

# 大枣多糖的提取与抗活性氧研究

## Extraction of Jujube Polysaccharide and Its Effect of Cleaning Oxygen Radical

李雪华 龙盛京

Li Xuehua Long Shengjing

(广西医科大学化学教研室 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Dept. of Chemistry, Guangxi Medical Univ., 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要** 为了分析大枣多糖对各类活性氧的清除能力,建立了热水提取-乙醇沉淀-氯仿、正丁醇去蛋白的工艺以提取大枣多糖(JPS),并作了糖的含量测定。用化学发光分析法分别测定提取的JPS对全血化学发光法中的全血白细胞呼吸爆发中产生的活性氧( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ )、连苯三酚自氧化法产生的 $\text{O}_2^-$ (超氧阴离子自由基)、抗坏血酸- $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系产生的 $\cdot\text{OH}$ (羟氧自由基)以及 $\text{H}_2\text{O}_2$ -鲁米诺发光体系中的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的清除作用。结果:大枣多糖的得率为0.848%,总糖含量为37.7%。测定JPS清除 $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 白细胞呼吸爆发中产生的氧自由基活性的AOV值分别为109.48, 9057.9, 312.01, 5.204。结论:JPS具有清除氧自由基的作用,其活性大小与多糖的用量呈正相关。在全血生理环境下,对全血化学发光中活性氧的清除能力最强。

**关键词** 大枣多糖 活性氧 化学发光分析 分离 提取

中图分类号 S 665.1; O 629.12

**Abstract** To isolate and extract jujube polysaccharide from jujube and analyse its effect on cleaning all kinds of oxygen radical, a technique with hot water extract, ethanol sedimentation, chloroform and butanol deproteinization was preformed. Sugar content was also determined. With the help of chemiluminescent analysis, we separately determined JPS cleaning activities to oxygen free radicals of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  in whole blood from Chemiluminescence,  $\text{O}_2^-$  from Pyrogallol autooxidation method,  $\cdot\text{OH}$  from ascorbic acid  $\text{Cu}^{2+}$  -  $\text{H}_2\text{O}_2$  system,  $\text{H}_2\text{O}_2$  from Hydrogen peroxide - luminous system. The extraction ratio was 0.848%. Total sugar content was 37.7%. AOV was 109.48 for  $\cdot\text{OH}$ , 9057.9 for  $\text{O}_2^-$ , 312.01, for  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and 5.204 for oxygen free radicals from phagocytic of leucocyte in whole blood chemiluminescence. The test showed that JPS could weed out oxygen radical, and its effect increased with amount of suger increasing. JPS has strongest ability in clearing up oxygen free radical from chemiluminescence in whole blood under the circumstance of whole blood physiology.

**Key words** jujube polysaccharide, oxygen free radical, chemiluminescent, isolation, extract

人体在正常生理作用下产生的超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^-$ 会被超氧化物歧化酶SOD作用生成 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,而 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可迅速被细胞内的过氧化酶除去,当这些酶不足时或者生成 $\text{O}_2^-$ 过多,特别是在一些如电离辐射、紫外线或某些药物作用下在体内产生大量 $\text{O}_2^-$ ,且在体内无法及时得到去除时, $\text{H}_2\text{O}_2$ 可与另一 $\text{O}_2^-$ 在变价铁离子催化下,迅速生成氧化性更强的氢氧自由基 $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{OH}$ 几乎可与细胞内的一切有机化合物反应,引起系列连锁反应,从而破坏核酸、蛋白质、氨基酸脂类化合物,进而损伤细胞的结构与功能。从整

个自由基形成及对细胞的损伤过程可看出,体内的活性氧物质不外乎为 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 。如果能找到最佳抗氧化剂来清除或阻断这些活性氧的生成,机体就不会造成损伤<sup>[1]</sup>。近年来,随着人们对多糖抗肿瘤、抗衰老,提高机体特异及非特异性免疫研究的加强,原先在中草药中被忽视的多糖成分已受到刮目相看,但对多糖的研究大多停留在动物的药理实验阶段,特别是对大枣多糖的抗衰抗氧化作用未见报道。本文通过从大枣中提取大枣多糖,利用化学发光法通过体外实验,研究大枣多糖对各种活性氧的清除作用,为大枣多糖在抗衰抗氧化作用方面提供科学依据。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 材料 沧州大枣。

1.2 试剂 鲁米诺为法国 Merck-Schuchrat 公司的产品; 酵母多糖为 Sigma 公司的产品; 酵母浸膏为生化试剂; 双氧水 连苯三酚、碳酸钠、碳酸氢钠、抗坏血酸、硫酸铜、磷酸氢钠、葡萄糖等均为国产分析纯试剂; 所用水均为双蒸水。

1.3 仪器 DG3030 发光光度计 (南京华东电子管厂生产)。

## 2 实验方法

2.1 大枣多糖的提取 取 500 g 洗净大枣于 2 l 蒸馏水中煮沸 4 h, 过滤, 滤渣用同法水提 4 次, 合并水提液。减压浓缩。加 4 倍于滤渣体积的 95% 乙醇, 静置过夜。分出沉淀物溶于 200 ml 蒸馏水中, 并于流动水中用玻璃纸透析 4 d 除去小分子杂质。透析液减压浓缩, 再醇沉。水溶, 醇沉, 直至沉淀物中大枣色素提取完为止。将沉淀物用相对于沉淀物体积的 1/5 体积氯仿与 1/25 体积正丁醇去除蛋白 5 次。将去蛋白后的粗多糖液再次醇沉, 将沉淀溶于蒸馏水中, 再于蒸馏水中透析 5 d 减压浓缩。再次醇沉, 得灰白色沉淀的大枣多糖 (JPS), 经硫酸-苯酚颜色反应为棕红色, 与硫酸-萘酚试剂反应呈深绿色证明所提取物为多糖。

以下抗活性氧活性测定均以此粗多糖 JPS 作供试品。

### 2.2 分析

2.2.1 总糖含量测定采用硫酸-苯酚法<sup>[2]</sup>。

2.2.2 0.5% JPS 对碱性连苯三酚体系 (非酶体系) 产生的  $O_2^-$  的清除作用的测定方法参照文献 [3] 的方法。在测定管中依次加入 pH 值 10.16, 0.11  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  配制的 5 mmol/L 鲁米诺 800  $\mu$ l, 加入不同体积的 0.5% 的大枣多糖, 混匀后置于仪器测定室中, 于 30°C 加入 6 mmol/L 连苯三酚 (用 10 mmol/L HCL 配制) 100  $\mu$ l, 启动反应, 测 5 s 内发光强度平均值。每个样品取三种不同体积, 每种体积平均测定 3 次, 取平均值; 以双蒸水作空白对照; 按下式计算清除率:

$$\text{清除率} (\%) = \frac{\text{空白对照值} - \text{样品值}}{\text{空白对照值}} \times 100\%$$

结果以清除率为 50% 时, 所需样品的量  $C_{50}$  表示。

2.2.3 0.5% JPS 清除  $H_2O_2$  的测定方法参照文献 [4] 略加改进。依次在测定管中加入 pH 值 10.77 的  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲液 500  $\mu$ l, 加入 10 mmol/L

$H_2O_2$  100  $\mu$ l, 加入不同  $\mu$ l 数的 0.5% JPS 供试液 (空白不加), 混匀后置于发光仪中于 30°C 加入 5 mmol/L 鲁米诺与 10 mmol/L CTMAB (溴代十六烷基三甲胺) 1:1 的混合液 500  $\mu$ l 启动反应, 延时 15 s, 测定 10 s 内发光强度的平均值。每个样品平行做 3 次, 取平均值, 按下式计算相对发光抑制率:

$$\text{发光抑制率} \% = \frac{\text{空白对照值} - \text{样品值}}{\text{空白对照值}} \times 100\%$$

结果以抑制率为 50% 时, 所需样品的量  $C_{50}$  表示。

2.2.4 0.5% JPS 清除羟氧自由基  $OH$  的测定方法参照文献 [5] 略加改进。1.8 mmol/L VitC 用 500 mmol/L 磷酸钠缓冲液配制, 其余试剂改用双蒸水配制。使用时所有试剂, 供试液均于 37°C 恒温水浴箱中保温。在测定管中加入 1.8 mmol/L VitC 0.2 ml, 加 1.8 mmol/L  $CuSO_4$  0.4 ml, 加 500 mg/ml 酵母 0.2 ml, 加 0.2 mol/L pH 值 6.2 磷酸钠缓冲液 0.6 ml 启动反应, 测定 10 s 内发光强度的总值。每样品平行测定 3 次, 取平均值, 按下式计算清除率。结果以清除率为 50% 时, 所需样品的量  $C_{50}$  表示。

2.2.5 0.5% JPS 对全血化学发光强度影响的测定方法参照文献 [6] 的方法略加改进。选用 Wistar 大鼠, 后腿注射 0.15 ml 甲醛液, 使之致炎。12 h 后, 双腿水肿, 眼球取血 5.4 ml, 抗凝血以 1:8 的比例用 Hanks 液稀释, 得 43 ml 应用液, 摇匀放入冰箱内静置 1 h。在测定管中加入 Hanks 液稀释的血样 0.9 ml, 加 50  $\mu$ l 鲁米诺 (1 mmol/L) 37°C 恒温水浴 10 min, 加不同量的供试液, 恒温 37°C 10 min, 加 5 mg/ml 酵母多糖 100  $\mu$ l 后, 恒温水浴 10 min, 置发光仪器室测定 60 s 内发光强度积分值。样品平行测定 3 次, 取平均值, 按 (2) 式计算发光抑制率。结果以清除率为 50% 时, 所需样品的量  $C_{50}$  表示。

## 3 结果

为了更好地进行相关比较, 我们以生物体内公认的抗氧化剂 VitC 作为比较标准 (抗坏血酸 -  $Cu^{2+}$  -  $H_2O_2$  体系以硫脲作为比较标准), 按下式计算大枣多糖对各测定体系的抗氧化值 AOV

$$AOV = \frac{SI_{测} - SI_{标}}{SI_{标}}$$

其中  $SI_{测}$  = 测定原液  $C_{50}$   $\times$  固体  $C_{50}$ ;  $SI_{标}$  = 标准原液  $C_{50}$   $\times$  标准固体  $C_{50}$

规定 VitC (或硫脲) 的 AOV 值为零。当  $AOV < 0$  时, 说明样品抑制能力大于标准品 VitC (或硫脲), 反之亦然, 与标准品相比, 正值越大, 抑制能力就越小。

(1) 清除  $O_2^-$  自由基活性的结果表明, 碱性连苯

三酚自氧化体系的发光强度与样品量成负相关, 其  $C_{E0}$  为 1.459 mg, AOV 为 9057.9 清除  $O_2^-$  活性的结果表明, 加入 0.5% JPS 25 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 400 $\mu$ l 时, 清除率分别为 10.858%, 34.194%, 54.442%, 随着大枣多糖量的增加其清除率上升。阳性对照: 加入 0.5% VitC 1 $\mu$ l, 3 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 清除率分别为 14.83%, 51.39%, 81.18%,  $C_{E0}$  为 0.0153 mg。

(2) 清除  $\cdot OH$  自由基活性的结果表明, 抗坏血酸  $-Cu^{2+} -H_2O_2$  体系发光强度与样品量成负相关, 其  $C_{E0}$  为 4.814 mg, AOV 为 109.48 加入 0.5% JPS 200 $\mu$ l, 500 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l, 抑制率分别为 9.83%, 24.41%, 52.317%, 抑制率与 JPS 量呈正相关关系。阳性对照: 加入 0.5% 硫脲 10 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 其抑制率分别为 7.324%, 28.245%, 54.389%,  $C_{E0}$  为 0.458

(3) 清除  $H_2O_2$  自由基活性的结果表明,  $H_2O_2$  鲁米诺发光体系发光强度与样品量成负相关关系, 其  $C_{E0}$  为 0.189 mg, AOV 为 312.01 加入 0.5% JPS 10 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 其抑制率分别为 30.923%, 59.501%, 89.875%, 随着 JPS 量的增加其抑制率逐渐上升。阳性对照: 加入 0.5% VitC 1 $\mu$ l, 3 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 清除率分别为 14.245%, 62.236%, 94.074%,  $C_{E0}$  为 0.0107 mg

(4) 清除全血化学发光中白细胞呼吸爆发产生的  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$   $H_2O_2$  自由基活性的结果表明, 全血化学发光体系发光强度与样品量成负相关关系, 其  $C_{E0}$  为 0.473 mg, AOV 为 5.204 加入 0.5% JPS 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l 时, 其抑制率分别为 36.013%, 52.077%, 65.46%, 随着 JPS 量的增加其抑制率逐渐上升。阳性对照: 加入 0.5% VitC 10 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l 清除率分别为 25.74%, 52.33%, 70.25%,  $C_{E0}$  为 0.190 mg

从以上的红枣多糖对各个体系产生的活性氧的清除能力结果可知, 0.5% 大枣多糖对各体系产生的活性氧均具有清除作用, 且所加入的供试液量与清除率具有量效关系。从其相量及所推出的  $C_{E0}$  (即当清除率为 50% 时, 所需样品的量) 来看, 供试液加入的量愈大, 其清除活性氧的能力就愈大。

从以上各体系的 AOV 值可看出, 大枣多糖在全血化学发光体系中, 即相当于在生物体的生理环境条件下, 对活性氧的清除能力最强; 其次为对  $\cdot OH$  的清除作用较强, 大枣多糖对连苯三酚法中  $O_2^-$  的清除能力最弱。大枣多糖对这几个体系产生的活性氧的清除能力顺序为: 全血化学发光中 ( $O_2^-$ ,  $\cdot OH$   $H_2O_2$ ) >  $H_2O_2$  >  $O_2^-$  >  $\cdot OH$  (AOV 值分别为: 5.204 110.48

312.01 9057.9) 另从标准阳性对照品 VitC 的  $C_{E0}$  看, 其清除活性氧的能力顺序为  $H_2O_2$  >  $O_2^-$  > ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$   $\cdot OH$ ), 其  $C_{E0}$  分别为 2.14 23.052 7.173 说明 VitC 与大枣多糖的清除能力不同, 其清除  $H_2O_2$  的能力最强, 而清除全血化学发光中活性氧的能力最弱, 正好与大枣多糖相反。

## 4 讨论

本文利用的几个产生活性氧体系衡量大枣多糖对各种活性氧的清除能力的大小的测定原理是大同小异的, 仅仅是所产生不同类型活性氧的机制不同而已。  $H_2O_2$  鲁米诺体系是在弱碱性条件下,  $H_2O_2$  氧化鲁米诺而发光; 抗坏血酸  $Cu^{2+} -H_2O_2$  体系为, 抗坏血酸首先将  $Cu^{2+}$  还原为  $Cu^+$ ,  $Cu^+$  可以将  $H_2O_2$  还原为羟离子和羟自由基, 羟自由基攻击酵母, 从酵母壁中获取电子, 同时伴随化学发光; 在碱性条件下, 碱性连苯三酚能迅速自氧化释放出活性氧  $O_2^-$ , 所生成的  $O_2^-$  能与鲁米诺反应立即发光; 全血化学发光是利用吞噬细胞 (PC) 在吞噬时出现呼吸爆发, 而产生多种活性氧, 包括  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  游离羟基  $\cdot OH$  单线态  $^1O_2$ , 这些活性氧与细胞内某些可激发物质发生反应, 产生化学发光, 以鲁米诺来增强其化学发光。以上几个体系所产生的化学发光的强度与这些活性氧的量成正比。在这些体系中加入供试液, 若供试液能清除活性氧, 则体系的发光强度下降, 这样可用发光抑制率的大小表示供试剂清除活性氧的程度。

从本文的研究结果看, 大枣多糖对各种活性氧均具有抗氧化作用, 原因是多糖分子上均具有还原性的半缩醛羟基, 可与氧化剂-活性氧发生氧化还原反应。本文的研究还显示, 大枣多糖在全血化学发光中对活性氧的清除能力最强。这可能是大枣多糖与机体维系自由基平衡的物质共同协调发挥作用, 从而发挥了大枣多糖的抗氧化能力。提示大枣多糖特别适合于人体血液系统中的抗氧化反应的首选物质。其次, 大枣多糖对  $\cdot OH$  的清除能力也较强, 可利用大枣多糖来清除体内的  $\cdot OH$ 。另外, 从大枣多糖与 VitC 对活性氧的抗氧化作用效果不同 (大枣多糖清除全血化学发光中的活性氧最强, 而 VitC 反而最弱; VitC 清除  $O_2^-$  最强) 可知, 同一药物在不同的反应环境下会有不同的抗氧化效力, 不同药物在相同反应条件下显示不同的作用能力, 所以在使用抗氧化物质时, 宜让其处于最佳的反应环境以发挥其最大的抗氧化效力。

(下转第 63 页 Continue on page 63)

## 参考文献

- 1 Carnal N M, Black C C. Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase a new glycolytic enzyme in pineapple. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 86: 20~26.
- 2 Sarbulare D C, Anderson R L. Inorganic pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in mung bean and its activation by D-fructose 1, 6-bisphosphate and D-glucose 1, 6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 100: 1423~1429.
- 3 Van Schaftingen E et al. A kinetic study of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Eur J Biochem*, 1982, 129: 191~195.
- 4 李林, 潘力, 许根俊. 马铃薯块茎焦磷酸: 果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶的初速度动力学. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22 (3): 277~283.
- 5 Yan Tyan-Fuh L, Tao M. Multiple forms of pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. *J Biol Chem*, 1984, 259: 5087~5092.
- 6 Kombrink E, Kruger N J, Beevers H. Kinetic properties of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean

- endosperm. *Plant Physiol*, 1984, 74: 395~401.
- 7 Frederik C, Botha J G, Chris S et al. Isolation and characterization of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from cucumber seeds. *Plant Cell Physiol*, 1986, 7: 1285~1295.
- 8 吴敏贤, 查静娟, 施教耐. 玉米叶片依赖焦磷酸的磷酸果糖激酶两种分子型动力学特性的研究. *植物生理学报*, 1986, 12 (4): 342~354.
- 9 胡志元, 查静娟, 吴敏贤等. 番茄果实中焦磷酸: D-果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶两种酶型的分离纯化及其特性. *植物生理学报*, 1992, 18 (2): 151~159.
- 10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 73: 248~254.
- 11 Black C C, Smyth D A, Wu M X. Pyrophosphate-dependent glycolysis and regulation by fructose-2, 6-bisphosphate in plants. In: Ludden P W, Burris J E. Nitrogen fixation and CO<sub>2</sub> metabolism. Elsevier Science Publishing Co. 1985, 361~370.
- 12 李霁, 张洪渊. PFP的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 1995, 22 (4): 307~312.
- 13 Carnal N M, Black C C. Kinetic characteristics of pineapple pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. *Plant Physiol*, 1983, 72: 124~128.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 56页 Continue from page 56)

## 参考文献

- 1 许士凯. 抗衰老药理学. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 40.
- 2 Dubotis M, Gilles K A, Hamilton J K et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal Chem*, 1956, 28: 350.

- 3 李雪华, 龙盛京. 三种根茎类食物抗氧化自由基的比较研究. *食品科学*, 1998, 19 (2): 13.
- 4 龙盛京, 秦爱娟. 化学发光分析法研究广西茶叶水提取物抗活性氧的作用. *广西医学院学报*, 1992, 9 (3): 1.
- 5 陈季武, 胡天喜. 测定<sup>•</sup>OH产生与清除的化学发光体系. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 19 (2): 136.
- 6 徐孝仪, 程松高. 人全血化学发光技术及其临床应用. *中国免疫学杂志*, 1986, 2 (1): 34.

(责任编辑: 蒋汉明)