

空心莲子草多糖的体外抗氧化活性

蔡凌云^{1,2}, 周江菊¹, 乐利², 黄国雪¹, 王艳¹, 贺顺美², 付发琼²

(1. 凯里学院环境与生命科学学院, 贵州 凯里 556011;

2. 西华师范大学生命科学学院, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637002)

摘要: 目的: 研究空心莲子草多糖抗氧化能力。方法: 用对 DPPH 自由基清除率、DMPD 自由基清除率和还原能力来考察不同质量浓度的空心莲子草多糖的体外抗氧化活性。结果: 不同质量浓度的空心莲子草多糖的抗氧化能力不同; 对 DPPH 自由基的 EC_{50} 值为 26.93mg/L (VC 47.22mg/L), 对 DMPD 自由基的 EC_{50} 值为 73.42mg/L (VC 71.25mg/L)。结论: 空心莲子草多糖是良好的天然抗氧化剂。

关键词: 空心莲子草; 多糖; 抗氧化

Antioxidant Activity *in vitro* of Polysaccharides from *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb

CAI Ling-yun^{1,2}, ZHOU Jiang-ju¹, YUE Li², HUANG Guo-xue¹, WANG Yan¹, HE Shun-mei², FU Fa-qiong²

(1. College of Environmental and Life Science, Kaili University, Kaili 556011, China; 2. Key Laboratory for Southwest Wildlife Resources Conservation, Ministry of Education, College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: Objective: To study the antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from the whole plant of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb (APG). Methods: The antioxidant activity of polysaccharides from APG was evaluated by reducing power and scavenging capacities against DPPH and DMPD free radicals. Results: The antioxidant activity of polysaccharides from APG at various concentrations displayed an obvious difference. Compared with vitamin C, polysaccharides from APG had higher antioxidant activity. The EC_{50} values of polysaccharides from APG and vitamin C against DPPH free radicals were 26.93 mg/L and 47.22 mg/L, and against DMPD free radicals were 73.42 mg/L and 71.25 mg/L, respectively. Conclusion: Polysaccharides from APG is an effective and multifunctional natural antioxidant and radical scavenger so that it has potential exploitation and utilization.

Key words: *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb (APG); polysaccharide; antioxidant activity

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0186-04

空心莲子草 [*Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb] 又名螃蜞菊、空心苋、水花生、革命草。为苋科 (Amaranthaceae) 莲子草属 (*Alternanthera* Forsk.) 植物空心莲子草的干燥全草, 该植物原产巴西, 20 世纪 30 年代由国外引种至我国, 由于繁殖能力强, 现以遍及北京、吉林、四川、湖北、湖南、广东、福建、贵州等 20 多个省、自治区和直辖市, 生长于江、湖、河、塘、田野、水沟、荒湿地等处, 自然资源极其丰富。空心莲子草性味甘寒无毒, 具有清热、凉血、解毒的功效, 临床上用于治疗麻疹、流行性感冒、乙型脑炎、流行性出血热等病毒性疾患。现代药理研究表明, 空心莲子草提取物具有抗流行性出血热病毒、流

感病毒、乙肝病毒、狂犬病毒、疱疹病毒等多种病毒的作用^[1-2]。迄今已从莲子草属植物中分离鉴定的化合物类型包括皂苷、萜、蒽醌、有机酸、甾醇、生物碱、内酰胺、氨基酸和无机盐等, 它们的生物活性广泛, 如抗病毒、免疫调节、止泻、抗病原微生物、镇痛、抗肝损伤等^[3-11]。在研究空心莲子草活性成分中发现: 空心莲子草多糖含量丰富, 而多糖具有多种生物活性, 如抗氧化活性^[12-16]。开发空心莲子草的多糖类物质具有实用价值和经济价值。但空心莲子草多糖抗氧化研究未见报道, 因此对其多糖的抗氧化作用进行研究, 旨在为空心莲子草的进一步开发应用提供参考。

收稿日期: 2010-08-20

基金项目: 贵州省教育厅自然科学研究项目 (黔教科(2010078)); 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室开放基金项目 (XNYB-0903); 贵州省凯里学院自然科学研究重点项目 (ZX1034)

作者简介: 蔡凌云 (1972—), 女, 高级实验师, 硕士, 主要从事天然产物提取、分离和结构鉴定研究。

E-mail: cailingyun2005@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

空心莲子草 2011 年 6 月采集于凯里学院实验田边, 经生命科学学院周江菊教授鉴定为苋科莲子草属植物空心莲子草(*Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 日本和光纯药; *N,N*-二甲基对苯撑二胺(DMPD)、VC、葡聚糖 德国 Ruibio 公司; 水为蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

R-200 旋转蒸发器 瑞士 Buchi 公司; Eppendorf Research 移液器 德国 Eppendorf AG 公司; TU-1900 双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; KQ3200DE 数控超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司; LD4-2 低速离心机 北京医用离心机厂; BT124S 电子天平 北京赛多利斯天平有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理和提取液制备

80℃干燥的空心莲子草全草粉末过 60 目筛, 置于干燥器中备用。精确称取上述空心莲子草粉末 10.00g, 置 500mL 锥形瓶中, 加水, 料液比为 1:15, 超声间断提取 2 次, 每次 20min, 功率 100%, 合并提取液, 用 Savag 法反复除去蛋白, 共 5 次。加入无水乙醇沉淀, 放置在 4℃冰箱冷藏过夜, 于 4000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 离心后沉淀用水溶解后定容于 50mL 容量瓶, 加入 100g/L 氢氧化钠溶液 100.0mL, 100g/L 铜试剂溶液 100.0mL, 沸水浴中煮沸 2min, 冷却, 4000r/min 离心 5min, 弃去上清液。残渣用洗涤液洗涤, 离心后弃去上清液, 反复操作 3 次, 残渣用体积分数 10% 硫酸溶液 100.0mL 溶解并转移至 250mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。此溶液为样品测定液。

1.3.2 多糖含量测定

含量测定采用蒽酮-硫酸法, 以葡聚糖为对照品。在波长 626nm 处测定, 以葡聚糖质量浓度(ρ)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线, 其回归方程为: $A = 10.425\rho + 0.0045$ ($r = 0.9992$)。

1.3.3 还原能力测定

参照 Oyaizu^[17]的方法测定。取 pH6.6 的缓冲液和 1g/100mL 铁氰化钾溶液各 2.5mL, 加入不同质量浓度的多糖溶液 1mL, 混匀后 50℃水浴 20min。加入 10g/100mL 三氯乙酸溶液 2.5mL, 混匀, 4000r/min 离心 10min。取上清液 2.5mL, 加入蒸馏水和 0.1g/100mL FeCl₃ 各 2.5mL, 混匀, 静置 10min 后于 700nm 波长处测定吸光度。用不同质量浓度的 VC 代替样品重复上述实验。

1.3.4 DPPH 自由基清除率的测定

定量准确量取不同质量浓度空心莲子草多糖溶液, 依次加入 2.0mL 2mmol/L DPPH 溶液, 摇匀, 在 25℃水浴加热反应 30min, 取出, 测定在 517nm 波长处的吸光度。用不同质量浓度的 VC 代替样品重复上述实验, 测定吸光度。用蒸馏水代替 DPPH 溶液测定吸光度。用蒸馏水代替样品和 VC, 测定吸光度。

1.3.5 DMPD 自由基清除率的测定

10mL 100mmol/L DMPD 溶液与 2mL 0.1mol/L pH5.25 醋酸盐缓冲溶液混匀, 加入 0.2mL 0.05mol/L FeCl₃, 振荡混匀, 取上述溶液 2mL, 分别加入不同质量浓度的多糖液和 VC 溶液, 25℃水浴 10min。于波长 505nm 处测定吸光度。用蒸馏水代替样品和 VC, 在 505nm 波长处的吸光度, 用蒸馏水代替 DMPD 溶液, 测定样品和 VC 本底吸光度。

1.3.6 抑制质量浓度 EC₅₀ 的计算

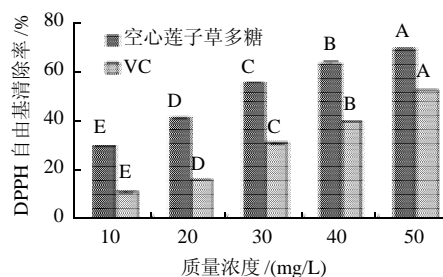
用 SPSS 11.5 软件以样品质量浓度与抑制率作回归分析, 根据拟合方程求出抑制率为 50% 时所需样品的质量浓度, 即半抑制质量浓度 EC₅₀。

2 结果与分析

2.1 空心莲子草多糖含量的测定结果

取空心莲子草多糖样品测定液, 在波长 626nm 处测定吸光度, 代入回归方程计算其多糖含量为 6.78mg/g。

2.2 空心莲子草多糖、VC 对 DPPH 自由基的清除率



大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)。下同。

图1 空心莲子草多糖、VC 对 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 Scavenging rates of polysaccharides from APG and vitamin C at different concentrations against DPPH free radicals

经相关性分析, 空心莲子草多糖质量浓度与 DPPH 自由基清除率的相关系数达 0.984, VC 质量浓度与 DPPH 自由基清除率的相关系数达 0.988。由图 1 可知, 随空心莲子草多糖质量浓度、VC 质量浓度的增大对 DPPH 自由基的清除率增强, 但空心莲子草多糖对 DPPH 自由基的清除率强于 VC。在所选质量浓度范围内, 空心莲子草多糖质量浓度、VC 质量浓度为 50mg/L 时, 对 DPPH 自由基的清除率最高。差异性分析表明, 空心莲子草

多糖质量浓度、VC 质量浓度对 DPPH 自由基清除率的影响极显著($P < 0.01$), 各质量浓度间均具有极显著差异($P < 0.01$)。

以空心莲子草多糖质量浓度、VC 质量浓度与抑制率作回归分析。空心莲子草多糖对 DPPH 自由基清除率的回归方程为: $Y=1.02X + 22.53(r=0.970)$ 。VC 对 DPPH 自由基清除率的回归方程为: $Y=1.09X - 1.47(r=0.977)$ 。空心莲子草多糖对 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 26.93mg/L, VC 对 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 47.22mg/L, 说明空心莲子草多糖的抗氧化能力强, 并远远高于 VC, 是良好的天然抗氧化剂。

2.3 空心莲子草多糖、VC 的还原能力

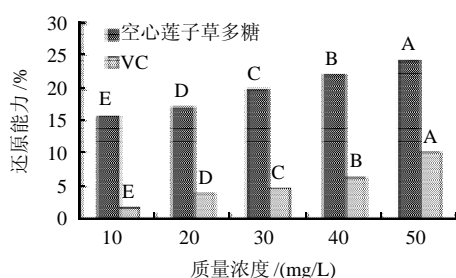


图2 空心莲子草多糖、VC 的还原能力

Fig.2 Reducing power of polysaccharides from APG and vitamin C at different concentrations

经相关性分析, 空心莲子草多糖质量浓度与还原能力的相关系数达 0.999, VC 质量浓度与还原能力的相关系数达 0.994。由图 2 可知, 随空心莲子草多糖、VC 质量浓度的增大还原能力逐渐增强, 空心莲子草多糖的还原能力强于 VC。在所选质量浓度范围内, 空心莲子草多糖、VC 质量浓度为 50mg/L 时, 还原能力最高。差异性分析表明, 质量浓度对空心莲子草多糖、VC 的还原能力影响极其显著, 各质量浓度间均具有极显著差异($P < 0.01$)。

2.4 空心莲子草多糖、VC 对 DMPD 自由基的清除率

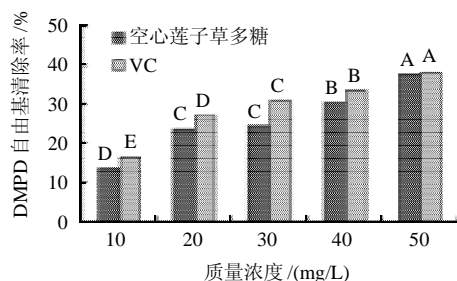


图3 空心莲子草多糖、VC 对 DMPD 自由基的清除率

Fig.3 Scavenging rates of polysaccharides from APG and vitamin C at different concentrations against DMPD free radicals

经相关性分析, 空心莲子草多糖质量浓度与 DMPD

自由基清除率的相关系数达 0.975, VC 质量浓度与 DMPD 自由基清除率的相关系数达 0.950。由图 3 可知, 随空心莲子草多糖、VC 质量浓度的增大对 DMPD 自由基的清除率逐渐增强。对 DMPD 自由基的清除作用空心莲子草多糖与 VC 差异不大, 略低于 VC。在所选质量浓度范围内, 空心莲子草多糖质量浓度、VC 质量浓度为 50mg/L 时, 对 DMPD 自由基的清除率最高。差异性分析表明, 空心莲子草多糖质量浓度为 20mg/L 和 30mg/L 时差异不显著($P < 0.01$), 其他各质量浓度均具有极显著差异($P < 0.01$), VC 各质量浓度均具有极显著差异($P < 0.01$)。

以空心莲子草多糖质量浓度、VC 质量浓度与抑制率作回归分析。空心莲子草多糖对 DMPD 自由基清除率的回归方程为: $Y=0.5531X+9.3894(r=0.983)$ 。VC 对 DMPD 自由基清除率的回归方程为: $Y=0.5009X+14.3127(r=0.989)$ 。空心莲子草多糖和 VC 对 DMPD 自由基的 EC_{50} 接近, 分别为 73.42mg/L 和 71.25mg/L, 说明空心莲子草多糖的抗氧化能力强, 是良好的天然抗氧化剂。

3 结论与讨论

3.1 自由基过多或清除自由基过慢会使生物大分子受到攻击, 会加速机体的衰老进程, 并诱发炎症、恶性肿瘤、免疫失调等多种疾病^[18]。为了抑制自由基损伤, 人工合成的抗氧化剂被大量应用于食品、化妆品和医药等领域, 化学合成制品大多有毒副作用, 长期摄入合成抗氧化剂可导致肝损伤并诱发恶性肿瘤^[19], 因此从天然产物中寻找低毒或无毒的抗氧化有效成分具有十分重要的意义。天然多糖类化合物对物理、化学以及生物等因素产生的自由基具有清除作用, 有望作为天然抗氧化剂使用。

3.2 Gil 等^[20]用 DPPH 法测石榴汁、VC、和葡萄酒的总的抗氧化能力, 将清除 DPPH 50% 所用量定义为 EC_{50} , 用来作为抗氧化能力的指标。郝晓丽等^[21]用 DPPH 自由基清除法测定了多种植物(马齿苋, 扁蓄, 车前等)的清除自由基的能力。在测定样品对 DPPH 自由基的清除能力时可通过计算 EC_{50} 、 TEC_{50} 和 AE 等参数来反映抗氧化剂清除自由基反应的动力学行为。另外在酸性条件下, DMPD 可被 $FeCl_3$ 、 $CuCl_2$ 、 H_2O_2 等氧化生成稳定有颜色的 DMPD 自由基, 它在 505nm 波长处有最大吸收峰。当加入抗氧化剂时, 抗氧化剂能转移 1 个氢原子给 DMPD 自由基, 使其溶液脱色。脱色程度越强, 说明抗氧化剂的抗氧化能力越强。此反应迅速、稳定。所以此方法也可用来有效的筛选抗氧化剂^[22]。

3.3 目前, 多糖的提取分离大多采用水提醇沉的工艺。醇沉是依据分子质量大小进行分离纯化的, 所以醇沉时乙醇体积分数不同, 多糖的组成和得率不同。本

实验采用 100% 乙醇沉降空心莲子草多糖。通过与公认的抗氧化剂 VC 比较还原能力、对 DPPH 自由基、DMPD 自由基的清除作用,证实了空心莲子草多糖具有清除自由基、抗氧化的功效,是一种良好的自由基清除剂。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1470.
- [2] 中国科学院北京植物所. 中国高等植物图鉴(第 4 册)[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 610.
- [3] 林清华. 空心莲子草的免疫药理研究[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1991, 3(3): 39-42.
- [4] 迟霁菲, 张国强, 张红霞. 莲子草属植物的化学成分及生物活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 149-153.
- [5] 熊卫国, 刘雅士, 刘焱文. 空心莲子草的化学成分研究[J]. 中草药, 2000, 31(7): 501.
- [6] 武汉市螃蟹菊科研协作组. 螃蟹菊制剂实验研究及临床应用[J]. 中草药通讯, 1973(2): 28-33.
- [7] 曲春枫, 杨占秋, 向近敏, 等. 空心莲子草有效部位对流行性出血热病毒感染乳鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(5): 304-305.
- [8] 杨占秋, 程丽. 空心莲子草在体外对单纯疱疹病毒的抑制作用[J]. 华西药志, 1989, 4(4): 217-220.
- [9] 樊一桥, 武谦虎, 王雪梅, 等. 空心莲子草醇提取物抗 CCl₄ 肝损伤的实验研究[J]. 药学进展, 2004, 28(1): 36-38.
- [10] 武谦虎, 樊一桥, 洪敏, 等. 空心莲子草醇提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(4): 373-375.
- [11] 蒋文玲, 罗宪玲, 邝素娟. 空心莲子草抗登革病毒作用的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(4): 454-456.
- [12] 盛伟, 方晓阳, 吴萍. 白灵菇、杏鲍菇、阿魏菇多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 103-109.
- [13] 夏晓凯, 张庭延, 陈传平. 黄精多糖的体外抗氧化作用研究[J]. 湖南中医杂志, 2006, 22(4): 90-96.
- [14] 周永国, 杨越冬, 王树元, 等. 天然活性多糖在生物医药领域中的研究进展[J]. 高分子通报, 2006(9): 16-22.
- [15] 何新益, 刘仲华. 苦瓜多糖降血糖活性的高通量筛选研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 313-316.
- [16] 单斌, 张卫国, 赵强, 等. 苦瓜多糖抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 182-183; 229.
- [17] OYAIZU M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer chromatography[J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1986, 35: 771-775.
- [18] BUTTERFIELD D A, CASTENGA A, POCERNICH C B. Nutritional approaches to combat oxidative stress in alzheimers disease[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(8): 444-461.
- [19] GRICE H C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium [J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 26(8): 717-723.
- [20] GIL M I, TOMÁS-BARBERÁN F A, HESS-PIERCE B, et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and pressing[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 4561-4569.
- [21] 郝晓丽, 许申鸿, 杭瑚, 等. 用两种方法评价四种食品抗氧化剂的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 127-129.
- [22] 刘国安, 杨玉玲, 张亚楠, 等. 黄连素抗氧化活性的研究[J]. 西北师范大学学报, 2009, 45(6): 87-91.