

(1)健儿清解液处方:金银花 110 g,菊花 100 g,连翘 65 g,山楂 50 g,苦杏仁 50 g,陈皮 2.5 g。制成 1 000 ml。

(2)制备工艺:以上 6 味,金银花、菊花、连翘、苦杏仁分别蒸馏提取芳香水,山楂用 80% 乙醇加热回流提取二次,每次 2 小时,滤过,合并滤液,滤液回收乙醇,浓缩成浸膏;陈皮用 60% 乙醇作溶剂进行渗漉,收集渗漉液,回收乙醇,将山楂浸膏与其合并,加水沉析,滤过,加入上述芳香水和 0.05 g 枸橼酸、300 ml 单糖浆及苯甲酸,加水至 1 000 ml,搅匀,滤过,即得。

(3)试验数据及方差分析

见表 1、2、3。

表 1 健儿清解液因素水平表

水平	因素		
	A 加水倍数/倍	B 水沉温度/℃	C 水沉时间/h
1	0.5	2	24
2	1	20	48
3	2	30	72

表 2 健儿清解液正交试验结果表

试验号	因素				综合评分(分) (Y _i)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	5
2	1	2	2	2	5
3	1	3	3	3	2
4	2	1	2	3	8
5	2	2	3	1	6
6	2	3	1	2	3
7	3	1	3	2	9
8	3	2	1	3	5
9	3	3	2	1	3
K ₁	12	22	13	14	
K ₂	17	16	16	17	
K ₃	17	8	17	15	
R	5	14	4	3	

表 3 健儿清解液正交试验方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	5.56	2	2.78	2.78	
B	47.89	2	23.945	23.945	P < 0.05
C	26.89	2	13.445	13.445	
e	2	2	1		

$$F_{0.01(2,2)} = 99; F_{0.05(2,2)} = 19$$

(4)评分标准

各项计分按澄明度由澄清到浑浊、两项鉴别由强至弱进行综合评分,满分 10 分。

3 小结

由表 2、3 可知,各因素对健儿清解液澄明度的影响程度大小依次为:B > A > C,其中 B 因素对健儿清解液澄明度有非常显著的影响,A、C 因素无显著影响,极差分析与方差分析结果一致,最佳水沉条件为 A₂B₁C₃,即加水 1 倍,水沉温度 2℃,水沉时间 72 小时。加水 1 倍与 2 倍无显著性差异,从生产实际出发,加 1 倍更合理。

银耳多糖的提取及清除自由基作用的研究

★ 王枫 (浙江省江山市人民医院 江山 324100)

摘要:目的:对银耳多糖的提取纯化及其清除自由基的作用进行研究。方法:讨论采用热水提取、乙醇沉淀、Sevag 法获得银耳多糖的方法。并在体外化学模拟系统反应中,观察银耳多糖消除过氧化氢、羟自由基、超氧阴离子自由基的性能。结果:经提取方法的改进,银耳粗多糖的得率达到了 19.22%。银耳多糖对 H₂O₂ 具有一定的清除作用,其清除羟自由基和超氧阴离子的作用也比较明显,清除能力随着多糖浓度的升高而升高。结论:在银耳子实体中多糖的含量较高且具有很好的清除自由基的能力。

关键词:银耳多糖;羟自由基;超氧阴离子

银耳是公认的具有保健功能的大型食用真菌,其所含的银耳酸性杂多糖对肿瘤的阻抑率可达 35.4%^[1,2]。银耳所含化学成分比较复杂,主要可分为 3 大类,即多糖类、脂类和蛋白类(酶、蛋白质、氨基酸),此外还有无机盐、维生素 B 族等。灰分中含 S、P、Fe、Mg、Ca、K、Na 等成分。据国内外学者研究报道,银耳多糖作为银耳的主要活性成份可分为酸性杂多糖、中性杂多糖(多糖 LPS)、酸性低聚糖、胞壁多糖和胞外多糖 5 大类。关于银耳多糖的提取方法,常用的有:热水提

取法、酸提取法、碱提取法、酶解提取法以及超滤提取法。根据银耳原材料的不同,提取条件和局部操作的选择也有所不同^[1]。

1 实验方法

1.1 试验材料、试剂、仪器与设备

优质椴木银耳(四川通江产)、氢氧化钠、氯化钠、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、氯仿、正丁醇、无水乙醇、乙醚、过氧化氢、硫酸亚铁、水杨酸、碘化钾、硫代硫酸钠、碳酸钠、

淀粉、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、盐酸、邻苯三酚、抗坏血酸、硫酸等试剂均为国产分析纯,蒸馏水,AK-600A 型 300 克摇摆式中药粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)、DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)、KXH-202AF 型远红外干燥箱(上海科析试验仪器厂)、101-3AB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)、R201B-II 型旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司)、FA1104 型电子分析天平(上海上平仪器公司)、UNLCO7200 型紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 银耳粗多糖的制备 将银耳置于电热鼓风干燥箱中于 70~80℃ 的温度下烘干,若干分钟,随即趁热粉碎,粉碎粒度需 60 目以上的大于 60%,称取 20.40 g。将称量好的银耳粉末用 80% 的乙醇浸泡 15 小时,将浸泡液减压抽滤,弃滤液。通过减压抽滤的方法将乙醇浸出物除去。将处理过的银耳粉加入 600 ml 的蒸馏水,在 85℃ 的水浴条件下浸提 5 小时,3 000 rpm/min 的条件下冷冻离心 10 min,得一次浸提液。将离心的下层物再加入 3 倍量的蒸馏水浸提,得二次浸提液,合并两次浸提的上层液备用。将上层液于 80℃ 水浴搅拌浓缩至糖浆状,将浓缩液加入 1:4 体积的氯仿-正丁醇溶液(氯仿:正丁醇 = 3:1)剧烈振摇,离心(3 000 rpm/min, 10 min),弃下层氯仿和中层变性蛋白质。然后重复去蛋白几次,直至无白色变性蛋白质出现为止。将除去蛋白质的银耳粉浸提液用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液调至 pH = 7。然后以 65℃ 于旋转蒸发仪中浓缩至原来体积的 1/3,再缓慢的向浓缩液中加入约 3 倍量的无水乙醇,在此过程中用玻璃棒轻轻搅拌,随着乙醇量的增加,有白色絮状物析出,即为银耳粗多糖。当乙醇浓度达到约 80% 的时候,溶液中出现大量絮状物,表明多糖已基本全部析出。静置 5 小时后多糖沉于烧杯底部,离心(3 000 rpm/min, 5 min)取沉淀置于 70℃ 的烘箱中烘干。将干燥体于研钵中研成粉末,称重 3.92 g,回收率为 19.22%。

1.2.2 通过紫外吸收光谱扫描测定多糖中所含的成分 将 0.10 g 多糖充分溶于 10 ml 超纯水中,以超纯水作为空白对照,在 190~350 nm,间隔 5 nm 进行光谱扫描。

1.2.3 银耳多糖的纯化 精密称取粗品 1.02 g 溶于 100 ml 蒸馏水中,充分搅拌,溶解后离心(3 000 rpm/min, 10 min),除去不溶物。上清液加 2% CTAB 溶液至沉淀完全,摇匀,静置 4 小时。离心(3 000 rpm/min, 5 min),沉淀用热水洗 3 次后加 100 ml 2 mol/L 的 NaCl 溶液于 60℃ 解离 4 小时,在此过程中用玻璃棒充分搅拌。离心(3 000 rpm/min, 10 min),将上清液置于处理过的透析袋中扎袋透析 24 小时,隔 12 小时换一次水。将透析液于 80℃ 水浴浓缩,缓慢加入 3 倍量的无水乙醇,用玻璃棒轻轻搅拌,得大量絮状沉淀,离心(3 000 rpm/min, 5 min)。将沉淀干燥,研磨,称重得银耳多糖纯品 0.514 g,回收率为 50.39%。

2 银耳多糖清除自由基能力的研究

2.1 清除 H₂O₂ 能力的测定

采用碘量法。在试管中加入 0.1 mol/L 的 H₂O₂ 1.0 ml 和一定量的样品(分别加入 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg/ml 的浓度),37℃ 水浴保温 2 小时,让其反应,然后向其中滴入几滴 KI 溶液,用 0.05 mol/L 的硫代硫酸钠标准溶液,滴定溶

液至淡棕色,然后加 1 ml 淀粉溶液,继续滴定至蓝色消失为止,记录下所耗硫代硫酸钠标准溶液的量。再采用同种方法探讨抗坏血酸清除 H₂O₂ 的能力,二者进行比较。银耳多糖对 H₂O₂ 具有一定的清除作用,但其清除能力低于同等浓度的抗坏血酸。

2.2 羟自由基清除能力的测定

(1)配制 8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液、9 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、9 mmol/L 水杨酸溶液和浓度分别为 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mg/ml 的多糖溶液。

(2)取型号相同的带塞试管,分别加入配制好的 FeSO₄ 溶液 1 ml、过氧化氢溶液 1 ml 和 1 ml 水杨酸溶液,摇匀。

(3)将以上配制好的溶液于 37℃ 水浴 30 min 后取出,以蒸馏水为对照,测其吸光度 A_i,记录。

(4)在以上各试管中再依次加入配制好的不同浓度的多糖溶液,摇匀,水浴继续加热 30 min 后取出。同样以蒸馏水为空白对照,测其吸光度 A_j,记录。

银耳多糖对 ·OH 具有较好的清除作用,清除效果与多糖浓度成正相关。当多糖浓度为 0.15 mg/mL 时对 ·OH 的清除率达到了 50.17%。

2.3 银耳多糖清除超氧阴离子自由基能力的测定

(1)配制 pH 为 8.2, 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液、25 mol/L 的邻苯三酚溶液、8 mol/L 的盐酸溶液和浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/ml 的多糖溶液。

(2)取型号相同的带塞试管,先加入配制好的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 ml,置于 20℃ 水浴中预热 20 min。

(3)再向试管中分别加入 1 ml 配制好的不同浓度的多糖溶液和 25 mol/L 的邻苯三酚溶液 0.4 ml,充分混匀后于 25℃ 水浴中反应 5 分钟。

(4)最后向试管中加入 1 ml 8 mol/L 的 HCl 终止反应。

(5)将以上反应液置于 325 nm 处测定吸光度,将加入邻苯三酚的试液作为空白对照组,记录下其吸光度 A_x 和加入多糖溶液的试液的吸光度 A_y。

银耳多糖对 O₂^{-·} 具有很好的清除作用,清除效果与多糖浓度成正相关。当多糖浓度为 0.25 mg/mL 时对 O₂^{-·} 的清除率达到了 48.83%。

3 讨论

银耳多糖对 H₂O₂ 具有一定的清除作用,但其清除能力低于同等浓度的抗坏血酸,对羟自由基的清除作用比较明显,当多糖浓度为 0.15 mg/mL 时对 ·OH 的清除率达到了 50.17%,对邻苯三酚自氧化也有较好的抑制效果,对超氧自由基的清除能力随着多糖浓度的升高而升高,当多糖浓度为 0.25 mg/mL 时对 O₂^{-·} 的清除率达到了 48.83%。

自由基与衰老、心脑血管疾病、癌症等疾病的发生发展密切相关。因此银耳多糖可以保护细胞免受自由基的破坏,抑制组织脂质过氧化,避免自由基过多对人体造成危害,并能有效提高人体免疫力,延缓衰老。因此,开发银耳多糖类功能食品具有较现实的现实意义。

参考文献

- [1]王谦.大型食用真菌的多糖类物质[J].广西轻工.1995,4:16-19.
- [2]夏尔宁.银耳子实体多糖的分离、分析及生物活性[J].真菌学报.1988,7(3):166.