

李哲明, 谢集照, 罗迪, 等. 青天葵多糖的分离纯化、结构表征及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 61–67. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010223

LI Zheming, XIE Jizhao, LUO Di, et al. Separation, Purification, Structural Characterization and Antioxidation Effects of a Polysaccharide from *Nervilia fordii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 61–67. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010223

· 研究与探讨 ·

青天葵多糖的分离纯化、结构表征及其 抗氧化活性分析

李哲明, 谢集照, 罗迪, 武鑫铎, 何诗能, 邱莉*
(广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

摘要: 对水提醇沉获得的青天葵粗多糖进行分离纯化, 并对多糖组分进行分析表征和体外抗氧化活性评价。结果表明, 用 DEAE-52 纤维素及葡聚糖凝胶 G-100 柱色谱分离纯化出的多糖组分 NFP-2 分子质量为 1150 kDa, 总糖含量为 82.64%, 糖醛酸含量为 16.65%, 蛋白质含量为 6.38%。NFP-2 由半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖醛酸组成, 摩尔比为 21.27:13.21:5.26:3.02:2.82:1, 其为不含三螺旋结构的酸性多糖, 糖苷键构型为 β -构型。体外清除自由基试验结果显示, NFP-2 对羟基自由基 (IC_{50} 7.95 mg/mL) 和超氧阴离子自由基 (当浓度为 0.5 μ g/mL 时, 清除率为 60%) 均有明显清除作用; 当 NFP-2 浓度为 10 mg/mL 时, ABTS 阳离子自由基的清除率为 35.44%; 当 NFP-2 浓度为 120 μ g/mL 时, DPPH 自由基清除率为 17%。

关键词: 青天葵, 多糖, 分离纯化, 结构表征, 抗氧化活性

中图分类号: O629.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)22-0061-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010223



本文网刊:

Separation, Purification, Structural Characterization and Antioxidation Effects of a Polysaccharide from *Nervilia fordii*

LI Zheming, XIE Jizhao, LUO Di, WU Xinduo, HE Shineng, QIU Li*

(Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: The crude polysaccharide from *Nervilia fordii* obtained by water extraction and ethanol precipitation was separated and purified, and the components of the polysaccharide were analyzed and characterized, and the antioxidant activity *in vitro* was evaluated. Results showed that: A polysaccharide, NFP-2 was purified by DEAE-52 cellulose and Sephadex G-100 column chromatography from the crude polysaccharides of *Nervilia fordii* obtained by water extraction and ethanol precipitation. The molecular weight of NFP-2 was determined to be 1150 kDa, and the total sugar content, the uronic acid content and the protein content of NFP-2 were measured to be 82.64%, 16.65% and 6.38%, separately. It was measured that the NFP-2 was composed of galactose, arabinose, mannose, glucose, rhamnose, and galacturonic acid with their molar ratio of 21.27:13.21:5.26:3.02:2.82:1. And NFP-2 was an acidic polysaccharide without triple helix structure, its glycosidic bond configuration was β -configuration. Its antioxidation effects were tested by several assays *in vitro*, and it showed that the NFP-2 could scavenge hydroxyl radicals with IC_{50} 7.95 mg/mL, the scavenging ability of the NFP-2 of 0.5 μ g/mL on superoxide anion radicals was 60%, the scavenging ability of the NFP-2 of 10 mg/mL on ABTS cation free radicals was 35.44%, and the scavenging ability of the NFP-2 of 120 μ g/mL on DPPH free radicals was 17%.

Key words: *Nervilia fordii*; polysaccharide; separation and purification; structural characterization; antioxidant activity

青天葵为兰科植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr.的块茎和全草, 别名独叶莲、珍珠草、

收稿日期: 2022-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260634)。

作者简介: 李哲明 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的研究与开发, E-mail: 382805900@qq.com。

* 通信作者: 邱莉 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础及中药质量控制, E-mail: qlydmyyq@163.com。

独脚莲、珍珠叶等,主要分布于广东、广西、云南、四川等地^[1-2]。在东南亚地区和我国两广地区,青天葵全草为民间习用的凉茶药材之一,也常与瘦肉炖汤食用,是岭南地区常用的具有清热润肺止咳、解毒散瘀止痛的药食两用的药材^[3-4]。目前,研究者已从青天葵全草中分离得到黄酮^[5-6]、萜类^[7]、氨基酸和挥发油等一些分子化合物。相关药理学研究证实这些化合物具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒等活性^[8]。

多糖又称为多聚糖,由多个单糖或单糖衍生物经过聚合生成的聚合度大于 10 的大分子化合物,主要分为植物多糖、动物多糖及微生物多糖^[9]。植物多糖由于在增强免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂、抗病毒、抗炎作用等方面具有良好的应用前景及来源广与无毒副作用的特性,越来越引起国内外研究者的兴趣^[10]。多糖的药理活性与多糖的一级结构如分子量、单糖组成、取代基种类和数目、支化度等有关,还与多糖的空间高级结构以及多糖的溶解度等多种因素有关。当多糖任一构成因素发生变化时,其药理活性可能会相应改变。

本课题组在前期研究中,采用水提醇沉法获得青天葵多糖,通过 DEAE-52 和葡聚糖凝胶 G-100 层析柱分离纯化得到了 7 个多糖组份。截至目前,本课题组已经报道了两个青天葵均一多糖(NFP-A4 和 NFP-1)的理化性质、结构表征及其免疫调节活性^[11-12]。研究表明,这两个均一多糖无论分子量、单糖组成、取代基种类,还是药理活性都存在较大差异,体现了青天葵多糖化学结构和药理活性的多样性。因此,本文继续研究第三个多糖组分 NFP-2 的理化性质和结构表征,以及测定 NFP-2 对 DPPH、羟基、ABTS 阳离子、超氧阴离子等自由基的清除能力,为丰富青天葵多糖结构和活性探讨提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

青天葵全草 广西一心医药有限公司(产地为广西);单糖标品(氨基葡萄糖、氨基半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、岩藻糖、木糖、阿拉伯糖) 美国 Sigma 公司;DEAE-52 纤维素 上海恒信化学试剂有限公司;Sephadex G-100 葡聚糖凝胶 Pharmacia Biotech 公司;透析袋(分子截留量 3500 Da) 美国 Viskase 公司;其余试剂 均为国产分析纯。

LC-20A 高效液相色谱仪、mini-1240 紫外可见分光光度计 日本岛津公司;PerkinElmer One FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪 美国 PerkinElmer 公司;FD-1A-50 型冷冻干燥器 北京博医康实验仪器有限公司;TDL-4 型低速台式离心机 上海安亭科学仪器厂;SpectraMaxPlus384 型连续光谱扫描式酶标仪 美国 Molecular Devices 公司;CQ 50 型超声波水浴 上海超声波仪器厂;R-1001N 型旋转蒸发仪 郑州长城科工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 青天葵总多糖样品的制备 取青天葵干燥全草,粉碎,过 24 目筛,得到粗粉。取 800 g 青天葵粉末,用 10 倍量蒸馏水加热回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,滤液用旋转蒸发仪 50 ℃ 减压浓缩。用无水乙醇调节浓缩液至含乙醇量至 80%,4 ℃ 冰箱静置 24 h,离心,丢弃上清液,取沉淀;沉淀溶于适量去离子水中,Sevag 法 [氯仿:正丁醇=5:1(v/v)] 除去游离蛋白,离心,取上清液,重复 5 次,冷冻干燥得到青天葵总多糖^[13]。

1.2.2 青天葵总多糖的分离纯化 取青天葵总多糖 20 g,加 50 mL 60 ℃ 蒸馏水溶解后,然后在 3500 r/min 离心 10 min,取上清液,缓慢滴加到活化且平衡后的 DEAE-52 层析柱上(φ3.6×45 cm),以蒸馏水、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.2 mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱。每梯度洗脱液的洗脱体积约为 1000 mL,每管收集 20 mL,隔管检测 490 nm(苯酚-硫酸显色后)下的吸光度,绘制洗脱曲线。通过洗脱曲线选取最佳洗脱峰,收集洗脱峰处的洗脱液,浓缩,透析,冷冻干燥得到 7 个组分(DT-1~DT-7)。

取组分 DT-2(0.9 g),加 5 mL 60 ℃ 蒸馏水溶解后,3500 r/min 离心 10 min,取上清液,滴加到 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶色谱柱上(φ1.2×25 cm),100 mL 洗脱,2 mL/管收集流份。隔管检测 490 nm(苯酚-硫酸显色后)下的吸光度值,绘制洗脱曲线,收集峰尖部分溶液,浓缩,透析,冷冻干燥得到样品(NFP-2)待分析。

1.2.3 青天葵多糖 NFP-2 的基本理化性质测定

1.2.3.1 NFP-2 总糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[14],分别吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 100 μg/mL 的葡萄糖对照品溶液于 10 mL 具塞试管中,补加蒸馏水至 1.0 mL,各加入 1.0 mL 的 5% 苯酚溶液,涡旋混匀,立即加入 5 mL 的浓硫酸,反应 20 min 后,在 490 nm 处测定吸光度值。以葡萄糖含量(mg)为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。取 1.0 mL 多糖溶液(1 mg/mL),按上述方法测定吸光度值,根据标准曲线计算总糖含量。

1.2.3.2 NFP-2 蛋白含量测定 采用 Lowry 法^[15],分别吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 100 μg/mL 的牛血清蛋白(BSA)对照品溶液于 10 mL 具塞试管中,补加蒸馏水至 1.0 mL,各加入 5 mL 碱性碳酸铜溶液,混合均匀,置于室温反应 10 min 后,加入 0.5 mL 福林酚试剂并放置 30 min,显色后在 650 nm 处测定吸光度值。以 BSA 含量(mg)为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。取 1.0 mL 多糖溶液(1 mg/mL),按上述方法测定吸光度值,根据标准曲线计算蛋白含量。

1.2.3.3 NFP-2 糖醛酸含量测定 采用硫酸-咔唑法^[16],分别吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 100 μg/mL 的半乳糖醛酸对照品溶液于 10 mL 具塞

试管中,补加蒸馏水至 1.0 mL,冰浴条件下各加入四硼酸钠-硫酸溶液 5 mL,涡旋混匀,置于恒温水浴锅中加热煮沸 20 min,取出后立即冰水冷却至室温,加入 0.15% 吡啶溶液,塞上塞子后,涡旋混匀,室温下保持 2 h 后于 523 nm 下测定吸光度。以半乳糖醛酸含量(mg)为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。取 1.0 mL 多糖溶液(1 mg/mL),按上述方法测定吸光度值,根据标准曲线计算糖醛酸含量。

1.2.4 NFP-2 分子质量测定 根据文献[17],利用高效凝胶渗透色谱(high performance gel permeation chromatograph, HPGPC)测量均一多糖的分子质量。色谱条件如下:TSKgel G4000PWxl 凝胶柱(7.8×300 mm, 10 μm);流动相 1 mL/min 三蒸水;柱温 40 ℃;进样量 10 μL;示差折光检测器。分别取 10 μL 10 mg/mL 系列 Dextran 标准葡聚糖溶液(分子质量分别为 70、150、270、410、500、1100、2000 kDa)注入高效液相色谱仪,绘制其分子量对数值与保留时间(t_R)的关系曲线。将等量多糖样品溶液在上述色谱条件下进样,根据其保留时间和关系曲线计算多糖分子质量。

1.2.5 NFP-2 单糖组成比例 称取多糖样品 5 mg,加入 10 mL 2 mol/L 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)溶液,油浴 110 ℃ 反应 4 h。反应结束后,冷却至室温,加入 2 mL 甲醇减压蒸干,重复操作 3 次,以完全除去 TFA。加入蒸馏水溶解样品,取 100 μL 样品溶液,置于 1.5 mL 的离心管中,然后参照文献[17]方法进行 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮进行衍生。反应结束后,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,备高效液相色谱分析用。色谱条件如下:Inertsil ODS C₁₈ 柱(4.6×250 mm, 5 μm);流动相为 1.0 mL/min 乙腈/磷酸盐缓冲液(18:82, v/v);检测波长 245 nm;柱温 35 ℃;进样量 10.0 μL。分别配制单糖(氨基葡萄糖、氨基半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、岩藻糖、木糖、阿拉伯糖)标准溶液 1 mg/mL,依照上述色谱方法分析,通过标准品的保留时间和峰面积,可以确定多糖样品中的单糖组成和计算摩尔百分比[17]。

1.2.6 红外光谱分析 称取干燥的多糖样品 1~2 mg 与 200 mg 溴化钾研磨,压制成透明的圆形薄片,在 4000~400 cm⁻¹ 范围内进行红外光谱扫描。

1.2.7 刚果红实验 取 6 份 2 mg/mL 的多糖溶液 1.0 mL,分别加入 3.0 mL 不同浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 mol/L)的 NaOH 溶液,然后再加入 0.5 mL 蒸馏水和 1.5 mL 0.2 mmol/L 刚果红溶液,涡旋混匀,静置 1 h,设定 200~800 nm 扫描范围,记录各浓度 NaOH 溶液的最大吸收波长(λ_{max}),空白对照组以蒸馏水替代多糖溶液[18]。

1.2.8 青天葵多糖的抗氧化活性

1.2.8.1 ABTS 阳离子自由基清除率的测定 参

照文献[19]方法测定。首先,将 ABTS 粉末溶于 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液中生成 ABTS 原液(7 mmol/L),然后在室温下于避光静置 12 h 后,用乙醇稀释至 0.2 mmol/L。取 96 孔板,相应孔中加入 180 μL ABTS 溶液(0.2 mmol/L)与 20 μL 不同浓度的多糖溶液混合(0、0.2、0.5、1、2、4、8、10 mg/mL),混匀,室温下避光反应 30 min。以维生素 C 为阳性对照,在 734 nm 处测定吸光度。

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率(\%)} = \left(1 - \frac{A_0 - A_s}{A_c}\right) \times 100$$

式(1)

式中: A_0 为实验组吸光值; A_s 用去离子水代替试剂做样品的本底比色吸光值; A_c 为空白对照(以去离子水代替多糖溶液)。

1.2.8.2 羟基自由基清除率的测定 参照邵佳等[20]的方法测定。取 96 孔板,相应孔中分别加入 50 μL 的不同浓度的青天葵多糖溶液(0、1、2、4、6、8、10 mg/mL),然后依次加 4 mmol/L 硫酸亚铁溶液 50 μL 及 4 mmol/L 过氧化氢溶液 50 μL,混匀,室温反应 10 min,然后加入 4 mmol/L 水杨酸溶液 50 μL,混匀,室温反应 30 min,于 510 nm 处分别测定各孔吸光度,记录数据,实验重复 3 次,以抗坏血酸为阳性对照。计算多糖对羟基自由基的清除率,即公式为:

$$\text{羟基自由基清除率(\%)} = \left(1 - \frac{A_0 - A_s}{A_c}\right) \times 100$$

式(2)

式中: A_0 为实验组吸光值; A_s 用去离子水代替试剂做样品的本底比色吸光值; A_c 为空白对照(以去离子水代替多糖溶液)。

1.2.8.3 DPPH 自由基清除率的测定

参照文献[21]方法测定。取 96 孔板,相应孔中分别加入 50 μL 不同浓度的青天葵多糖溶液(0、0.5、1、2、4、8、10 mg/mL),再加入 100 μL 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液,混匀,室温避光反应 30 min,在 517 nm 下测定吸光度,测量 3 次。空白组以无水乙醇代替 DPPH 溶液。按下列公式计算 DPPH 自由基清除率,按公式(1)计算:

$$\text{DPPH自由基清除率(\%)} = \left(1 - \frac{A_0 - A_s}{A_c}\right) \times 100$$

式(3)

式中: A_0 为实验组吸光值; A_s 用去离子水代替试剂做样品的本底比色吸光值; A_c 为空白对照(以去离子水代替多糖溶液)。

1.2.8.4 超氧阴离子自由基清除率的测定 采用邻苯三酚自氧化法[22]测定。取 96 孔板,相应孔中加入 150 μL Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol/L, pH8.2),再分别加入 30 μL 不同浓度的青天葵多糖(0、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/mL),混匀,室温避光反应 10 min,然后加入 30 μL 的没食子酸溶液

(6 mmol/L), 混匀, 室温避光反应 3 min, 最后加 30 μ L 8 mol/L 盐酸终止反应。在 325 nm 处测定吸光度。空白组以用 30 μ L 蒸馏水取代没食子酸溶液, 其他步骤如上操作, 测吸光度, 计算样品对超氧阴离子自由基的清除率。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_0 - A_s}{A_c}\right) \times 100$$

式(4)

式中: A_0 为实验组吸光值; A_s 用去离子水代替试剂做样品的本底比色吸光值; A_c 为空白对照(以去离子水代替多糖溶液)。

2 结果与分析

2.1 青天葵多糖组分 NFP-2 的纯化

青天葵总多糖过 DEAE-52 纤维素层析柱, 经蒸馏水、NaCl 溶液梯度洗脱, 洗脱曲线如图 1 所示, 按照洗脱峰收集组分, 共收集 7 个流份(DT-1~DT-7), 分别减压浓缩、透析、冻干后进一步纯化。

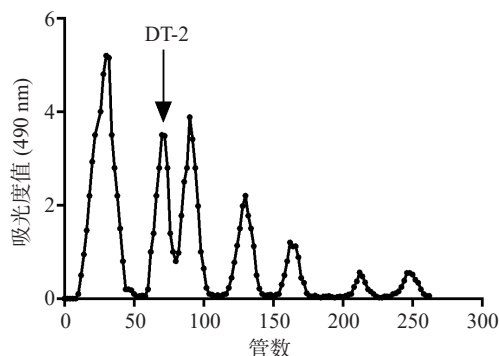


图 1 青天葵多糖 DT-2 的 DEAE-52 纤维素柱层析图
Fig.1 Elution curve of DT-2 from DEAE-cellulose 52 anion exchange chromatogram

将离子交换层析分离得到的 DT-2 溶于水进一步分离纯化, 上样于 Sephadex G-100 凝胶柱, 洗脱曲线如图 2 所示。收集峰尖部分, 透析, 浓缩, 冻干后得到组分 NFP-2 进行下一步分析。

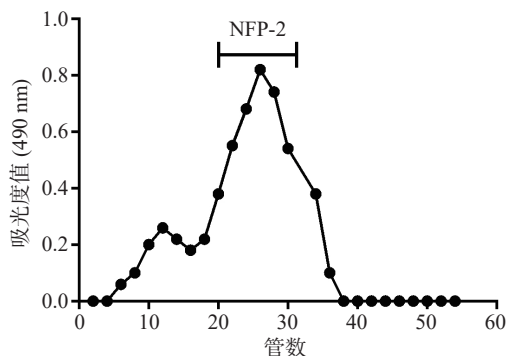


图 2 青天葵多糖 NFP-2 的 Sephadex G-100 柱层析结果
Fig.2 Elution curve of NFP-2 from Sephadex G-100 gel filtration chromatogram

2.2 青天葵多糖 NFP-2 的基本理化特性

多糖 NFP-2 易溶于热水, 不溶于乙醇、丙酮等

有机试剂, 经过测定其总糖含量为 82.64%, 糖醛酸含量为 16.65%, 蛋白质含量为 6.38%。

2.3 青天葵多糖 NFP-2 的分子量及单糖组成

HPGPC 测定结果如图 3 所示, 色谱图出现一个单峰, 确认 NFP-2 为单一组分, 纯度为 92.12%。根据多糖 NFP-2 的色谱保留时间带入标准多糖分子量回归曲线($\lg M_w = -0.3395R_t + 8.4278$, $R^2 = 0.9661$), 推算得到 NFP-2 的分子量为 1150 kDa; 经酸水解、高效液相色谱分析其单糖组成, 结果如图 4 所示, 主要由半乳糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖醛酸, 其摩尔比为 21.27:13.21:5.26:3.02:2.82:1, 并含有少量的木糖、葡萄糖醛酸。

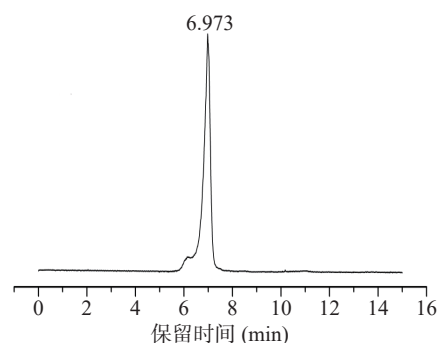


图 3 青天葵多糖 NFP-2 的 HPGPC 色谱图
Fig.3 HPGPC chromatogram of NFP-2

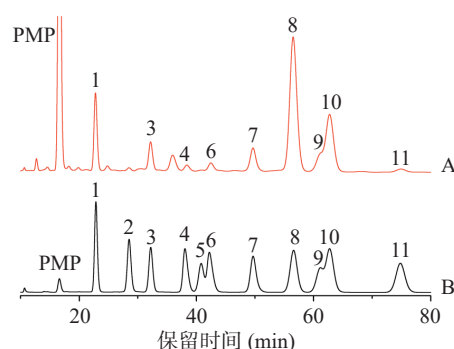


图 4 基于 PMP 柱前衍生的青天葵多糖 NFP-2(A)和标准品(B)的单糖液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of the PMP derivatives of NFP-2 hydrolysate sample (A) and standard monosaccharide mixture (B)

注: 1: D-甘露糖; 2: D-氨基葡萄糖; 3: D-鼠李糖; 4: D-葡萄糖醛酸; 5: D-氨基半乳糖; 6: D-半乳糖醛酸; 7: D-葡萄糖; 8: D-半乳糖; 9: D-木糖; 10: L-阿拉伯糖; 11: D-岩藻糖。

2.4 红外光谱分析

NFP-2 的红外光谱图如图 5 所示, 3401 cm^{-1} 处附近出现的强且宽的吸收峰归属于 -OH 的伸缩振动峰, 是糖类的特征吸收峰, 说明青天葵多糖 NFP-2 具有分子间氢键^[23]。2931 cm^{-1} 处则发现甲基- CH_3 或次甲基- CH_2 的 C-H 的伸缩振动峰, 是典型的多糖特征^[24], 1400~1200 cm^{-1} 处出现 C-H 伸缩和变角振动峰, 可初步判定为糖类化合物^[25]。在 1618 cm^{-1} 的 -NH_2 和 -NH_3 的特征吸收峰, 说明存在蛋白多糖峰^[26], 与蛋白质含量测定一致。1072 cm^{-1} 的吸收峰显示多糖糖

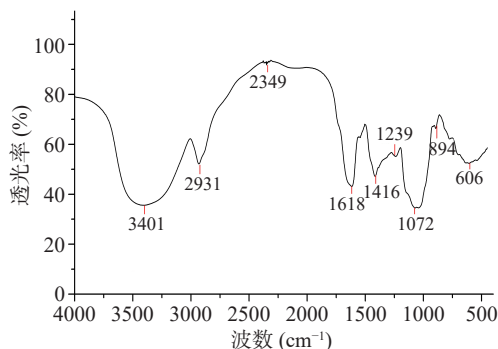


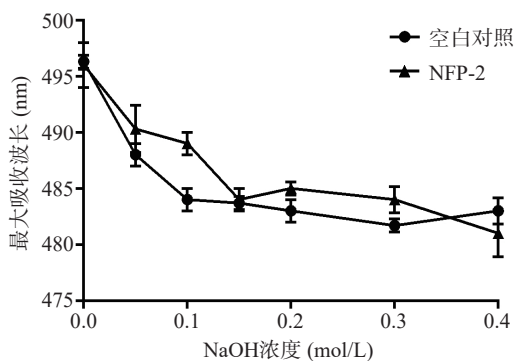
图 5 青天葵多糖 NFP-2 的红外光谱图

Fig.5 FT-IR spectrum of NFP-2

环构型为吡喃型^[27]。894 cm^{-1} 处的弱峰为吡喃环的 β -端差向异构的 C-H 变角振动产生的^[28]。由此推测多糖 NFP-2 为 β -吡喃型多糖^[29]。

2.5 刚果红实验结果分析

刚果红实验是研究多糖分子构象特性一种有效方法。刚果红可以与具有螺旋构象的多糖分子发生络合反应,产生的络合物的最大吸收波长与纯刚果红相比会发生红移^[30]。从图 6 可知,与纯刚果红溶液的 λ_{max} 相比,刚果红-NFP-2 多糖复合物的 λ_{max} 发生红移。当添加不同浓度的 NaOH 溶液时,多糖的螺旋结构经过不同程度的展开,使复合物的 λ_{max} 值减小,当 NaOH 浓度为 0~0.4 mol/L 时,复合物的 λ_{max} 值发生变化。与纯刚果红溶液相比,NFP-2 在各浓度的 NaOH 溶液中均无明显红移。因此,可以推断 NFP-2 在水溶液中缺乏三股螺旋构象。刚果红分析法只是确定多糖构象结构的初步方法,还需要其他方法来确定多糖的确切结构。

图 6 青天葵多糖 NFP-2 与刚果红复合物在不同浓度 NaOH 溶液中的 λ_{max} 变化Fig.6 Changes in the absorption maximum λ_{max} of NFP-2 various concentrations of sodium hydroxide complexed with Congo red

2.6 青天葵多糖 NFP-2 抗氧化活性分析

大量医学研究结果表明动脉粥样硬化、癌症、神经性疾病等多种疾病都与氧化胁迫有关。当机体内正常代谢产生的活性氧、活性氮超出人体自身抗氧化保护系统的范围就会对机体造成伤害。许多外源性物质如抗坏血酸、维生素 E 以及各种多酚物质可以抵抗活性氧造成的危害^[31]。各种食品、天然动植

物中富含这些物质,是保护人体健康的重要来源。因此抗氧化能力是评价食品、药品功效的一个重要指标。

目前使用的抗氧化测定方法非常多,以清除自由基测定抗氧化能力的方法是目前最流行、使用最多的方法。根据自由基的种类不同可以分为两大类:生物体中存在的自由基:超氧自由基、过氧化氢、羟自由基等;人工合成的自由基。目前最常用的自由基清除测定方法有 ABTS 法、羟自由基清除能力、DPPH 法和超氧自由基清除能力法。研究表明多糖

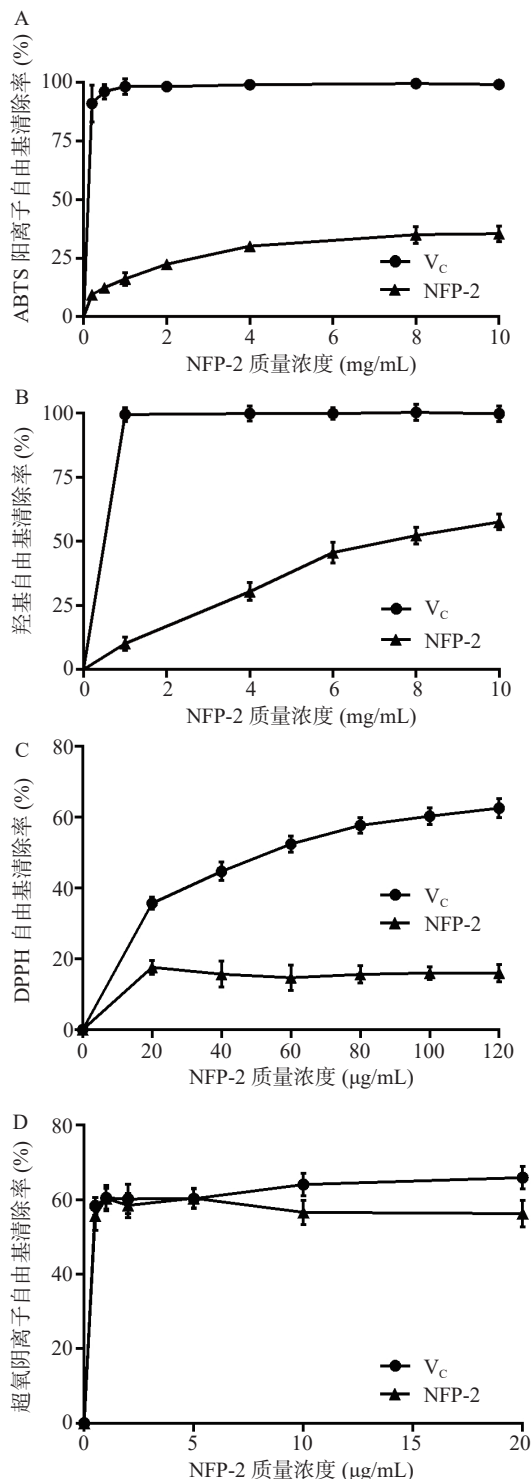


图 7 青天葵多糖 NFP-2 抗氧化活性

Fig.7 Antioxidant activities of NFP-2

产生抗氧化性的机制之一是多糖可以直接与自由基发生反应,从而达到抗氧化作用^[30]。为了研究多糖 NFP-2 的抗氧化能力,本文选择 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基测定 NFP-2 的清除自由基的能力。

从图 7A~图 7B 中可知,NFP-2 具有清除 ABTS 阳离子自由基、羟基自由基的活性,并且清除能力在 0.1~10 mg/mL 浓度范围内呈现剂量依赖效应,随着浓度增大而增强。在 0.1~10 mg/mL 内,NFP-2 对 ABTS 阳离子自由基的清除率从 9.43% 增强到 35.44%;对羟基自由基的清除率从 10.09% 增强到 57.55%,其 IC_{50} 为 7.95 mg/mL。从图 7C~图 7D 可知,NFP-2 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基的清除能力在设定浓度范围内无明显的剂量依赖效应。在质量浓度 20~120 μ g/mL 内,NFP-2 对 DPPH 自由基的清除能力较弱,始终维持在 15%~17%;在质量浓度 0.5~20 μ g/mL 内,NFP-2 对超氧阴离子自由基的清除能力较强,始终维持在 60% 左右。

尽管多糖的自由基清除活性机制尚不完全明确,但相关研究表明,酸性多糖更易成为清除自由基的供氢剂,从而表现出更高的抗氧化活性^[32]。由于 NFP-2 的糖醛酸含量较高,暴露的羧基参与了多糖与自由基的反应,从而使 NFP-2 对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力均达到 50% 以上。另外,在 5~20 μ g/mL 浓度范围内,NFP-2 的超氧阴离子自由基清除能力不存在浓度依赖性,表明 NFP-2 多糖的抗氧化活性并不是只受到单一因素影响,可能受到分子量、单糖组成、糖醛酸、取代基和链构象等多种因素的影响。

3 结论

综上所述,从青天葵药材中分离纯化得到一个分子量为 1150 kDa 的水溶性多糖组分 NFP-2。NFP-2 主要由半乳糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖醛酸等单糖组成。结构分析表明多糖的糖苷键为 β -吡喃型,无三股螺旋结构。抗氧化性评价表明 NFP-2 具有一定的自由基清除能力。这些结果将有助于青天葵多糖的进一步研究。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:740-741. [Editorial Committee of Chinese Materia Medica of the State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 740-741.]

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2006:25. [Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 2006: 25.]

[3] 陈蔚文,徐鸿华. 岭南道地药材研究[M]. 广州:广东科技出版社,2007:326-351. [CHEN W W, XU H H. Study of genuine medicinal materials from Lingnan[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2007: 326-351.]

[4] 谢友良. 南药青天葵的抗急性肺损伤作用机理及其质量标准研究[D]. 广州:广州中医药大学,2008. [XIE Y L. The mechanism of anti-inflammation and study of quality control of southern Chinese materia medica of herba *Nervilia fordii* (Qingtiankui)[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2008.]

[5] ZHOU G X, LU C L, WANG H S, et al. An acetyl flavonol from *Nervilia fordii* (Hance) Schltr[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2009, 11(6): 498-502.

[6] TIAN L W, PEI Y, ZHANG Y J, et al. 7-O-Methyl kaempferol and -quercetin glycosides from the whole plant of *Nervilia fordii* [J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(6): 1057-1060.

[7] 黄桂坤,邱莉,焦杨,等. 青天葵中一个新二萜苷[J]. *药学报*, 2014, 49(5): 652-655. [HUANG G K, QIU L, JIAO Y, et al. A new labdane diterpenoid glycoside from *Nervilia fordii* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(5): 652-655.]

[8] 邱莉,徐灵源,缪建华,等. 青天葵植物化学成分和药理学活性研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(9): 2258-2260. [QIU L, XU L Y, LIAO J H, et al. Study advances on chemical constituents from *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. and its bioactivities[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2011, 22(9): 2258-2260.]

[9] 陈怡. 天然多糖的研究概况[J]. *世界科学技术-中药现代化*, 2000, 2(6): 52-56,59. [CHEN Y. A survey of research on natural polysaccharide[J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine*, 2000, 2(6): 52-56,59.]

[10] XIE J H, JIN M L, MORRIS G A, et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(sup1): S60-S84.

[11] XIE J Z, ZOU L H, LUO X, et al. Structural characterization and immunomodulating activities of a novel polysaccharide from *Nervilia fordii* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 520-528.

[12] XIE J Z, ZOU L H, XIE Y F, et al. Purification, structural elucidation and immunostimulatory effect of a new protein-polysaccharide conjugate produced by *Nervilia fordii* [J]. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2021, 40(5): 226-242.

[13] 宋丽丽,闻格,霍姍浩,等. 小黄姜多糖的分离纯化及其结构特征及抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(12): 73-79. [SONG L L, WEN G, HUO S H, et al. Isolation, purification, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Zingiber officinale* Roscoe[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(12): 73-79.]

[14] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.

[15] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.

[16] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. *Analytical Biochemistry*, 1962, 4(4): 330-334.

[17] 邹录惠. 南药青天葵多糖化学成分及抗补体免疫活性研究[D]. 南宁:广西医科大学,2015. [ZOU L H. Research on chemi-

cal constituents of crude polysaccharide from *Nervilia fordii* and the screening of anti-complement and anti-inflammatory activity[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2015.]

[18] 田有秋, 贾金霞, 束旭, 等. 淡红侧耳子实体多糖的分离纯化及结构探析[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(12): 66–72. [TIAN Y Q, JIA J X, SHU X, et al. Purification and structure analysis of polysaccharides from *Pleurotus djamor*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(12): 66–72.]

[19] LIU X Y, CHEN Y X, WU L X, et al. Optimization of polysaccharides extraction from *Dictyophora indusiata* and determination of its antioxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 103: 175–181.

[20] 邵佳, 郁建平, 胡美忠. 草珊瑚水溶性粗多糖提取及抗氧化性能研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 283–286. [SHAO J, YU J P, HU M Z. Study on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Sarcandra glabra*[J]. *Food Science*, 2007, 28(11): 283–286.]

[21] DANG Z L, FENG D M, LIU X H, et al. Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from *Radix hedysari*[J]. *Fitoterapia*, 2013, 89: 20–32.

[22] CHEN J C, LI L, ZHOU X, et al. Preliminary characterization and antioxidant and hypoglycemic activities *in vivo* of polysaccharides from *Huidouba*[J]. *Food & Function*, 2018, 9: 6337–6348.

[23] MUTAILLIFU P, BOBAKULOV K, ABUDUWAILI A, et al. Structural characterization and antioxidant activities of a water soluble polysaccharide isolated from *Glycyrrhiza glabra*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 144: 751–759.

[24] 胡爱军, 李杨, 郑捷, 等. 鹰嘴豆非淀粉多糖的分离纯化及结构表征[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 22–26. [HU A J, LI Y, ZHENG J, et al. Separation, purification and structural analysis of non-starch polysaccharides from chickpea seeds[J]. *Food Science*, 2019, 40(8): 22–26.]

[25] 滕浩, 颜小捷, 林增学, 等. 百香果皮多糖的组成及其体外抗氧化活性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(5): 176–181. [TENG H, YAN X J, LIN Z X, et al. Composition and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from passion fruit shell[J]. *Food and*

Fermentation Industries, 2019, 45(5): 176–181.]

[26] ROZI P, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 97–106.

[27] 江琦, 姜在祥, 王正齐, 等. 蛹虫草虫草多糖的分离纯化、分子构象分析及抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(1): 22–28. [JIANG Q, LOU Z X, WANG Z Q, et al. Isolation and purification, structure and molecular conformation and antioxidant activities of polysaccharides from *Cordyceps militaris*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(1): 22–28.]

[28] 刘芳, 陈贵堂, 胡秋辉, 等. 金针菇锌多糖分离纯化及其结构特征[J]. *食品科学*, 2014, 35(5): 1–7. [LIU F, CHEN G T, HU Q H, et al. Separation, purification and structure characteristics of Zn-binding polysaccharides from *Flammulina velutipes*[J]. *Food Science*, 2014, 35(5): 1–7.]

[29] 刘冬, 韩吉欣, 张云, 等. 白鲜皮多糖纯化、结构表征以及抗过敏研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33: 1627–1634. [LIU D, HAN J X, ZHANG Y, et al. Purification, structure characterization and antiallergic activity of Cortex Dictamni polysaccharides[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33: 1627–1634.]

[30] ROZI P, ABUDUWAILI A, MA S J, et al. Isolations, characterizations and bioactivities of polysaccharides from the seeds of three species *Glycyrrhiza*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 364–371.

[31] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(3): 247–252. [WANG X Y, DU G R, LI H. Progress of analytical methods for antioxidant capacity *in vitro*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(3): 247–252.]

[32] CHANG S C, HSU B Y, CHEN B H. Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluated of antioxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47: 445–453.