

参薯多糖检测及其体外抗氧化能力研究

裴会鹏, 黄 俊, 吴凯旋, 杨培君*

(陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

摘要: 以参薯 (*Dioscorea alata* L.) 块茎为研究材料, 采用热水浸提、Savage 法除蛋白、乙醇沉淀及有机溶剂纯化的方法, 获得参薯粗多糖。通过蒽酮—硫酸显色法测定参薯的多糖含量, 研究了参薯粗多糖体外对羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 的清除能力。结果表明: 参薯多糖含量高达 19.17%, 参薯粗多糖对羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 具有一定的清除活性, 抗氧化能力与多糖浓度之间存在良好的相关性。当粗多糖质量浓度分别达到 9.0 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时, 对羟自由基和过氧化氢的清除率可达到 100%。参薯多糖具有较好的体外抗氧化作用, 是一种具有开发价值的天然抗氧化剂。

关键词: 参薯; 多糖; 体外抗氧化作用

中图分类号: Q946.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)11-0113-04

Determination and Antioxidant Activity *in vitro* of Polysaccharides from *Dioscorea alata*

PEI Hui-peng, HUANG Jun, WU Kai-xuan, YANG Pei-jun*

(School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: The tuber of *Dioscorea alata* was used as test material to determine the polysaccharide and the antioxidant activity *in vitro*. The methods contained hot water extraction, Sevage removal protein, precipitation by ethanol, purifying polysaccharide by organic solvents, producing polysaccharide of *D. alata*. Moreover, the antioxidant activities *in vitro* of *D. alata* polysaccharide on hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were researched with anthrone-sulfuric acid colorimetric. The results indicated that the content of *D. alata* polysaccharide was 19.17% and had a clearing ability on $\cdot\text{OH}$ and H_2O_2 , the antioxidant activity was significantly correlated with its concentration. The polysaccharide completely scavenged the hydroxyl and hydrogen peroxide free radicals when its mass concentration was 9.0 mg/mL and 0.5 mg/mL respectively. *D. alata* can be used as a resource of plant active polysaccharides with a strong antioxidant effect, and can be exploited as a natural antioxidant.

Key words: *Dioscorea alata* L.; Polysaccharide; Antioxidant activity *in vitro*

参薯 (*Dioscorea alata* L.) 属薯蓣科薯蓣属多年生草质缠绕藤本, 又名大薯、脚板山药等^[1]。参薯块茎中含有薯蓣皂苷元、多糖、多酚等多种成分。薯蓣属植物为重要的资源植物之一, 薯蓣具健脾、补肺、固肾、益精之功效^[2]。有研究表明, 薯蓣植物粗提物对禁食大鼠和兔子有降血糖的作用, 能控制四氧嘧啶引起的高血糖, 其乙醇提取物的水溶液部分

与降血糖活性有关^[3]。传统的用药习惯, 常将参薯作为淮山药入药, 《浙江省中药炮制规范》亦明确将其列为淮山药的一个品种来源, 而 2010 版《中国药典》中没有记载。但参薯在形状、显微、理化鉴别上与怀山药都有差异^[4]。

多糖是一类重要的植物活性物质, 是生命有机体的重要组成部分, 并与维持生命所需的多种生理

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 陕西省科技厅“13115”工程中心项目 (2010ZDGC-23-18)

作者简介: 裴会鹏 (1986-), 男, 河南安阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物生物技术。E-mail: peihuiPeng@eyou.com

* 通讯作者: 杨培君 (1960-), 男, 陕西汉中, 教授, 硕士, 主要从事资源植物方面研究。E-mail: yang@snut.edu.cn

功能有关,具有促进免疫、抗肿瘤、抗突变、降血脂、抗病毒等作用。近年来,对植物活性多糖的研究倍受关注,关于多糖的分离纯化、结构及生理活性等方面已有报道,但关于参薯粗多糖体外抗氧化能力的研究还未见报道。随着多糖研究的不断深入,活性多糖将被应用于更多的领域,为人类健康和安全提供更有利的帮助。本研究测定了参薯中多糖的含量,探究了粗多糖体外抗氧化能力,旨在为综合评价参薯的资源学地位提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

参薯块茎采自于陕西省城固县栽培种,块茎清洗干净、切片,60℃干燥,粉碎,过 0.63 mm 孔径筛备用。葡萄糖、硫酸亚铁、双氧水、乙醇、乙醚、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、蒽酮、硫酸、邻二氮菲等化学试剂均为国产分析纯。

紫外分光光度计(UV-2550 日本岛津)、旋转蒸发器(RV10 德国 IKA)、高速冷冻离心机、电子天平(梅特勒 AL204,精确度 0.0001 g)、数显恒温水浴锅(北京科伟)、移液器(芬兰大龙)、索氏提取仪等。

1.2 参薯多糖的提取与精制

准确称取 20.0 g 参薯块茎粉末,用滤纸包好置于索氏提取装置,加入乙醚(40~60℃)回流 5 h,挥干材料中的乙醚。脱脂后的材料用 95%乙醇 200 mL,90℃回流 1 h,趁热抽滤,滤渣重复提取一次。挥干乙醇后,按浸提温度 100℃、浸提时间 4 h、料液比 1:20 (mg/mL)提取,将提取液冷却后离心,沉淀物按同样条件重复一次,合并提取液。提取液旋转蒸发浓缩至 100 mL 左右,用 Sevag 法脱蛋白,离心,到无蛋白层出现为止。收集的水层中加入 4 倍量的无水乙醇使得醇含量达到 80%,于 4℃冰箱静置 12 h,抽滤,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤多次,60℃烘干,置于干燥器中至恒定质量,备用。

1.3 葡萄糖标准曲线的绘制

1.3.1 标准溶液的配制 精确称取 0.1 g 葡萄糖于 105~110℃烘干 3 h,冷却后用纯水溶解并定容于 100 mL 容量瓶,作为母液,分别吸取母液 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 和 5.0 mL 于 5 个 50 mL 的容量瓶中并定容。得到葡萄糖标准溶液的梯度为:20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L 和 100 mg/L。

1.3.2 蒽酮—硫酸溶液的配制 准确称取 0.33 g 蒽酮,加 100 mL 浓硫酸,置于棕色瓶中,混合摇匀置于冰箱中(现配现用)。

1.3.3 标准曲线的绘制 分别取纯水、20 mg/L、

40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L 和 100 mg/L 葡萄糖标准溶液各 1.0 mL 于试管中,分别在冰水浴中缓慢加入 8.0 mL 0.2%蒽酮—硫酸溶液摇匀后于沸水浴中,水浴 10 min 后,迅速置于冰水浴中冷却,静置 10 min 后,在紫外—可见分光光度计上,于 620 nm 检测。

1.4 参薯多糖含量制备

1.4.1 样品溶液的绘制 准确称取参薯粉末 2.0 g,用 95%乙醇 90℃回流 1 h,趁热抽滤,滤渣重复提取一次,挥干乙醇后的材料,按料液比 1:20 (mg/mL),提取温度 100℃,提取时间 4 h,抽滤,滤渣按同样方法重复提取一次,合并水提液,定容至 250 mL,再吸取 2.5 mL 定容至 50 mL 容量瓶,得样品溶液。

1.4.2 样品溶液多糖含量测定 精密吸取 1.4.1 制备的样品溶液 1.0 mL 于试管中,按 1.3 项的方法测定吸光度,用回归方程计算多糖浓度(C),按下面的公式计算多糖含量。

多糖含量 = $CD/m \times 100\%$,式中:D 为样品溶液的稀释因素,m 为材料质量。

1.4.3 重现性试验 精密称取同批参薯粉末 5 份各 2.0 g,按 1.4.1 项的方法同时制备样品溶液。吸取 1.0 mL 样品液于试管中,按 1.3 项的方法测定吸光度,计算参薯多糖含量。

1.4.4 精密度试验 精密吸取样品溶液 1.0 mL 分别置于试管,按 1.3 项的方法测吸光度,平行测定 5 次。

1.4.5 稳定性试验 精密吸取样品溶液于试管中,按 1.3 项的方法测定吸光度,每 30 min 测一次,连续测 2 h,考察稳定性。

1.4.6 回收率试验 准确吸取 3 份已知质量浓度的供试样品溶液 0.5 mL 于试管中,分别加入 20 mg/L、40 mg/L 和 60 mg/L 的标准葡萄糖溶液 0.5 mL,按 1.3 项的方法测定吸光度值,按下式计算回收率。

回收率(%) = (加标试样测定值 - 试样测定值) / 加标量 $\times 100$ 。

1.5 参薯多糖体外抗氧化作用

1.5.1 参薯粗多糖溶液制备 取 1.2 项制备的粗多糖 1.0 g,定容至 100 mL 得 10 mg/mL 母液,然后再稀释配制不同浓度的粗多糖溶液,备用。

1.5.2 参薯多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除体系 采用邻二氮菲— Fe^{2+} 氧化法^[5], $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$ 体系可以通过 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 把邻二氮菲— Fe^{2+} 水溶液氧化为邻二氮菲— Fe^{3+} 后,其 536 nm 最大吸收峰消失。取 0.75 mmol/L 邻二氮菲溶液 1.0 mL,加入 150 mmol/L、pH7.4 磷酸缓冲液(PB)1.5 mL 充

分混匀后,加入 0.75 mmol/L FeSO_4 溶液 1.0 mL,每加一管,立即混匀,加 0.01% H_2O_2 1.0 mL,最后以超纯水补充至总体积为 10.0 mL。反应液 37℃ 保温 1 h,测定波长 536 nm 处的吸光度 $A_{\text{损伤}}$ 。参薯多糖对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用,依上法,分别加入 1.0 mL 不同质量浓度多糖溶液后再加入 0.01% H_2O_2 ,37℃ 保温 1 h,测 $A_{\text{加样}}$ 。未损伤管为不加 H_2O_2 及多糖溶液。以维生素 C 为对照。具体加样量见表 1。

清除率(%)=[($A_{\text{加样}}$ - $A_{\text{损伤}}$)/($A_{\text{未损伤}}$ - $A_{\text{损伤}}$)]
×100。

| 表 1 清除 $\cdot\text{OH}$ 多糖加样量 | | | | mL |
|-------------------------------|------|------|------|----|
| 试剂 | 未损伤管 | 损伤管 | 样品管 | |
| 邻二氮菲 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| 磷酸缓冲液(PB) | 1.5 | 1.5 | 1.5 | |
| FeSO_4 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| 不同质量浓度多糖或维生素 C | — | — | 1.0 | |
| H_2O_2 | — | 1.0 | 1.0 | |
| 蒸馏水 | 6.5 | 5.5 | 4.5 | |
| 总体积 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | |

1.5.3 参薯多糖对过氧化氢(H_2O_2)的清除体系^[6]

加入由 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH7.4)配制的 5 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 2.8 mL,再加入不同质量浓度的多糖溶液 1.0 mL,用纯净水补齐至 10.0 mL,25℃ 放置 10 min 后,于波长 230 nm 处测定吸光度值 $A_{\text{样品}}$,对照为不加多糖溶液。以维生素 C 作为对照。具体加样量见表 2。

清除率(%)=($A_{\text{样品}}$ - $A_{\text{对照}}$)/ $A_{\text{对照}}$ ×100。

| 表 2 清除 H_2O_2 多糖加样量 | | | mL |
|-------------------------------------|------|------|----|
| 试剂 | 对照管 | 样品管 | |
| H_2O_2 | 2.8 | 2.8 | |
| 不同浓度多糖或维生素 C | — | 1.0 | |
| 蒸馏水 | 7.2 | 6.2 | |
| 总体积 | 10.0 | 10.0 | |

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线结果

依据 1.3.3 项测得吸光度(A)为横坐标,以葡萄糖标准溶液的浓度梯度(C)为纵坐标做标准曲线。得到标准曲线的回归方程 $C=353.26A+2.0153$, $r^2=0.9993$ 。表明在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内葡萄糖质量浓度与吸光度具有良好的线性关系(图 1)。

2.2 重现性试验结果

按照 1.4.3 项方法,在同等条件下进行 5 次重复试验,得到的多糖含量为 19.17%,RSD 值为 1.25% ($n=5$),小于 5%,表明本试验的重复性良好(表 3)。

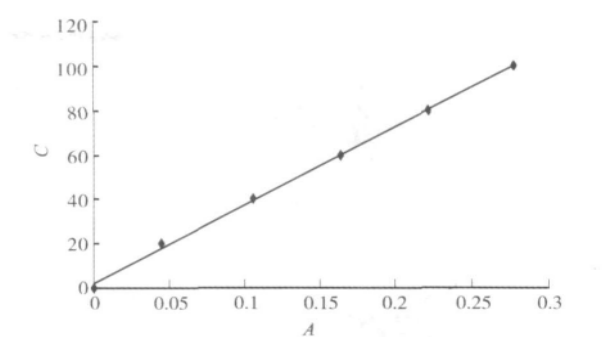


图 1 葡萄糖标准曲线

表 3 重现性试验结果($n=5$)

| 项目 | 样品编号 | | | | |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 多糖含量/% | 19.05 | 19.08 | 18.88 | 19.46 | 19.37 |
| RSD/% | 1.25 | | | | |

2.3 精密度试验结果

按照 1.4.4 项方法,精密吸取样品溶液 1.0 mL 分别置于试管,按 1.3 项方法测吸光度,平行测定 5 次,得到 RSD=0.28%,小于 5%,表明精密度良好(表 4)。

表 4 精密度试验结果($n=5$)

| 项目 | 样品编号 | | | | |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 多糖含量/% | 19.04 | 19.08 | 19.07 | 19.01 | 19.15 |
| RSD/% | 0.28 | | | | |

2.4 稳定性试验结果

按照 1.4.5 项精密吸取样品溶液于试管中,按 1.3 项方法测定吸光度,每 30 min 测一次,连续测 2 h,多糖含量在 2 h 内基本保持不变,其 RSD 值为 3.35%,表明该方法稳定性良好(表 5)。

表 5 稳定性试验结果

| 项目 | 时间/h | | | | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| 吸光度(A) | 0.211 | 0.212 | 0.210 | 0.199 | 0.198 |
| RSD/% | 3.35 | | | | |

2.5 加样回收率试验结果

准确吸取 3 份已知质量浓度的供试样品溶液 0.5 mL 于试管中,分别加入 20 mg/L、40 mg/L 和 60 mg/L 的标准葡萄糖液 0.5 mL,按 1.3 项方法测定吸光度值,结果见表 6,加样回收率达到 97.29%,RSD 为 1.00%。

表 6 加样回收率试验结果($n=3$)

| 样品编号 | 样品含量/ μg | 加入标品量/ μg | 测得值/ μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|---------------------|----------------------|--------------------|-------|---------|-------|
| 1 | | 10.0 | 47.94 | 98.40 | | |
| 2 | 38.10 | 20.0 | 57.48 | 96.90 | 97.29 | 1.00 |
| 3 | | 30.0 | 67.07 | 96.57 | | |

2.6 参薯多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性

参薯多糖对 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系通过 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 具有清除作用,且随质量浓度的增加,清除率上升,二者呈正相关。当粗多糖质量浓度达到 9 mg/mL 时,清除率达到 100% ,作为对照的维生素 C 为 0.8 mg/mL 时,清除率已经达到 100% ,根据半数有效浓度 EC_{50} ^[7],维生素 C 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力远远优于参薯多糖(图 2)。

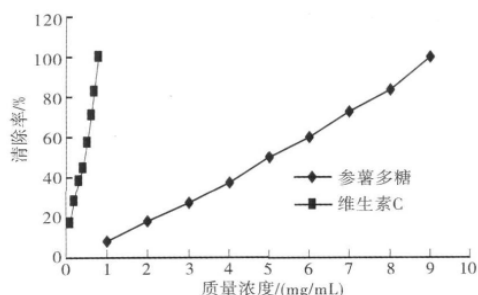


图 2 参薯多糖和維生素 C 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

2.7 参薯多糖对过氧化氢(H_2O_2)的清除活性

参薯多糖和維生素 C 对 H_2O_2 均有清除能力,且随质量浓度增大,清除能力显著提高,呈较好的量效关系,结果见图 3。当粗多糖质量浓度达到 0.5 mg/mL 时清除率达到 100% ,对照維生素 C 为 1.6 mg/mL 时清除率达到 100% 。根据半数有效浓度 EC_{50} ,参薯多糖对 H_2O_2 的清除活性强于維生素 C。

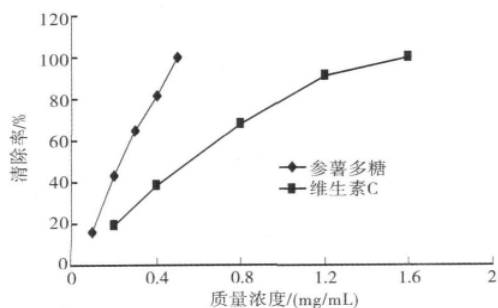


图 3 参薯多糖和維生素 C 对 H_2O_2 的清除作用

3 讨论

本试验结果表明,参薯粗多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和过氧化氢(H_2O_2)都有一定的清除作用,当粗多糖质量浓度达到 9 mg/mL 时,对羟自由基清除率达到 100% ,当粗多糖质量浓度达到 0.5 mg/mL 时,对过氧化氢清除率达到 100% 。維生素 C 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力远远优于参薯多糖,但参薯粗多糖对 H_2O_2 的清除活性强于維生素 C。张泽庆等^[8]采用与本研究相同的方法研究了防风多糖对

$\cdot\text{OH}$ 的清除作用,结果表明,在多糖质量浓度为 8.0 mg/mL 时,防风多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率接近 70% ,而参薯多糖在 8 mg/mL 时,清除率就已经达到 80% ,所以参薯多糖对 $\cdot\text{OH}$ 清除力强于防风多糖。茹巧美等^[9]研究了忽地笑多糖对 H_2O_2 的清除作用,结果表明忽地笑多糖对 H_2O_2 的清除率达 50% 时所需的质量浓度小于 0.1 mg/mL ,而参薯多糖清除 H_2O_2 的能力明显弱于忽地笑多糖。

根据试验结果可知,参薯块茎中的多糖含量高达 19.17% ,与姜芳婷等^[10]报道的广西参薯多糖含量(17.56%)相近,较官波等^[11]报道的山药多糖含量(2.56%)高出数倍。并且参薯产量为 $7500\sim 30000\text{ kg/hm}^2$,要高于同属植物产量,因此参薯可作为一种植物活性多糖类药物源。

在提取参薯多糖的过程中,发现有大量黏液存在,而在参薯黏液方面的研究还未曾报道。为确定参薯的资源学地位,本研究还将在其他有效成分方面进行研究,以期参薯的综合开发和利用提供科学依据。

参考文献:

- [1] 裴鉴,丁志遵. 中国植物志(第十六卷,第一分册)[M]. 北京:科学出版社,1985:117-119.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:科学技术出版社,1985:166-168.
- [3] Maurie M. The hypoglycemic principle of dioscorea dumetorum[J]. Plant Med, 1990, 56(1): 119.
- [4] 王元梁,赖剑锋. 怀山药的伪品参薯、脚板苕的鉴别[J]. 海峡药学, 2002, 14(4): 28-30.
- [5] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [6] 茹巧美,真明,郑海雷. 忽地笑多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1536-1540.
- [7] 林丽清,黄丽英,郑艳洁,等. 金线莲多糖的提取及清除氧自由基作用的研究[J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(5): 37-39.
- [8] 张泽庆,田应娟,张静. 防风多糖的抗氧化活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(2): 268-272.
- [9] 茹巧美,裴真明,郑海雷. 忽地笑多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1536-1540.
- [10] 姜芳婷,李明静,史会齐,等. 山药及其同属植物参薯中多糖含量的测定[J]. 化学研究, 2004, 15(3): 47-49.
- [11] 官波,郑文诚. 山药多糖提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 98-101.