

实验简报

## 沙棘果皮多糖清除氧自由基的活性研究

张海容

(山西省忻州师范学院生化分析技术研究所 忻州 034000)

**摘要** 沙棘(*Hippophae rhamnoides*)果皮经80℃恒温水浴提取,乙醇沉淀得粗多糖。Sevag法去蛋白,经50%和70%乙醇分级,得3种级分沙棘多糖H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>和H<sub>3</sub>;以Fenton反应,即H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>/水杨酸为·OH产生和检测体系;以邻苯三酚/EDTA/Tris-HCl为O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生体系,对沙棘多糖H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>和H<sub>3</sub>进行抗氧化自由基活性研究。结果表明,沙棘多糖对·OH和O<sub>2</sub><sup>-</sup>有较显著的清除能力。不同级分多糖H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>和H<sub>3</sub>浓度达200 μg·mL<sup>-1</sup>时,对·OH的清除率分别为44.9%、49.0%和26.4%,抗O<sub>2</sub><sup>-</sup>活性分别为36.9%、15.4%和23.1%。多糖质量浓度增大时,两种自由基清除率增加,且呈量效关系。

**关键词** 沙棘, 多糖, 超氧阴离子, 羟自由基, 自由基清除率

## Study of the Scavenging Radical Activities of Polysaccharide of *Hippophae rhamnoides* Fruit Peel

ZHANG Hai-Rong

(Institute of Biochemical Analysis, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000)

**Abstract** To study the scavenging radical activities of polysaccharide of *Hippophae rhamnoides* fruit peel, crude polysaccharide was isolated from the fruit peel of *H. rhamnoides* with hot water at 80℃, then precipitated by ethanol, and the protein in the extracts was removed by the Sevag method. The fractions of H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub> of *H. rhamnoides* polysaccharide were obtained by adding 50% and 70% ethanol, respectively. The Fenton reaction was used to produce and detect hydroxyl radicals (·OH), and pyrogallol/EDTA/Tris-HCl was used to produce and detect superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>). *H. rhamnoides* polysaccharides had a strong scavenging capacity for both ·OH and O<sub>2</sub><sup>-</sup> oxygen radicals. When the fractional concentrations of H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub> were at 200 μg·mL<sup>-1</sup>, their scavenging rates to hydroxyl radicals were 44.9%, 49.0%, and 26.4%, respectively, and to superoxide anion 36.9%, 15.4%, and 23.1%, respectively. The scavenging rates to oxygen radicals increased with increasing the polysaccharide concentration; there appeared a proportional relation between effect and quantity.

**Key words** *Hippophae rhamnoides*, Polysaccharide, Superoxide anion free radical, Hydroxyl radicals, Free radical scavenging rate

山西省归国留学基金(2004-67)资助。

通讯作者。Author for correspondence. E-mail: [biochem@xztc.edu.cn](mailto:biochem@xztc.edu.cn)

收稿日期: 2005-01-18 接受日期: 2005-04-30 责任编辑: 于昕

氧自由基主要指超氧阴离子( $O_2^-$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、单线态氧( $^1O_2$ )和过氧化氢( $H_2O_2$ )一类化学性质活泼、半衰期极短、能夺取其他敏感分子电子的氧化剂。氧自由基过多的有害作用,表现在可使许多生物大分子如核酸、蛋白质、多糖及膜多聚不饱和脂肪酸发生过氧化物反应,使生物大分子出现交链或断裂,引起细胞结构和功能的损害(雷学军, 1997; Mathé, 1999; Magnani *et al.*, 2000; Thomas, 2000)。氧自由基的这些毒性反应被认为与炎症、自身免疫、肿瘤、心脑血管缺血和衰老等疾病的成因直接有关。因此,寻找可以用于临床、能够清除活性氧自由基的天然药物有极其重要的价值。

沙棘(*Hippochase rhamnoides*)属胡秃子科植物,分布在欧亚大陆的温带、寒带及亚热带高山区。我国的东北、华北、西北和西南等地区是沙棘属植物的主要分布区。沙棘作为药材含有多种活性物质,是我国古代藏医和蒙医用来治病的常用药。我国早在唐代的《月王药珍》和公元8世纪的《四部医典》就详细地记载了它的药性,它具有祛痰、利肺、养胃、健脾、活血等生理功效。现代药理证实,沙棘可以治疗多种疾病,并具有抗疲劳、增强机体免疫力、延缓衰老等作用(徐铭渔等, 1994)。目前,沙棘已被广泛用于食品、化妆品、保健品和医药等多个领域。多糖为天然高分子化合物,存在于各种植物、动物和微生物组织中,具有许多重要的生理功能。陈玉香等(1997)研究发现,沙棘多糖对柯萨奇病毒B<sub>3</sub>有明显的抑制作用,但有关沙棘多糖清除氧自由基( $\cdot OH$ 、 $O_2^-$ )活性未见报道。本文尝试从沙棘果皮中提取多糖,经乙醇分级后,研究它们对 $\cdot OH$ 、 $O_2^-$ 的清除能力,为更好地研究沙棘药理作用机理、扩大沙棘资源的综合利用提供依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与仪器

沙棘果皮由山西岢岚县酸溜溜厂提供(10月下旬)。

DKZ电热恒温振荡水槽,上海一恒实验仪器有限公司; LD4-2型离心机,北京医用离心机厂; 722型光栅可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂; FTIR-8400傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 沙棘多糖的提取工艺** 粗多糖的提取:称500 g沙棘果皮,用95%乙醇1 000 mL在50℃恒温水浴18小时脱脂,倾倒入乙醇浸泡液,沥干;用80℃恒温水浴提取2次(沙棘果皮:水=1:6),每次8小时,合并提取液,离心除杂,浓缩;用95%乙醇沉淀;纯化:粗多糖用Sevag法(氯仿:正丁醇=1:4)去蛋白多次,直至紫外光谱检不出蛋白质为止;真空干燥,得去蛋白沙棘多糖1.3608 g,样品呈褐黄色。沙棘多糖分级:将粗多糖配成1%( $g \cdot mL^{-1}$ )溶液,80℃恒温水浴加热1小时,静置,去除不溶物,上清液用于乙醇分级。乙醇终浓度达50%时离心,沉淀即为H<sub>1</sub>;乙醇浓度达70%时离心,沉淀即为H<sub>2</sub>;上清液浓缩,沉淀即H<sub>3</sub>。

**1.2.2 沙棘多糖清除羟自由基的测定** 实验中,在10 mL比色管中依次加入7.5 mmol·L<sup>-1</sup>硫酸亚铁铵1 mL, 7.5 mmol·L<sup>-1</sup>水杨酸1 mL, 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mL, Tris-HCl缓冲液2 mL,最后分别加入一定量1 000 μg·mL<sup>-1</sup>沙棘多糖H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>和H<sub>3</sub>,室温静置2小时,在722型光栅可见分光光度计测吸光值。清除率(尹学琼等, 2002)按下式进行计算:

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

式中,  $A_{\text{样品}}$ 为加入多糖后的羟自由基体系的吸光度值;  $A_{\text{对照}}$ 为不加多糖时羟自由基体系的吸光度值。

**1.2.3 沙棘多糖对超氧离子自由基抑制率的测定** 邻苯三酚在碱性条件下,能迅速自氧

化,生成一系列在400~425 nm处有强烈光吸收的中间产物(许申鸿等, 2001),同时释放出 $O_2^{\cdot-}$ 。在5 mL pH8.34 0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲溶液(含2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA)中,加入1 mL 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>邻苯三酚,2次水定容至刻度。每隔30秒记录一次吸光度 $A_{420}$ 值,时间为4分钟。根据邻苯三酚自氧化速率计算抑制率(许申鸿等, 2001):

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{A_1/t - A_2/t}{A_1/t} \times 100\%$$

式中,  $A_1/t$ 为邻苯三酚自氧化反应速率;  $A_2/t$ 为加入多糖后邻苯三酚自氧化反应速率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 沙棘多糖的红外光谱特征

沙棘多糖 $H_1$ 、 $H_2$ 和 $H_3$ 均呈现多糖的特征吸收(表1),且在833 cm<sup>-1</sup>附近有明显的吸收, $C_1$ 构型系 $\alpha$ -D-吡喃型葡萄糖。

### 2.2 不同沙棘多糖对氧自由基清除率影响的测定

按照实验方法1.2.2和1.2.3节,分别加入

多糖 $H_1$ 、 $H_2$ 和 $H_3$ (1 mg·mL<sup>-1</sup>)各2 mL,测体系的吸光值或 $A/t$ ,结果见表2。

结果表明,沙棘多糖 $H_1$ 、 $H_2$ 和 $H_3$ 对·OH、 $O_2^{\cdot-}$ 均有一定的清除能力,且在相同多糖浓度条件下,3种多糖对·OH清除率优于对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率。本文所采用的自由基模型体系产生的·OH和 $O_2^{\cdot-}$ 远大于生物体内自由基的浓度,因此,沙棘多糖是一种良好的自由基清除剂,这与临床实践中沙棘多糖具有增强免疫功能、抗肿瘤和抗感染活性的结论相一致。 $H_3$ 对·OH清除率明显低于 $H_1$ 和 $H_2$ ,可能由于在分级纯化处理过程中,许多原本与多糖结合的糖肽、蛋白质成分被除去了,而这些成分一般具有较强的抗氧化性(李贵荣和杨胜国, 2001)。 $H_1$ 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力则优于 $H_2$ 和 $H_3$ 。

### 2.3 质量浓度对沙棘多糖清除·OH、 $O_2^{\cdot-}$ 的影响

分别考察了3种沙棘多糖在0~300  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>及0~600  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>范围内对·OH、 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的清除率,实验结果见图1和图2。由图1易知,随多糖浓度增加,3种沙棘多糖清

表1 3种沙棘多糖的红外光谱数据(cm<sup>-1</sup>)

Table 1 IR spectral data of three kinds of *Hippophae rhamnoides* polysaccharides

Groups	Characteristic peaks (cm <sup>-1</sup> )	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>
O-H stretching vibration	3 600 - 3 200	3431	3410	3425
C-H stretching vibration	3 000 - 2 800	2854	/	2849
C=C framework vibration of benzene ring	1 900 - 1 650	1633	1626	1630
C-H bending vibration	1 400 - 1 200	1400	1404	1410
C-O stretching vibration	1 200 - 1 000	1010	1033	1017
$\alpha$ -D- glucopyranose	855 - 833	833	838	834
Isomeric pyranose symmetrical stretch	766 $\pm$ 10	769	/	/

表2 3种沙棘多糖清除氧自由基活性的测定

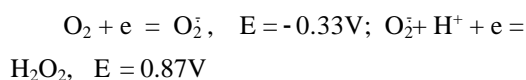
Table 2 Determining of scavenging ability of  $O_2^{\cdot-}$  Free radical with three kinds of *Hippophae rhamnoides* polysaccharides

<i>Hippophae rhamnoides</i> polysaccharides	Control	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>
Absorbency(A)	0.704	0.388	0.356	0.518
·OH scavenging rate(%)	0	44.9	49.0	26.4
$A/t$	0.013	0.0082	0.011	0.010
$O_2^{\cdot-}$ scavenging rate(%)	0	36.9	15.4	23.1

除·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>的活性增加,呈现一定的正相关性。如果用清除率达50%时所需抗氧化剂浓度作为多糖清除氧自由基活性判断依据,则对·OH自由基清除率IC<sub>50%</sub>大小顺序为:H<sub>2</sub>>H<sub>1</sub>>H<sub>3</sub>,对O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基清除率的顺序为:H<sub>1</sub>>H<sub>3</sub>>H<sub>2</sub>。

### 3 作用机理探讨

众所周知,在生命活动的新陈代谢过程中,·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>及脂自由基(ROO·)是3种有代表性的自由基,其中·OH氧化能力很强,是仅次于氟的一种非选择性氧化剂。O<sub>2</sub><sup>-</sup>极不稳定,其g\*2p反键轨道中有一个未成对的电子,它既可以得到电子,又可以失去电子,还可与有单电子的化合物结合。中性介质中,O<sub>2</sub><sup>-</sup>与O<sub>2</sub>及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的电极电势如下:



抗氧化作用指能够使自由基的氧化作用减缓或停止自由基氧化的各种过程,它包括:1)自由基的清除和阻止增殖;2)酶水解脂质中酯键以除去过氧化脂肪酸;3)过渡金属离子的阻断;4)酶催化过氧化物的还原。常见的抗氧化剂醛、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>、胡萝卜素及黄酮类化合

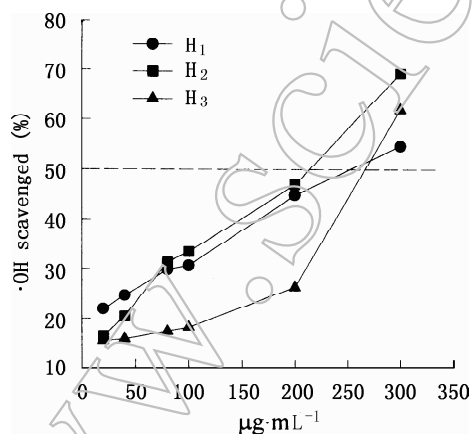


图1 浓度对沙棘多糖清除·OH活性的影响  
Fig. 1 Effect of concentrations of *Hippophae rhamnoides* polysaccharide on the activity of scavenging ·OH

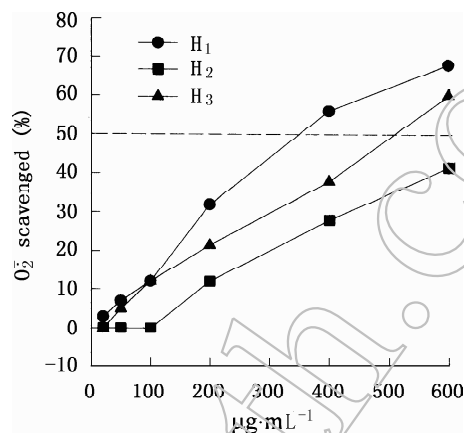
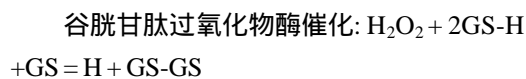
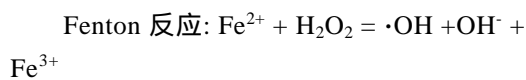
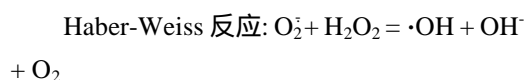
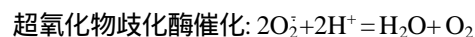
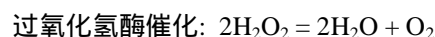


图2 浓度对沙棘多糖清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>活性的影响  
Fig. 2 Effect of concentrations of *Hippophae rhamnoides* polysaccharide on the activity of scavenging O<sub>2</sub><sup>-</sup>

物易被O<sub>2</sub>氧化(Thomas, 2000)。沙棘多糖具有清除·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>的活性,说明多糖中的半缩醛还原基团、伯仲羟基等与氧自由基有明显的化学作用,此结论对临床药物筛选、抗衰老、抗肿瘤、防病治病有重要的参考价值。值得指出的是,生物体内在各种酶存在的条件下,·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>间可以相互转化,已知的化学反应如:



·OH的浓度至少受O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和金属离子3个因素的影响;反过来,O<sub>2</sub><sup>-</sup>的存在与其他氧化还原剂、介质酸碱性有密切的关系(邵勇和宋俊峰, 2001)。尽管人们无法模拟生物体内各种生物酶和活性氧自由基的浓度大小及真实的反应机理,选择不同抗氧化剂清除氧自由基、保护细胞和组织免受损伤或减轻其受损

程度, 无疑是抗衰老药理学、生物医学领域 充满希望的一个研究课题。

### 参 考 文 献

- 陈玉香, 张丽平, 梁忠岩, 苗春艳, 张翼伸 (1997) 沙棘果水溶性多糖  $H_n$  的分离纯化与抗病毒研究. 东北师范大学学报(自然科学版), **29(4)**: 74-77
- 雷学军 (1997) 抗氧化自由基的天然药物. 日用化学工业, **27(5)**: 35-39
- 李贵荣, 杨胜圆 (2001) 党参多糖的提取及对活性氧自由基的清除作用. 化学世界, **42**: 421-434
- 邵 勇, 宋俊峰 (2001) 超氧阴离子  $O_2^-$ . 化学通报, **64**: 158-163
- 徐铭渔, 孙小宣, 童文新 (1994) 沙棘的医药开发和研究. 沙棘, **7(1)**: 32-40
- 许申鸿, 杭瑚, 李运平 (2001) 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进. 化学通报, **64**: 516-519
- 尹学琼, 林强, 张歧, 杨丽春 (2002) 低聚壳聚糖及其金属配合物的抗  $O_2^-$  活性研究. 应用化学, **19**: 325-328
- Mathé G (1999) Red wine, green tea and vitamins: do their antioxidants play a role in immunologic protection against cancer or even AIDS? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **53**: 165-167
- Magnani L, Gaydou EM, Hubaud JC (2000) Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*, **411**: 209-216
- Thomas MJ (2000) The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, **16**: 716-718

## 《植物学通报》征稿启事

《植物学通报》是中国科学院植物研究所和中国植物学会主办, 科学出版社出版的高级学术刊物, 生物学、农学、农作物类核心期刊, 目前已被国内外多家数据库收录。期刊定位是以中文(英文摘要)及时、快速和全面地反映我国植物科学及其相关学科研究的最新成果。根据《中国学术期刊综合评价数据库》5716种源期刊的统计, 《植物学通报》2003年载文量97, 总被引频次742, 影响因子0.6471。

目前, 本刊已全文同步上网, 免费全文下载。从2006年第1期开始, 本刊稿件的纸版平均发表周期将缩短为8个月。

1. 征稿范围: 植物学科各领域有创新的原始研究论文和快讯, 以及植物学热点问题和重要领域国际最新进展的综述。刊登范围为植物分子与发育生物学, 系统与进化植物学, 植物生态与环境生物学等相关领域。

2. 稿件要求: 请以中文投稿。具体格式体例请参考我刊网站要求及最新一期刊物。

3. 投稿方式: 实行网上投稿。请登录我刊网站([www.chinbullbotany.com](http://www.chinbullbotany.com)), 在作者区注册投稿。如投稿成功3日后未收到回执的, 请及时查询, 以免遗漏。E-mail address: [cbb@ibcas.ac.cn](mailto:cbb@ibcas.ac.cn)

4. 审稿流程: 收到稿件后由编辑部严格初审。对于学术水平和写作格式未达到我刊要求的及时退还。送审合格的稿件经编辑加工后退给作者修改定稿。重要论文优先发表。排版后将清样寄给作者。

5. 稿件费用: 稿件发表后寄给作者样刊1本, 精美抽印本30份, 稿酬每面20元。

以上措施自2005年11月1日起实行, 未尽事宜另行通知。

《植物学通报》编辑部

2005年10月