

款冬花多糖抗氧化能力测定

刘彩虹, 王爱玲, 李玉琴, 李珂, 贾宝秀(泰山医学院药学院, 山东 泰安 271000)

摘要: 目的 用流动注射化学发光法探讨中药款冬花多糖的体外抗氧化作用。方法 将款冬花多糖提取液加入 3 种化学发光体系, 测量其发光强度, 根据系统化学发光被抑制的程度评价款冬花对活性氧自由基的清除能力, 并以抗坏血酸(Vc)为阳性对照。结果 款冬花多糖对 $\cdot\text{OH}$ 有很好的清除作用, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 也有一定的清除作用, 且在 $0.25\sim 4.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内清除作用随浓度的增加而增强; 对自由基的清除能力大小: $\cdot\text{OH} > \text{H}_2\text{O}_2 > \text{O}_2^{\cdot-}$ 。结论 在一定浓度范围内, 款冬花多糖具有一定的抗氧化活性。

关键词: 流动注射化学发光; 款冬花多糖; 抗氧化

中图分类号: R913

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)10-0886-04

Determination of Antioxidation of Polysaccharides in *Tussilago Farfara*

LIU Caihong, WANG Ailing, LI Yuqin, LI Ke, JIA Baoxiu(Pharmacy Department of Taishan Medical University, Taian 271000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the scavenging ability on ROS free radical of polysaccharides in *Tussilago farfara* *in vitro* by flow injection chemiluminescence. **METHODS** The determination was based on the inhibition effect of *Tussilago farfara* polysaccharides extraction in three chemiluminescence system, and vitamin C was used as positive control. **RESULTS** It was showed that *Tussilago farfara* original liquid could inhibit and clear the ROS such as $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ and H_2O_2 effectively, and the efficiency was related to the concentration of polysaccharides in *Tussilago farfara* in the concentration range from 0.25 to $4.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The scavenging abilities of polysaccharides in *Tussilago farfara* on ROS was $\cdot\text{OH} > \text{H}_2\text{O}_2 > \text{O}_2^{\cdot-}$. **CONCLUSION** The polysaccharides of *Tussilago farfara* have an antioxidation effect within a range of certain concentration *in vitro*.

KEY WORDS: flow injection chemiluminescence; polysaccharides of *Tussilago farfara*; antioxidation

中药款冬花为菊科植物款冬(*Tussilago farfara*)的干燥花蕾, 始载于《神农本草经》, 为常用中药材之一, 具有润肺止咳、化痰平喘之功效^[1], 现代临床上多用于治疗慢性支气管炎、哮喘等疾病^[2]。目前国内外对款冬花的研究主要集中在萜类、黄酮、生物碱、有机酸和精油等化学成分^[1, 3-5], 对多糖类成分的研究相对较少。尽管现代药理研究发现款冬花粗多糖对体外培养人白血病 K562 细胞有一定的凋亡诱导作用^[6], 但其它生物活性的研究非常少, 也鲜见有关款冬花多糖清除自由基方面的报道。为更好地开发和利用这一药用资源, 本试验采用流动注射化学发光技术, 检测了款冬花清除活性氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2)的能力, 并将其与维生素 C 的清除能力进行对比, 为合理利用款冬花中的生物活性成分提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

款冬花购于安徽亳州药市, 批号: 20090508,

经本校药物综合实验室李同德教授鉴定为款冬 *Tussilago farfara* 的干燥花蕾; 鲁米诺(Sigma 公司); 葡萄糖对照品(天津市福晨化学试剂厂, 分析纯, 批号: 20070927)、邻苯三酚、维生素 C、无水乙醇、铁氰化钾、过氧化氢等试剂均为分析纯; 实验用水均为重蒸水。

1.2 仪器

IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈科技有限公司); UV-2450PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 溶液的配制

邻苯三酚溶液用 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液配制, 使用前用水稀释至所需浓度, 鲁米诺用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲溶液配制成所需浓度; 亚铁氰化钾、鲁米诺以及 H_2O_2 均用 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ($\text{pH}=7.20$)缓冲溶液配制, 使用前配制。

基金项目: 山东省教育厅基金资助项目(J09LF30)

作者简介: 刘彩虹, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0538)6229751 E-mail: Liuch7688@163.com

2.2 款冬花多糖的提取^[7]

将款冬花干燥,粉碎,过筛,称取款冬花粉末 5 g,置于 250 mL 锥形瓶中用 95%的乙醇脱脂,加入 125 mL 水,在 65 °C,50 kHz 条件下超声浸提脱脂后的药材粉末,提取 3 次,合并滤液并浓缩后,再加 5 倍量 95%乙醇放置过夜,抽滤。滤饼依次用无水乙醇、丙酮、乙醚淋洗后,真空干燥,即得款冬花粗多糖。

2.3 款冬花多糖含量测定

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准品配置成浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的葡萄糖标准溶液。精密量取葡萄糖标准溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 10 mL 试管中,依次加水至 2 mL,摇匀。然后各加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,振摇 5 min,于沸水浴中加热 15 min,冷却。在波长 490 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标作图,进行曲线拟合得标准曲线方程: $A=0.0687C+0.02297(r=0.9953)$,线性范围为 1.25~12.5 μg·mL⁻¹。

2.3.2 换算因子的测定 精密称取款冬花粗多糖 10 mg,置于 50 mL 量瓶中,加水溶解,稀释至刻度,摇匀,备用。精密吸取上述溶液 2 mL,按“2.3.1”项下方法操作,据标准曲线计算款冬花粗多糖中葡萄糖的浓度,按下式计算换算因子: $f=W/CD$ (W 为多糖质量; C 为多糖液中葡萄糖的浓度; D 为款冬花多糖的稀释因子),测得结果: $f=1.251$ 。

2.3.3 样品多糖含量测定 称取款冬花样品 2 g,置于 250 mL 锥形瓶中,按照“2.2”项下方法,合并滤液于 250 mL 量瓶中,稀释至刻度。精密量取 1 mL 置于 100 mL 量瓶中,用蒸馏水定容。由标准曲线及换算因子得样品液中多糖含量为 7.76 mg·mL⁻¹ ($n=5$)。

2.4 流动注射化学发光

流动注射化学发光分析流路见图 1,蠕动泵分别泵入邻苯三酚溶液(a)、鲁米诺-碳酸盐缓冲液(b)和 H₂O(c)(·OH 体系中,蠕动泵分别泵入鲁米诺、亚铁氰化钾溶液以及 H₂O₂ 溶液; H₂O₂ 自由基体系中分别泵入 H₂O₂、鲁米诺-碳酸盐缓冲液和 H₂O),分别在混合器中混合并发生反应,记录发光信号。当蠕动泵中进的是空白溶液时,发光信号为空白值 I_0 ,当进的是待测液或维生素 C 溶液时,发光信号记为 I_T ,根据发光信号的降低值(I_0-I_T),可以定量分析款冬花多糖与维生素 C 清除自由基的能力。

自由基抑制率为: $[(I_0-I_T)/I_0] \times 100\%$ 。

以发光抑制率为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘出发光抑制曲线并算出自由基抑制率为 50% 时的浓度 IC_{50} ,用来衡量样品对自由基的清除能力。 IC_{50} 值越小,表明样品清除自由基能力越强^[8]。

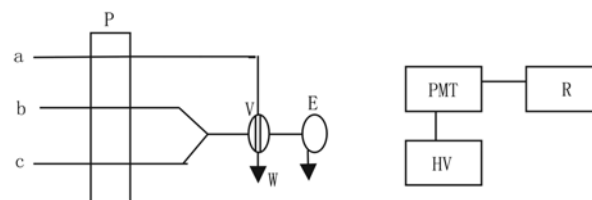


图 1 流动注射化学发光示意图

a-邻苯三酚溶液; b-鲁米诺-碳酸盐缓冲液; c-H₂O; P-蠕动泵; V-进样阀; E-流通池; W-废液; PMT-光电倍增管; HV-负高压; R-记录仪

Fig 1 Flowchart of flow injection chemiluminescence

a-pyrogallol; b-luminol; c-water; P-peristaltic pump; V-sampling valve; E-flow cell; W-waster; PMT-photo multiplier tube; HV-negative high valtage; R-computer

2.5 O₂⁻清除能力检测

采用邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-鲁米诺体系测定^[9],邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生 O₂⁻, O₂⁻与化学发光增效剂鲁米诺反应,使之氧化,产生一个电子激发态的中间物,当其返回基态时,可发出化学冷光,用发光检测装置即可测定发光强度。反应体系中 O₂⁻的量可以用化学发光强度来相对表示。

测定中,选择邻苯三酚: 0.25 mmol·L⁻¹; 鲁米诺: 0.4 mmol·L⁻¹; NaHCO₃-Na₂CO₃ 缓冲溶液 pH: 9.95,此时体系的发光强度、稳定性及重现性较好。

2.6 ·OH 清除能力检测

·OH 由 Fe²⁺催化的 Fenton 体系产生,鲁米诺为发光增效剂,采用亚铁氰化钾-鲁米诺-H₂O₂ 体系测定^[10]。根据反应物和鲁米诺的浓度对化学发光强度、稳定性以及重现性的影响,本实验选择亚铁氰化钾: 0.26 mmol·L⁻¹; 鲁米诺: 0.1 mmol·L⁻¹; H₂O₂ 含量: 0.2%。

2.7 H₂O₂ 清除能力检测

采用鲁米诺-过氧化氢碳酸盐缓冲溶液体系测定^[11],碱性条件下,过氧化氢氧化鲁米诺使之发光,其发光强度与过氧化氢含量成正比,发光强度的下降可以体现样品清除过氧化氢的能力。实验中 H₂O₂ 含量: 0.3%; 鲁米诺: 0.2 mmol·L⁻¹; NaHCO₃-Na₂CO₃ 缓冲溶液 pH: 9.6。

3 结果

3.1 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

按照“2.5”项下条件, 分别对空白溶液、款冬花多糖提取液及维生素 C 溶液进行化学发光强度测定, 每个体系重复测定 3 次, 发光强度取平均值。

款冬花多糖提取液对 $O_2^{\cdot-}$ 体系发光强度的影响见图 2, 由此看出款冬花多糖能够降低该体系的发光强度, 发光强度降低即表示反应物对 $O_2^{\cdot-}$ 具有抑制能力, 说明款冬花多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 具有一定的清除作用。

配制不同浓度的款冬花多糖和维生素 C 溶液进行测定, 并计算发光抑制率, 绘制发光抑制率曲线如图 3。由图 3 可见, 在实验范围内, 款冬花提取液和维生素 C 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用均随浓度增大而增大。相同条件下, 款冬花提取液对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用弱于维生素 C, 二者的 IC_{50} 分别为 3.54 和 $2.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

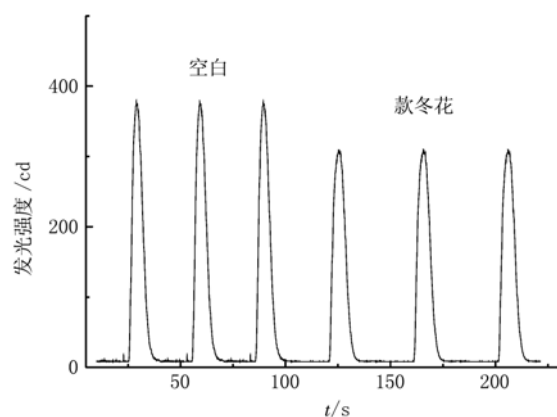


图 2 款冬花多糖对发光强度的影响

Fig 2 Effect of *T. farfara* polysaccharide on chemiluminescence intensity

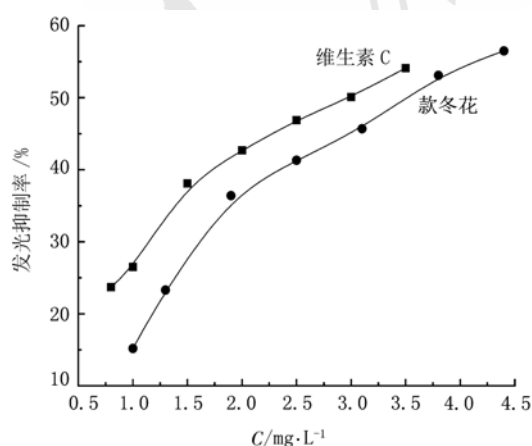


图 3 维生素 C 和款冬花多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

Fig 3 The scavenging abilities on $O_2^{\cdot-}$ of Vc and *T. farfara* polysaccharide

3.2 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

按“2.6”项下条件, 测定不同浓度的款冬花多糖和维生素 C 溶液对 $\cdot\text{OH}$ 体系发光强度的影响, 计算发光抑制率, 并绘制发光抑制率曲线如图 4。由图 4 可知款冬花多糖和维生素 C 对 $\cdot\text{OH}$ 有较好的清除作用, 且在实验范围内清除率随浓度增大而增大。同条件下, 款冬花提取液和对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用弱于维生素 C, IC_{50} 分别为 0.99 和 $0.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 对 H_2O_2 的清除作用

按“2.7”项下条件, 测定不同浓度的款冬花多糖和维生素 C 溶液对 H_2O_2 系发光强度的影响, 计算发光抑制率, 并绘制发光抑制率曲线如图 5。由图 5 可知, 款冬花多糖及维生素 C 对 H_2O_2 有一定的清除作用, 且在实验范围内呈明显的量效关系。相同浓度下, 款冬花多糖对的清除能力低于维生素 C, 二者 IC_{50} 分别为 2.35 和 $0.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

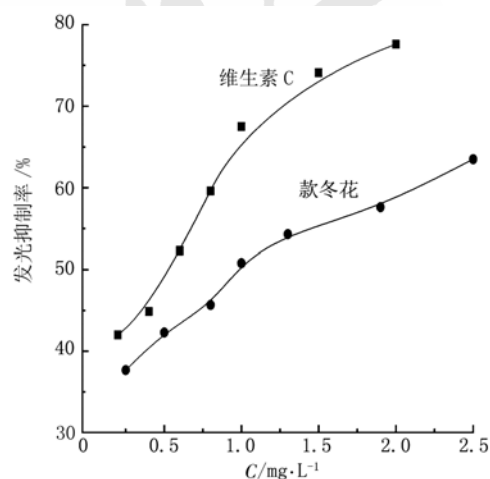


图 4 维生素 C 和款冬花多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Fig 4 The scavenging abilities on $\cdot\text{OH}$ of Vc and *T. farfara* polysaccharide

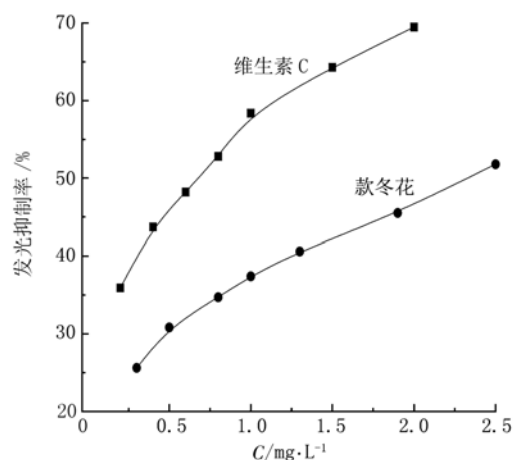


图 5 维生素 C 和款冬花多糖对 H_2O_2 的清除作用

Fig 5 The scavenging abilities on H_2O_2 of Vc and *T. farfara* polysaccharide

本实验通过将款冬花多糖与维生素 C 进行对比可知: 款冬花多糖提取物具有一定的清除活性氧自由基的作用, 对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 的清除能力均弱于维生素 C, 其清除能力大小为 $\cdot OH > H_2O_2 > O_2^{\cdot-}$ 。值得注意的是, 对比 IC_{50} 值可知, 款冬花多糖提取物对 $\cdot OH$ 有很好的清除作用。

4 讨论

动物体生命活动过程中会产生 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 等活性氧自由基, 在正常情况下, 体内的自由基的产生与清除处于一种动态平衡之中, 如果失衡, 过多的自由基可导致人体正常细胞和组织的损坏, 引起各种疾病, 如心血管疾病、炎症、肿瘤等。许多研究表明^[12-14], 多糖类物质在体外和体内都具有较强的抗氧化活性, 不同的多糖类化合物对不同体系的抗氧化作用可能不同, 对不同自由基存在一定的选择性。本实验结果表明, 款冬花多糖对 $\cdot OH$ 有很好的清除作用, 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 也有一定的清除作用, 且浓度与抑制率在一定浓度范围内呈量效关系。说明款冬花多糖能够达到清除自由基, 阻断自由基链式反应的作用, 在一定浓度范围内能抑制自由基引起的氧化损伤, 这为解释其防治疾病的部分作用机制提供了理论参考, 为款冬花的进一步开发和利用提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] WU D, ZHANG C F, ZHANG M, et al. Study on chemical constituents of the flower buds of *Tussilago farfara* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(4): 260-263.
- [2] State Administration of Traditional Chinese Materia Medica Editorial Board. Chinese Herbal Medicine(中华本草) [M]. Shanghai: Publishing House of Shanghai Science and Technology, 2000: 994.
- [3] LIU Y F, YANG X W, WU B. GC-MS analysis of essential oils constituents from the flower buds of *Tussilago farfara* L [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学杂志), 2006, 15(1): 10-14.
- [4] LIU Y F, YANG X W, WU B. Studies on chemical constituents in the buds of *Tussilago farfara* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(22): 2378-2381.
- [5] WANG J F, YANG S P, MAO P J. Study the effects of different extracts of *Tussilago farfara* L. on the contraction of isolated of guinea pig [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(9): 781-784.
- [6] ZHANG X C, LIU H, LIU Y Y, et al. Apoptosis of K562 cells induced by Flos Farfarae polysaccharide *in vitro* [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research(中国组织工程研究与临床康复), 2007, 11(11): 2029-2031.
- [7] ZHAO P, LI W H, ZHU J H, et al. Optimization for ultrasonic wave extraction of polysaccharide from *Tussilago farfara* by response surface method [J]. Fine Chem(精细化工), 2009, 26(6): 546-549.
- [8] LIU R H, YU B Y, QIU S X, et al. Study on scavenging activities for superoxide anion radicals ($O_2^{\cdot-}$) and structure-activity relationship of polyphenolic compounds from leaves of *Crataegus* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2005, 40(14): 1066-1069.
- [9] WANG Y Y, YU B Y, LI X, et al. Biotransformation of rutin by streptomyces griseus and antioxidation of metabolites [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2006, 4(1): 66-68.
- [10] SUN T, ZHOU D X, MAO F, et al. Analysis of superoxide anion radical $O_2^{\cdot-}$ and hydroxyl radical $\cdot OH$ by flow injection chemiluminescence [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2006, 27(11): 184-182.
- [11] SHANGGUAN X D, LIANG H Y. Determination of flavonoids of *Ginkgo biloba* by H_2O_2 -Luminol chemiluminescence inhibition with flow injection [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2004, 23(11): 10-13.
- [12] WANG Z Y, DAI L, ZHU YE Y, et al. Barbata acidic polysaccharide SBPs of the purification, characterization and antioxidant activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40(5): 728-731.
- [13] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Carbohydr Polym, 2007, 68(1): 54-58.
- [14] CHEN S K, TSAI M L, HUANG J R, et al. *In vitro* antioxidant activities of low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(7): 2699-2704.