

褐藻多糖类化合物对卵磷脂氧化的抑制作用

于广利 薛长湖 楼伟凤

(青岛海洋大学食品工程系, 266003)

摘要 褐藻多糖类化合物在乳化体系中对卵磷脂(PC)氧化具抑制作用,通过测定卵磷脂氢过氧化物(PC-OOH)含量,确定各化合物的抗氧化能力。结果表明:在自由基引发剂(AAPH)作用下,褐藻多糖类化合物(褐藻胶 ALG、磺化褐藻胶 SALG、甘糖酯 PGMS、藻酸双酯钠 PSS, 50 $\mu\text{mol/L}$)对 PC 氧化的抑制作用均比 V_C (60 $\mu\text{mol/L}$) 好,但不如 V_E (30 $\mu\text{mol/L}$) 的效果好;抑制顺序是: $V_E > \text{SALG} > \text{PGMS} > \text{PSS} > \text{ALG} > V_C$ 。

关键词 褐藻多糖, 抗氧化, 卵磷脂, 卵磷脂氢过氧化物, 自由基引发剂

近几年来,对褐藻多糖类化合物的研究很多,尤其是对胞间粘多糖的生理活性研究较为突出,发现褐藻多糖具有抗癌、降低胆固醇、降血糖、抗辐射作用以及清除自由基作用。如 Fujihara 等^[6]从马尾藻、海带及昆布中提取褐藻酸,并分级得到 M 段与 G 段分级产物,发现含 M 段高的褐藻酸分子比含 G 段高的褐藻酸分子抗 S-180 作用强;Noda H 等^[7]发现,含 M 段高的分子抗纤维瘤(Meth-A)活性强,而纯的 M 或 G 段产物则几乎无此活性。褐藻酸或其分级产物经特定方式改性后,有特殊的生理活性,如国家新药 PSS、PGMS 等都是典型的抗血栓、降血脂的类肝素海洋药物^[1,2]。张尔贤,王学琦等^[3,4]从马尾藻提取的多糖(分子量为 10 000)不仅抑制 S-180 及 EC109 癌细胞,且有清除超氧阴离子自由基作用,用 60%~80% 乙醇提取的铜藻多糖(分子量为 3 435)有清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)作用。在研究褐藻多糖类化合物抑制不饱和脂质氧化方面,尚未见报道。本文首次以褐藻多糖化合物为研究对象,采用 PC/AAPH 自由基引发氧化体系,用 HPLC 测定卵磷脂氢过氧化物(PC-OOH)的含量,并与天然自由基清除剂 V_C 、 V_E 比较,研究褐藻酸钠及其改性物(PSS, SALG)和分级后改性物(PGMS)对 PC 氧化的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

褐藻酸钠(ALG)(青岛海洋工业公司产,批号 941017。经 HCl 降解、纯化,得降解产物, MW 15 000)。磺化褐藻胶(SALG)(S% = 10, MW 20 000, 批号 950518)、藻酸双酯钠(PSS)(S% = 12, MW 11 000, 批号 950325)、甘糖酯(PGMS)(S% = 10, MW 5 200, 批号 951012)均

收稿日期:1996-07-11

为青岛海洋大学海洋药物与食品研究所提供。

V_E (Japan, NACALAITESQUE WC)、自由基引发剂(AAPH)(Japan, Wako Pure Chem. Ind. LTD.)、 V_C (BDH Chemicals)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)(BDH 进口分装, 经甲醇溶解、乙醚再生纯化后使用)、PC(Sigma 公司), 其它试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理及溶液配制 将 ALG、SALG、PSS、DGMS 溶于重蒸水, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 用无水乙醇沉淀后, 40°C 烘干, 盛放于硅胶干燥器中备用。PC 储备液: 称取定量 PC, 用 CHCl_3 配成 $0.1\ \text{mol/L}$ 储备液, 于 -20°C 存放备用。Tris-HCl 缓冲液: 称取定量 Tris, 用超纯水溶解, 加入定量 EDTA 和 $0.1\ \text{mol/L}$ HCl(GR), 混合配成 $10\ \text{mmol/L}$ (pH 7.4) 缓冲液。其中 EDTA 为 $0.5\ \text{mmol/L}$ 。 V_C : 称取定量 V_C , 用 $10\ \text{mmol/L}$ Tris-Bufler 溶解, 24 h 内使用。AAPH 贮备液: 称取定量 AAPH, 用 $10\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl 缓冲液配成 $0.1\ \text{mol/L}$, 于 -10°C 保存。

1.2.2 多糖化合物对 AAPH 引发的 PC 氧化的抑制 在 $5\ \text{ml}$ 具塞的试管中加入 $0.1\ \text{ml}$ PC ($0.1\ \text{mol/L}$), 用 N_2 吹干后, 加入 $1.0\ \text{ml}$ $10\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl 缓冲液, 超声乳化 $1\ \text{min}$, 振荡器上混合 $0.5\ \text{min}$, 使 PC 形成磷脂膜多分子层脂质体悬浮液。于 37°C 恒温振荡器中培养 $5\ \text{min}$ 后, 立即加入 $0.1\ \text{ml}$ $0.1\ \text{mol/L}$ AAPH, 计时培养。每隔 $0.5\ \text{h}$ 取 $10\ \mu\text{l}$ 进 HPLC 分析测定 PC-OOH 含量。同样在 $10\ \text{mmol/L}$ PC 乳化液中依次加入 V_C $60\ \mu\text{mol/L}$, ALG、SALG、PSS、PGMS 浓度均为 $50\ \mu\text{mol/L}$, V_E 为 $30\ \mu\text{mol/L}$, 均加入 $100\ \mu\text{l}$ AAPH 引发, 通过测定 PC-OOH 的含量, 确定它们各自对 PC 氧化的抑制情况。

1.2.3 V_C 及 V_E 含量测定^[5] V_C 分析条件: Spherisorb-NH₂ $5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$, UV265 nm; 流动相: 甲醇 $40\ \text{mmol/L}$, 磷酸二氢钠(9/1); 流速: $1.0\ \text{ml/min}$ 。 V_E 分析条件: Zorbax-ODS $5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$; 流动相: 甲醇; 流速: $1.0\ \text{ml/min}$; E_x 295 nm, E_m 325 nm; FL100 荧光检测器。

1.2.4 PC-OOH 含量测定^[8] 分析条件: Spherisorb-C₈, $5\ \mu\text{m}$, $5.0\ \text{mm i.d} \times 150\ \text{mm}$; UV235 nm; 流动相: MeOH/H₂O(95/5); 流速: $1.0\ \text{ml/min}$; 进样量: $10\ \mu\text{l}$ 。

2 结果与讨论

氧化过程中 V_C 与 V_E 的消耗情况见图 1, 褐藻多糖及其衍生物对 PC 氧化的抑制情况见图 2。从图 1 可看出, 自由基清除剂 V_C ($60\ \mu\text{mol/L}$) 和 V_E ($30\ \mu\text{mol/L}$) 消耗较快, 在 $30\sim 60\ \text{min}$ 内耗完。从图 2 可看出, PC-OOH 上升的幅度, 对照组最大, V_C 次之, V_E 最小。同对照组相比, 褐藻多糖对 AAPH 引发的 PC 脂质体中 PC 的氧化有一定的抑制作用。从图 2 还可看出, 4 种多糖能明显延缓 PC-OOH 的形成, 从而保护 PC 免遭自由基的伤害。从 4 种多糖对卵磷脂氧化的抑制效果看, SALG 最好, ALG 最差, PGMS 较 PSS 稍好。

褐藻多糖抗 PC 的氧化机理是通过与 PC 结合, 减少与自由基作用机会, 还是多糖直接与脂自由基($\text{L}\cdot$)或脂过氧自由基($\text{LOO}\cdot$)作用尚不清楚。4 种多糖的抑制效果有一定差别, 这也许是它们的化学结构不同所致。ALG 是甘露糖醛酸(M)与古罗糖醛酸(G)组成的嵌段化合物, SALG 较 ALG 多了 10% 硫酸基含量, 可见硫酸基对抑制自由基氧化具有一定作用。PSS 与 PGMS 均属聚阴离子多糖, 其有机硫含量(PSS 为 12%, PGMS 为 10%)差别不大, 主要不同在于 PGMS 为含硫酸基的多聚甘露糖醛酸(M), 而 PSS 则是含硫酸基的甘露糖醛酸(M)与古罗糖醛酸(G)的嵌段化合物, 从构效关系看, 含甘露糖醛酸多的褐藻硫酸多

糖清除自由基作用较含甘露糖醛酸少的褐藻硫酸多糖强些。这对于 PGMS 与 PSS 在临床上的应用提供了理论数据。

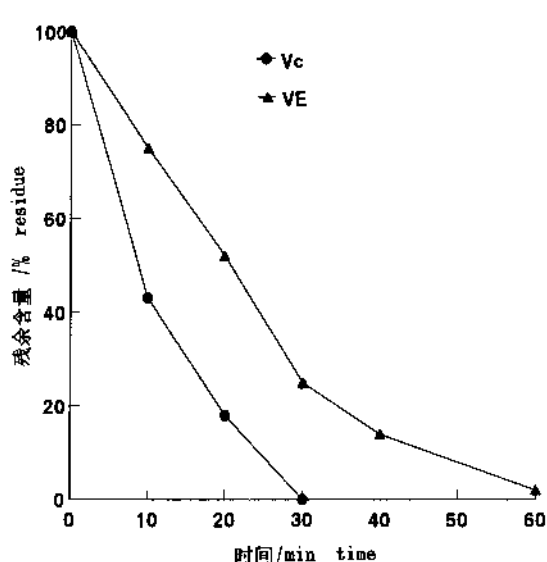


图1 V_C 与 V_E 在脂质氧化体系中消耗情况

Fig. 1 Decrease of V_C and V_E in AAPH-initiated oxidation of PC liposomes

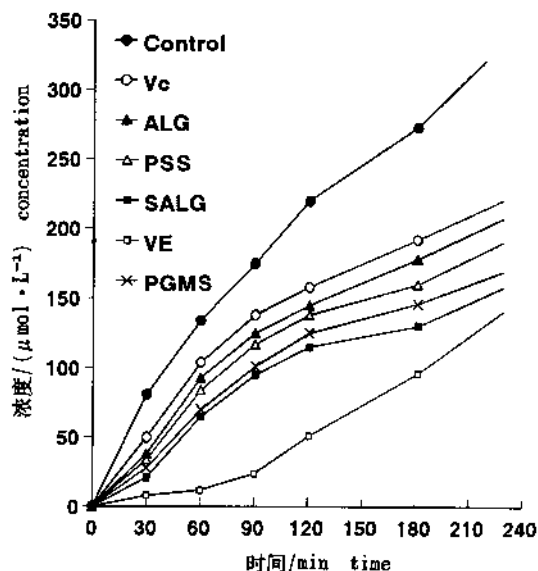


图2 褐藻多糖对卵磷脂氧化的抑制

Fig. 2 Antioxidation of brown algae polysaccharides to PC

参 考 文 献

- 1 刘希江,等. 藻酸双酯钠的基础研究与临床研究进展. 中国海洋药物, 1992, 3: 26~26
- 2 刘成玉,等. 甘露糖、藻酸双酯钠对急性脑梗死患者白细胞变形能力的影响. 中国海洋药物, 1994, 4: 20~22
- 3 张尔贤,等. 鼠尾藻醇提取物的生理活性和生物化学研究. 中国海洋药物, 1994, 3: 1~9
- 4 王学琦,等. 鼠尾藻多糖对人粒细胞超氧阴离子自由基释放的影响. 中国海洋药物, 1992, 2: 4~6
- 5 金恒亮. 高压液相色谱法. 北京: 原子能出版社, 1987. 243p
- 6 Fujihara M, et al. The effect of content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. Carbohydr Res, 1992, 224: 343~346
- 7 Noda H, et al. Studies on the antitumor activity of marine algae. Nippon Suisan Gakkaishi. 1989, 55(7): 1259~1263
- 8 Junji Terao, et al. Lipid hydroperoxide assay for antioxidant activity of carotenoids. Methods in Enzymology. 1992, 213: 454~640

Antioxidation of brown algae polysaccharides to phosphatidylcholine

Yu Guangli Xue Changhu Lou Weifeng

(Department of Food Engineering, Ocean University of Qingdao, 266003)

Abstract The antioxidative ability of brown algae polysaccharides to phosphatidylcholine (PC) in water was determined by testing the concentration of phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH). In the presence of free radical initiator AAPH, the antioxidations of alginate (ALG), sulfated alginate (SALG), propylene glycol alginate sodium sulfate (PSS) and propylene glycol mannurate sulfate (PGMS), 50 $\mu\text{mol/L}$ respectively, are all better than that of 60 $\mu\text{mol/L}$ Vc, but poorer than that of 30 $\mu\text{mol/L}$ V_E. And the antioxidative ability of brown algae polysaccharides to phosphatidylcholine is V_E > SALG > PGMS > PSS > ALG > V_C.

Key words brown algae polysaccharides, antioxidation, PC, PC-OOH, AAPH