

维药芜菁籽多糖体外抗氧化活性研究

马合木提·买买提明¹, 克里木·伊明², 玛尔哈巴·吾斯满^{1*}

(1. 新疆医科大学药学院化学教研室, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

[摘要] **目的:**通过体外清除自由基试验初步研究芜菁籽多糖的抗氧化活性。**方法:**采用脱脂,水提,除蛋白,脱色,醇沉等方法提取多糖。利用4种常见的体外抗氧化活性测试方法,即清除DPPH·自由基,羟自由基,超氧阴离子自由基以及总还原能力等来衡量芜菁籽多糖的抗氧化能力,并与维生素C(Vc)进行对照。**结果:**芜菁籽多糖提取率为2.34%,并具有一定的抗氧化活性,抗氧化能力与浓度之间有很好的量效关系,浓度越大,抗氧化活性越强。其中芜菁籽多糖的总还原能力较强,清除超氧阴离子自由基的能力较弱。**结论:**芜菁籽多糖具有天然抗氧化能力,在以芜菁籽为原料开发多糖类功能食品方面有较现实的实际意义。

[关键词] 芜菁籽; 多糖; 抗氧化活性; 清除自由基

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0118-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070118

Study on Antioxidative Activity of Polysaccharide from Uighur Medicine Turnip Seed *in vitro*

Mahemuti · Maimaitiming¹, Kelimu · Yiming², Maerhaba · Wusiman^{1*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Horticulture Institute of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

[Abstract] **Objective:** An preliminary study on antioxidant activity of Turnip seed polysaccharide was carried out through radical scavenging experiment *in vitro*. **Method:** Several methods include degreasing, water extraction, deproteinization, decolorization and alcohol precipitation were adopted to extract polysaccharide. Four common of antioxidant activity *in vitro* testing methods were selected, namely scavenging DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide anion radical and total reducing ability, to measure the antioxidant capacity of Turnip seed polysaccharide, and ascorbic acid Vit C (Vc) was selected as the positive control. **Result:** Turnip seed polysaccharide have a certain amount of antioxidant activity, and the extraction rate of is 2.34%. The antioxidant capacity of polysaccharide and its concentration have good dose-effect relationship. Besides, higher concentration can enhance the antioxidant activity. Meanwhile, Turnip seed polysaccharide has strong total reduction ability, but relatively weak superoxide anion radical scavenging capacity. **Conclusion:** The experiments show that Turnip seed polysaccharide has natural antioxidant capacity, and using turnip seed as raw materials to develop multi-functional carbohydrate foods will have a more realistic practical significance.

[Key words] Turpin seed; polysaccharide; antioxidant activity; free radical scavenger

芜菁籽为芜菁干燥成熟的种籽,具有养肝明目、润肺止咳、软肠通便、行气利水、清热解毒、利湿退黄、

[收稿日期] 20130603(013)

[基金项目] 新疆教育厅高校科研计划重点项目(XJEDV2010I33)

[第一作者] 马合木提·买买提明,副教授,从事新疆地方药物研究和开发, Tel:0991-4362364, E-mail:xjmu111@163.com

[通讯作者] * 玛尔哈巴·吾斯满, 工程硕士, 助理研究员, 从事食品、花卉保鲜及加工研究, Tel:0991-4523470, E-mail:umutyultuzi666@yahoo.com.cn

破积通淋的功效^[1]。是维吾尔族医药中常用的族药之一,与中医中芫菁籽的用法不同,维医中常以芫菁籽治疗干寒性或黑胆质性疾,如黄疸性肝炎、肺燥咳嗽、肾脏虚衰、性功能减退、浮肿、黄疸、伤寒等^[2]。

多糖是由10个以上单糖通过糖苷键连接而成的一类天然聚合物。药理研究表明,多糖具有增强免疫、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗衰老等作用,而这些功能主要又跟多糖的抗氧化作用有关。马彦玲^[3]采用高效毛细管电泳法测定芫菁籽多糖中的单糖组成,发现芫菁籽多糖中含有阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸等单糖,芫菁籽多糖体外抗氧化作用未见报道。研究芫菁籽多糖对DPPH·、·OH和O₂⁻·的清除作用以及总还原能力,旨在获得芫菁籽多糖抗氧化基础数据,为其在功能性保健品或医疗领域中的开发应用提供科学依据。

1 材料

UV-3600紫外-可见分光光度计(日本岛津),RE-52型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),AR1140型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],AIPHAI-4LD PLUO型真空冷冻干燥机(德国CHRIST),TG16-WS型台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),FW177型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),SB-120D型超声波清洗器。

芫菁籽采自新疆阿克苏地区柯坪县。1,1-二苯基苦基苯酚(DPPH),购自Sigma公司,Vc,邻二氮菲,邻苯三酚等其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 芫菁籽多糖的提取 将干净芫菁籽放入80℃烘箱烘干,粉碎,取100g过40目筛的粉末于2000mL烧杯中,以1:20比例加入石油醚(60~90℃)超声处理60min后,浸泡24h脱脂和除色素,旋转蒸馏除去石油醚,抽滤,滤渣自然挥干。干渣置于索氏提取器中,用95%乙醇提取3次,每次60min。抽滤(合并滤液,旋转蒸馏挥干溶剂另用),得到的残渣晾干后加入适量蒸馏水,回流提取2次(2,1h),合并上清液,上清液减压浓缩至50mL。用Sevag法(三氯甲烷-正丁醇5:1)多次萃取,除尽蛋白质(取少量多糖溶于水中,加入几滴0.01%茚三酮溶液,加热约10min,无紫色为止)。收集上层液离心10min(4000r·min⁻¹),离心液按体积加入2%活性炭,60℃水浴锅中脱色30min,趁热过滤除去活性炭。滤液缓慢加入无水乙醇,使其浓度达到80%。在4℃冰箱中静置24h后,离心收集沉淀,沉淀依次用无水乙醇,丙酮,乙醚洗涤3次,离心15min(4000r·

min⁻¹),除去乙醇,单糖和小分子杂质等。60℃干燥称重,即得淡黄色芫菁籽多糖样品2.1206g。

$$\text{多糖产率} = \text{多糖样品含量} / \text{样品干重} \times 100\%$$

2.2 芫菁籽多糖含量测定方法 采用硫酸-苯酚法测定多糖含量^[4]。

2.2.1 标准曲线的制作 精密称取105℃烘至恒重的葡萄糖对照品50mg,加超纯水适量溶解,定容至50mL棕色量瓶中,摇匀,得1.00g·L⁻¹的对照品溶液。分别移取对照品溶液1.00,2.00,3.00,4.00,5.00mL定容至100.0mL。取稀释液各2.00mL,加1.00mL6%重蒸后新配制的苯酚溶液,然后快速滴入浓硫酸7.00mL,在100℃沸水浴中加热20min。冷水冷却至室温,在波长490nm处平行测定吸光度3次取平均值。以2.0mL超纯水按同样显色操作为空白对照。葡萄糖浓度为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,制作标准曲线,得回归方程 $A = 5.97C + 0.0243$ ($R^2 = 0.9973$),线性范围0.01~0.05g·L⁻¹。

2.2.2 芫菁籽多糖含量的测定 取芫菁籽多糖样品50.0mg,用超纯水溶解转移至100mL量瓶中,摇匀定容。从中分别准确量取2.00mL多糖溶液3份,按照2.2.1中操作方法测定在490nm处的吸光度值。多糖含量 = $C \times D \times V / W \times 100\%$,C为回归方程计算出的质量浓度(g·L⁻¹),D为稀释倍数,V为溶液体积,W为多糖样品质量(mg)。

2.3 芫菁籽多糖抗氧化活性研究

2.3.1 芫菁籽多糖清除DPPH自由基能力的测定^[5]。精确称取10.00mgDPPH用无水乙醇溶解并定容于100mL量瓶中,摇匀,即得0.1g·L⁻¹的DPPH溶液。精密称取芫菁籽多糖样品50mg,溶解定容至50.0mL。从中分别移取溶液1.00,2.00,3.00,4.00,5.00mL定容至100.0mL,作多糖待测液备用。在具塞试管中各取待测液2mL,加入2mLDPPH,摇匀后室温避光反应30min,分别测定517nm处的A_i,测3次取平均值,同时测2mL无水乙醇2mLDPPH混合后的A_c和2mL无水乙醇与2mL待测液混合后的A_j。以新配制的Vc为阳性对照。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j / A_c)] \times 100\%$$

2.3.2 芫菁籽多糖清除羟自由基(·OH)能力的测定 采用铁氧化邻二氮菲-Fe²⁺模型测定芫菁籽多糖清除羟自由基的能力^[6]。在10.00mL锥形瓶中依次取5mmol·L⁻¹邻二氮菲溶液1.00mL,磷酸盐缓冲溶液(0.2mol·L⁻¹pH7.4)2.00mL,硫酸亚铁溶液(7.5mmol·L⁻¹)1.00mL,加入不同浓度的多糖样品溶液,充分混匀后,再加入0.1% H₂O₂溶液

1.00 mL 启动反应, 37 °C 水浴保温 60 min 后, 于 536 nm 测定 A_1 , 每个样品做 3 个平行取平均值。以新配 Vc 溶液为阳性对照。利用公式:

$$(\cdot\text{OH}) \text{ 自由基清除率} = [(A_1 - A_2) / (A_3 - A_2)] \times 100\%$$

A_1 样品吸光度; A_2 以 1.00 mL 蒸馏水代替以上操作中 1.00 mL 0.1% 的 H_2O_2 溶液(不加多糖样品溶液); A_3 以上操作中未加多糖样品溶液的吸光度。

2.3.3 芫菁籽多糖清除超氧阴离子自由基能力的测定 通过邻苯三酚自氧化法进行测定^[7], 以 Vc 为阳性对照。在干燥的具塞小试管中分别加入 0.2 mL 不同浓度的多糖溶液(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5.6 mL 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.20), 充分混匀, 在 25 °C 水浴保温 20 min 后, 迅速加入 0.2 mL 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚(25 °C 预热), 摇匀后于 320 nm 处测定第 1 min 和第 5 min 的 A_1 , 计算其氧化速率。以 Tris-HCl 做空白参比, 用等体积蒸馏水代替样品液, 同法测定第 1 min 和第 5 min 的 A_2 。实验平行测定 3 次, 取平均值。根据邻苯三酚自氧化速率计算清除率

$$\text{清除率} = [(\Delta A_2 / \Delta t - \Delta A_1 / \Delta t) / \Delta A_2 / \Delta t] \times 100\%$$

式中: $\Delta A_2 / \Delta t$ 为邻苯三酚自氧化时反应速率, $\Delta A_1 / \Delta t$ 为加入萃取物后邻苯三酚自氧化反应速率, $\Delta A = A_5 - A_1$ 。

2.3.4 芫菁籽多糖还原能力测定 总还原能力的测定采用普鲁士蓝法^[8]。在 2.5 mL 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 6.6) 磷酸钠缓冲液中加入 1.0 mL 不同浓度的多糖溶液(0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

和 2.5 mL 1% 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 将混合物在 50 °C 条件下保温 20 min, 最后加入 2.5 mL 10% 的三氯醋酸, 震荡混匀, 在 4 °C 下离心 10 min(3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液 2.5 mL, 加 2.5 mL 超纯水和 1 mL 0.1% 的 FeCl_3 , 混和均匀, 静置 10 min 后, 于波长 300 ~ 700 nm 扫描确定最大吸收波长为 700 nm, 在此波长下测定 A , 平行测定 3 次取平均值。同时以 Vc 为对照品, 超纯水为参照液。

3 结果与分析

3.1 芫菁籽多糖含量测定方法 葡萄糖标准曲线回归方程为 $A = 5.97C + 0.0243$ ($R^2 = 0.9973$), 该方程在 0.01 ~ 0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有良好的线性关系。经计算多糖产率为 2.12%。3 份芫菁籽多糖溶液的平均 A 为 0.1164 ($n = 3$, RSD 0.271%), 由回归方程计算出的质量浓度为 0.0154 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 芫菁籽多糖含量为 6.16%。

3.2 清除 DPPH 自由基的能力 DPPH 是一种以氮为中心的非常稳定的自由基, 溶液呈紫色且在 517 nm 处有强的吸收峰。在 DPPH 溶液中有自由基清除剂时, 溶液颜色由紫色变为淡黄, 通过测定吸收减弱的程度, 可以评价抗氧化剂清除 DPPH 自由基的能力^[9]。芫菁籽多糖清除 DPPH 自由基的能力都随其浓度的增加而增强, 在 0.01 ~ 0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Vc 清除 DPPH 自由基的能力强于芫菁籽多糖。由图 1 和表 1 可知, 芫菁籽多糖清除 DPPH 的 IC_{50} 0.054 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Vc 的 $\text{IC}_{50} = 0.010 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $\text{IC}_{50} \text{ 芫菁籽多糖} / \text{IC}_{50} \text{ Vc} = 5.4$, 表明芫菁籽多糖具有一定的清除 DPPH 自由基能力。

表 1 芫菁籽多糖清除自由基的能力及 IC_{50}

样品	清除 DPPH			清除羟自由基			清除超氧自由基		
	拟合线性方程和	R^2	IC_{50} / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	拟合线性方程和	R^2	IC_{50} / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	拟合线性方程和	R^2	IC_{50} / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
芫菁籽多糖	$Y = 941.6X - 1.31$	0.996	0.054	$Y = 170.98X - 3.40$	0.992	0.312	$Y = 76.25X - 2.581$	0.954	0.690
Vc	$Y = 1406X + 35.5$	0.858	0.010	$Y = 249.12X + 13.4$	0.915	0.147	$Y = 144.6X + 33.71$	0.928	0.113

3.3 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力 羟自由基是活性氧中毒性最强的氧自由基, 可以造成生物有机体中的糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤, 使细胞坏死或突变。实验通过 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 氧化邻二氮菲- Fe^{2+} 溶液使其转变成邻二氮菲- Fe^{3+} , 从而邻二氮菲- Fe^{2+} 在 536 nm 处的最大吸收峰消失, 根据 536 nm 吸光度的变化, 可推知体系中羟自由基的产量^[10]。实验数据经 SPSS 17.0 软件统计分析, 可得到清除 50% $\text{OH} \cdot$ 的 IC_{50} 值。根据图 2 和表 1 可知, 芫菁籽多糖的 $\text{IC}_{50} =$

0.312 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在试验范围内最大清除率为 38.33%, 说明其对羟自由基有较强的清除能力, 但其清除能力低于 Vc。

3.4 清除超氧阴离子自由基的能力 超氧阴离子自由基不仅会导致细胞 DNA 损伤及细胞膜损伤, 而且其衍生的自由基也会引起机体细胞功能的损伤。邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化反应产生超氧阴离子自由基, 并生成一系列有色中间体, 它在 320 nm 处有最大 A , 当加入清除物后, 中间产物的形成会被抑制, A 减弱。以 A 对 t 做曲线图, 其斜率即为

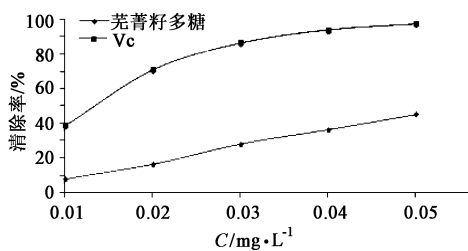


图1 芜菁籽多糖对 DPPH 自由基的清除能力

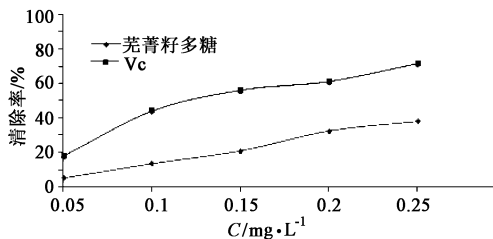


图2 芜菁籽多糖对羟自由基的清除能力

邻苯三酚自氧化速率,进而可计算出清除率,由此可判断芜菁籽多糖对超氧阴离子自由基的清除能力^[11]。由图3可知,芜菁籽多糖对超氧阴离子自由基的抑制作用不是特别明显。当多糖质量浓度为 $0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,清除率达到最高值 32.22% ,继续增大浓度,清除率不再升高。从表1可知,芜菁籽多糖 IC_{50} 为 $0.690 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,清除效果弱于Vc(IC_{50} 为 $0.113 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3.5 还原能力测定 物质的还原力可以作为评价受试物抗氧化活性的重要指标。物质抗氧化能力与还原力的大小有着显著的相关性,既与抗氧化性溶液浓度呈正相关性,抗氧化剂浓度越大,则吸光度值越大,进而可知其还原力越大^[12]。由图4可知,芜菁籽多糖和Vc均呈现出浓度越高,A值越大,即还原力越大的趋势。当芜菁籽多糖浓度达到 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其还原能力与Vc相差不多,表明其具有较高的抗氧化性。

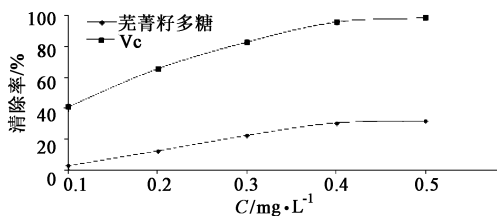


图3 芜菁籽多糖对超氧阴离子自由基的清除能力

4 结论

试验采用脱脂、水提、除蛋白、脱色、醇沉等方法提取芜菁籽多糖,提取产率为 2.12% ,多糖含量为 11.23% 。体外抗氧化实验结果表明,芜菁籽多糖对DPPH·、·OH和 O_2^- ·均有一定的清除作用,且清除能力与浓度均表现出良好的正相关性,其中还原能

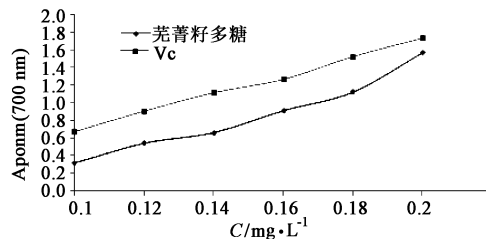


图4 芜菁籽多糖的还原能力

力最强,清除超氧阴离子自由基的能力比较弱。芜菁籽多糖能够清除自由基,可能是由于多糖分子上具有还原性的半缩醛羟基,它与活性自由基发生氧化还原作用,使其从激发态转回到基态或芜菁籽多糖可能给出电子使自由基生成稳定的化合物,阻断自由基连锁反应。综上所述,芜菁籽多糖具有较强的抗氧化能力,是一种安全无毒的具有保健功能的天然抗氧化剂,可作为清除体内自由基,抗脂质氧化,延缓机体衰老的功能性保健品。

[参考文献]

- [1] 中国中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第33卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:162.
- [2] 《中国医学百科全书》编委会. 中国医学百科全书. 维吾尔医学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:268.
- [3] 马彦玲. 芜菁子化学成分的基础研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2012.
- [4] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. Nature, 1951, 352:167.
- [5] 杨永东,李颖颖,唐策,等. 藏药蔓菁抗氧化活性多糖的提取及纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7):7.
- [6] 李恃圻,赵晓蕾,张思强,等. 薏苡多糖的提取及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(7):84.
- [7] 程杰,袁清霞,朱苗,等. 野生仙人掌多糖体外抗氧化作用研究[J]. 湖南农业科学, 2013(2):88.
- [8] 魏秀娟,向发椿,崔明筠,等. 铁苋菜多糖体外抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3):19.
- [9] 孙建晨,尹水日,崔泰花,等. 北五味子提取液清除DPPH自由基的作用[J]. 食品科技, 2012, 37(6):247.
- [10] 郭巧玲,谢建华,杨学敏,等. 菠萝多糖抗氧化功能的研究[J]. 农学学报, 2012, 3(2):50.
- [11] 肖湘,薛日海,张小芬,等. 杨桃提取物体外清除氧自由基作用[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(7):963.
- [12] 蒋剑平,徐敏,卢琳琳,等. 白花蛇舌草多糖的抗氧化活性研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(5):1076.

[责任编辑 邹晓翠]