

翼齿六棱菊多糖的含量测定及抗氧化活性考察

杜清华, 黄元河, 潘乔丹*, 王柳念, 唐海燕, 林庆云

(右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:**测定翼齿六棱菊多糖的含量并探讨其体外抗氧化活性。**方法:**运用微波-超声波协同提取翼齿六棱菊多糖,采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,通过 FRAP 法、水杨酸法、ABTS 法和邻苯三酚法检测翼齿六棱菊多糖的抗氧化能力。**结果:**翼齿六棱菊多糖提取量 $200 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;与对照品抗坏血酸和茶多酚相比,翼齿六棱菊多糖的 Fe^{3+} 还原抗氧化能力 ($829.75 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 弱于抗坏血酸 ($1\ 536.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), 强于茶多酚 ($739.75 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$);清除 ABTS⁺ 自由基能力 ($\text{IC}_{50} 0.197 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 及清除超氧阴离子自由基能力 ($\text{IC}_{50} 0.289 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 比抗坏血酸弱 (IC_{50} 分别为 $0.032, 0.259 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 但比茶多酚强 (IC_{50} 分别为 $0.233, 0.335 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$);清除 OH[·] 自由基能力 ($\text{IC}_{50} 0.245 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 弱于抗坏血酸 ($\text{IC}_{50} 0.199 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和茶多酚 ($\text{IC}_{50} 0.233 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。**结论:**采用苯酚-硫酸比色法测定翼齿六棱菊多糖的含量具有简便、快速、准确、灵敏度好等优点,翼齿六棱菊多糖具有较强的抗氧化能力。

[关键词] 翼齿六棱菊; 多糖; 含量测定; 抗氧化活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0067-03

[doi] 10.11653/syfy2013150067

Determination and Antioxidant Activity Investigation of Polysaccharides from *Laggera pterodonta*

DU Qing-hua, HUANG Yuan-he, PAN Qiao-dan*, WANG Liu-nian, TANG Hai-yan, LIN Qing-yun
(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of polysaccharides in *Laggera pterodonta* and investigate its *in vitro* antioxidative activity. **Method:** Polysaccharides in *L. pterodonta* was extracted by ultrasonic-microwave synergistic method, the content of polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid colorimetry, its antioxidant activity was measured by FRAP assay, salicylic acid assay, ABTS assay and adjacent benzene pyrogallol assay. **Result:** The content of polysaccharides in *L. pterodonta* was $200 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Compared with the positive control of ascorbic acid and tea polyphenols, reducing Fe^{3+} antioxidant capacity of polysaccharides in *L. Pterodonta* ($829.75 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) was weaker than ascorbic acid ($1\ 536.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), but higher than tea polyphenols ($739.75 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$). Scavenging ABTS⁺ radical capacity ($\text{IC}_{50} 0.197 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and superoxide anion radical capacity ($\text{IC}_{50} 0.289 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was lower than ascorbic acid (IC_{50} were $0.032, 0.259 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively), but higher than tea polyphenols (IC_{50} were $0.233, 0.335 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively). Scavenging OH[·] ($\text{IC}_{50} 0.245 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was lower than ascorbic acid ($\text{IC}_{50} 0.199 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and tea polyphenols ($\text{IC}_{50} 0.233 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). **Conclusion:** Phenol-sulfuric acid colorimetry to determine the content of polysaccharides from *L. pterodonta* was simple, rapid and accurate with good sensitivity, antioxidant activity of polysaccharides from *L. pterodonta* was strong.

[Key words] *Laggera pterodonta*; polysaccharides; content determination; antioxidant activity

多糖是高等植物、动物细胞膜、微生物细胞壁中天然大分子物质,是构成生命的基本物质之一,具有

[收稿日期] 20130124(017)

[基金项目] 中医药公共卫生专项(财社[2011]76号);中医药行业科研专项(201207002)

[第一作者] 杜清华,在读本科,从事天然产物化学研究,E-mail:237081269@qq.com

[通讯作者] *潘乔丹,硕士,讲师,从事天然产物化学研究,Tel:0776-2849498,E-mail:panqiao112@163.com

抗肿瘤、抗炎、抗病毒、降血糖、抗衰老、免疫调节等生物活性^[1-3],这些生物活性与多糖的抗氧化活性密切相关^[4]。翼齿六棱菊又名臭灵丹草,气特异,味苦,具有清热解毒、止咳祛痰的功效,用于治疗风热感冒、咽喉肿痛、肺热咳嗽等症^[5]。目前有关翼齿六棱菊多糖含量测定和抗氧化活性研究的尚未见报道。本实验采用苯酚-硫酸比色法测定翼齿六棱菊多糖的含量,通过 FRAP 法、水杨酸法、ABTS 法和邻苯三酚法对翼齿六棱菊多糖的抗氧化性能进行检测,为多糖的药物研制及保健食品开发提供参考。

1 材料

DF-15 型台式连续投料粉碎机(温岭市林大机械有限公司),DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),TU-1800 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),FA1104 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),XH-300A 型微波超声波组合合成萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司)。

翼齿六棱菊(采自广西百色,经本院生物教研室黄元河老师鉴定为翼齿六棱菊 *Laggera pterodonta* (Dc.) Benth 的开花期植株),三吡啶三吡嗪(TPTZ,阿拉丁试剂上海有限公司),2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸)二氨盐(ABTS,生工生物公司),葡萄糖对照品(百灵威化学技术有限公司,批号 234317),抗坏血酸(天津博迪化工股份有限公司),茶多酚(广州食品添加剂公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取

称取翼齿六棱菊干燥粉末 32.248 g,加 8 倍量石油醚(60~90℃)回流脱脂 2 次,每次 1 h;加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,以除去单糖和低聚糖,将药渣烘干,加水用超声波-微波联合提取 3 次,每次 5 min,微波功率 500 W,超声波功率 100 W。合并提取液,浓缩至 100 mL,加 4 倍量 95% 乙醇于 4℃ 静置过夜,5 000 r·min⁻¹离心 10 min,沉淀用适量无水乙醇洗涤 2 次,室温干燥,用水溶解,过滤,反复加 1/3 倍量的三氯甲烷-正丁醇(4:1)溶液去蛋白,浓缩至干,得精多糖样品 2.439 g。精密称取翼齿六棱菊多糖 0.10 g,加水配制成 2.0 g·L⁻¹ 的母液,稀释成不同质量浓度的溶液备用。

2.2 多糖含量测定

2.2.1 标准曲线的绘制

称取葡萄糖对照品适量,配制成不同质量浓度对照品溶液,采用苯酚-硫酸法测定^[6],于 300~900 nm 扫描,确定检测波长 490 nm。

以吸光度(A)为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 7.62X + 0.084$ ($r = 0.9995$),线性范围 0.01~0.05 g·L⁻¹,计算翼齿六棱菊多糖的提取量 200 mg·g⁻¹。

2.2.2 重复性、精密度与稳定性试验

按 2.1 项下方法制备 5 份样品溶液,按 2.2.1 项下方法测定,结果多糖含量的 RSD 0.68%,说明该方法重复性较好。精密吸取 5 份样品溶液各 2 mL,按 2.2.1 项下方法测定,结果 A 的 RSD 0.77%,表明仪器精密度良好。精密吸取样品溶液 2 mL,按 2.2.1 项下方法测定 A,每隔 30 min 测 1 次,测 5 次,结果 A 的 RSD 0.45%,说明样品溶液在 2.5 h 内较稳定。

2.3 抗氧化活性测定

2.3.1 总抗氧化能力(FRAP 法)^[7]

移取不同质量浓度的多糖溶液各 1.0 mL,加入 TPTZ 工作液 1.0 mL,混匀,于 37℃ 水浴 1 h,在 593 nm 处测定 A,每份样品平行操作 3 次,计算清除率。结果均以 FeSO₄ 当量表示,FeSO₄ 线性回归方程 $Y = 0.0004X + 0.003$ ($r = 0.9992$),显示翼齿六棱菊多糖的 Fe³⁺ 还原/抗氧化能力(829.75 μmol·g⁻¹)弱于抗坏血酸(1 536.5 μmol·g⁻¹),但强于茶多酚(739.75 μmol·g⁻¹)。

2.3.2 清除羟基自由基(OH·)能力(水杨酸法)

采用 Fenton 反应法^[8]。移取不同质量浓度的多糖溶液各 2.0 mL 于试管中,加入 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 2.0 mL,9 mmol·L⁻¹ 水杨酸-乙醇溶液 2.0 mL 和 9.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 2.0 mL,于室温下反应 1 h。以蒸馏水调零,于 510 nm 处测定 A ($n = 3$),结果见图 1。

$$\text{OH}\cdot\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_1')}{A_0} \times 100\%$$

式中 A₀ 为溶剂代替样品液的吸光度;A₁ 为样品组的吸光度;A₁' 为蒸馏水代替 H₂O₂ 的空白对照组吸光度。

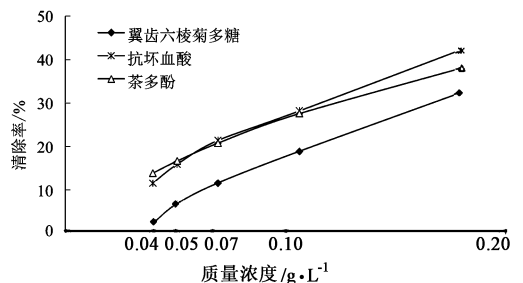


图 1 翼齿六棱菊多糖的清除羟基自由基作用

由图 1 可知,翼齿六棱菊多糖对羟基自由基具有一定的清除能力,并呈明显的量效关系。根据试样质量浓度与羟基自由基清除率的线性回归方程(r

均 >0.99), 计算半清除率质量浓度 (IC_{50}), 表明对羟基自由基的清除能力顺序为抗坏血酸 ($0.199 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $>$ 茶多酚 ($0.233 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $>$ 翼齿六棱菊多糖 ($0.245 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.3.3 清除 $ABTS^+$ 自由基能力 (ABTS 法) 分别移取不同质量浓度的多糖溶液 2.0 mL 于试管中, 各加入 $ABTS^+$ 测定液 4.0 mL [9], 准确振荡 30 s , 反应一定时间后, 于 734 nm 处测定 A , 计算清除率, 见图 2, 结果表明翼齿六棱菊多糖对 $ABTS^+$ 自由基表现出一定程度的清除能力, 并呈明显量效关系, 对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力顺序为抗坏血酸 ($0.032 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $>$ 翼齿六棱菊多糖 ($0.197 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $>$ 茶多酚 ($0.233 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

$$ABTS^+ \text{ 清除率} = (A_{\text{测定液}} - A_{\text{样品}}) / A_0 \times 100\%$$

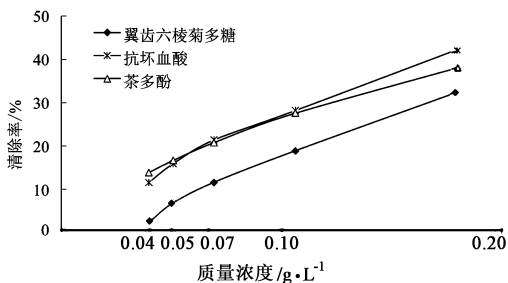


图 2 翼齿六棱菊多糖的清除 $ABTS^+$ 自由基作用

2.3.4 超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的抑制作用 (邻苯三酚法) [10] 分别移取不同质量浓度的多糖样品 1.0 mL 于试管中, 各加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.5 mL , 加水 3.2 mL , 混匀后于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 20 min , 取出后立即加入于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中预热过的 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚 0.3 mL , 混匀, 立即倒入比色杯, 于 320 nm 处每隔 30 s 测定 1 次 A , 共测定 8 次, 以 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 代替邻苯三酚作空白调零, 以 1.0 mL 水代替多糖溶液作邻苯三酚自氧化管, 计算氧化速率 (K) 和抑制率, 见图 3, 结果发现多糖对超氧阴离子自由基的清除能力呈明显量效关系, 各样品对超氧阴离子自由基清除能力顺序为抗坏血酸 ($0.259 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $>$ 翼齿六棱菊多糖 ($0.289 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $>$ 茶多酚 ($0.335 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

$$\text{抑制率} = (K_{\text{自氧化}} - K_{\text{样品}}) / K_{\text{自氧化}} \times 100\%$$

3 讨论

微波-超声波协同提取技术克服了常规超声波和微波萃取的不足, 具有速度快、耗能小、溶剂用量小、回收率高等优点, 有利于极性和热不稳定组分的提取 [11]。

多糖在各种实验体系中均表现出明显的抗氧化

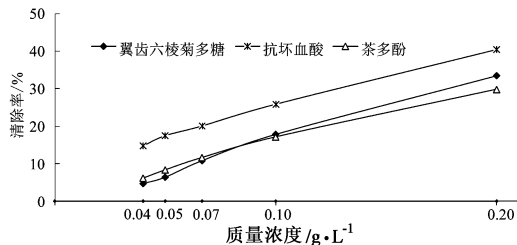


图 3 翼齿六棱菊多糖的清除超氧阴离子自由基作用

活性, 这可能是它抗衰老、抗炎症、降血脂、抗肿瘤、增强免疫等功效的药理基础 [12]。通过抗氧化性试验发现, 翼齿六棱菊多糖对 Fe^{3+} 的抗氧化还原能力、清除 $ABTS^+$ 自由基能力及清除超氧阴离子自由基能力比抗坏血酸弱, 但比茶多酚强; 而清除 $\text{OH} \cdot$ 自由基能力却弱于抗坏血酸和茶多酚。

[参考文献]

- [1] 林丽珊, 蔡文秀, 许云禄. 徐长卿多糖抗肿瘤活性研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(5): 40.
- [2] 林俊, 李萍, 陈靠山. 近 5 年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1116.
- [3] 门晓媛, 徐文贵, 朱湘, 等. 杉叶蕨藻多糖的提取、纳米硒化及抗病毒活性研究[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1891.
- [4] 陈艳, 姚宏, 李少光, 等. 蒲葵子多糖含量测定及其抗氧化活性研究[J]. 福建医科大学学报, 2011, 45(3): 164.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 267.
- [6] 陈燕忠, 符美燕, 谢清春, 等. 灰兔巴粗多糖的提取及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 79.
- [7] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239(3): 70.
- [8] ZHENG W, WANG S Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(2): 502.
- [9] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biol Med, 1999, 26(9): 1231.
- [10] 姚卫峰, 陈汀, 张丽, 等. 女贞子醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 138.
- [11] 杨胜丹, 付大友. 超声波、微波萃取及其联用技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 广东化工, 2010, 37(2): 120.
- [12] 焦扬, 李彩霞, 倪丽芳, 等. 锁阳多糖抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2007, 32(11): 113.

[责任编辑 全燕]