

猕猴桃根多糖抗疲劳、抗氧化与单糖组分鉴定

刘祝祥¹, 尹红², 肖琳莉¹, 唐敏¹, 李加兴^{2,3}, 肖文军⁴, 黄诚^{2,*}

(1.吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000;

2.吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000; 3.湖南省猕猴桃产业化工程技术研究中心, 湖南 吉首 416000;

4.湖南农业大学 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要: 将小鼠随机分成对照组(生理盐水)、实验组(高、中、低剂量组给糖量分别为150、75、37.5mg/(kg·d)), 每组10只, 以20mL/(kg·d)剂量给小鼠连续灌胃15d, 然后测定其负重游泳时间、常压耐缺氧时间, 并测定其血清中乳酸、血清尿素氮、肝糖原和肝组织中丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果显示: 猕猴桃根多糖能延长小鼠常压耐缺氧时间($P < 0.01$); 增加小鼠负重游泳时间(低剂量时 $P < 0.05$; 中、高剂量时 $P < 0.01$); 高剂量组降低运动后小鼠血清乳酸($P < 0.01$)和血清尿素氮($P < 0.01$)的浓度; 中、高剂量组能提高小鼠体内肝糖原的储备量(中剂量组 $P < 0.05$; 高剂量组 $P < 0.01$); 高剂量组提高肝组织中SOD活性($P < 0.05$), 中、高剂量组降低肝组织中MDA含量(中剂量组 $P < 0.05$; 高剂量组 $P < 0.01$)。该结果表明猕猴桃根多糖对小鼠具有抗疲劳和抗氧化作用。将猕猴桃根多糖水解和乙酰化后, 用气质联用仪分离和鉴定多糖单糖组分, 显示猕猴桃根多糖是由核糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成的杂多糖。

关键词: 猕猴桃根多糖; 抗疲劳; 抗氧化; 单糖组分

Antifatigue and Antioxidant Activities and Monosaccharide Composition of Polysaccharide from Roots of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)

LIU Zhu-xiang¹, YIN Hong², XIAO Lin-li¹, TANG Min¹, LI Jia-xing^{2,3}, XIAO Wen-jun⁴, HUANG Cheng^{2,*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization, Jishou University, Jishou 416000, China; 2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China; 3. Research Center of KiwiFruit Industrialization Engineering and Technology of Hunan Province, Jishou 416000, China; 4. National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: This study was performed to investigate the antifatigue and antioxidant activities and monosaccharide composition of a polysaccharide (PRK) extracted from roots of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). SPF mice were divided into control group and three experimental groups (high-dose, moderate-dose and low-dose groups, which were established by oral administration at 150, 75 mg/(kg·d) and 37.5 mg/(kg·d), respectively) with 10 mice in each group. All the mice were administered by gavage with 20 mL/(kg·d) of normal saline or PRK solutions continuously for 15 d. At 30 min after the last administration, the loaded-swimming time, the contents of serum lactic acid and urea nitrogen, the contents of glycogen and MDA and the activity of SOD in the liver were tested, and at 2 h, the survival time in hypoxic conditions under normal pressure was recorded. Compared with the control group, PRK could prolong significantly the survival time in hypoxic conditions under normal pressure ($P < 0.01$) and the loaded-swimming time in low-dose group ($P < 0.05$), moderate-dose and high-dose group ($P < 0.01$), increase the content of liver glycogen in moderate-dose group ($P < 0.05$) and high-dose group ($P < 0.01$), and enhance the activity of liver SOD in high-dose group ($P < 0.05$). Moreover, PRK could decrease the contents of lactic acid and urea nitrogen in the serum after swimming in high-dose group ($P < 0.01$), decrease liver MDA content after swimming in moderate-dose group ($P < 0.05$) and high-dose group ($P < 0.01$). These results showed that PRK had anti-fatigue and anti-oxidant activities in mice. PRK was hydrolyzed and acetylated into acetylated monosaccharides. The acetylated monosaccharides were isolated and identified by gas chromatography-mass spectrometry. The result indicated that PRK was heteropolysaccharide and composed of ribose, arabinose, glucose and galactose.

收稿日期: 2012-06-29

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD10B00);

植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室开放基金项目(JSK200904)

作者简介: 刘祝祥(1978—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为生物资源开发与利用。E-mail: liuzhuxiang@126.com

*通信作者: 黄诚(1963—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品科学与技术。E-mail: huangcheng@jzu.edu.cn

Key words: polysaccharide extracted from kiwifruit roots; anti-fatigue activity; antioxidant activity; monosaccharide composition

中图分类号: Q539

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)13-0239-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201313050

猕猴桃系猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia* Lindl)植物,为落叶、半落叶至常绿藤本植物^[1]。猕猴桃植物的根民间又叫藤梨根,性寒、味苦,能清热解毒、活血消肿,民间常用于治疗肝炎、水肿、跌打损伤、风湿关节痛、乳汁不足、淋虫、带下、疮疖、瘰癧等^[2]。猕猴桃根中含有多种化学成分^[3-6],猕猴桃根多糖被认为是其主要活性物质,研究表明猕猴桃根多糖具有清除自由基、抗肿瘤和抗病毒等作用^[7-9]。目前对猕猴桃根多糖的研究主要集中在多糖提取及工艺^[10-13]、抗肿瘤^[7]和抗病毒活性^[8-9]等方面,但对其抗疲劳抗氧化活性及单糖组分研究少见报道。本实验采用小鼠实验和气质联用仪器对猕猴桃根多糖抗疲劳抗氧化活性及多糖单糖组分进行研究,旨在为猕猴桃根多糖的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

猕猴桃根由湘西州永顺石堤“米良一号”猕猴桃基地提供,按照文献^[12]报道工艺提取和纯化多糖。

SPF级KM种雄性小鼠200只,体重1921g,由斯莱克景达动物实验中心提供。

血清乳酸、尿素氮、肝糖原、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒 南京建成生物工程研究所。

723型分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;组织匀浆器、SC-20A型恒温水槽 宁波新芝生物科技股份有限公司;TD-24K型离心机 湘仪离心机有限公司,GCMS-QP2010气质联用仪(配NIST2011标准质谱库和Wiley质谱库) 日本岛津公司;自制游泳箱(50cm×40cm×35cm)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠负重游泳实验

取40只雄性小鼠,随机分为多糖高剂量组(150mg/(kg·d))、中剂量组(75mg/(kg·d))、低剂量组(37.5mg/(kg·d))和对照组(生理盐水),每组10只。各组均灌胃给糖,1次/d(20mL/kg),连续给糖15d。末次给糖30min后,置小鼠于游泳箱中游泳,水深30cm,水温(30±1)℃,小鼠尾根部负荷5%体质量的铅皮,记录小鼠自开始游泳至死亡的时间即为小鼠负重游泳时间。

1.2.2 小鼠常压耐缺氧实验

分组及给糖同负重游泳实验,于末次灌胃2h后将小

鼠逐只放入200mL广口瓶中,凡士林封口,直至小鼠腹部不再起伏,鼻翼不再扇动为小鼠死亡,记录小鼠死亡时间。

1.2.3 血清乳酸含量的测定

分组及给糖同负重游泳实验,末次给予受试样品30min后,在温度为(30±1)℃的水中不负重游泳30min,摘眼球取血,4000×g离心15min,取血清按南京建成生物工程研究所乳酸测试试剂盒说明进行血清乳酸含量测定。

1.2.4 血清尿素氮含量的测定

分组及给糖同负重游泳实验,末次给予受试样品30min后,在温度为(30±1)℃的水中不负重游泳90min,休息60min后立即摘眼球采血,置于4℃冰箱约3h,血凝固后,4000×g离心15min,取血清按南京建成生物工程研究所尿素氮测试试剂盒说明进行尿素氮含量测定。

1.2.5 肝糖原含量的测定

分组及给糖同负重游泳实验,末次给予受试样品30min后立即处死小鼠,取肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,制成10%肝匀浆,按南京建成生物工程研究所肝糖原测试试剂盒说明进行肝糖原含量的测定。

1.2.6 肝组织MDA含量及SOD活力的测定

分组及给糖同负重游泳实验,末次给予受试样品30min后立即处死小鼠,取肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,制成10%肝匀浆,按南京建成生物工程研究所SOD和MDA测试试剂盒说明进行肝组织MDA含量及SOD活力的测定。

1.2.7 猕猴桃根多糖的水解和乙酰化

多糖的水解:取5mg猕猴桃根多糖,加入2mol/L 3mL三氟乙酸,密封在安瓿管中,120℃加热2h,直至变色为止,50℃减压抽干。

单糖的还原:取水解产物同时加入1mL 1mol/L NaBH₄和10μL浓氨水,密封过夜,加少量醋酸中和至不冒气泡为止,50℃减压抽干,用甲醇反复冲洗数次,减压抽干甲醇。

乙酰化:取还原的单糖,加入1mL吡啶和1mL乙酸酐,密封过夜,减压抽干;用5mL水溶解乙酰化反应后的乙酰化单糖,然后用3倍体积三氯甲烷萃取乙酰化单糖,取三氯甲烷相,减压浓缩至5mL备测。

1.2.8 乙酰化单糖气质联用分析

色谱柱: RTX-5MS石英毛细柱(30m×0.25mm, 0.25μm);升温程序: 150℃保持3min,以5℃/min升至280℃,保持

3min; 载气为氦气, 流速1mL/min; 进样量0.5 μ L, 分流比为20:1。

质谱条件: 电子轰击(EI)离子源; 电子能量70eV; 接口温度230℃; 离子源温度200℃; 质量扫描范围 m/z 29~450。

1.3 数据处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析, 组间比较用 t 检验, 采用SPSS13.0软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃根多糖抗疲劳和抗氧化实验结果

表1 多糖对小鼠负重游泳及常压耐缺氧的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of kiwifruit root polysaccharide on the loaded-swimming time and survival time in hypoxic conditions under normal pressure of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	缺氧生存时间/min	游泳生存时间/min
对照组	18.8 \pm 2.3	91.9 \pm 13.8
猕猴桃根多糖低剂量组	24.6 \pm 2.2**	109.2 \pm 16.4*
猕猴桃根多糖中剂量组	25.8 \pm 2.0**	118.9 \pm 17.8**
猕猴桃根多糖高剂量组	26.5 \pm 2.7**	124.6 \pm 18.7**

注: *, 与对照组相比, 有显著性差异($P < 0.05$); **, 与对照组相比, 有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

从表1可以看出, 低剂量组、中剂量组和高剂量组均高于对照组。组间 t 检验结果表明: 在缺氧生存时间方面低剂量组、中剂量组和高剂量组均与对照组有极显著性差异($P < 0.01$); 在游泳生存时间方面低剂量组与对照组有显著性差异($P < 0.05$); 中剂量组和高剂量组均与对照组有极显著性差异($P < 0.01$)。

表2 多糖对小鼠肝糖原、血清尿素氮及乳酸含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of kiwifruit root polysaccharide on the levels of hepatic glycogen, urea nitrogen and lactic acid in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	肝糖原含量/(mg/g组织)	血清尿素氮含量/(mmol/L)	血清乳酸含量/(mg/L)
对照组	35.2 \pm 3.2	18.31 \pm 1.87	466.9 \pm 44.2
猕猴桃根多糖低剂量组	34.9 \pm 3.4	17.52 \pm 1.95	467.2 \pm 51.2
猕猴桃根多糖中剂量组	38.5 \pm 2.7*	17.81 \pm 1.89	458.2 \pm 50.6
猕猴桃根多糖高剂量组	42.2 \pm 4.9**	13.38 \pm 1.67**	375.8 \pm 43.5**

从表2可以看出, 服糖后小鼠单位肝组织肝糖原含量在中剂量组和高剂量组均增加, 组间 t 检验结果表明与对照组相比中剂量组有显著性差异($P < 0.05$), 高剂量组有极显著性差异($P < 0.01$)。小鼠游泳运动后检测血液中血清尿素氮和血清乳酸, 结果表明服糖后低、中、高剂量组对照组血清中尿素氮含量降低, 且对高剂量组组间与对照组间有极显著性差异($P < 0.01$); 服糖后中剂量组和高剂量组对对照组血清中血清乳酸含量降低, 且对高剂量组与对照组间有极显著性差异($P < 0.01$)。

表3 多糖对小鼠肝组织MDA含量及SOD活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of kiwifruit root polysaccharide on MDA content and SOD activity in hepatic tissues of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	SOD活力/(U/mg pro)	MDA含量/(nmol/mg pro)
对照组	382.6 \pm 33.8	23.2 \pm 3.5
猕猴桃根多糖低剂量组	392.8 \pm 36.2	21.6 \pm 4.6
猕猴桃根多糖中剂量组	403.3 \pm 35.4	19.5 \pm 3.5*
猕猴桃根多糖高剂量组	420.3 \pm 41.5*	18.5 \pm 1.4**

从表3可以看出, 服糖后, 小鼠肝组织中SOD活性低剂量组、中剂量组和高剂量组均高于对照组, 组间 t 检验表明高剂量组与对照组间有显著性差异($P < 0.05$); 小鼠肝组织中MDA含量低剂量组、中剂量组和高剂量组均低于对照组, 其中中剂量组与对照组间有显著性差异($P < 0.05$), 高剂量组有极显著性($P < 0.01$)。

2.2 柱衍生法测定猕猴桃根多糖单糖组分

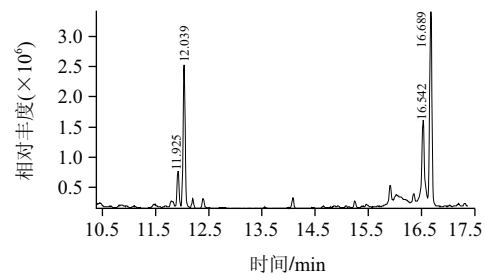


图1 猕猴桃根多糖水解乙酰化后气质联用分析总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram of acetylated polysaccharides from kiwifruit roots by GC-MS

按照上述方法使用气质联用仪对水解及乙酰化后猕猴桃根多糖单糖组分进行分离和鉴定, 总离子流图见图1。对总离子流图中的各峰经积分, 按峰面积归一化法确定各组相对含量, 并结合NIST2011标准质谱库和Wiley质谱库, 对各峰进行鉴定, 结果见表4。

表4 猕猴桃根多糖水解物乙酰化后气质联用分析结果

Table 4 GC-MS analysis results for acetylated polysaccharides from kiwifruit roots

保留时间/min	化合物名称	分子式	相对分子质量	相似程度/%	相对含量/%	对应单糖
11.925	五乙酰核糖 (ribitol pentaacetate)	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362	95	6.68	核糖 (ribose)
12.039	五乙酰阿拉伯糖 (arabitol pentaacetate)	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362	94	29.20	阿拉伯糖 (arabinose)
16.542	六乙酰葡萄糖 (glucitol hexaacetate)	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂	434	96	18.63	葡萄糖 (glucose)
16.689	六乙酰半乳糖 (galactitol hexaacetate)	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂	434	97	44.30	半乳糖 (galactose)

从图1和表4可以看出, 乙酰化单糖经过气质联用仪分离, 得到4个乙酰化单糖峰, 4个乙酰化单糖峰相对含量占总量的98.81%, 通过与NIST2011标准质谱库进行自动相似性检索, 并和Wiley质谱库进行比对, 4个乙酰化单糖峰分别为五乙酰核糖、五乙酰阿拉伯糖、六乙酰葡萄糖和六乙酰半乳糖; 4个乙酰化单糖对应的单糖组分为核糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖。

3 结 论

一般采用运动耐力实验和血乳酸、血清尿素氮及肌/肝糖原等3项生化检测项目来作为抗疲劳的指标较为合适。若1项以上(含1项)耐力运动实验和2项以上(含2项)生化指标为阳性,即可以判定受试物具有抗疲劳活性^[15]。SOD是生物体内重要的抗氧化酶,广泛分布于各种生物体内,是体内最主要的自由基清除剂。MDA为生物体内自由基作用于脂质发生过氧化反应终产物,其含量的多少反映了机体内脂质过氧化反应的强弱,间接地反映出细胞损伤的程度^[16]。猕猴桃根多糖能延长小鼠常压耐缺氧时间($P<0.01$);增加小鼠负重游泳时间(低剂量组 $P<0.05$;中、高剂量组 $P<0.01$);提高小鼠体内肝糖原的储备量(中剂量组 $P<0.05$;高剂量组 $P<0.01$);降低运动后小鼠血清乳酸(高剂量组 $P<0.01$)和血清尿素氮(高剂量组 $P<0.01$)的浓度;提高运动后肝组织中SOD活性(高剂量组 $P<0.05$),降低运动后肝组织中MDA含量(中剂量组 $P<0.05$ 、高剂量组 $P<0.01$)。上述结果显示猕猴桃根多糖具有抗疲劳抗氧化功效。柱前衍生法测定猕猴桃根多糖单糖组分,结果表明猕猴桃根多糖是由核糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成的杂多糖。

参考文献:

[1] 冯国楣. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 260.

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 2210-2212.
- [3] 邹益友. 猕猴桃根抑制肿瘤细胞的实验研究[J]. 湖南中医药导报, 1999, 5(4): 37-38.
- [4] 楼丽君, 吕定量, 胡增仁. 猕猴桃根抗肿瘤作用研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(6): 808-811.
- [5] XU Yixin, XIANG Zhaobao, JIN Yongsheng, et al. Two new triterpenoids from the roots of *Actinidia chinensis*[J]. Fitoterapia, 2010, 81: 920-924.
- [6] 崔莹, 张雪梅, 陈纪军, 等. 中华猕猴桃根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1663-1665.
- [7] 石森林, 潘国凤, 张晓东. 中华猕猴桃多糖抗肿瘤作用及其机理的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(6): 777-779.
- [8] 阎家祺, 王九一, 赵敏. 中华猕猴桃多糖的提取及其对自由基的清除作用[J]. 中国生化药物杂志, 1995, 16(1): 12-14.
- [9] 邵传森, 林佩芳. 中华猕猴桃多糖体外抗轮状病毒作用的初步观察[J]. 浙江中医学院学报, 1991, 6(15): 29-30.
- [10] 吴瑾瑾, 石森林, 张小寅, 等. 浙产猕猴桃属植物根、茎、叶中多糖的比较[J]. 中草药, 2006, 37(7): 1099-1100.
- [11] 吴瑾瑾, 夏聪华, 葛卫红, 等. 阴离子树脂交换法纯化猕猴桃根多糖的工艺研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(6): 906-910.
- [12] 李加兴, 李敏利, 陈建伏, 等. 微波辅助提取猕猴桃根多糖工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 42-45.
- [13] 吴瑾瑾, 叶丽美, 郭云霞, 等. 猕猴桃根多糖的提取工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 301-303.
- [14] 王鑫杰, 缪浏萍, 吴彤, 等. 中华猕猴桃根化学成分与药理活性研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1233-1239.
- [15] 何来英, 严卫星, 楼密密, 等. 保健食品抗疲劳作用实验研究[J]. 中国食品卫生杂志, 1997, 9(4): 3-8; 26; 48.
- [16] 习雪峰, 王单一, 熊正英, 等. 云芝多糖对运动训练大鼠脑组织抗氧化能力和ATPase活性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 256-259.