

## 绵麦冬多糖的分离纯化及自由基清除活性



HUANG Ni

黄妮,熊双丽\*,卢飞

(西南科技大学生命科学与工程学院,四川 绵阳 621010)

**摘要:** 绵麦冬经乙醇除脂后,用超声波辅助法进行提取,再经三氯乙酸除蛋白,乙醇沉淀后得粗多糖(CP)。用 DEAE-Sephrose Fast Flow 离子交换柱色谱分离纯化粗多糖,并进行光谱学分析和自由基清除活性探讨。结果显示:经离子交换柱首次分离出 1 种中性糖(NP)和 3 种酸性糖(AP)。中性糖的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)和羟自由基清除(·OH)能力都不强;3 种 AP 的 DPPH· 和 ·OH 清除能力为 AP3 > AP2 > AP1。AP3 具有极高的 ·OH 清除能力。粗多糖的 ·OH 清除能力随浓度变化大于 AP1 和 AP2, DPPH· 清除能力显著高于纯化后的多糖。各糖对 DPPH· 清除能力的半数抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)分别为:AP1 22.30 g/L, AP2 9.96 g/L 和 AP3 7.70 g/L, CP 2.01 g/L;对 ·OH 清除能力的 IC<sub>50</sub> 分别为:AP1 8.42 g/L、AP2 25.73 g/L 和 AP3 1.86 g/L, CP 4.93 g/L。

**关键词:** 绵麦冬;多糖;分离纯化;自由基清除活性

中图分类号:TQ357.0;Q539.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2011)01-0068-05

## Extraction, Purification and Radical Scavenging Activity of the Polysaccharides from *Ophiopogon japonicus*

HUANG Ni, XIONG Shuang-li, LU Fei

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

**Abstract:** Crude polysaccharides (CP) were obtained from *Ophiopogon japonicus* (Thumb.) Ker-Gawl by ultrasonic extraction, followed by trichloroacetic acid deproteination and ethanol precipitation. CP were further purified by DEAE-sepharose fast-flow ion-exchange column chromatography. Finally the spectroscopy of CP was analyzed and the free radical scavenging activities of various fractions toward DPPH· and ·OH were studied. One neutral polysaccharide (NP) and three kinds of acidic polysaccharides (AP) were separated by DEAE-sepharose FF. The result showed that NP has very low activities in scavenging DPPH· and ·OH. The ability of three kinds of AP for scavenging DPPH· and ·OH were in the sequence of: AP3 > AP2 > AP1. AP3 has high ability of scavenging ·OH. CP has very high ability of scavenging DPPH·, and its ability of scavenging ·OH changed rapidly with the concentration change. The IC<sub>50</sub> of various polysaccharides toward DPPH· were: AP1 22.30 g/L, AP2 9.96 g/L, AP3 7.70 g/L; CP 2.01 g/L. The IC<sub>50</sub> of various polysaccharides toward ·OH were: AP1 8.42 g/L, AP2 5.73 g/L, AP3 1.86 g/L; CP 4.93 g/L.

**Key words:** *Ophiopogon japonicus* (Thumb.) Ker-Gawl; polysaccharides; extraction and purification; free radical scavenging activity

麦冬(*Ophiopogon japonicus*(Thumb.) Ker-Gawl)为百合科沿阶草属麦冬的干燥块根,是常用的滋阴中药。具有养阴生津、润肺清心的功效,用于肺燥干咳、虚劳咳嗽、津伤口渴、心烦失眠、肠燥便秘等症<sup>[1]</sup>。绵麦冬作为我国麦冬的一大主要产品,所含的主要成分多糖具有多种生物活性,近年来对其的研究主要集中在抗心肌缺血、降血糖、耐缺氧能力等方面,但抗氧化方面的活性报道较少<sup>[2-3]</sup>。机体内的自由基主要包括超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、羟基自由基(·OH)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、单线态氧(1O<sub>2</sub>)等。

收稿日期:2010-07-06

基金项目:西南科技大学博士基金项目(06zx7122)

作者简介:黄妮(1984-),女,山西运城人,硕士生,研究方向为碳水化合物与生物技术

\* 通讯作者:熊双丽,女,副教授,硕士生导师,研究方向为碳水化合物与生物技术;E-mail:lxberry225@yahoo.com.cn。

适量的自由基是人体生命活动所必须的,它可以促进细胞增殖,消除炎症,分解毒物等,但是自由基具有高度的反应活性,当机体内自由基过量时,就会对机体造成损伤,进而引起衰老现象<sup>[4]</sup>。随着现代分子生物学和免疫学的发展,多糖在众多的延缓衰老的物质中脱颖而出,研究发现多糖能消除衰老机体内自由基的增加,消除氧自由基以及抗氧化方面有较明显的效果<sup>[5-8]</sup>。本研究主要是提取分离和纯化绵麦冬多糖,并对各糖组分理化特性、光谱特征和抗氧化活性进行探讨,为绵麦冬应用于医药和功能食品提供理论基础。

## 1 实验方法

### 1.1 材料与仪器

原料:新鲜绵麦冬,购于四川绵阳三台花园镇,经西南科技大学植物研究所侯大斌教授鉴定为绵麦冬。试剂:DEAE-Sephrose FF 离子交换柱,Sephrose 凝胶柱,Pharmacia 公司;半乳糖醛酸,间羟基联苯,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·),Sigma 公司;葡萄糖、浓硫酸、苯酚、三氯乙酸、双氧水、水杨酸等均为分析纯。仪器:Waters2140 高效液相色谱仪(示差折光检测器),Waters 公司;美国 Nicolet Nexus FT-IR 傅立叶变换红外光谱仪,美国尼高力仪器公司;真空冷冻干燥机,美国 Thermo Electron 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;HD-3 紫外检测仪,HL-2B 数显恒流泵,DBS-160 电脑全自动收集器,上海沪西分析仪器厂。

### 1.2 原料的预处理

取 1 kg 麦冬粉碎,用 80% 乙醇 80℃ 回流提取 2 h,取药渣除去乙醇,晾干,收集,备用。

### 1.3 麦冬多糖的提取

预处理的麦冬→提取→三氯乙酸除蛋白→离心(4 500 r/min,10 min)→真空旋转浓缩→80% 乙醇沉淀→离心,收集沉淀→冷冻真空干燥得粗多糖。

### 1.4 麦冬多糖的分离纯化

**1.4.1 DEAE-Sephrose FF 离子交换柱层析** 将预处理的 DEAE-Sephrose FF 沿玻璃棒缓慢倒入 2.5 cm × 50 cm 封口层析柱,用 pH 值 5.50,浓度为 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液平衡层析柱。取溶解好的多糖样品缓慢上样。加样完成后先用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液洗脱,再用 0~1.5 mol/L 的氯化钠梯度洗脱。用苯酚硫酸法和分光光度法检测总糖,收集各洗脱峰,4℃ 透析 48 h,真空冷冻干燥。

**1.4.2 Sepharose 凝胶柱分离** 将预处理的 Sepharose 凝胶沿玻璃棒缓慢倒入 1.6 cm × 80 cm 封口层析柱,用去离子水平衡,取溶解好的的经 DEAE-Sephrose FF 分离的多糖样品缓慢上样。用去离子水洗脱,洗脱速度为 0.1 mL/min,并用苯酚-硫酸法和分光光度法检测洗脱峰。

**1.4.3 红外光谱分析** 溴化钾压片,在 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 范围内扫描。

**1.4.4 相对分子质量的测定** 相对分子质量的测定采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)。标准品为葡聚糖,相对分子质量分别为 500 000(T500),110 000(T110),70 000(T70),40 000(T40),20 000(T20),10 000(T10),葡萄糖测定  $V_1$ ,蓝色葡聚糖测定  $V_0$ ,流动相为 0.1 mol/L,流速 0.9 mL/min,检测器为 Waters 2410 示差折光检测器,温度 45℃。

### 1.5 羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )和 DPPH·清除活性<sup>[9]</sup>

**1.5.1  $\cdot\text{OH}$  的清除活性** 水杨酸法测定  $\cdot\text{OH}$  清除能力。在反应体系中加入 0.1 mL 浓度为 9 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$ ,1 mL 浓度为 9 mmol/L 的水杨酸和 0.5 mL 不同的浓度多糖液,最后加入 1 mL 浓度为 8.8 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应,37℃ 水浴 15 min,510 nm 用 0.5 cm 比色皿测定吸光值。以维生素 C( $V_c$ )为阳性对照。

$$y = [A_0 - (A_i - A_{i_0})] / A_0 \times 100 \%$$

式中: $y$ —清除率,%; $A_0$ —以 1 mL 去离子水代替样品溶液时空白对照溶液的吸光值; $A_i$ —加入一定浓度的样品溶液时溶液的吸光值; $A_{i_0}$ —质量浓度为  $i$  时以 1 mL 去离子水代替水杨酸时该浓度样品溶液的

本底吸光值。

**1.5.2 DPPH·的清除活性** 取1 mL DPPH,分别加入1 mL不同多糖液,25 °C 恒温水浴 15 min,525 nm 测吸光值( $A_i$ ),以1 mL 体积分数 50 % 的乙醇代替样品作为空白管( $A_c$ ),以1 mL 体积分数 50 % 的乙醇代替 DPPH 为样品的参比管( $A_j$ ),并以等体积水和体积分数为 50 % 的乙醇混合空白调零。以  $V_c$  为阳性对照。

$$y' = 1 - (A_i - A_j) / A_c \times 100 \%$$

式中: $y'$ —清除率,% ;  $A_i$ —样品管吸光值;  $A_j$ —样品参比管吸光值;  $A_c$ —空白管吸光值。

## 2 结果和分析

### 2.1 麦冬粗多糖的离子交换柱色谱和凝胶柱色谱

提取的麦冬多糖经乙醇沉淀,冷冻干燥后,粗糖的得率为 30.36 %  $\pm$  0.87 %。DEAE-sepharose FF 离子交换柱不破坏多糖的结构和生物活性,同时多糖中含有的基团和数量及类型都各有差异,用不同离子浓度的氯化钠溶液洗脱可洗脱出不同性质的多糖成分。实验中粗多糖(CP)经缓冲液和氯化钠梯度洗脱后分离出了1种中性多糖(NP)和3种酸性多糖(AP1,AP2,AP3),见图1。以往的报道中经 DEAE-Sephrose FF 只能分离出一种酸性糖<sup>[10]</sup>,本实验结果显示经 DEAE-Sephrose FF 可以分离出3种酸性糖。

为检测多糖的纯度,再将 DEAE-Sephrose FF 分离的各多糖组分用 Sepharose 凝胶柱色谱分离,分离结果见图2。凝胶柱色谱结果显示经离子柱色谱分离出的多糖成分基本单一,说明离子柱色谱可以较好的分离麦冬多糖。

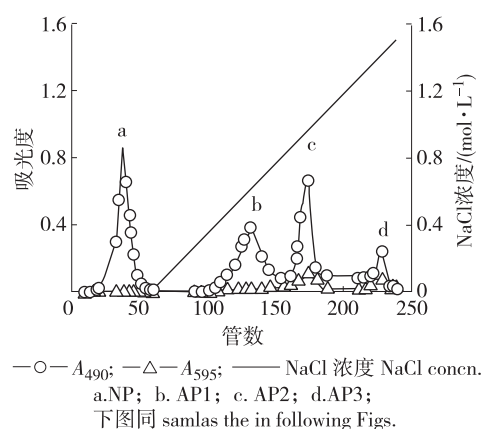


图1 粗多糖的 DEAE-Sephrose FF 洗脱曲线  
Fig.1 Elution pattern of crude polysaccharide on DEAE-Sephrose FF column

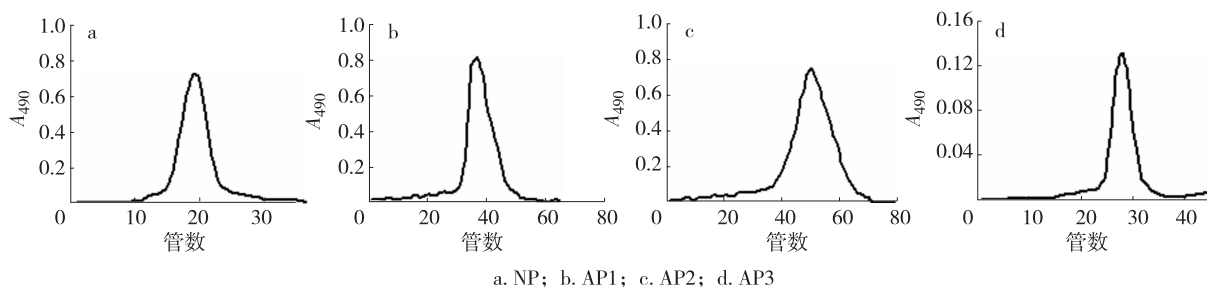


图2 不同糖的凝胶柱色谱

Fig.2 Elution pattern of different polysaccharides on Sepharose FF column

### 2.2 各组分的相对分子质量( $M_r$ )

多糖的纯度与其结构分析和功能评价直接相关。因此,对分离纯化后的多糖进行纯度鉴定也是必要环节。多糖是大分子化合物,它的纯度只代表某一多糖的相似链长的平均分布,通常意义上的纯品是指一定范围的多糖的均一组分。

为进一步证明各组分的纯度,将 DEAE-Sephrose FF 纯化后的多糖进行 HPGPC 实验,结果见表1。实验测得中性糖的纯度达到 96 % 以上,3 种酸性糖的纯度都只有 70 % 多,可能是由于酸性糖的溶解性不好,影响了纯度的测定。以  $M_r$  的对数( $Y$ )为纵坐标,保留时间( $X$ )为横坐标,得到标准曲线。线性回归方程为  $Y = 1.20 - 3.90X$ ,  $R^2 = 0.9993$ ,在相对分子质量 10 000 到 2 000 000 之间呈现良好的线性关系。

表1 不同多糖的分子质量  
Table 1  $M_r$  of various polysaccharides

多糖 polysaccharides	$M_n$	$M_w$	$M_p$
NP	1540	2735	2505
AP-1	84545	124300	127376
AP-2	121632	324652	185091
AP-3	4754	6746	5791

### 2.3 各糖组分的红外光谱图谱

图3为不同组分的红外光谱图。

从图3可看出:各洗脱峰在 $3400\text{ cm}^{-1}$ 附近出现的吸收宽峰是O—H的伸缩振动峰,表明该组多糖存在分子间或分子内的氢键, $2930\text{ cm}^{-1}$ 附近出现的较弱的吸收峰是C—H的伸缩振动, $1550\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是C=O的非对称伸缩振动, $1400\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰是C=O的对称伸缩振动, $1200\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是C—H的变角振动, $1075\sim 1120\text{ cm}^{-1}$ 为O—H的变角振动。b、c、d在 $1550\text{ cm}^{-1}$ 和 $1400\text{ cm}^{-1}$ 附近的强吸收峰,说明组分中均存在羧基。b、c在 $1050$ 和 $1030\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收峰是由糖环C—O—C伸缩振动引起的。a组分在 $815\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收说明组分中可能存在 $\alpha$ -吡喃半乳糖<sup>[11]</sup>, $934.3\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是呋喃环的对称伸缩振动造成的。b组分 $866.3\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是脱氧糖的次甲基所引起的,且可以说明成分中可能存在吡喃糖。c组分中可能存在吡喃糖,d组分中可能存在呋喃糖。

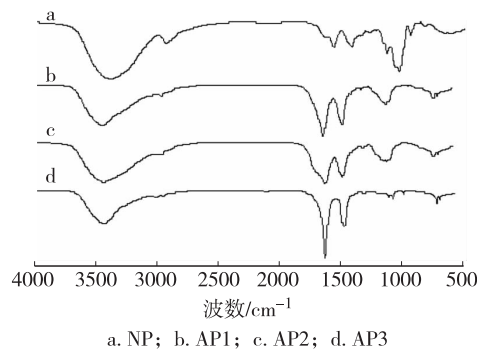


图3 不同组分的红外谱图

Fig. 3 IR spectra of various polysaccharides

### 2.4 麦冬多糖的自由基清除活性

在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种自由基,如 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和脂质过氧化物( $\text{R}\cdot$ 、 $\text{RO}\cdot$ 、 $\text{ROO}\cdot$ 、 $\text{ROOH}$ )等,其中, $\text{O}_2\cdot^-$ 形成最早, $\cdot\text{OH}$ 作用最强, $\text{ROOH}$ 链锁反应循环最持久。因为 $\cdot\text{OH}$ 在其氧原子上有一个未配对电子,夺取电子的能力很强,是仅次于 $\text{F}^-$ 的强氧化剂,其反应活性最强,对机体危害最大,几乎可以和所有的细胞组分(核酸、蛋白质和脂质等)发生反应,筛选、评价具有自由基清除能力的功能性食品和生化药品有着重要意义。本研究从麦冬中提取分离其活性成分多糖,并进行自由基清除能力的比较。

**2.4.1 麦冬多糖的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性** 由图4可以看出相同试验条件下,中性糖的抑制能力基本没变化,酸性糖的抑制能力随浓度的增大而增大,其抑制能力大小为 $\text{AP3} > \text{AP2} > \text{AP1}$ 。其半数抑制质量浓度( $\text{IC}_{50}$ )分别为:AP1  $8.42\text{ g/L}$ ,AP2  $5.73\text{ g/L}$ ,AP3  $1.86\text{ g/L}$ ,CP  $4.93\text{ g/L}$ 。而且AP3具有极高的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性,在浓度为 $5\text{ g/L}$ 时,其抑制力已经与 $\text{V}_c$ 相当。经乙醇沉淀的CP的抑制能力要比AP1和AP2的变化大,这主要可能是由于粗糖中存在其他的活性成分。

**2.4.2 麦冬多糖的DPPH $\cdot$ 清除活性** 从图5可以看出在相同试验条件下,中性糖基本没有DPPH $\cdot$ 清除活性。CP的DPPH $\cdot$ 清除能力要高于纯化后的多糖,这可能是由于CP里还存在其他的活性成分,AP的清除活性随浓度的增大而增大,且随着酸性的增强,活性也增强,这可能与酸性糖含有的硫酸基和羧基有关,其构效关系有待进一步的研究。几种糖对DPPH $\cdot$ 清除能力的 $\text{IC}_{50}$ 分别为:AP1  $22.30\text{ g/L}$ ,AP2  $9.96\text{ g/L}$ ;AP3  $7.70\text{ g/L}$ ;CP  $2.01\text{ g/L}$ 。但相比较来说,麦冬多糖对DPPH $\cdot$ 的清除活性没有对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性强。

## 3 结论

**3.1 麦冬粗多糖经DEAE-Sephrose FF离子交换柱色谱和凝胶柱色谱可得到纯度较高的中性糖(NP)和3种酸性糖(AP1, AP2, AP3),说明DEAE-Sephrose FF可以对麦冬多糖起到较好的分离作用。**

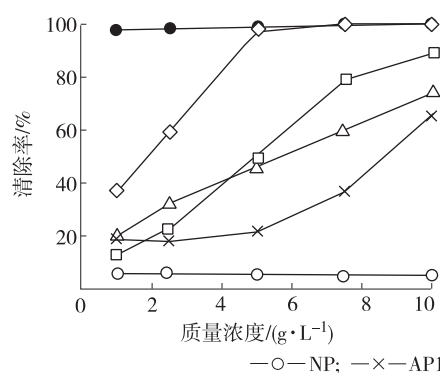


图4 不同多糖组分的·OH清除活性  
Fig.4 Ability of eliminating ·OH by various polysaccharides

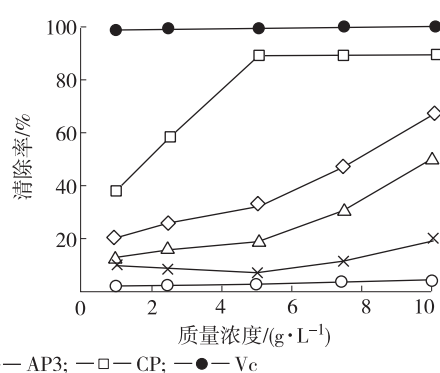


图5 不同糖组分的DPPH·清除活性  
Fig.5 Ability of eliminating DPPH· by various polysaccharides

3.2 体外自由基清除活性测定结果表明各糖组分均具有活性,并且呈一定的量效关系。NP的清除能力不强;3种AP的清除能力为AP3 > AP2 > AP1。AP3具有极高的·OH清除能力。粗多糖(CP)的·OH清除能力随浓度变化大于AP1和AP2, DPPH·清除能力显著高于纯化后的多糖。

#### 参考文献:

- [1] 阴健. 中药现代研究与临床应用[M]. 上海: 中医古籍出版社, 1995: 170.
- [2] 齐建红, 陶贵荣, 郭新军, 等. 麦冬多糖的生物活性研究进展[J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2008, 11(1): 44-46.
- [3] KAKO M, MLURA T, USAMI M, et al. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Ophiopogon tuber* in normal and diabetic mice [J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(5): 785-787.
- [4] LUO Z Y, TANG Y, YOU J L, et al. Protective effect of anisodamine in cultured bovine pulmonary endothelial cell injury induced by oxygen free radicals [J]. Arch Surg, 1992, 12(7): 1204-1208.
- [5] 贺亮, 宋先亮, 殷宁, 等. 川楝子总黄酮和多糖提取及其抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(5): 78-82.
- [6] 熊双丽, 李安林, 金征宇. 猪喉软骨硫酸软骨素体外超氧阴离子自由基清除机理探讨[J]. 食品科学, 2008, 27(2): 362-365.
- [7] 聂凌鸿, 宁正祥. 活性多糖的构效关系[J]. 林产化学与工业, 2003, 12(4): 89-93.
- [8] 董群, 方积年. 多糖在医药领域中的应用[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(10): 649-652.
- [9] 李婕姝, 贾冬英, 姚开, 等. 荸荠皮多糖体外清除自由基活性的研究[J]. 氨基酸和生物源, 2008, 30(4): 7-9.
- [10] 王昭晶, 罗巖辉. 麦冬水溶性多糖 OPA 的分离纯化及其抗氧化活性研究[J]. 现代中药, 2008, 28(5): 77-79.
- [11] 张维杰. 糖复合生化技术[M]. 浙江大学出版社, 1999: 83.