芙蓉菊多糖体外抗氧化活性研究

孟　雪，曲有乐*，高　欣，崔宇鹏
浙江海洋学院 食品与药学学院，浙江 舟山　316000

摘　要：目的　研究芙蓉菊多糖的体外抗氧化活性。**方法**　采用 1,1-二苯基苦基苯肼（DPPH）自由基、还原力、超氧阴离子、羟自由基 4 种体外抗氧化模型研究芙蓉菊多糖的抗氧化活性，用维生素 C 作对照。**结果**　芙蓉菊粗多糖对 DPPH 自由基、还原力、超氧阴离子、羟自由基均有明显的清除能力，其中 DPPH、超氧阴离子、羟自由基的 EC_{50} 值分别为 0.273、0.669、0.594 mg/mL，对羟自由基清除能力强于维生素 C。芙蓉菊多糖对自由基清除率与其质量浓度存在着明显的量效关系。**结论**　芙蓉菊多糖具有良好的体外抗氧化活性，作为天然抗氧化剂和自由基清除剂有进一步研究的价值。

关键词：芙蓉菊多糖；抗氧化；1,1-二苯基苦基苯肼自由基（DPPH）；还原力；超氧阴离子；羟自由基
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2012)06 - 0566 - 04

In vitro antioxdative activity of *Crossostephium chinense* polysaccharides

MENG Xue, QU You-le, GAO Xin, CUI Yu-peng
School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China

Abstract: Objective　To study the *in vitro* antioxidative activity of *Crossostephium chinense* polysaccharide (CCPS). **Methods**　Four models of *in vitro* anti-oxidative activity were used to study, including DPPH, reducing power, superoxide anion radicals, and hydroxyl free radicals, compared with vitamin C. **Results**　CCPS had the evident free radical scavenging capacities on DPPH, reducing power, superoxide anion radicals, and hydroxyl free radicals, and their EC_{50} values on DPPH, superoxide anion radicals, and hydroxyl free radicals were 0.296, 0.669, and 0.594 mg/mL, respectively. Hydroxyl scavenging capacity of CCPS was higher than that of vitamin C. There was a good linear relationship between the concentration and free radical scavenging capacity of CCPS. **Conclusion**　CCPS has a good *in vitro* anti-oxidative activity and it deserves to be further studied as a natural anti-oxidant and free radical scavenger.

Key words: *Crossostephium chinense* polysaccharides; anti-oxidative activity; DPPH; reducing power; superoxide anion radicals; hydroxyl free radicals

菊科芙蓉菊属植物芙蓉菊 *Crossostephium chinense* (L.) Makino 是一味民间草药，其叶可用于治疗支气管炎、百日咳、风寒感冒、痈疽、疔疮，其茎、根则能祛风湿，用于治疗风湿关节痛、胃脘冷痛[1]。在岭南地区民间有用水煎服芙蓉菊治疗糖尿病的传统[2]。对芙蓉菊的研究多见于化学成分方面，早年日本学者 Sasaki 等[3]从其根茎中分离出蒲公英赛醇、蒲公英赛醇乙酯、蒲公英赛酮等成分，邹磊等[4]对其进行了挥发油的成分分析，杨秀伟[5]、邹磊等[6]对其进行了有效化学成分及寡糖方面的研究。本实验对芙蓉菊多糖的抗氧化活性进行了研究，旨在为芙蓉菊多糖的进一步开发利用提供依据。

1　材料与仪器

葡萄糖对照品为分析纯，1,1-二苯基苦基苯肼（DPPH）自由基购自美国 Sigma 公司，三羟甲基氨基甲烷（trisbase）、EDTA 均为美国 Biosharp 公司生产，其他试剂均为国产分析纯，试验用水为自制 Millipore 超纯水。

芙蓉菊采自舟山市东极岛，由浙江海洋学院曲有乐教授鉴定为菊科植物芙蓉菊 *Crossostephium chinense* (L.) Makino 的全草。

收稿日期：2012-08-27
基金项目：国家星火计划项目（2012GA700194）
*通讯作者　曲有乐（1960—），男，教授，硕士生导师，研究方向为天然产物活性研究、结构改造与设计。
Tel: (0580) 2556269　E-mail: youle1960@sina.com

FW80 高速万能粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司；SHB—III 循环水式多用真空泵、HWS12 型电热恒温水浴锅，上海一恒科技仪器有限公司；RE—2000 旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；UPWS—I—20T 超纯水器，杭州永达洁净水科技有限公司；BSA323S 电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；722 型可见光分光光度计，上海安亭科学仪器厂；FD—1000 冷冻干燥机，上海爱朗仪器有限公司；TDL—40B 离心机，上海安亭科学仪器厂。

2　方法与结果

2.1　多糖的制备

采用微波法提取芙蓉菊多糖。称取 2.000 g 芙蓉菊全草粉末于三颈瓶中，加入 160 mL 蒸馏水，微波功率 900 W，提取时间 12 min，温度 90 ℃提取，提取液滤过，取滤液，浓缩至原体积的 1/4，与 Sevag 试剂[氯仿－正丁醇（4∶1）]按体积比 1∶1 放入三角瓶，用摇床振荡 60 min，置于分液漏斗中静置 3 h 分层，去掉下层的蛋白质，留上层溶液。浓缩，加入 3 倍体积 95%乙醇，放置 4 ℃冰箱过夜。离心机离心，除去上清液，取下层沉淀，真空冷冻干燥，即得多糖。

2.2　多糖的测定

2.2.1　标准曲线的制备[7]　准确称取干燥至恒质量的葡萄糖对照品 100 mg，置 100 mL 量瓶中，用蒸馏水溶解并稀释至刻度。分别吸取 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 稀释液于具塞试管中，补水至 4 mL，精密加入 6%苯酚溶液 1 mL，然后再迅速加入浓硫酸 5 mL，置 90 ℃水浴中反应 15 min 后取出，自来水冷却至室温，然后在 490 nm 处测定其吸光度（A）值。以质量浓度为横坐标，A 值为纵坐标，绘制标准曲线，得到回归方程 Y=1.798 X－0.019 6，R^2=0.999 2，结果表明葡萄糖质量浓度在 0.2～0.6 mg/mL 与其 A 值呈良好的线性关系。

2.2.2　测定结果　取 1 mg/mL 芙蓉菊多糖溶液 0.3 mL，补水至 4 mL，加入 6%苯酚 1 mL，混匀后加入浓硫酸 5 mL，置 90 ℃水浴中反应 15 min，取出，冷却。以蒸馏水为空白对照，在 490 nm 波长下，测定芙蓉菊多糖溶液的 A 值，代入回归方程中，计算质量浓度，进一步计算得芙蓉菊多糖的质量分数为 1.21%。

2.3　对 DPPH 自由基的清除作用[8-9]

DPPH 自由基乙醇溶液呈紫色，在 517 nm 波长处有强烈吸收，当存在自由基清除剂时，自由基会提供一个电子与 DPPH 自由基孤对电子配对，使其褪色，褪色程度与其接受的电子呈定量关系，在 517 nm 处 A 值变小，其变化程度与自由基清除程度呈线性关系，即自由基清除剂的清除自由基能力越强，A 值越小。

将芙蓉菊多糖溶液配制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 的溶液，待用。取乙醇 2 mL 和 0.02 mol/L DPPH 溶液 2 mL，振摇后静置 30 min，在 517 nm 处测定 A_0 值。用不同浓度芙蓉菊多糖溶液代替 DPPH 溶液，测定其 A_1 值。取不同浓度芙蓉菊多糖溶液 2 mL，加入 DPPH 2 mL，按上述方法测定 A_2 值。按同样方法以维生素 C 作对照，临用前用蒸馏水配制。计算对 DPPH 自由基的除率[清除率=（A_0＋A_1－A_2）/A_0×100%]。结果见图 1。

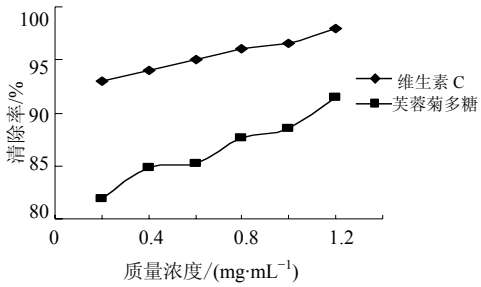

图 1　芙蓉菊多糖对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 1　Scavenging effect of *Crossostephium chinense* polysaccharides on DPPH free radicals

可见随着质量浓度的增加，芙蓉菊多糖和维生素 C 的清除率都呈现缓慢上升趋势，并有较高的清除率。对曲线进行拟合，得线性回归方程，芙蓉菊多糖：Y=8.715 7 X＋80.491 0，R^2=0.966 2；维生素 C：Y=4.777 1 X＋92.109 0，R^2=0.990 1，结果表明质量浓度在 0.2～1.2 mg/mL 两者变化程度与自由基清除程度都呈线性关系，维生素 C 的线性关系略好于芙蓉菊多糖。质量浓度在 1.2 mg/mL 时，芙蓉菊多糖对 DPPH 的清除率为 93.69%，维生素 C 的清除率为 99.25%；芙蓉菊多糖和维生素 C 的 EC_{50} 值分别为 0.273、0.234 mg/mL。可见芙蓉菊多糖对 DPPH 具有很好的清除能力，略低于维生素 C。

2.4　还原力的测定

抗氧化剂的抗氧化能力与其还原力有关，其原理是样品将铁氰化钾还原成亚铁氰化钾，亚铁氰化钾再与 Fe^{3+}作用，生成亚铁氰化铁（普鲁士

蓝），以在 700 nm 波长处检测普鲁士蓝的 *A* 值表示还原力的大小，*A* 值越高，则表示样品的还原力越强[10]。

将芙蓉菊多糖溶液配制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 的溶液，分别取各溶液 2 mL，加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.6）2 mL，再加入 1%铁氰化钾溶液 2 mL，混合后在 50 ℃水浴中反应 20 min。取出后在混合物后加入 10%三氯乙酸 2 mL，再分别从中取出 2 mL 混合物，加入蒸馏水 2 mL 和 0.1%三氯化铁 0.4 mL 于试管中，反应 10 min 后，于 700 nm 波长处测定 *A* 值。以维生素 C 为阳性对照同法操作[11]。结果见图 2。

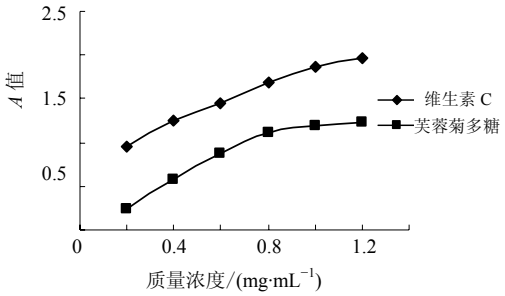

图 2　芙蓉菊多糖的还原力作用

Fig. 2　Reducing power of *Crossostephium chinense* polysaccharides

可见在质量浓度为 0.2～1.2 mg/mL 时，随着质量浓度的增大，芙蓉菊多糖和维生素 C 的 *A* 值也增大，即还原力在逐渐增大。对曲线进行拟合，得线性回归方程，芙蓉菊多糖：Y=1.004 9 X+0.166 6，R^2=0.913 0；维生素 C：Y=1.016 0 X+0.814 5，R^2=0.971 6。结果表明芙蓉菊多糖的还原力与质量浓度也呈线性关系，但不如维生素 C 的线性关系好。在质量浓度为 1.2 mg/mL 时，芙蓉菊多糖的 *A* 值为 1.229，维生素 C 的 *A* 值 1.958，提示芙蓉菊多糖具有一定的还原力，但略弱于维生素 C。

2.5　对羟自由基的清除作用[12]

取 0.75 mmol/L 邻二氮菲 1 mL 于试管中，依次加入 PBS（pH 7.40）2 mL，蒸馏水 1 mL，充分混匀后，加入 0.75 mmol/L 硫酸亚铁 1 mL，混匀，加质量分数为 0.12%的 H_2O_2 1 mL，37 ℃水浴 90 min，于 536 nm 处测定其吸光度 A_p 值；用蒸馏水代替 H_2O_2，测定其吸光度 A_b 值；用芙蓉菊多糖溶液代替蒸馏水 1 mL，测定其吸光度 A_s 值。计算样品对羟自由基的清除率[清除率=（A_s－A_p）/（A_b－A_p）×100%]。结果见图 3。

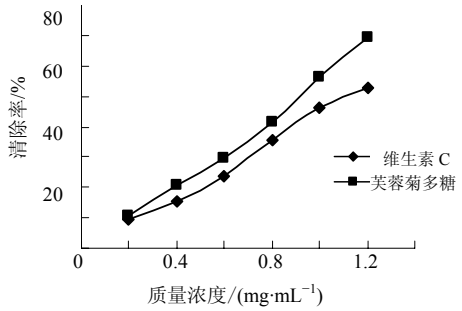

图 3　芙蓉菊多糖清除羟自由基的能力

Fig. 3　Scavenging effect of *Crossostephium chinense* polysaccharides on hydroxyl free radical

可见随着质量浓度的增大，芙蓉菊多糖对羟自由基的清除能力增强，同样维生素 C 的清除力也随着质量浓度的增加而增强。对曲线进行拟合，得线性回归方程，芙蓉菊多糖：Y=58.894 X－3.389 3，R^2=0.991 4；维生素 C：Y=45.817 X－1.43，R^2=0.989 5。结果表明质量浓度在 0.2～1.2 mg/mL 时两者变化程度与自由基清除程度都呈线性关系，并且芙蓉菊多糖的线性关系好于维生素 C。在质量浓度为 1.2 mg/mL 时，芙蓉菊多糖和维生素 C 的清除率分别为 69.12%、53.02%，EC_{50} 分别为 0.669、1.059 mg/mL。提示芙蓉菊多糖具有较强的清除羟自由基的能力，且高于维生素 C。

2.6　对超氧阴离子自由基的清除作用[13]

超氧阴离子是所有自由基的前身[14]，生物体内氧化还原反应中，有 2%～5%氧会产生超氧自由基，超氧自由基的毒性是机体发生氧中毒的主要原因[15]。邻苯三酚在碱性条件下自氧化形成中间产物，此自由基能促进邻苯三酚的自氧化，通过测定物质对邻苯三酚自氧化的抑制作用，可表征其对超氧阴离子的清除作用[16]。

将芙蓉菊多糖溶液配制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 的溶液，待用。分别加入 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.2，含 2 mmol/L EDTA-2Na）4.5 mL、5.0 mmol/L 邻苯三酚溶液（以 10 mmol/L 盐酸配制）0.2 mL，再分别加入不同质量浓度的芙蓉菊多糖溶液 1.0 mL，蒸馏水 2.5 mL，混匀。以等体积 10 mmol/L 盐酸代替邻苯三酚溶液为空白调零，对照组以等体积去离子水代替样品。于 25 ℃下保温 20 min，在 325 nm 波长下每隔 30 s 测定样品和对照管的 *A* 值，计算线性范围内 *A* 值随时间的变化值，重复 3 次。设维生素 C 阳性对照，同法平

行测定 3 次，取平均值。计算对超氧阴离子自由基的清除率。结果见图 4。

清除率＝（V_1－V_2）/V_1×100%

V_1 为对照管邻苯三酚的自氧化速率，△A/min

V_2 为样品管邻苯三酚的自氧化速率，△A/min

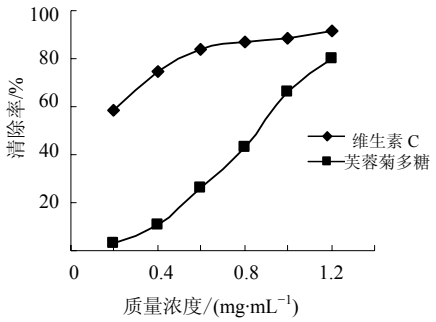

图 4　芙蓉菊对超氧阴离子的清除作用

Fig. 4　Scavenging effect of *Crossostephium chinense* polysaccharides on superoxide ion radicals

可见在质量浓度为 0.2～1.2 mg/mL 时，随着质量浓度的增大，芙蓉菊多糖对超氧阴离子的清除率呈现明显的递增趋势，维生素 C 的清除率也呈上升趋势。对曲线进行拟合，得线性回归方程，芙蓉菊多糖：Y=81.137 X－18.523，R^2=0.981 8；维生素 C：Y=0.302 3 X＋0.597 4，R^2=0.830 3。结果表明在质量浓度为 0.2～1.2 mg/mL 时二者变化程度与自由基清除程度都呈线性关系，芙蓉菊多糖的线性关系好于维生素 C。在质量浓度为 1.2 mg/mL 时，芙蓉菊多糖和维生素 C 的清除率分别为 80.16%、91.72%。芙蓉菊多糖和维生素 C 的 EC_{50} 分别为 0.594、0.128 mg/mL。可见虽然芙蓉菊多糖的清除率低于维生素 C，但已经具有较强的清除能力。

3　讨论

以维生素 C 为对照，芙蓉菊多糖具有明显的抗氧化能力，并且芙蓉菊多糖的质量浓度越大，清除能力越强，变化程度与自由基清除程度呈线性关系。芙蓉菊多糖对 DPPH 清除率、还原力、超氧自由基清除率略低于维生素 C，羟基自由基清除率高于维生素 C。维生素 C 是血液中最具代表性的抗氧化剂，具有很强的抗氧化性，可作为自由基清除剂。提示芙蓉菊多糖可以作为天然抗氧化剂来进行研究。

芙蓉菊是一种天然中草药，由于分布地位置偏僻，对其研究较少，至今国内市场上还没有芙蓉菊制品。芙蓉菊多糖具有一定的抗氧化作用，对于多种自由基均具有很强的清除能力，可以开发其作为日常生活中常用的饮品，有利于预防和治疗衰老性疾病。芙蓉菊是具有潜力的天然抗氧化剂资源，可以作为一种绿色有效的自由基清除剂，应用于食品、保健品、药品、化妆品等领域。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 131.

[2] 车今智, 傅德贤, 欧阳藩. 芙蓉菊寡糖的分离纯化及其生物活性的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 458-460.

[3] Sasaki S, Aoyagi S, Hsü H Y. The isolation of taraxerol, taraxeryl acetate, and taraxerone from *Crossostephium chinense* Makino (Compositae) [J]. *Chem Pharm Bull* (*Tokyo*), 1965, 13(1): 87-88.

[4] 邹　磊, 傅德贤, 杨秀伟, 等. 芙蓉菊挥发油的成分分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 250-253.

[5] 杨秀伟, 邹　磊, 吴　琦, 等. 芙蓉菊化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 905-908.

[6] 邹　磊, 吴　琦, 杨秀伟, 等. 芙蓉菊化学成分对体外培养大鼠胰岛分泌胰岛素作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11): 1401-1405.

[7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 第 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 128.

[8] Moon J K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(5): 1655-1666.

[9] 邹桂欣, 尤献民, 吴　怡. DPPH 法评价伸筋草不同提取物清除自由基的能力 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(5): 359-361.

[10] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. *Jpn J Nutr*, 1986, 44: 307-315.

[11] 沈　蔚, 任晓婷, 张　建, 等. 芦根多糖的提取及其抗氧化活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1078-1080.

[12] 金　鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe^{2+}氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+}产生的自由基 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.

[13] Moridani M Y, Pourahmad J, Bui H, *et al*. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(2): 243-253.

[14] 王建英, 任引哲, 王迎新. 氧自由基与人体健康 [J]. 化学世界, 2006, 47(1): 61- 63.

[15] 马金宝, 沈业寿, 李　峰, 等. 亮菌多糖-1b 清除自由基作用研究 [J]. 中国食用菌, 2008, 27(6): 38-40.

[16] Qiao D L, Kea C L, Hu B, *et al*. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. *Carbohyd Polym*, 2009, 78(2): 199-204.