

文章编号: 1009 - 0568(2007)01 - 0001 - 03

甘草多糖清除自由基活性的研究

杨玲¹ 汪河滨² 罗锋²

(1 塔里木大学文理学院, 新疆 阿拉尔 843300)

(2 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要 本文利用超声-微波协同萃取法提取甘草多糖,并用分光光度法检测甘草多糖对 DPPH 自由基、羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除能力。结果表明,甘草多糖溶液对 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 均具有较好的清除作用。

关键词 甘草多糖;DPPH 自由基;羟自由基($\cdot\text{OH}$);超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Study on Scavenging Free Radical Activity with Polysaccharides in Glycyrrhiza Uralensis Fisch

Yang Ling¹ Wang Hebin² Luo Feng²

(1 College of Arts and Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

(2 Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resource in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Groups, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract The study uses ultrasonic - microwave synergistic extraction technique to extract polysaccharides of Glycyrrhiza uralensis Fisch and tests the scavenging quality of polysaccharides on DPPH free radical, hydroxyl free radical($\cdot\text{OH}$) and super oxide free radical($\text{O}_2^{\cdot-}$) by spectrophotometry. The result shows that polysaccharides has good scavenging effect on DPPH \cdot , $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Key words polysaccharides in Glycyrrhiza uralensis Fisch; DPPH free radical; hydroxyl free radical; super oxide free radical

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 系豆科 (Leguminosae) 甘草属多年生草本植物,是最常用而很有用的中药材^[1]。其化学成分主要有三萜皂苷类化合物(甘草酸、甘草次酸)、甘草黄酮、甘草多糖等。研究表明,甘草多糖具有免疫调节作用,能抑制变态反应,并具有较强的抗肿瘤作用和抗病毒作用^[2],而对其清除自由基作用的研究却很少见报道。

近年的研究结果表明,在生物体内,需氧代谢的氧化还原反应所产生的羟自由基,可以引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,损伤膜结构及功能并引起各类疾病;超氧自由基能损伤生命大分子而导致各种疾病。目前,自由基的研究方法有电化学法、

电子自旋共振法和分光光度法等^[3]。本文采用分光光度法对甘草多糖的 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基清除能力进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 仪器

Sartorius BS210S 电子天平 (北京塞多利斯天平有限公司);

超声-微波协同萃取仪 (上海新拓微波溶样测试有限公司);

超纯水仪 (美国 Millipore 公司);

收稿日期: 2007 - 01 - 10

基金项目: 塔里木大学校长重点基金 (编号: 2004 - 6); 新疆维吾尔自治区高等学校科研计划资助项目 (编号: Na XJEDU2005G07)

作者简介: 杨玲 (1965 -), 女, 教授, 主要从事天然产物化学研究。 E - mail: yangling29@yahoo.com.cn

T6—紫外可见分光光度计(北京普析通用有限公司)。

1.1.2 材料与试剂

材料:乌拉尔甘草(采自新疆塔里木盆地);

试剂:二苯代苦味酰基自由基(DPPH·),Sigma公司;抗坏血酸(维生素C);维生素E;Tris-HCl缓冲液:pH8.2;邻苯三酚;硫酸亚铁;水杨酸;双氧水;乙醇;盐酸以上均为分析纯。

1.2 甘草多糖提取物的制备

称取甘草粉末10.00g,加60%乙醇100mL,在50℃下超声—微波协同萃取2次,每次15min,过滤后在药渣中加水100mL于75℃水浴提取2次,每次15min。合并两次提取液,移至100mL量瓶中,将残渣用水洗涤2次,洗涤液并入量瓶中,定容作为供试液。

1.3 抗氧化性实验

1.3.1 甘草多糖对DPPH自由基的清除实验

DPPH溶液的配制:准确称取44mg DPPH,用无水乙醇溶解并定容于100mL容量瓶中,DPPH浓度为120μmol/L,避光保存(0~4℃)。

将甘草多糖提取液稀释400倍后取0.1mL与3mL 120μmol/L DPPH溶液加入同一试管中,摇匀,在黑暗中放置30min,以无水乙醇为空白在517nm测定其吸光度 A_i ,并以下式计算其清除率:

$$\text{清除率} = [(A_c - A_i) / A_c] \times 100\%$$

式中: A_c :0.1mL无水乙醇加3.0mL DPPH溶液的吸光度;

A_i :0.1mL待测液加3.0mL DPPH溶液的吸光度。

按照上面公式计算清除率,清除率越大抗氧化能力越强。

1.3.2 甘草多糖对羟自由基(·OH)的清除实验

按照Smimof(1989)的方法,利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生·OH在体系内加入水杨酸捕捉·OH并产生有色物质,该物质在510nm下有最大吸收^[4]。

反应体系中含9.8mmol/L H_2O_2 2mL,9mmol/L $FeSO_4$ 2mL,9mmol/L水杨酸-乙醇2mL,不同浓度的甘草多糖溶液2mL。最后加 H_2O_2 启动反应,37℃反应30min,以超纯水为参比,在510nm下测量各浓度的吸光度。考虑到多糖本身的吸收光值,以9mmol/L $FeSO_4$ 2mL,9mmol/L水杨酸-乙醇2mL,不同浓度的多糖溶液2mL和2mL超纯水作为多糖的本底吸收。

清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_0 - (A_x - A_{x_0})) / A_0] \times 100\%$$

式中: A_0 :为空白对照液的吸光度;

A_x :为加入多糖溶液后的吸光度;

A_{x_0} :为不加显色剂 H_2O_2 多糖溶液本底的吸光度。

1.3.3 甘草多糖对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除实验

1.3.3.1 采用邻苯三酚自氧化法的测定

取5mL,pH8.2,50mmol/L Tris-HCl缓冲液。2mL超纯水,混匀后在25℃水浴中保温20min。取出后立即加入在25℃预热过的3mmol/L邻苯三酚0.5mL(以10mmol/L HCl配制,空白管用10mmol/L HCl代替邻苯三酚的HCl溶液),迅速摇匀后倒入人比色杯,420nm下每隔30s测定吸光度值。

1.3.3.2 样品活性测定^[5]

在加入邻苯三酚前,先加入一定体积的多糖溶液,超纯水减少,然后按采用邻苯三酚自氧化法测定的方法操作,并计算抑制率。抑制率(%)计算公式为:

$$I\% = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100$$

A_1 :不含样品的吸光度值;

A_2 :不含样品和邻苯三酚的吸光度值;

A_3 :含有样品的吸光度值;

A_4 :含样品,但不含邻苯三酚的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 甘草多糖对DPPH·的清除作用

取甘草多糖3份,每份1mL,按1.3.1的方法自“将甘草多糖提取液稀释400倍后取0.1mL与3mL 120μmol/L DPPH溶液加入同一试管中”起依法测定,并计算其清除率,结果见表1。

表1 不同提取方法多糖抗氧化作用比较

样品质量 /g	浓度 /mg/mL	清除率 /%	RSD
5.00	0.125	14.25	
5.00	0.125	14.07	1.04%
5.00	0.125	13.96	

由表1可知,甘草多糖对DPPH·的清除能力比较明显,而且清除效果稳定。

2.2 不同抗氧化剂清除DPPH自由基的比较

分别取甘草多糖(超声—微波协同萃取)、维生素C、维生素E三种抗氧化剂0.1mL与3mL 120μmol/L DPPH溶液加入同一试管中,按1.3.1的方

法自“摇匀,在黑暗中放置 30min 起依法测定,并计算其清除率,结果见表 2。

表 2 不同抗氧化剂清除 DPPH 自由基的比较

提取类别	浓度 / mg/mL	清除率 / %
甘草多糖	0.100	9.27
维生素 C	0.100	23.98
维生素 E	0.100	6.2

由表 3 可以看出,在浓度基本相同条件下,甘草的抗氧化能力强于维生素 E,但比维生素 C 弱。

2.3 甘草多糖对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力

对甘草清除自由基能力的测定分析结果见表 3。

表 3 甘草清除自由基能力的测定

编号	清除羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)		清除超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	
	浓度 / (mg/mL)	清除率 / %	浓度 (mg/mL)	清除率 / %
1	1.00	26.87	0.25	14.3
2	2.00	27.98	0.50	15.2
3	3.00	32.63	0.75	34.8
4	4.00	12.45	1.00	6.2

从甘草多糖清除自由基能力的测定分析结果看,多糖对羟自由基和超氧阴离子自由基都有一定的清除能力,清除效果与多糖浓度的关系在一定浓度范围内呈现正相关。

3 讨论

3.1 甘草多糖对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基都有清除能力。在一定浓度范围内,甘草多糖对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除效果与多糖浓度成正相关。

3.2 甘草多糖具有较好的清除羟自由基的活性,而清除超氧阴离子自由基能力不如清除羟自由基的能力。

3.3 甘草多糖含量较高,提取工艺简单,重复性好,而且对环境无污染,并能有效清除自由基,具有很高的开发利用前景。

参考文献

- [1] 金宏. 浅谈甘草药理作用. 时珍国医国药, 2000, 11 (1): 78 ~ 79.
- [2] 惠寿年,董阿玲. 国内对甘草化学成分的研究进展. 中草药, 1999, 30 (4): 313 ~ 315.
- [3] 崔文新,张静静,耿越. 几种天然植物色素清除自由基能力比较研究. 山东师范大学学报 (自然科学版), 2006, 21 (2): 105 ~ 107.
- [4] 颜军,郭小强,邬晓勇,等. 银耳多糖的提取及其清除自由基作用. 成都大学学报, 2006, 25 (1): 35 ~ 38.
- [5] 韩强,林惠芬. 一些天然提取物对超氧自由基和羟自由基的清除作用. 日用化学工业, 2000, 30 (3): 14 ~ 17.