

低剂量均能显著降低 *D*-半乳糖所致亚急性衰老模型组小鼠血清、肝组织、脑组织中脂质代谢产物 MDA 的含量($P<0.01$), 均能显著升高 *D*-半乳糖所致亚急性衰老模型组小鼠血清、肝组织、脑组织中 SOD、GSH-Px 活力($P<0.01$)。故其可通过增强机体的抗氧化能力而延缓衰老。同时, 芙蓉李总多酚提取物可明显增高 *D*-半乳糖所致亚急性衰老模型组小鼠胸腺指数和脾脏指数, 说明其可能通过机体的免疫系统而延缓衰老, 从而达到提高生存质量的目的。

REFERENCES

[1] CHEN D, YU L L, REN R Q. A kind of extraction and purification of total polyphenols in Furong Plum: China,

- 201110226278.7 [P]. 2013-10.
- [2] LEI S Y, LI Y S, ZHANG B, et al. Effect of curcumin on acute lung injury of mice with GSH-PX and iNOS activity in lung tissues [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(7): 583-586.
- [3] CAO J L, LI Z L, CHEN J W, et al. Effect of *Semen cannabis* oil on *D*-galactose induced subacute aging model serum NO, SOD, GSH-Px activity and MDA content [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*(四川中医), 2005, 23(3): 29-30.
- [4] WEI P, LIU W X, JIA F L, et al. Protective effect of 8-methoxypsoralen against acetaminophen-induced acute hepatic injury in mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(8): 682-686.
- [5] FU L Q, LI X Y, YANG C X. Galangin attenuates cognitive impairment in senescent mice [J]. *Her Med*(医药导报), 2012, 31(7): 863-866.
- [6] PENG X J, HAN Z Q, HAN X Z, et al. Huanglong pill on the *D*-galactose induced sub-acute aging mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2010, 28(10): 2035-2037.

收稿日期: 2013-01-21

银杏叶渣中多糖的提取及其抗氧化活性研究

吴巧攀¹, 乔洪翔², 何厚洪², 胡江宁², 吴健², 姚建标², 王如伟^{2*}(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江中药与天然药物研究院, 杭州 310052)

摘要:目的 研究银杏叶渣中多糖的提取工艺及其抗氧化活性。方法 以多糖提取率为评价指标, 通过苯酚-硫酸法检测, 经单因素试验得到最佳工艺, 所得银杏多糖进行还原能力和清除 DPPH 自由基的试验。结果 最佳工艺条件为: 料液比 1:7, 提取时间 2 h, 提取 2 次, 醇沉浓度 90%, 醇沉 1 h。银杏多糖具有较强的还原能力和清除 DPPH 自由基的能力。结论 该工艺简便可行, 稳定可靠, 适于工业生产, 所得多糖具有较强的抗氧化活性。

关键词: 银杏叶渣; 多糖; 提取; 自由基清除; 抗氧化

中图分类号: R284.2; R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0009-05

Extraction of Polysaccharides from Residue of *Ginkgo Biloba* Leaves and Study on Its Anti-oxidant Activity

WU Qiaopan¹, QIAO Hongxiang², HE Houhong², HU Jiangning², WU Jian², YAO Jianbiao², WANG Ruwei^{2*}(1.Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Institute of TCM & Natural Drug Co.Ltd, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop the optimal extraction technology of polysacchrides from residue of *Ginkgo biloba* leaves, and conduct anti-oxidant tests. **METHODS** Taking the extraction ratio of polysaccharides for evaluation index and detected by phenol-sulfuric acid method, the optimal technology was obtained through single factor experiments. And experiments were taken on reducing activity and scavenging activity against DPPH. **RESULTS** The optimal extraction conditions were material-to-liquid ratio of 1:7, extraction time of 2 h, 2 times, alcohol precipitation concentration of 90%, alcohol precipitation time of 1 h. The polysaccharides obtained had a good reducing activity and scavenging activity against DPPH. **CONCLUSION** The technology is convenient and workable, stable and dependable, which is suitable for industrial manufacture. The polysaccharides obtained have strong anti-oxidant activities.

KEY WORDS: residue of *Ginkgo biloba* leaves; polysaccharides; extraction; scavenging free radicals; anti-oxidant activity

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09203-001-18); 浙江省重点实验室和中试基地计划项目(2009E10009)

作者简介: 吴巧攀, 男, 硕士生 Tel: (0571)87774791 E-mail: pange0923@126.com *通信作者: 王如伟, 男, 硕士, 博导 Tel: (0571)87774766 E-mail: wangrw@conbagroup.com

银杏叶(*Ginkgo biloba leaves*),是具有“活化石”、“植物界大熊猫”之称的裸子植物银杏的干燥叶,性甘、苦、涩、平,归心、肺经,具有敛肺、平喘、活血化瘀、止痛等作用^[1]。其含量最多的成分是黄酮类、内酯类,此外还有有机酸、酚类、有机醇、多糖、矿物质等^[2]。目前,对黄酮类、内酯类成分的研究已相对成熟^[3],而其他成分研究较少。

多糖是一类由单糖连接而成的聚合物,广泛存在于植物的细胞壁和动物的细胞膜中。对多糖的研究最早可追溯到1936年。研究已发现银杏多糖具有免疫调节^[4]、抗氧化^[5]、抗肿瘤^[6]、延缓衰老^[7]等多种重要的生物活性和功能。而工业生产中,经稀乙醇提取后的银杏叶,其废渣中的多糖随之被抛弃,造成资源的浪费。本研究立足于提高银杏产业的经济价值,采用水提法提取银杏叶渣中的多糖,变废为宝。

1 仪器与试剂

TGL-16M 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验实验室仪器开发有限公司);UV2450 紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司);BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);HWS26 型恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

重蒸酚(国药集团化学试剂有限公司,批号:20130305);浓硫酸(上海凌峰化学试剂有限公司);无水乙醇(无锡市佳妮化工有限公司)。DPPH(美国 Sigma 公司);三氯乙酸(无锡市佳妮化工有限公司);铁氰化钾(上海凌峰化学试剂有限公司);三氯化铁(无锡市佳妮化工有限公司);

D-无水葡萄糖(中国食品药品检定研究院,批号:110838-200904,纯度:100%)。

银杏叶渣(浙江康恩贝提供,批号:1008064)。银杏叶(浙江康恩贝提供,批号:1008055),由浙江中药与天然药物研究院姜迅知教授级高工鉴定为银杏 *Ginkgo biloba* 叶。

2 方法与结果

2.1 多糖的检测方法

取提取液,滤过,定容至250 mL。取续滤液1 mL,加入9 mL 无水乙醇,冷藏过夜。离心(7 000 r·min⁻¹,5 °C,23 min),加少量热水溶解沉淀,冷却后定容至15 mL。以葡萄糖对照品作标准曲线,采用苯酚-硫酸法^[8]定量,结果葡萄糖含量在20~100 μg·mL⁻¹内线性良好,线性方程为 $Y=0.0097X+0.0024$, $r=0.9998$ 。

2.2 多糖提取条件的选择

2.2.1 提取时间的选择 取银杏叶渣10 g,3份,置250 mL 圆底烧瓶中,加入70 mL 水,分别提取1,2,3 h。过滤,定容至250 mL。按“2.1”项下方法测定多糖含量,结果见图1。

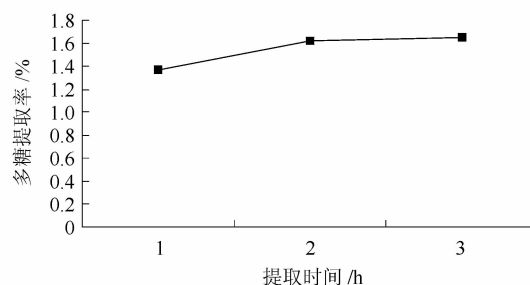


图1 提取时间对多糖提取率的影响

Fig 1 Effect of extraction duration on extraction ratio of polysaccharides

结果表明,提取时间从1 h至3 h,银杏多糖提取率呈升高趋势。当提取时间从2 h延长到3 h,多糖提取率的增加作用不再明显,这可能因为细胞内外的扩散已相对平衡^[9],因此采用2 h作为提取时间较为适合。

2.2.2 提取次数的选择 取银杏叶渣10 g,3份,分别置250 mL 圆底烧瓶中,加入70 mL 水,分别提取1次,2次,3次,每次提取时间2 h。过滤,滤液合并定容至250 mL。按“2.1”项下方法测定多糖含量,结果见图2。

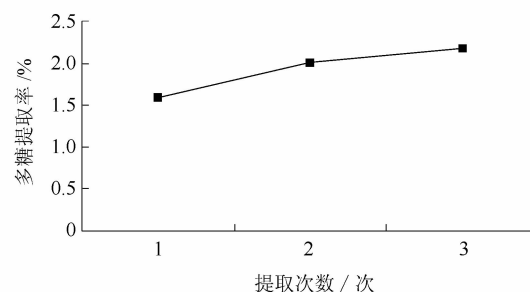


图2 提取次数对多糖提取率的影响

Fig 2 Effect of extraction times on extraction ratio of polysaccharides

结果表明,在提取3次内,银杏多糖提取率在增加。但提取2次与3次相差不大。考虑到生产成本,选择提取2次。

2.2.3 料液比的选择 取银杏叶渣10 g,3份,置250 mL 圆底烧瓶中,分别加入70,100,150 mL 水,每次提取2 h,共提取2次。过滤,定容至250 mL。按“2.1”项下方法测定多糖含量,结果见图3。

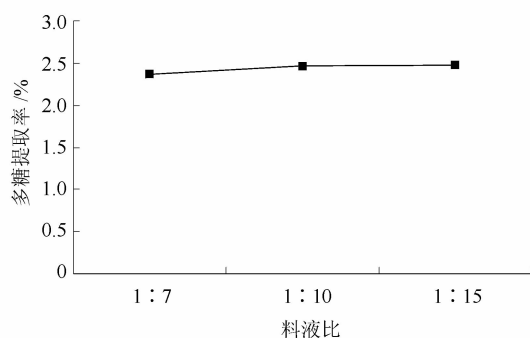


图3 料液比对多糖提取率的影响

Fig 3 Effect of material-to-liquid ratio on extraction ratio of polysaccharides

结果表明,料液比从1:7升高到1:15,银杏多糖提取率在升高,但上升的幅度非常小,考虑到生产成本,选择料液比1:7。

2.3 醇沉条件的选择

2.3.1 醇沉浓度的选择 取银杏叶渣 10 g,置 250 mL 圆底烧瓶中,加入 70 mL 水,提取 2 h,2 次。过滤,定容至 250 mL。取 1.5 mL 样品液,分别加入 3.5, 6, 9, 13.5 mL 无水乙醇,对应的醇沉浓度分别为 70%, 80%, 85%和 90%,冷藏过夜。离心($7\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $5\ ^\circ\text{C}$, 23 min),用水溶解沉淀,定容至 25 mL。按“2.1”项下方法测定多糖含量,结果见图 4。

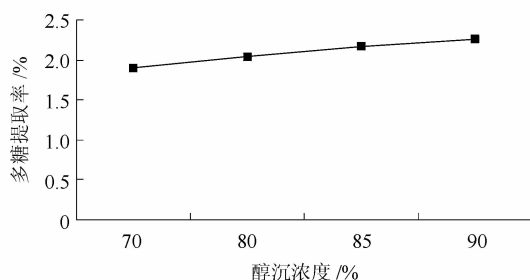


图4 醇沉浓度对多糖提取率的影响

Fig 4 Effect of alcohol precipitation concentration on extraction ratio of polysaccharides

结果表明,醇沉浓度从80%提高到90%,银杏多糖提取率呈升高趋势,因此选择醇沉浓度为90%。

2.3.2 醇沉时间的选择 取银杏叶渣 10 g,置 250 mL 圆底烧瓶中,加入 70 mL 水,提取 2 h,2 次。过滤,定容至 250 mL。取 1.5 mL 样品液,加入 13.5 mL 无水乙醇,使醇沉浓度为 90%,分别冷藏 1, 2, 3, 4 h。离心,溶解沉淀,定容至 25 mL。按“2.1”项下方法测定多糖含量,结果见图 5。

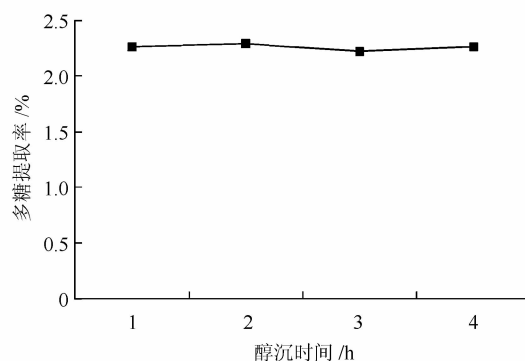


图5 醇沉时间对多糖提取率的影响

Fig 5 Effect of alcohol precipitation duration on extraction ratio of polysaccharides

结果表明,不同醇沉时间所得多糖提取率基本持平。考虑到时间成本,选择醇沉 1 h。

2.4 提取工艺验证试验

取银杏叶渣 100 g, 3 份,于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 700 mL 水,提取 2 h, 2 次。过滤,滤液浓缩、定容至 250 mL。取 1.5 mL 样品液,加入 13.5 mL 无水乙醇,使醇沉浓度为 90%,冷藏 1 h。离心,溶解沉淀,定容至 25 mL。按“2.1”项下方法测定多糖含量。取 200 mL,加入 9 倍量无水乙醇,冷藏 1 h。抽滤,减压干燥,得银杏多糖。结果表明,银杏多糖提取工艺稳定可靠,多糖的提取率为 2.35%,得率为 6.07%,含量为 38.7%。

2.5 银杏多糖的制备

2.5.1 从银杏叶中提取多糖 取银杏叶 100 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 700 mL 蒸馏水,于 $100\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中提取 2 h, 2 次。过滤,量取过滤液体积,加入 9 倍量无水乙醇,冷藏 1 h。抽滤,减压干燥,得银杏多糖 A,多糖含量为 28.7%。

2.5.2 从银杏叶渣中提取多糖 取银杏叶 100 g,用稀乙醇提取,弃去提取液。残渣烘干。置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 700 mL 蒸馏水,于 $100\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中提取 2 h, 2 次。过滤,量取过滤液体积,加入 9 倍量无水乙醇,冷藏 1 h。抽滤,减压干燥,得银杏多糖 B,多糖含量为 38.2%。

2.6 抗氧化活性的研究

2.6.1 还原能力^[10] 吸取各浓度样品 1.0 mL,分别加入 $0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 为 6.6 磷酸缓冲液以及 1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL, $50\ ^\circ\text{C}$ 水浴 20 min,迅速冷却,加入 10%三氯乙酸(TCA)2.5 mL, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液 3 mL,加入 3 mL 蒸馏水

和 0.1% TCA 0.5 mL, 混匀, 静置 10 min, 于 700 nm 测定吸光度, 吸光度越大说明还原能力越强。结果见图 6。

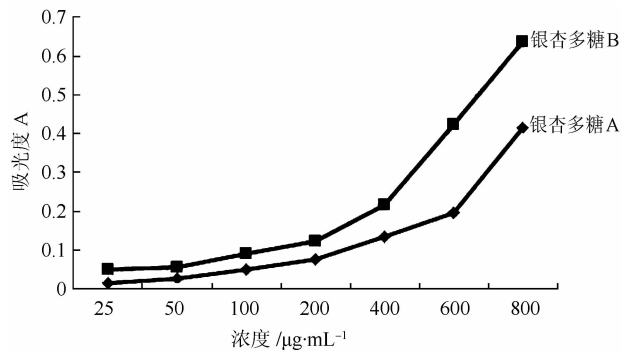


图 6 2 种多糖还原能力的比较
Fig 6 Comparison of reducing activity from two kinds of polysaccharides

结果表明, 银杏多糖 B 还原能力好于银杏多糖 A。原因可能是银杏叶经过醇提后, 多数杂质已被提取, 剩下的叶渣提取得到的多糖杂质较少, 使得其还原能力明显增加。

2.6.2 DPPH 自由基清除作用^[11-12] 取 4 mL 不同浓度的银杏多糖溶液, 加入 1 mL 用无水乙醇配制的 DPPH 溶液。用力振摇, 暗室中静置 30 min, 517 nm 下测定吸光度 A_1 。用 4 mL 多糖溶液与 1 mL 无水乙醇反应, 测得 A_2 。用 4 mL 蒸馏水与 1 mL 无水乙醇反应, 测得 A_0 。2 种多糖 DPPH 自由基清除率结果见图 7。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100\%$$

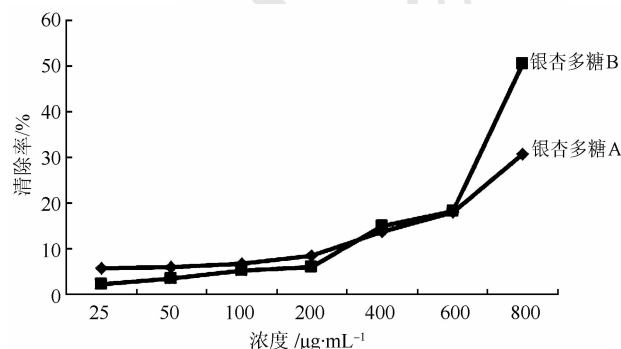


图 7 2 种多糖清除 DPPH 自由基能力的比较
Fig 7 Comparison of scavenging activity from two kinds of polysaccharides

由结果可知, 在浓度 0.2~0.6 mg·mL⁻¹ 内, 随着 2 种多糖质量浓度的增加, 对 DPPH 自由基的清除能力效果增加不显著, 当浓度进一步增大时, 银杏多糖 B 的清除率显著增加, IC_{50} 为 0.79 mg·mL⁻¹;

而银杏多糖 A 的清除率仅为 30.9%, 说明从银杏叶渣中提取得到的多糖 B 对 DPPH 自由基的清除能力强于银杏多糖 A。

3 讨论

本实验对银杏叶渣多糖提取的单因素进行研究, 确定银杏叶渣最佳提取工艺为: 以 7 倍体积水在 100 °C 水浴中提取 2 h, 2 次。过滤, 得滤液。滤液中加入适量无水乙醇, 使乙醇浓度为 90%, 静置 1 h。抽滤, 将固体减压干燥, 得到粗多糖。通过 3 次验证实验证明, 该工艺稳定可靠。

体外抗氧化试验表明, 银杏多糖具有较强抗氧化活性。具有较强的清除 DPPH 自由基地能力, 以及较强的还原能力。但从叶渣提取所得多糖, 其抗氧化活性高于银杏叶直接水提所得多糖。其原因可能是稀乙醇将一些杂质提取出去, 最后所得多糖纯度较高, 有更高的抗氧化活性。

本研究立足于银杏叶渣多糖的提取, 从而变废为宝, 提高银杏叶的资源利用率, 继而提高银杏叶产业的经济价值。我国是银杏大国, 占世界银杏叶产量的 90% 以上。提高对银杏叶的利用率, 对提高我国银杏产业的市场竞争力, 具有一定的意义。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 版. 一部)[S]. 2010: 296-297, 392-393, 1079-1082.
- [2] NIE L X, DAI Z, LU J, et al. Quality control of *Ginkgo biloba*, *Ginkgo* leaves extract and their preparations [J]. *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2011, 25(2): 171-172.
- [3] WANG D L, DI B, LI L, et al. Pharmacokinetics of ginkgo flavones in *Ginkgo* Leaf tablets in Beagle dogs [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 483-486.
- [4] WANG T Y, ZHAO B, WANG Y C. Research progress of polysaccharides on immunoregulation and antitumor [J]. *Chin J Proc Eng*(过程工程学报), 2006, 6(4): 678-681.
- [5] CHENG C, LI W. Antioxidant activity *in vitro* of water soluble polysaccharides from several plants [J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2006, 9(27): 63-65.
- [6] CHEN Q, LIU T J. Immunoregulation and antitumor of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2003, 19(5):18-19.
- [7] WEI W, LI X H. Research progress on polysaccharides [J]. *Foreign Med Sci*(Sec Pharm)(国外医学: 药学分册), 2005, 32(3): 179-183.
- [8] ZHANG M, YU T, SU X L, et al. Extraction technology of polysaccharide from *Chuanminshen violaceum* Shen et Shan [J]. *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2007, 22(3): 361-362.
- [9] XIA X H, WANG H O. Study on extraction technology of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2006, 27(1): 69-71.

- [10] WANG H B, LIU D C, SHE Z H, et al. Study on extraction, antioxidant activity and stability of soy isoflavone[J]. Food Sci(食品科学), 2004, 25(1): 111-114.
- [11] XU H D, QIN S H. Ultrasonic-assisted extraction and *in vitro* antioxidant activity evaluation of polysaccharides from *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne [J]. Food Sci(食品科

学), 2010, 31(10): 106-111.

- [12] LIANG Q L, WEN Y M, XIE Y H, et al. Study on antioxidation activities of polysaccharides from *Panopea generosa in vitro* [J]. Her Med(医药导报), 2013, 32(2): 171-173.

收稿日期: 2013-07-30

外源性磷酸肌酸对缺血豚鼠心室肌细胞钠通道的影响

时向民¹, 李天德², 王玉堂², 单兆亮², 杨庭树²(1.解放军总医院海南分院心内科, 海南 三亚 572000; 2.解放军总医院心内科, 北京 100853)

摘要: 目的 观察不同浓度外源性磷酸肌酸(PCr)对豚鼠缺血心室肌细胞钠通道(I_{Na})电流的影响, 探讨其预防缺血性心律失常的电生理学机制。方法 心室肌细胞经酶解从豚鼠左心室获得, 膜片钳全细胞模式记录 I_{Na} 电流, 通过灌注模拟缺血液并充以 95% N_2 +5% CO_2 的混合气体建立缺血模型。将 PCr 加入模拟缺血液中分别配成 5, 10, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ 浓度。将细胞分成 6 组, 分别予模拟缺血液、含有 5, 10, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ PCr 的模拟缺血液和台氏液灌注, 后者充以 95% O_2 +5% CO_2 的混合气体。10 min 后记录各组的峰电流及电流密度。结果 与单纯模拟缺血液组相比, 含有 5, 10, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ PCr 的模拟缺血液组 I_{Na} 峰电流及电流密度均明显增加($P < 0.05$)。10 $mmol \cdot L^{-1}$ PCr 模拟缺血液组与 5, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ 组之间具有统计学差异($P < 0.05$)。结论 PCr 能增加缺血时受抑制的 I_{Na} 峰电流及电流密度, 这可能是其预防缺血性心律失常的电生理学机制。PCr 在低浓度(0~10 $mmol \cdot L^{-1}$)对 I_{Na} 峰电流及电流密度的影响呈现明显的量效关系。

关键词: 磷酸肌酸; 钠电流; 缺血性心律失常; 膜片钳

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)01-0013-05

Effect of Exogenous Phosphocreatine on Natrium Current in Ischemic Ventricular Myocytes of Guinea Pig

SHI Xiangmin¹, LI Tiande², WANG Yutang², SHAN Zhaoliang², YANG Tingshu²(1.Department of Cardiology, the Affiliated Hainan Hospital of the General Hospital of PLA., Sanya 572000, China; 2.Department of Cardiology, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the effect of exogenous phosphocreatine(PCr) with different concentration on natrium (I_{Na}) current in guinea pig ischemic ventricular myocytes and to explore the antiarrhythmia mechanism in the treatment of ischemic heart disease. **METHODS** Ventricular myocytes were isolated enzymatically from left ventricular of guinea pig. Peak I_{Na} current was recorded using patch clamp techniques in the whole-cell configuration when myocytes had been superfused with normal Tyrode solution, simple ischemic solution, ischemic solution containing PCr with different concentration of 5, 10, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ for 10 minutes respectively. **RESULTS** Compared with simple simulated ischemic solution, peak I_{Na} current and current density of ischemic solution containing PCr of 5, 10, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ significantly improved($P < 0.05$). There was statistical significance among ischemic solution containing PCr of 10 and 5, 20, 30 $mmol \cdot L^{-1}$ ($P < 0.05$). **CONCLUSION** PCr can reverse the inhibition of I_{Na} current under ischemic condition, which can be the mechanism responsible for arrhythmia prevention in ischemia heart disease. PCr at concentration of 0-10 $mmol \cdot L^{-1}$ exerts significant dose-effect relationship.

KEY WORDS: phosphocreatine; natrium current; ischemia; patch clamp

在心室肌细胞, Na^+ 经钠通道(I_{Na})内流形成动作电位的上升支并决定动作电位在细胞间的传导, 心肌缺血时 I_{Na} 通道受到明显抑制, 0 相除极速度减慢, 从而使细胞间传导速度降低, 在正常

细胞与缺血细胞之间产生折返, 诱发心律失常^[1]。上述变化与缺血时细胞内 ATP 水平下降影响离子通道特性有关。外源性磷酸肌酸(exogenous phosphocreatine, PCr)作为 ATP 来源的重要底物已

基金项目: 解放军总医院苗圃基金(08MP13)

作者简介: 时向民, 男, 博士, 副主任医师

Tel: 13661305765

E-mail: shixm301cardiac@hotmail.com