

阳春砂多糖的分离纯化及体外抗氧化作用研究

李世杰, 张丹雁*, 严娅娟, 曹曼

广州中医药大学中药学院, 广州 510006

摘要: 本实验研究了阳春砂多糖(AVP)及其纯化组分的抗氧化活性, 首先采用 DEAE-纤维素-52 离子交换柱分级洗脱阳春砂粗多糖, 再采用 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶色谱柱进一步纯化得到纯化多糖; 分别采用超氧阴离子自由基体系、羟自由基体系、1,1-二苯基苦基苯肼自由基体系, 对阳春砂多糖的抗氧化活性进行研究, 并以维生素 C 为阳性对照物, 实验结果表明阳春砂粗多糖及纯化组分对超氧阴离子自由基、羟自由基、1,1-二苯基苦基苯肼自由基均有较强的清除能力, AVP-3 体外抗氧化活性最强。

关键词: 阳春砂多糖; 抗氧化; 自由基

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Isolation, Purification and Antioxidant Activity of Polysaccharide from *Amomum villosum*

LI Shi-jie, ZHANG Dan-yan*, YAN Ya-juan, CAO Man

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: In the present study, the antioxidant activities of *Amomum villosum* polysaccharide (AVP) and its purified product were investigated. The crude AVP was purified by DEAE-cellulose-52 ion exchange column chromatography and further purified through a Sephadex G-100 column. The antioxidant activities of AVP and its purified fractions were then tested using superoxide anion radical system, hydroxyl radical system, 1,1-diphenyl picrylhydrazyl radical system with vitamin C as a positive control. The results showed that AVP and its purified fractions showed strong scavenging ability on superoxide anion free radicals, hydroxyl radical and 1,1-diphenyl picrylhydrazyl radical, in which AVP-3 showed the strongest antioxidant activity.

Key words: *Amomum villosum* polysaccharide; antioxidant activity; free radical

阳春砂来源于姜科豆蔻属植物阳春砂 (*Amomum villosum* Lour.) 的干燥成熟果实, 是我国著名的“四大南药”之一。具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎的功效, 临床上主要用于湿浊中阻、脘痞不饥、脾胃虚寒、呕吐泄泻、妊娠恶阻、胎动不安等症^[1]。

近年来, 大量学者从植物、微生物中提取多糖并进行相关药理研究, 取得了巨大的成果。目前研究表明, 多糖具有抗炎、抗氧化、抗癌、调节免疫、降低血压等功效^[2-6]。然而, 阳春砂多糖 (*Amomum villosum* polysaccharides, 以下简称 AVP) 的药理活性研究还尚未见报导, 目前针对阳春砂的药理研究主要集中在其水提液及挥发油研究上, 单纯研究水提液

的药理作用不能阐明其具体作用机制, 无法给出合理科学的解释, 而阳春砂水提液中主要成分为水溶性多糖, 因此, 对 AVP 初步药理活性研究具有重要的现实意义。本文以 AVP 及其纯化组分为研究对象, 比较其对超氧阴离子自由基、羟自由基及二苯代苦味肼基自由基的清除作用, 以了解 AVP 抗氧化作用活性, 为阳春砂的开发提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

阳春砂, 采自阳春市砂仁种植场, 样品经广州中医药大学中药鉴定教研室张丹雁教授鉴定为姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实; 乙醇 (AR, 上海久亿试剂公司), 硫酸 (AR, 上海久亿试剂公司), 正丁醇 (AR, 南京试剂公司), 氯仿 (AR, 南京试剂公司); DEAE-纤维素-52 凝胶、Sephadex G-100 凝胶、葡聚糖标准品、1,1-二苯基苦基苯肼、菲

咯嗪、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)、还原型辅酶I(NADH)、三吡啶吡嗪(TPTZ)购于Sigma公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

KQ-400KDE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA2004电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);501-A型超级恒温器(上海实验仪器厂有限公司);DL-6000B离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-360紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DHL-2B型电脑数显恒流泵、DBS-100A型电脑全自动部份收集器(上海沪西分析仪器厂);层析柱(2.6×30 cm,2.6×60 cm,上海亚荣生化仪器有限公司);Alphal-2型冷冻干燥机(英国LABCONCO公司);Re-52AA型旋转蒸发仪(金坛市玻璃实验厂)。

2 方法与结果

2.1 AVP分离纯化

2.1.1 AVP样品制备

采用水提醇沉法^[7]得到粗多糖AVP样品。

2.1.2 离子交换色谱法初步分离

称取60 mg AVP粗多糖溶于3 mL去离子水中,加样于DEAE-纤维素-52层析柱(2.6×30 cm)中,用0.0、0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl溶液依次梯度洗脱,流速1.0 mL/min,分步收集(10 min/管),每梯度20管,硫酸-苯酚法检测各管多糖含量(490 nm处吸光度),收集不同洗脱梯度相应的组分。合并相同组分,50℃旋转蒸发浓缩,去离子水透析48 h以去除NaCl及小分子杂质,最后将透析液真空冷冻干燥,得初步纯化产品。同时以收集的管数为横坐标,吸光度(490 nm)为纵坐标绘制DEAE-纤维素-52色谱柱洗脱曲线,洗脱曲线见图1。由图1可以看出,阳春砂多糖经DEAE-纤维素-52层析柱分离

后得到三个主要组分,分别为纯水洗脱的组分F₁、0.1 mol/L NaCl溶液洗脱的组分F₂和0.3 mol/L NaCl溶液洗脱的组分F₃。

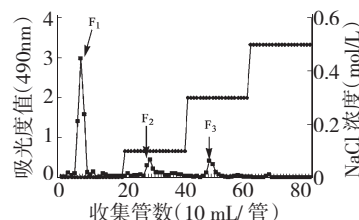


图1 AVP DEAE-纤维素-52 色谱柱洗脱曲线图

Fig. 1 DEAE-cellulose-52 column elution curve of AVP

2.1.3 葡聚糖凝胶色谱法进一步纯化

分别称取10 mg经DEAE-纤维素-52初步纯化的各多糖组分,溶于5 mL去离子水中,加样于Sephadex G-100层析柱(2.6×60 cm)中,用去离子水洗脱,流速0.25 mL/min,分步收集(10 min/管)。硫酸-苯酚法检测各管多糖含量(490 nm处吸光度),分别收集不同的组分。合并相同组分,50℃减压蒸发浓缩,去离子水透析48 h以去除小分子杂质,最后将透析液真空冷冻干燥,得纯化产品用于进一步的分析。同时以收集的管数为横坐标、吸光度(490 nm)为纵坐标绘制Sephadex G-100色谱柱洗脱曲线,洗脱曲线见图2。从图2可以看出,初步分离的三个组分(F₁、F₂和F₃)经葡聚糖G-100凝胶柱分离后各得一个纯化组分,分别命名为AVP-1、AVP-2和AVP-3。多糖组分由于存在糖醛酸、硫酸基等一些荷电基团,因此要想获得纯多糖,通常先按照离子强度的不同进行初步分离,得到电荷单一的组分,然后再通过分子量的不同进行第二次分离获得电荷和分子量均单一的多糖。本实验通过离子交换层析和凝胶过滤层析纯化阳春砂多糖,得到了三个纯化组分(AVP-1、AVP-2和AVP-3),用于进一步的分析。

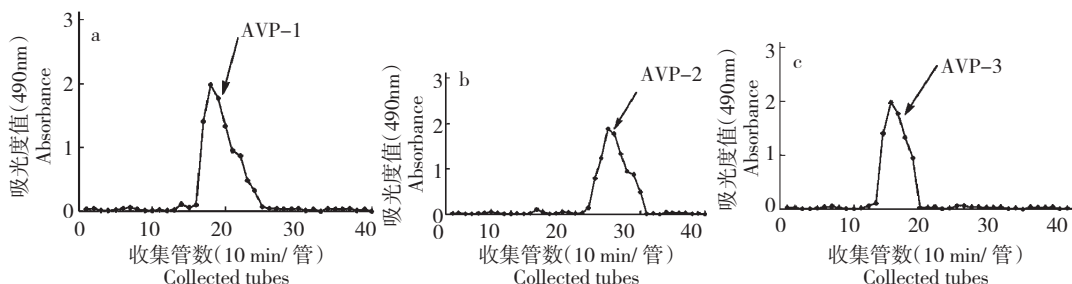


图2 AVP Sephadex G-100 色谱柱洗脱曲线图

Fig. 2 Sephadex G-100 column elution curves of AVP

a: 初步分离组分 F₁ 的洗脱曲线; b: 初步分离组分 F₂ 的洗脱曲线; c: 初步分离组分 F₃ 的洗脱曲线

a: elution curve of fraction F₁; b: elution curve of fraction F₂; c: elution curve of fraction F₃

2.2 AVP 抗氧化实验

2.2.1 多糖对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除作用

采用超氧阴离子自由基体系^[8],观察多糖对的清除作用。取不同浓度的 AVP 样品(粗 AVP、AVP-1、AVP-2 和 AVP-3)及维生素 C 溶液(0.1、0.5、1.0、1.5、3.0 及 5.0 mg/mL)1.0 mL 于试管中,分别加入 1.0 mL NBT 溶液(156 $\mu\text{mol/L}$)、1.0 mL NADH 溶液(468 $\mu\text{mol/L}$)和 1.0 mL PMS 溶液(60 $\mu\text{mol/L}$)。混匀反应体系,25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,于 560 nm 波长处测吸光度。NBT 溶液、NADH 溶液及 PMS 溶液都是用 0.1 M pH=7.4 的磷酸盐缓冲液配制。以水代替 AVP、维生素 C 溶液;0.1 M pH=7.4 磷酸盐缓冲液代替 NBT 溶液,作空白实验调零用。每个试样做 3 次平行试验取平均值。清除率计算公式为:

$$P(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为对照实验(水代替 AVP、维生素 C 溶液)的吸光度; A_1 为样品实验的吸光度; A_2 为样品干扰实验(0.1 M pH=7.4 磷酸盐缓冲液代替 NBT 溶液)的吸光度。

不同浓度的 AVP 对超氧阴离子自由基的清除作用结果见图 3。由图 3 可知,AVP 及其纯化组分 AVP-1、AVP-2、AVP-3 对 $O_2^{\cdot-}$ 自由基清除活性呈一定的量效关系。AVP-3 清除 $O_2^{\cdot-}$ 活性稍高于粗 AVP、AVP-1 及 AVP-2。当浓度高于 1 mg/mL 时,多糖清除 $O_2^{\cdot-}$ 活性优于阳性对照品维生素 C。

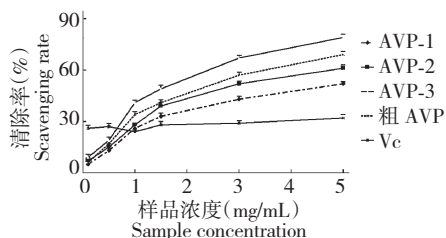


图 3 阳春砂多糖及其纯化组分 (AVP-1、AVP-2、AVP-3) 清除 $O_2^{\cdot-}$ 活性

Fig. 3 Scavenging effects of AVP and its purified fractions (AVP-1, AVP-2 and AVP-3) on superoxide radical

2.2.2 多糖对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

羟基自由基清除活性的测定参照 Yang 等^[9]报道的方法稍作修改。取不同浓度的 AVP 样品(粗 AVP、AVP-1、AVP-2 和 AVP-3)及维生素 C 溶液(0.1、0.5、1.0、1.5、3.0 及 5.0 mg/mL)溶液 1.0 mL 于试管中,分别加入 2.4 mL 磷酸盐缓冲液

(0.1 M pH=7.4) 和 0.6 mL H_2O_2 溶液(40 mmol/L)。混匀反应体系,10 min 后于分光光度计 230 nm 处测吸光度,以水代替 AVP、维生素 C 溶液和 H_2O_2 溶液,作空白实验调零用。每个试样做 3 次平行试验取平均值,清除率计算公式同式 1。

不同浓度的 AVP 对羟基自由基的清除作用结果见图 4。由图 4 可知,AVP 及其纯化组分对 $\cdot\text{OH}$ 自由基具有明显的清除活性。AVP-3 清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基活性最强,当其浓度达到 3.0 mg/mL 时,对 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率为 68.2%。但是 AVP 及其纯化组分对 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除活性比阳性对照品要弱。

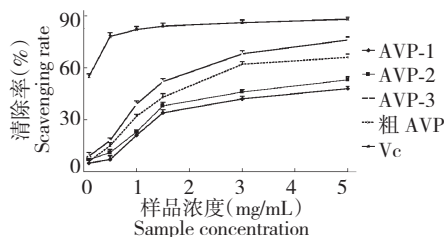


图 4 阳春砂多糖及其纯化组分 (AVP-1、AVP-2、AVP-3) 清除 $\cdot\text{OH}$ 活性

Fig. 4 Scavenging effects on hydroxyl radical of AVP and its purified fraction (AVP-1, AVP-2 and AVP-3)

2.2.3 多糖对 1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH \cdot)

清除活性的测定参照 Li 等^[3]报道的方法稍作修改。取不同浓度的 AVP 样品(粗 AVP、AVP-1、AVP-2 和 AVP-3)及维生素 C 溶液(0.1、0.5、1.0、1.5、3.0 及 5.0 mg/mL)1.0 mL 于试管中,分别加入 0.2 mL DPPH 溶液(0.4 mmol/L),再加入 2.0 mL 水。混匀反应体系,30 min 后于波长 517 nm 处测吸光度。DPPH 溶液用无水乙醇配制。以水代替 AVP、维生素 C 溶液,无水乙醇代替 DPPH 溶液,作空白实验调零用。每个试样做 3 次平行试验取平均值。清除率计算公式同式 1。

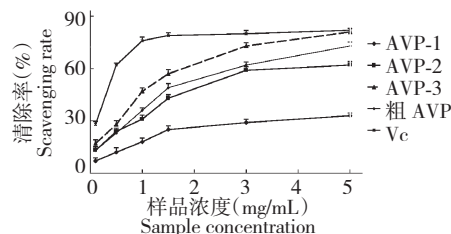


图 5 阳春砂多糖及其纯化组分 (AVP-1、AVP-2、AVP-3) 清除 DPPH \cdot 活性

Fig. 5 Scavenging effects of AVP and its purified fraction (AVP-1, AVP-2 and AVP-3) on DPPH radical

不同浓度的 AVP 对 DPPH· 的清除作用结果见图 5, 图 5 表明 AVP 及其纯化组分对 DPPH· 都具有一定的清除活性。AVP-1 对 DPPH· 的清除作用最弱, AVP-3 清除活性最强; 当浓度达到 5 mg/mL 时, AVP-3 对 DPPH· 的清除作用基本与阳性对照品相同。

3 结论

植物来源的多糖类化合物拥有免疫调节、抗肿瘤活性以及降血糖、降血脂活性和抗氧化等的独特功能, 而且大多数毒性较小, 在预防疾病上优于其他化合物, 因此其应用具有广阔的前景。本实验以阳春砂粗多糖 AVP 及纯化后的组分 AVP-1、AVP-2、AVP-3 为研究对象进行抗氧化活性研究, 确证了阳春砂多糖具有抗氧化的作用, 它们具有很好的清除超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 ($\cdot OH$) 及 1,1-二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 活性, AVP-3 比粗 AVP、AVP-1 及 AVP-2 具有更强的体外抗氧化活性。AVP 及其纯化组分对超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 清除活性要显著优于维生素 C。阳春砂多糖的药理活性目前尚未有深入研究, 本实验为阳春砂相关药品及食品研究开发提供的新的研究思路, 为阳春砂的开发利用提供一定的理论依据。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press,

2010. Vol I, 236.

- 2 Ukai S, Kiho T, Hara C, *et al.* Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J Pharmacobio-Dynam*, 1983, 6: 983-990.
- 3 Li X, Zhou A, Han Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum in vitro*. *Carbohydr Polym*, 2006, 66: 34-42.
- 4 Topping DL. Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. *Nutr Rev*, 1991, 9: 195-203.
- 5 Kiho T, OOKIB K, Usui S, *et al.* Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22: 966-970.
- 6 Gamal-Eldeen AM, Ahmed EF, Abo-Zeid MA. *In vitro* cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 1378-1384.
- 7 Zhang D, Li S, Xiong Q, *et al.* Extraction, characterization and biological activity of polysaccharides from *Amomum villosum*. *Carbohydr Polym*, 2013, 95: 113-122.
- 8 Xu R, Ye H, Sun Y, *et al.* Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food Chem Toxicol*, 2011, 50: 2473-2480.
- 9 Yang B, Zhao M, Shi J, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from *longan* fruit pericarp. *Food Chem*, 2008, 106: 685-690.

(上接第 1970 页)

9 Zhou LY (周凌云). Chemical constituents from the root of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2009; 29-30.

10 Zhang Y (张颖), Kong LY (孔令义). Studies on the constituents of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2006, 8: 16-17.

11 Yin F (尹锋), Lou FC (楼凤昌). Studies on the constituents of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39: 20-21.

12 Yin F (尹锋), Cheng L (成亮), Lou FC (楼凤昌). Studies on the constituents of *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2: 149-151.