

爬山虎多糖的体外抗氧化活性研究

梁晓霞*, 尹恒, 孔令茜, 范巧佳

四川农业大学动物医学院, 雅安 625000

摘要: 本文以 Vc 作为对照, 采用分光光度法对爬山虎多糖提取物体外抗氧还活性进行了研究。结果表明, 该多糖具有一定体外抗氧化能力和抗氧化多样性, 其中对 \cdot DPPH 清除能力较强, IC_{50} 为 0.663 mg/mL; 对 \cdot OH 和 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力适中, 但均明显低于 Vc; 而其总还原能力较弱。爬山虎多糖有望开发成天然抗氧化剂应用于食品和医药行业。

关键词: 爬山虎; 多糖; 体外抗氧化

中图分类号: R284.2; R285.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.016

Antioxidant Activity of Polysaccharides isolated from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch. *in vitro*

LIANG Xiao-xia*, YIN Heng, KONG Ling-xi, FAN Qiao-jia

Sichuan Agriculture University, College of Veterinary Medicine, Ya'an 625000, China

Abstract: With Vitamin C as the positive control, the antioxidant activity of polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch. *in vitro* was investigated by using spectrophotometry in this paper. The results indicated that the polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch. had moderate ability of antioxidant activity and diversity, showing strong antioxidant activity against \cdot DPPH with IC_{50} 0.663 mg/mL, good inhibitory effects to \cdot OH, $O_2^{\cdot-}$, which were weaker than Vitamin C, and weak reducing capacity. The polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch. is expected to be explored as a natural antioxidant applied to food and pharmaceutical industries.

Key words: *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.; polysaccharides; antioxidant activity *in vitro*

爬山虎 [*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.], 又名地锦、爬墙虎等, 为葡萄科 (Vitaceae) 地锦属 (*Parthenocissus* Planch.) 多年生木质落叶藤本^[1,2], 多分布于亚洲和北美洲, 我国主产于西南部至东部^[3]。该植物具有良好的生态适应性, 是装饰墙壁、假山的园林植物^[4]。其茎、根可入药, 味甘性温, 具有祛风通络, 活血解毒等功效, 可治产后血淤、腹中有块、赤白带下、风湿关节痛、偏头痛等症; 外用可医治跌打损伤、痈疔肿毒^[5]。研究表明, 爬山虎含有红色素、黄酮、多糖、二苯乙烯类、萜类、甾醇类、脂肪酸等多种类型化学成分^[6-8], 并具有广泛药理活性, 诸如免疫调节、抗疟原虫、抗凝血酶活性、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[7,8]。近年来, 随着研究的深入, 自由基与疾病和衰老的关系日益

明确, 抗氧化剂的研究已受到人们的广泛关注^[9-11]。目前常用抗氧化剂有茶多酚、维生素 C、维生素 E、大豆异黄酮、BHT、BHA 等^[12]。随着合成抗氧化剂毒副作用的凸显, 寻找高效低毒的天然抗氧化剂势在必行。

植物多糖普遍存在于自然界植物中, 大量研究表明多糖除了免疫调节、抗肿瘤活性外, 还具有抗氧化、降血糖、抗凝血等作用, 成为医药界研究热点^[13]。多糖是爬山虎中重要营养成分之一, 其茎叶中多糖含量较高^[14], 虽已有文献报道爬山虎多糖的抑菌作用^[15], 但对于其抗氧化活性的研究未见报道。本文以维生素 C 作为对照, 对爬山虎多糖的体外抗氧化活性进行了研究, 为开发新型天然抗氧化剂和爬山虎的综合开发利用提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

石油醚 (60 °C ~ 90 °C)、无水乙醇、三氯甲烷、

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2013-11-21

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (14ZA0003); 四川省科技厅应用基础研究计划 (2014JY0113)

* 通讯作者 Tel: 86-835-2885614; E-mail: crystal_0406@126.com

正丁醇、丙酮、乙醚、活性炭、邻二氮菲、铁氰化钾、硫酸亚铁、过氧化氢、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、邻苯三酚、三羟基氨基甲烷(Tris)、蒽酮、浓硫酸、抗败血酸等均为国产分析纯,1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基(DPPH·)购于Sigma公司

1.2 主要仪器

WFZ UV-2000 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)、RE 2000B 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、TD-6M 离心机(四川蜀科仪器有限公司)、ESJ200-4 电子天平(沈阳龙腾电子有限公司)、101A-4 鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)

1.3 材料

实验材料于2013年5月采集于四川农业大学校园内,经四川农业大学动物医学院药学系范巧佳教授鉴定为葡萄科地锦属植物爬山虎 *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch,洗净,室温晾干,保存于四川农业大学动物医学院药学系。

1.4 爬山虎多糖的制备

称取粉碎过40目的爬山虎茎60g,用250mL石油醚(沸程60℃~90℃)回流3h脱脂,抽滤,滤渣加入80%的乙醇100mL回流提取2次,每次2h,抽滤,合并滤液,离心(2400~3500rpm,30min)除单糖,得沉淀物。于沉淀物中加入400mL蒸馏水,回流提取2次,每次1h,离心(2400~3500rpm,30min),合并上清液,旋转蒸发浓缩至小体积后,加入Sevag试剂[氯仿-正丁醇(5:1)]除蛋白,反复操作至无蛋白层为止,加入活性炭脱色,抽滤得清液。向清液中加入无水乙醇至乙醇分数占80%,沉淀多糖,静置过夜,抽滤。沉淀分别用95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤3次,干燥得爬山虎多糖^[14,15],测定采用蒽酮-浓硫酸法^[15]测得多糖含量96.13%。

1.5 清除羟基自由基(·OH)能力的测定

将1.5mL 1.8mol/L水杨酸溶液与2mL 1.8mol/L FeSO₄溶液于试管中混匀后,加入1mL不同浓度爬山虎多糖溶液,然后加入1mL 0.3% H₂O₂,摇匀,于30℃保温30min,510nm处测得样品组吸光度A_i;同时将样品组中H₂O₂换成1mL蒸馏水,测得样品对照组吸光度A_j;将样品组中样品换成1mL蒸馏水,测得空白组吸光度A₀^[16]。以V_c为对照,每组做3个重复,求其平均值。按下式计算清除率:

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

1.6 清除超氧阴离子自由基(O₂⁻)能力的测定

采用改良邻苯三酚自氧化法^[17],取pH = 8.12的Tris-HCl缓冲溶液7.5mL和1.0mL不同浓度爬山虎多糖溶液,于25℃水浴中预热20min,再加入0.5mL 25mmol/L的邻苯三酚溶液,混匀后,于25℃水浴中反应5min,加入1.0mL浓HCl终止反应,于325nm处测定样品组吸光度A_i;样品对照组以相同体积的蒸馏水代替邻苯三酚溶液,测得吸光度A_j;空白对照组以相同体积的蒸馏水代替样品溶液测定溶液的吸光度A₀。以V_c为对照,每组做3个重复,求其平均值。按下式计算清除率:

$$\text{超氧阴离子自由基}(\text{O}_2^{\cdot-})\text{清除率}P(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

1.7 DPPH·清除能力的测定

取不同浓度爬山虎多糖溶液2.0mL,加入2.0mL 0.4mmol/L的DPPH无水乙醇溶液充分混匀,室温避光静置30min后,以溶剂为空白对照,517nm处测吸光度A₁;以同体积蒸馏水代替样品溶液做阴性对照,测定吸光度A₂;以同体积无水乙醇代替DPPH溶液做空白组,测定吸光度A₃^[18]。以V_c为对照,每组做3个重复,求其平均值。按下式计算清除率:

$$\text{样品对DPPH的清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_3) / A_2] \times 100\%$$

1.8 还原能力的测定

分别取不同浓度的爬山虎多糖溶液1mL加入到2.5mL,0.2mol/L,pH = 6.6磷酸盐缓冲液中,然后加入2.5mL,1%的铁氰化钾溶液,混匀后于50℃水浴20min,再加入2.5mL,10%的三氯乙酸(TCA)溶液,3000rpm离心10min,取上清液2.5mL,加入2.5mL蒸馏水和0.5mL 0.1% FeCl₃溶液,于700nm处测定吸光度,吸光度越高,还原能力越强^[19]。以V_c为对照,每组做3个重复,求其平均值。

2 结果与讨论

2.1 爬山虎多糖提取物对·OH的清除作用

羟基自由基(·OH)是活性氧中最活泼的氧自由基,可以导致各种疾病的发生,加速机体的衰老^[20]。清除羟基自由基可能是预防疾病和衰老的有效手段之一。按1.5的方法,研究了不同浓度的爬山虎多糖对羟基自由基的清除效果,结果见图1。

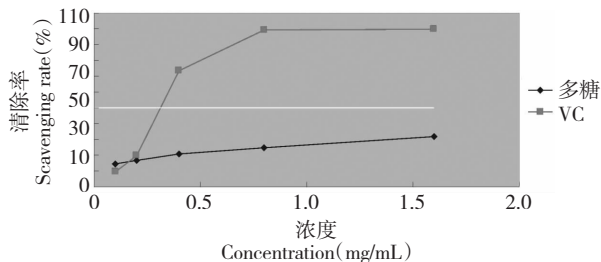


图1 不同浓度爬山虎多糖对·OH的清除作用

Fig. 1 Scavenging effect on ·OH by different concentration of polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.

爬山虎多糖对羟基自由基的清除作用具有明显的浓度依赖关系,随浓度的升高,其对羟基自由基的清除率也随着增大,在1.6 mg/mL时,清除能力达31.8%。在相同质量浓度下,小于0.16 mg/mL时,爬山虎多糖清除羟基自由基的能力大于Vc,但大于0.16 mg/mL后对照品Vc清除能力迅速上升,在0.42 mg/mL时清除率达50%,在0.8 mg/mL后,Vc清除能力接近100%。

2.2 爬山虎多糖提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)是机体内寿命最长的自由基,可引发体内脂质的过氧化,加快机体衰老,并诱发多种疾病。对超氧阴离子自由基的清除,有效减少氧自由基的生成,减少对机体的危害^[21]。爬山虎多糖对超氧阴离子自由基的清除能力由图2可知,爬山虎多糖对超氧阴离子自由基有一定的清除作用,清除能力随浓度的升高而增大,当多糖浓度在1.6 mg/mL时,清除率达39.1%。在相同浓度下,其清除率低于对照品Vc,Vc浓度在0.14 mg/mL时,清除率达50%。

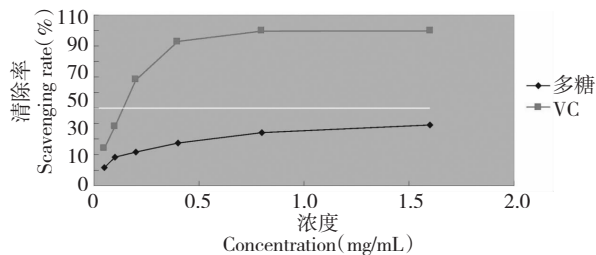


图2 不同浓度爬山虎多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

Fig. 2 Scavenging effect on $O_2^{\cdot-}$ by different concentration of polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.

2.3 爬山虎多糖提取物对DPPH·的清除作用

·DPPH的有效清除表明样品具有打断脂质过氧化链式反应和降低羟基自由基、烷氧自由基或过氧化自由基浓度的作用^[21]。爬山虎多糖对·DPPH自由基的清除能力如图3所示,爬山虎多糖对·DPPH具有较佳的清除能力,其清除能力随浓度的增加而明显增强,在其浓度为0.663 mg/mL时,清除能力达到50%;浓度为1 mg/mL时,清除率达67.18%。但低于相同质量的Vc溶液,Vc的 IC_{50} 为0.013 mg/mL。

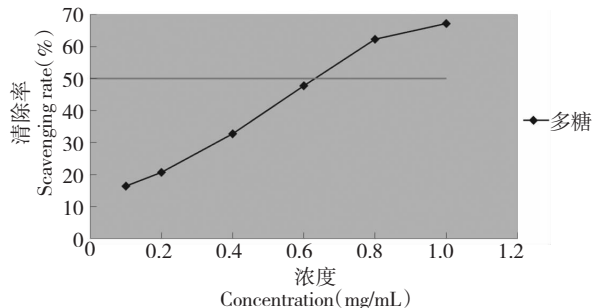


图3 不同浓度爬山虎多糖对·DPPH的清除作用

Fig. 3 Scavenging effect on ·DPPH by different concentration of polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.

2.4 爬山虎多糖提取物还原能力的测定

爬山虎多糖具有一定的总还原能力,见图4。其总还原能力明显低于Vc,但随着多糖浓度的增大,总还原能力增强。当样品浓度达到1.5 mg/mL,还原能力大0.127。

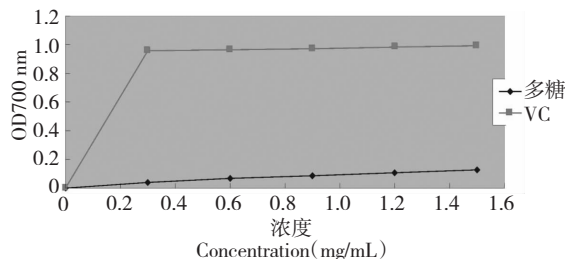


图4 爬山虎多糖总还原能力的测定

Fig. 4 Reducing capacity of polysaccharides from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.

3 结论

本研究通过四种不同体外抗氧化实验对爬山虎多糖的体外抗氧化活性进行评价,结果表明,爬山虎多糖具有一定的体外抗氧化能力和抗氧化的多样

性。其中,爬山虎多糖对·DPPH清除能力较强,IC₅₀为0.663 mg/mL;对·OH和O₂^{·-}的清除能力适中,但均明显低于Vc;而其总还原能力较弱,提示爬山虎多糖分子上具有较少还原性基团。总体而言,虽然爬山虎多糖的体外抗氧化能力不如Vc,但作为具有抗氧化性质的天然成分,有望被开发成天然抗氧化剂应用于食品和医药行业,为爬山虎进一步开发和利用提供理论依据。

参考文献

- 1 The Editorial Board of the Dictionary of Traditional Chinese Medicine(中药大辞典编委会). The Dictionary of Traditional Chinese Medicine, Part 1(中药大辞典,上册). Shanghai: Shanghai science and Technology Press, 1975. 809.
- 2 Zhang YG(张毅功), Lu SL(陆诗雷), Sun ZY(孙振元), et al. Utilization status of germplasm resources of creeper(Parthenocissus Planch). *Res Sci(资源科学)*, 2005, 27: 141-145.
- 3 Chen YG(陈永贵), He BS(何兵师), Ying Y(营毅), et al. The analysis of the germplasm resources of Parthenocissus plants and its application in landscaping. *Shanxi Forestry Sic Tec(陕西林业科技)*, 2005, (2): 1-5.
- 4 Feng DL(冯大领), Meng XS(孟祥书), Cui BB(崔彬彬), et al. Present situations and prospects of researches on Parthenocissus plants. *Hebei J Fro Orc Res(河北林果研究)*, 2006, 21: 272-275.
- 5 Yu CL(余传隆), Huang KT(黄泰康), Ding ZZ(丁志遵), et al. The Dictionary of Chinese Herb Medicine(中药辞海). Beijing: Chinese Pharmaceutical Publishing House, 1993. 1967-1968.
- 6 He S, Wu B, Pany J, et al. Stilbene oligomem from Parthenocissus laetevirens: Isolation, biomimetic synthesis, absolute configuration, and implication of antioxidative defense system in the plant. *JOC*, 2008, 73: 5233-5241.
- 7 Yang JB(杨建波). Studies on the chemical constituents and bioactivities from the Parthenocissus quinquefolia, Beijing: Peking Union Medical College(北京协和医学院), MSc. 2011.
- 8 Li Q(李倩), Li N(李娜), Gong J(巩江), et al. Overview of pharmaceutical research on plants of genus Parthenocissus Planch. *J Anhui Agric Sci(安徽农业科学)*, 2011, 39: 8385-8390.
- 9 Wu L, Zhang ZJ, Zhang ZS. Characterization of antioxidant activity of extracts from Flosloniceræ. *Drug Dev Ind Pharm*, 2007, 33: 841-847.
- 10 Gupta M, et al. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of Plumeria acuminata leaves. *J Bio Sci*, 2007, 7: 1361-1367.
- 11 Mahal HS, Mukherjee T. Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol antioxidant effect. *Res Chem Intermed*, 2006, 32: 59-71.
- 12 Li FL(李芳亮), Wang R(王锐), Zhang SM(张红梅). Study on the antioxidation activities of water soluble polysaccharides from Hippophae Rhamnoides Tea. *Nat Prod Res Dev(天然产物开发与研究)*, 2010, 22: 671-673.
- 13 Qian Q(钱青), Zhang ZY(张志勇). The progress of the Pharmacological research and application of polysaccharide form plants. *West China Med J(华西医学)*, 2009, 24: 250-253.
- 14 Dong AW(董爱文), Zhao HQ(赵虹桥), Shi LM(施立毛). Comparative study of polysaccharide contents in parthenocissus. *Nat Prod Res Dev(天然产物开发与研究)*, 2005, 17: 746-749.
- 15 Dong AW(董爱文), Chen JH(陈建华), Zhou H(周辉), et al. Extracting polysaccharide from parthenocissus tricuspidata plant and bacteriostasis research. *Guangzhou food Sci Tec(广州食品工业科技)*, 2003, 19(3): 15-17.
- 16 Yang X, Yu W, Ou Z, et al. Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from Ficus carica L. fruit. *Plant Food Hum Nutr*, 2009, 64: 167-173.
- 17 Tan P(谭萍), Fang YM(方玉梅), Wang YH(王毅红), et al. The anti-oxidation of polysaccharide in tartary buckwheat. *Food Res and Dev(食品研究与开发)*, 2011, (4): 5-7.
- 18 Yuan JF, Zhang ZQ, Fan ZC. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from Ligusticum chuanxiong Hort. *Carbohydr Polym*, 2008, 74: 822-827.
- 19 Chow ST, Chao WW, Chung YC. Antioxidative activity and safety of 50% ethaolic red extract. *J Food Sci*, 2003, 68: 21-25.
- 20 Chen LH(陈莉华), Long JG(龙进国), Tan LY(谭林艳), et al. Extraction and purification of polysaccharides from Hongguo Ginseng and the comparison of antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev(天然产物开发与研究)*, 2013, 25: 170-173.
- 21 Yuan JF(原江峰), Wang DH(王大红). Antioxidant effects and cytotoxicity of crude polysaccharide from Ligusticum chuanxiong Hort. *Nat Prod Res Dev(天然产物开发与研究)*, 2012, 24: 877-881.