

# 葎草多糖含量测定及其抗氧化性研究

王新风<sup>1</sup>, 杨芳<sup>1,2</sup>, 戈群妹<sup>1</sup>, 陈珊珊<sup>1</sup>

(1. 淮阴师范学院生物系资源微生物研究所, 江苏淮安 223300; 2. 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 南京 210097)

**摘要:** 对8月和10月采集的葎草全草、嫩头、叶和茎中多糖含量进行测定, 并对各部位提取纯化的多糖进行体外抗氧化作用研究。结果表明, 8月份嫩头中多糖含量最高, 达到 $(42.897 \pm 2.996)$  mg/g; 浓度为5 mg/mL的各部位葎草多糖溶液, 对Fenton反应生成的羟自由基具有较强的清除能力, 达85.15%~98.52%; 对邻苯三酚自氧化法产生的超氧阴离子自由基也有较好的抑制能力, 达57.15%~67.54%。葎草多糖对羟自由基和超氧阴离子自由基具有较高的清除能力。

**关键词:** 葎草; 多糖; 抗氧化性

中图分类号: Q946.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)03-0413-04

## Content and antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Humulus scandens*

WANG Xin-Feng<sup>1</sup>, YANG Fang<sup>1,2</sup>, GE Qun-Mei<sup>1</sup>, CHEN Shan-Shan<sup>1</sup>

(1. Institute of Resource Microorganism, Huaiyin Teachers' College, Huaian 22330, China; 2. Key Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The contents of polysaccharide in the whole plant, apic bud, leave and stem of *Humulus scandens* in August and October, the scavenging effect of its purified polysaccharide on  $O_2^-$  and  $\cdot OH$  were investigated. The results showed that the content of polysaccharide in apic bud in August was the highest, reached  $(42.897 \pm 2.996)$  mg/g. The concentration of 5 mg/mL polysaccharide of *H. scandens* can scavenge hydroxyl free radical formed in Fenton reaction, and the elimination rate reached 85.15%—98.52%. Oxygen free radicals of self-oxidation of pyrogallol was well inhibited by the polysaccharide, and the elimination rate reached 57.15%—67.54%. The polysaccharide of *H. scandens* had antioxidant activities on  $O_2^-$  and  $\cdot OH$ .

**Key words:** *Humulus scandens*; Polysaccharide; antioxidant activity

葎草(*Humulus scandens*)是桑科葎草属一年生缠绕草本植物(侯宽昭, 1984), 别名有拉拉秧、锯子草、五爪龙、降龙草等。全草含木樨草素, 葡萄糖甙, 胆碱, 天冬酰胺及挥发油; 球果含葎草酮, 蛇麻酮; 叶含木樨草素-7-葡萄糖甙, 大波斯菊甙和牡荆素(中华本草编委会, 1999)。葎草的药性为: 味甘、苦, 性寒。其主要的药理作用有清热解毒, 利尿通淋, 主治肺热咳嗽、肺痈、虚热烦渴、热淋、水肿、小便不利、湿

热泻痢、热毒疮疡、皮肤瘙痒等(朱晓明等, 2004; 尹佳等, 2006)。葎草生命力强, 资源丰富, 广泛分布于全国除青海、新疆以外的地区(王桃云等, 2005)。目前, 国内关于葎草的研究主要集中在葎草的化学成分、药理作用和药用作用的研究(尹海波等, 2001), 段国峰等(2006)对葎草多糖进行了纯化, 得到了四种组分的粗多糖, 并对各组分粗多糖的分子量及各自单糖组成进行了研究。尹海波等(2001)提出, 葎

收稿日期: 2008-02-25 修回日期: 2008-12-07

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(07KJB350011); 淮安市科技局项目(SN0635); 淮阴师范学院教授基金(08HSJSK05)[Supported by Natural Science Foundation of Jiangsu Province (07KJB350011); Project of Science and Technology Bureau of Huaian (SN0635); Professor Foundation of Huaiyin Teachers college(08HSJSK05)]

作者简介: 王新风(1964-), 男, 江苏涟水人, 教授, 从事微生物和药用生物技术研究。(E-mail)hywdwxf@sohu.com.

草药源丰富,生命力旺盛,内含抗衰老成分,考虑到多糖具有较高的抗氧化能力,因此我们进行初步纯化的基础上,对葎草多糖的抗氧化活性进行研究,以期提高葎草的附加值,促进我国葎草深加工产业的发展,同时也为葎草多糖在天然抗氧化剂和功能性食品领域的开发应用提供理论基础和实验依据,为人类的健康和社会经济的发展贡献力量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

于2007年8月和10月,分两次在淮阴师范学院校园内采集无虫斑、无病变的葎草茎叶,并经本院生物系罗玉明教授鉴定。材料分类洗净后,60℃烘干,磨成粉末,过60目筛,备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

蒽酮,水杨酸,邻苯三酚,三羟甲基氨基甲烷,均为分析纯试剂。T6新世纪紫外分光光度计(北京普析),TDL-5000B离心机(海安亭科学医学仪器厂),电子天平BS210S(北京赛多利斯天平有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 多糖测定方法 采用硫酸-蒽酮法(李群,2000),于620 nm处测定吸光值。以吸光值为纵坐标,以葡萄糖标准液浓度为横坐标,绘制标准曲线得回归方程  $y=0.0084x-0.0037$ ,  $R^2=0.9996$ (在糖浓度0~80 μg/mL之间时吸光值与糖浓度具有良好线性关系)。

1.3.2 葎草中多糖的提取及其纯化 精确称取已研磨好的葎草,用无水乙醇回流脱脂后,按10:1加入蒸馏水,摇匀后,80℃恒温水浴浸提2 h后取出用滤纸过滤,残渣再重新提取一次,合并提取液→脱色(终浓度5%  $H_2O_2$ )→浓缩→脱蛋白(Sevage法)→浓缩→95%乙醇沉淀→真空干燥→葎草多糖(段国峰等,2006)。

1.3.3 待测液的配制 用从葎草不同部位提取的多糖干品配制5 mg/mL的多糖溶液作为待测液,备用。

1.3.4 葎草多糖对羟自由基清除率的测定 利用  $H_2O_2$  与  $Fe^{2+}$  混合产生羟自由基,即:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + H_2O + Fe^{3+}$ 。再在体系内加入水杨酸捕捉羟自由基并产生有色物质。该物质在510 nm处有最大吸收。用该吸光值来表示羟自由基的含量。反应体系中含8.8 mmol/L  $H_2O_2$  1 mL,9 mmol/L  $FeSO_4$  1 mL,9 mmol/L水杨酸-乙醇1 mL,待测溶

液1 mL,其中  $H_2O_2$  是最后加入并启动整个反应,37℃反应0.5 h后,12 000 rpm离心6 min,然后以双蒸水作参比,在510 nm下测定吸光度。考虑待测溶液本身的吸光值不同,以9 mmol/L  $FeSO_4$  1 mL,9 mmol/L水杨酸-乙醇1 mL,待测溶液1 mL和双蒸水1 mL作为待测溶液的本底吸收值。清除率计算公式为:清除率(%) =  $(A_0 - (A_x - A_{x_0})) / A_0 \times 100\%$ 。其中  $A_0$  为空白对照液的吸光度,  $A_x$  为加入待测溶液后的吸光度,  $A_{x_0}$  为待测溶液的本底吸收值。每一吸光值平行测3次,取其平均值,结果用±sd表示(陈留勇等,2004;1989;马晓华等,2005)。

1.3.5 葎草多糖对超氧阴离子清除率的测定 对超氧阴离子的清除作用:采用邻苯三酚自氧化法,取0.05 mol/L pH8.2的Tris-HCl缓冲液4.5 mL于试管中,置25℃水浴中预热20 min,加入0.1 mL各供试液,2.5 mmol/L邻苯三酚0.4 mL,混匀后在25℃水浴中准确反应4 min,立即用8 mol/L HCl 0.1 mL终止反应,并在波长299 nm处测定吸光度(A)值(以蒸馏水调零),对照组用0.1 mL蒸馏水代替供试液,同时设立试剂空白管。清除率(%) =  $(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ ,结果用±sd表示(沈齐英等,2001)。

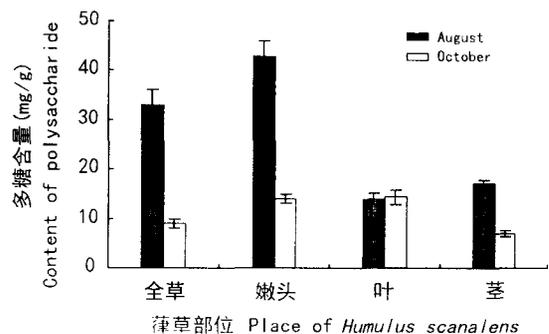


图1 不同月份葎草不同部位中多糖含量  
Fig. 1 The content of polysaccharide in different fractions of *Humulus scandens* in August and October

## 2 结果与分析

### 2.1 不同月份葎草各部位的多糖含量

从图1中可知,8月份葎草不同部位中的多糖含量依次为:嫩头>全草>茎>叶,嫩头与叶中含量差距最高,其比值达3.09;10月份:叶>嫩头>全草>茎,叶与茎中含量差距最高,其比值为2.04。10月份葎草不同部位中的多糖除了叶中的含量与八月份相比基本持平外,其余各部位多糖含量显著低于

8 月份。8 月份的嫩头多糖含量最高, 达到 (42.897 ± 2.996) mg/g。

## 2.2 不同月份采集葎草多糖对超氧阴离子自由基清除率

研究葎草不同部位提取的多糖干品配制的 5 mg/mL 多糖溶液对超氧阴离子自由基的清除率, 结果见图 2。

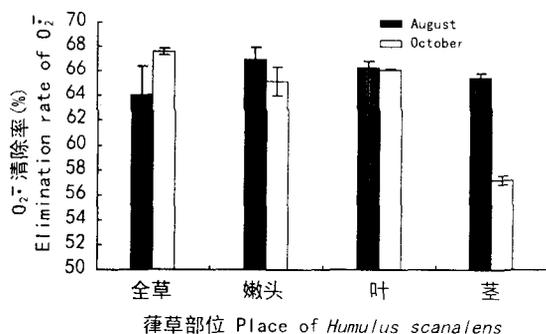


图 2 多糖对超氧阴离子自由基的清除率  
Fig. 2 Elimination rate of oxygen free radicals scavenged by the polysaccharide

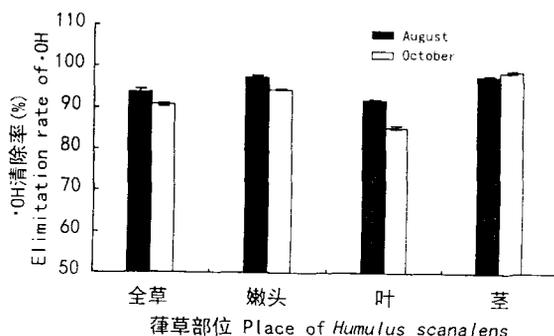


图 3 多糖对羟自由基的清除率  
Fig. 3 Elimination rate of hydroxyl free radicals scavenged by the polysaccharide

从图 2 可知, 8 月份采收的葎草不同部位浓度为 5 mg/mL 的多糖溶液抑制  $O_2\cdot^-$  能力在 64%~67% 之间, 各部位之间的抑制能力差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 相同浓度的 10 月份采收的葎草各部位多糖溶液抑制能力在 57%~68% 之间, 抑制能力差异也极显著 ( $P < 0.01$ ), 但此期间各部分的抑制能力除全草比 8 月份有显著上升 ( $P < 0.05$ ), 其他的则比 8 月份有下降 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 不同月份采集葎草多糖对羟自由基的清除率

由图 3 可知, 8 月份的葎草不同部位提取的多糖溶液清除  $\cdot OH$  能力在 91%~98% 之间, 各部位

的清除能力差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 10 月份的清除能力在 85%~99% 之间, 且各部位的清除能力差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 但 10 月份除茎的清除能力比 8 月份有增强外 ( $P < 0.01$ ), 其余各部位的多糖溶液对羟自由基的清除能力除茎之外均比 8 月份有明显减弱 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

不同月份采集的葎草不同部位多糖溶液对超氧阴离子自由基 ( $O_2\cdot^-$ ) 和羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 均具有明显的清除能力。

贺亮等 (2007) 在对川楝子多糖的抗氧化性研究中得出, 质量浓度达到 10 mg/mL 时, 川楝子多糖对  $O_2\cdot^-$  的清除效率达到 63.7%; 对  $\cdot OH$  的清除效率可以达到 74.0%, 且随着多糖质量浓度的增加, 对  $O_2\cdot^-$  及  $\cdot OH$  的清除效率也不断升高。柳红等 (2007) 在研究超声提南瓜粗多糖对羟自由基的清除能力时得出, 当南瓜粗多糖浓度从 1~6 mg/mL 时清除  $\cdot OH$  能力逐渐增加, 但是到了 8 mg/mL 时却呈下降趋势。本研究中得出 8 月份采集的葎草嫩头提取的多糖水溶液中多糖含量最高达到 0.429 mg/mL, 其经脱蛋白、脱脂后得到的多糖配制成的 5 mg/mL 测试液, 抑制超氧阴离子自由基能力为最大, 达 66.90%, 清除羟自由基能力也最大, 达 97.36%。比较该浓度情况下, 不同时期采集的不同部位的葎草多糖溶液的抗氧化能力发现, 除了 10 月份提取的茎中多糖溶液的抑制  $O_2\cdot^-$  能力最低为 57.15%, 其余部位抑制  $O_2\cdot^-$  能力都在 64%~67% 之间; 而 10 月份提取的叶中多糖溶液的抑制  $\cdot OH$  能力最低为 85.15%, 其它部位抑制  $\cdot OH$  能力都在 90.5%~98.5% 之间。我们得出不同月份采集的葎草不同部位多糖溶液对  $\cdot OH$  清除能力强于  $O_2\cdot^-$  的清除能力。相同浓度下的不同月份采收的各部位多糖溶液对  $O_2\cdot^-$  和  $\cdot OH$  清除的差异, 分析原因一方面由于葎草植株不同部位提取的多糖组成成分存在差异, 可能含有不同比例的蛋白等物质, 从而导致的抗氧化能力的差异; 另一方面可能是由于多糖是由 10 个以上多种单糖聚合而成的高分子物质, 当多糖分子以更加聚合的形式存在时, 其抑制  $O_2\cdot^-$  和清除  $\cdot OH$  能力更强 (周林珠等, 2002; 黄梅等, 2006)。

综上所述, 不同月份采集的葎草各部位多糖含

量有一定差异,且都具明显的抗氧化功能。葎草在我国资源巨大,目前除少量作为饲料外,大部分都未得到有效合理的利用,因而对葎草进行深加工和功能性产品的开发,具有十分广阔的前景。

### 参考文献:

- 中华本草编委会. 1999. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,2 514—2 515
- 尹海波,王颖,郑太坤,等. 2001. 中国葎草属植物的研究进展[J]. 辽宁中医学院学报,3(1):60—61
- 侯宽昭. 1984. 中国种子植物科属词典[M]. 北京:科学出版社,238
- Chen LY(陈留勇),Meng XJ(孟宪军),Jia W(贾薇),et al. 2004. The study on the antitumor activity and scavenging free radical and immune effect of the water-soluble polysaccharides from *A. Persica* var. *seleropersica*(黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基提高免疫活性研)[J]. *Food Sci*(食品科学),25(2):167—170
- Duan GF(段国峰),Li BJ(李宝军),Zhai ST(翟松涛),et al. 2006. Separation purification and composition analysis of polysaccharides from *humulus scandens*(葎草多糖的分离纯化及组成分析)[J]. *Strait Pharm J*(海峡药学),18(5):85—87
- He L(贺亮),Song XL(宋先亮),Yin N(殷宁),et al. 2007. Studies on extraction and anti-oxidation activities of flavonoids and polysaccharide from *Melia toosendan*(川楝子总黄酮和多糖提取及其抗氧化活性研究)[J]. *Chem Industry Fore Products*(林产化学与工业),27(5):78—82
- Huang M(黄梅),Wang XJ(王学军),Yang K(杨凯). 2006. Antioxidants of chinese materia medica and *in vitro* methods for assessment of antioxidant activities(中药抗氧化成分及抗氧化活性的体外评价方法)[J]. *J Chongqing Univ Sci Tech*(*Nat Sci*)(重庆科技学院学报·自然科学版),8(3):109—112
- Li Q(李群). 2000. Determination of holoside in toadstool using authrone colorimetric method and evaluation to the test(蒽酮比色法测定羊肚菌多糖及实验评价)[J]. *Chin J Health Lab Tech*(中国卫生检验杂志),10(1):31—32
- Liu H(柳红),Zhang J(张静). 2007. Study on the scavenging effect of different pumpkin polysaccharide on hydroxide free radicals *in vitro*(不同南瓜多糖体外清除羟基自由基作用的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),25(4):356—359
- Ma XH(马晓华),Lian B(连宾). 2005. Hydroxyl radical scavenging activities of several kinds of edible fungi(几种常见食用菌清除羟基自由基能力的研究)[J]. *Food Fermentation Industries*(食品与发酵工业),31(10):25—29
- Shen QY(沈齐英),Shen QY(沈秋英). 2001. Study on the resisting oxygen free radical and hydroxyl free radical effect of *Cordyceps militaris*(北虫草抗氧自由基和羟自由基作用的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),21(3):252—254
- Wang TY(王桃云),Ma HC(马红昌),Liu JY(刘江颖). 2005. The optimization for extraction technique of leaf protein concentrate (LPC) from *Humulus scandens*(葎草叶蛋白提取工艺的优化)[J]. *J Univ Sci Tech Suzhou*(苏州科技学院学报),22(1):59—64
- Yin J(尹佳),Wang RQ(王瑞琦),He HJ(何海娟),et al. 2006. Values of intradennal skin test and serums IgE detection in diagnosing *Humulus scandens* pollinosis(皮内试验和血清特异性IgE检测在诊断葎草花粉症中的临床价值)[J]. *Nat Med J China*(中华医学杂志),86(27):1 906—1 911
- Zhu XM(朱晓明),Zhou B(周蓓),Wei QY(魏庆宇). 2004. Summary of *Humulus* pollinosis study(葎草属花粉症研究概况)[J]. *Liaoning J Trad Chin Med*(辽宁中医杂志),31(7):601—602
- Zhou LZ(周林珠),Yang XL(杨祥良),Zhou JY(周井炎),et al. 2002. Advance of the antioxidative activities research of polysaccharides(多糖抗氧化作用研究进展)[J]. *Chin J Biochemical Pharm*(中国生化药物杂志),23(4):210—212
- Li Q(刘琴),Sun H(孙辉),He DW(何道文). 2005. Plant responses to the high temperature and moisture stress(干旱和高温对植物胁迫效应的研究进展)[J]. *J Chin West Norm Univ*(*Nat Sci*)(西北师范大学学报·自然科学版),26(4):364—368
- Luo CK(罗成科),Peng ZS(彭正松),Cai P(蔡鹏). 2007. *In vitro* regeneration of *Pinellia ternata* from leaf explants(三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(2):260—264
- Miao C(苗琛),Li RQ(利容千),Wang JB(王建波). 1994. Ultrastructural study in leaf of *Brassica oleracea* var. *capitata* under heat stress(甘蓝热胁迫叶片细胞的超微结构研究)[J]. *Acta Bot Sin*植物学报,36(9):730—733
- Shi JX(石进校),Zhao FY(赵福永),Liu YD(刘应迪),et al. 2002. Activity of POD,SOD and content of MDA of *Epimedium sagittatum* Maxim under temperature stress(温度胁迫下淫羊藿的膜脂过氧化和保护酶活性)[J]. *Life Sci Res*(生命科学杂志),6(2):160—162
- Xue JP(薛建平),Ding Y(丁勇),Zhang AM(张爱民),et al. 2004. The change of activity of protective enzyme around sprout tumble of *Pinellia ternata* under high temperature stress(高温胁迫下半夏倒苗前后保护酶活力的变化)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志),29(7):641—643
- Zhang B(张斌),Zhang TL(张桃林),Zhao QG(赵其国). 1999. Relationship between water potentials of red soiland crop leaves under five farming systems and their responses to drought stress in dry season(干旱季节不同耕作制度下作物红壤水势关系及其干旱胁迫响应)[J]. *Acta Pedol Sin*(土壤学报),2(1):101—110
- Zhang YL(章艳玲),Li GR(李关荣),Wei YL(位运粮). 2007. Advances in research of traditional chinese medicine *Pinellia ternata*(中药半夏的研究进展)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),23(7):163—167

(上接第392页 Continue from page 392)