深加工可开发为多种葛制品, 如葛根面包、葛根保健酒、葛花软糖、葛根冰淇淋、葛花牛奶、葛根醋、葛根豆腐等<sup>[6-7]</sup>, 是人们日常降压、降脂、降火的首选功能食品。

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009641); 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放基金项目(HS07014);

淮海工学院引进人才科研启动基金项目(KQ07018)

作者简介: 赵艳景(1976—), 女, 讲师, 博士, 主要从事海洋生物活性物质研究。E-mail: zhaoyanjing1976@163.com

近年来,研究人员发现人体细胞在氧化还原代谢过程中产生少量性质活泼的氧自由基(活性氧),主要有超氧阴离子自由基、羟自由基等。自由基具有高度的化学活性,一方面它是机体有效防御系统的一部分,另一方面它又是造成许多疾病的原因<sup>[8-9]</sup>。由于许多天然抗氧化剂具有清除体内自由基的活性,因此能起到防病、治病及抗衰老保健作用。近年来对于天然抗氧化剂的研究,已经成为最为活跃的研究课题之一<sup>[10-11]</sup>。本实验通过生物化学的方法从新鲜葛根中分离纯化葛根抗氧化肽,并对其体外抗氧化活性进行了研究,旨在为葛根的深度开发利用提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

葛根采于连云港云台山地区,低温冰箱-40℃保存。

2-脱氧-D-核糖 美国 Inalco 公司;乙腈 德国 Merck 公司;硫代巴比妥酸(TBA)、焦性没食子酸(邻苯三酚) 国药集团化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、茚三酮 美国 Sigma 公司;Tris-Base、乙醇 上海生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LG-5 真空冷冻干燥机 上海市离心机械研究所;Avanti J-26XP 高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司;Biologic Duoflow 蛋白质层析系统 美国 Bio-Rad 公司;600E 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司;Lambda35 紫外-可见分光光度计 美国 PE 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 葛根抗氧化肽的纯化制备

##### 1.3.1.1 葛根粗提液的分离

称取适量葛根,切片后置真空干燥箱 24h,将干燥的葛根片粉碎,过 40 目筛,体积分数 30% 乙醇浸提 6h,于冷冻离心机 4℃、12000r/min 离心 30min,取上清液冷冻干燥。取冻干粉加入到处理好的透析袋(3500D)中,透析过夜,冻干浓缩透析外液。

##### 1.3.1.2 DEAE 纤维素离子交换层析

取上述透析液上样 DEAE 纤维素离子交换柱,层析柱用 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)平衡,用 10mmol/L Tris-HCl + 1mol/L NaCl 溶液(pH7.5)进行离子强度线性梯度洗脱,洗脱处理温度 25℃,流速为 1.5mL/min,波长为 280nm,吸光度大于 0.03 时开始收集,每管收集 3mL。对收集到的不同组分进行抗氧化活性测定。

##### 1.3.1.3 RP-HPLC 分析

取 DEAE 离子交换层析得到的活性成分进行 HPLC 分

析,使用 Symmetry C<sub>18</sub> 分析型色谱柱(4.6mm × 150mm, 5μm),Waters 高效液相色谱系统。上样 100μL,先用 5% 乙腈等梯度洗脱 5min,再由 5% 线性梯度洗脱至 20%,洗脱时间为 5min,乙腈由 20% 线性梯度洗脱至 100%,洗脱时间为 10min,得到 HPLC 洗脱图谱。

##### 1.3.1.4 茚三酮反应

取样品 4 滴,加入 1% 茚三酮乙醇溶液两滴混合,沸水浴 1~2min,冷却后观察颜色变化。

##### 1.3.1.5 分子质量测定

采用凝胶层析法测定,由 Sephadex G-15(1.1cm × 50cm)分析检测。洗脱液为 10mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH7.0),流速 0.4mL/min,检测波长为 280nm,标准样品为 L-酪氨酸( $M_r = 181.19$ )、AMP( $M_r = 347.2$ )、辅酶 I(NAD,  $M_r = 681.44$ )、短杆菌肽( $M_r = 1486.2$ )。

### 1.3.2 抗氧化活性测定

#### 1.3.2.1 还原能力的测定

参照 He Yuehua 等<sup>[12]</sup>方法,取分离得到的葛根提取物 0.4mL,加入 0.2mol/L pH6.6 的磷酸缓冲溶液 2mL,质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液 2mL,混匀,在 50℃ 保温 20min,再加入质量分数为 10% 的三氯乙酸溶液 2mL,振荡混匀后在 4000r/min 离心 10min。取上清液 2mL,加 2mL 蒸馏水和 0.4mL 质量分数为 0.1% 的 FeCl<sub>3</sub> 溶液,静置 10min 后体系溶液由黄色变为蓝色,在 700nm 波长处进行比色,测定其吸光度,吸光度越大,还原能力越强。

#### 1.3.2.2 对羟自由基清除率的测定

参照胡华平等<sup>[13]</sup>的 Fenton 反应法测定。在测定体系中加入不同质量浓度的葛根提取物,测定清除率与效应物质量浓度的关系,分析葛根提取物对羟自由基清除作用的影响。反应结束后,在 532nm 波长处比色,测定其吸光度。按照公式(1)测定样品清除率。以 VC 做阳性对照。

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

式中:  $A_c$  为不加样品的吸光度;  $A_s$  为加入样品后的吸光度;  $A_0$  为试剂空白的吸光度。

#### 1.3.2.3 对超氧阴离子自由基清除率的测定

采用邻苯三酚自氧化体系<sup>[14]</sup>测定。作不同质量浓度的葛根提取物与其吸光度随时间的变化曲线,算出其回归方程,斜率为邻苯三酚的自氧化速率  $v$ ,按照公式(2)计算样品对超氧阴离子自由基的清除率,以 VC 做阳性对照。

$$\text{清除率}/\% = \frac{v_{\text{对照}} - v_{\text{样品}}}{v_{\text{对照}}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.3.2.4 对 DPPH 自由基清除率的测定

参照吴海涛等<sup>[15]</sup>方法, 取不同质量浓度样品 2mL, 加 2mL  $1 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 混匀, 于室温条件下避光反应 20min, 4000r/min 离心 10min, 取上清液在 517nm 波长处测定吸光度  $A_i$ 。空白组以等体积 95% 乙醇溶液代替 DPPH 溶液, 对照组以等体积去离子水代替样品溶液, 将 2mL 95% 乙醇和等体积去离子水混合用于调零。按照公式(3)测定样品清除率, 以 VE 做阳性对照。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_0$  为对照组吸光度;  $A_i$  为样品组吸光度;  $A_j$  为空白组吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 葛根抗氧化肽的纯化

葛根粉碎后经 30% 的乙醇浸提, 透析, 冷冻干燥后通过 DEAE 纤维素离子交换层析, 得到 3 种分子质量不同的组分, 结果见图 1。

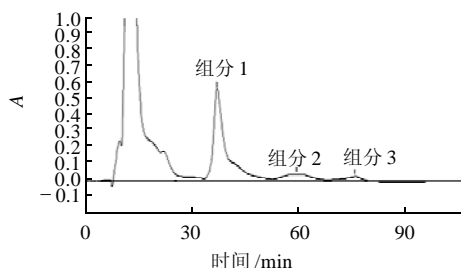


图1 DEAE 离子交换层析谱

Fig.1 Elution profile of crude *Radix Puerariae* extract on DEAE anion exchange column

### 2.2 葛根提取物 DEAE 层析产物的还原能力

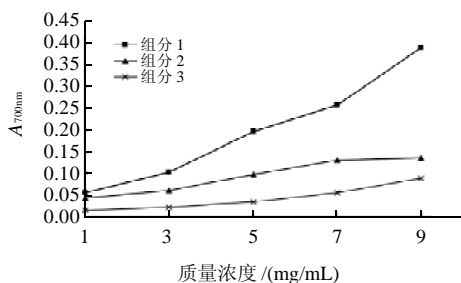


图2 葛根提取物的还原能力

Fig.2 Reducing power of three fractions obtained from DEAE anion exchange column chromatography

将上述 DEAE 分离得到的 3 个组分进行还原能力的

测定, 结果见图 2。3 个组分均有一定的还原能力, 其中组分 1 的还原能力最强(将组分 1 作为进一步研究的样品, 命名为 PE1), 并且还原能力在一定的浓度范围内呈明显的量效关系, 其还原能力随质量浓度的增加而增大。一般情况下, 样品的还原能力与抗氧化能力呈正相关, 所以葛根提取物的抗氧化能力随其质量浓度的增加而增强。

### 2.3 RP-HPLC 分析结果

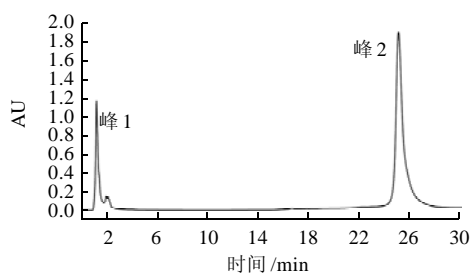


图3 RP-HPLC 分析图谱

Fig.3 RP-HPLC analysis of fraction 1 (PE1)

由图 3 可知, 峰 1 为溶剂峰, 峰 2 为洗脱峰; 洗脱峰峰形良好, 说明 PE1 纯度很高。

### 2.4 茚三酮反应结果

PE1 与茚三酮反应呈阳性, 表明该物质 N 端未被封闭且为链状肽。

### 2.5 分子质量测定结果

根据标准品的分子质量和洗脱体积, 以  $K_{av} - \lg M_w$  作标准曲线, 其中  $K_{av}$  为分配系数,  $M_w$  为分子质量, 得回归方程  $K_{av} = -0.8798 \lg M_w + 2.7677$ , 经计算, PE1 的分子质量约为 746D。

### 2.6 PE1 体外清除自由基活性结果

#### 2.6.1 PE1 对羟自由基的清除效应

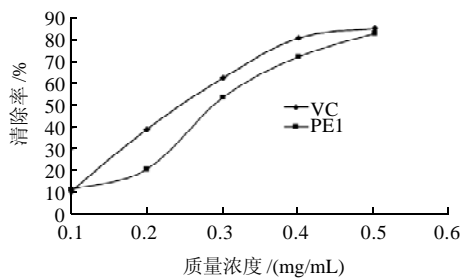


图4 PE1 对羟自由基的清除作用

Fig.4 Hydroxyl free radical scavenging capacity of PE1 at different concentrations

由图4可知, PE1和VC对羟自由基清除率均随质量浓度增加而升高, 具有显著的剂量依赖关系。在较低质量浓度条件下PE1对羟自由基清除率要略高于VC, 随着质量浓度增加, 二者的清除能力基本相同。

### 2.6.2 PE1对超氧阴离子自由基的清除效应

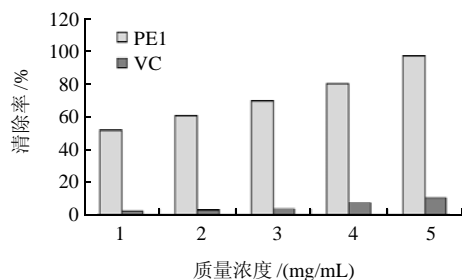


图5 PE1对超氧阴离子自由基的清除效应

Fig.5 Superoxide anion radical scavenging capacity of PE1 at different concentrations

由图5可知, PE1对超氧阴离子自由基具有很强的清除能力。在质量浓度很低的情况下就已表现出良好的清除能力; 在3mg/mL质量浓度条件下, 对超氧阴离子自由基的清除率高达69.73%, 并随质量浓度的增加, 清除超氧阴离子自由基的能力不断增加。而阳性对照VC则在相同质量浓度条件下对超氧阴离子自由基清除能力较弱, 在5mg/mL作用下, 清除能力只有10.36%。由此可见, PE1对超氧阴离子自由基的清除能力明显高于VC。

### 2.6.3 PE1对DPPH自由基的清除效应

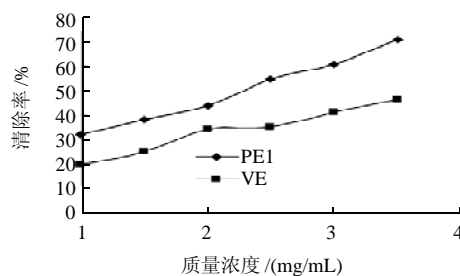


图6 PE1对DPPH自由基的清除作用

Fig.6 DPPH radical scavenging capacity of PE1 at different concentrations

由图6可知, PE1对DPPH自由基具有较强的清除

能力, 在相同质量浓度作用下, 清除能力高于阳性对照VE。在2.5mg/mL质量浓度条件下, 对DPPH自由基的清除率超过半数以上。在3.5mg/mL作用下, 对DPPH自由基的清除率达到75.02%, 根据回归方程, 其IC<sub>50</sub>为2.83mg/mL。

## 3 结论

本研究以野生葛根为实验材料, 经分离纯化, 得到葛根抗氧化肽PE1。采用邻苯三酚自氧化法、DPPH法、Fenton反应法检测PE1对超氧阴离子自由基、DPPH自由基、羟自由基的清除作用。结果显示PE1在体外可以有效清除以上3种自由基。

## 参考文献:

- [1] 郭珍. 葛根的化学成分[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1993, 15(2): 19-23.
- [2] 郭建平, 孙其荣, 周全. 葛根药理作用研究进展[J]. 中草药, 1995, 26(3): 163-165.
- [3] 史海明, 闵知大. 食用葛根的化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2000(6): 411-413.
- [4] 焦豪妍. 葛根的研究概况[J]. 海峡药学, 2010, 22(8): 47-50.
- [5] 迟霁菲, 张国刚, 李萍, 等. 安徽产葛根的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2007(1): 47-49.
- [6] 张雁, 李健雄, 魏振承, 等. 无糖葛根酸奶的工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 119-121.
- [7] 邵伟, 唐明, 熊泽, 等. 野生葛根保健醋发酵工艺研究[J]. 江苏调味品副食品, 2004(3): 5-7.
- [8] PRASAD K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flaxlignan complex isolated from flaxseed[J]. Atherosclerosis, 2005, 179(2): 69-75.
- [9] BENVENUTI S, PELLATI E, MELEGARI M, et al. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(3): 164-169.
- [10] DREHER D, JUNOD A F. Role of oxygen free radicals in cancer development[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(1): 30-38.
- [11] PATEL A, MISHRA S, GHOSH P K. Antioxidant potential of C-phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp.[J]. Indian J Biochem Biophys, 2006, 43(1): 25-31.
- [12] HE Yuehua, SHAHIDI F. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(11): 4262-4265.
- [13] 胡华平, 韩雅莉, 张峰. 木瓜提取物抗氧化性质的初步研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 645-648.
- [14] 许雅娟, 赵艳景, 胡虹. 邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的研究[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2006(6): 1207-1209.
- [15] 吴海涛, 张或, 缪琪, 等. 牡蛎水提液的抗氧化特性[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 42-45.