

DOI:10.11937/bfyy.201508035

仙鹤草多糖含量和抗氧化能力测定

王 云¹, 孟立霞¹, 薛 白², 李东平¹, 夏薛梅¹, 蔡凌云^{1,2}

(1.凯里学院,贵州 凯里 556011;2.四川农业大学 动物营养研究所,四川 雅安 625000)

摘 要:以黔东南产仙鹤草为试材,研究测定了仙鹤草多糖含量和抗氧化能力,以期仙鹤草开发利用提供依据。结果表明:黔东南产仙鹤草多糖的含量较高(以葡聚糖计),为 4.98 mg/g,对 DPPH 自由基的清除率在 52 $\mu\text{g/mL}$ 时达 64.1%,312 $\mu\text{g/mL}$ 时高达 93.9%。对 DMPD 自由基的清除率在 52 $\mu\text{g/mL}$ 时达 53.1%,312 $\mu\text{g/mL}$ 时高达 80%。黔东南州产仙鹤草多糖含量较高和抗氧化能力较强,开发价值大。

关键词:仙鹤草;多糖;含量;抗氧化能力

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0134-03

仙鹤草为蔷薇科龙芽草属植物龙芽草(*Agrimonia pilosa* Ledeb var. *japonica* (Miq.) Nakai)全草,别名脱力草、瓜香草、老牛筋、狼芽草,多年生草本,高达 1 m,全株具白色长毛。根茎短,常生 1 或数个根芽(越冬芽)。茎直立,被疏柔毛及腺毛。羽状复叶互生,小叶大小不等,间隔排列,卵圆形至倒卵圆形,长 2.5~7 cm,宽 1.5~3.5 cm,边缘有锯齿,两面均被柔毛;托叶近卵形。总状花序顶生;花萼倒圆锥形,5 裂,裂片基部生多数钩状刚毛,宿存;花瓣 5,黄色;雄蕊 5~15;子房半下位,花柱突出。萼筒于果熟时增厚,下垂,顶端有一轮直立钩刺,外有较深纵沟,极似仙鹤头部,因而称仙鹤草。花果期 5—12 月。我国南北均有分布^[1]。仙鹤草性平,味苦、涩。是良好的收敛止血药,传统多用于治疗各种出血症。如咳血、吐血、崩漏下血,疟疾,血痢,脱力劳伤,痈肿疮毒,阴痒带下等症。近年来研究发现,仙鹤草含有多种生理活性成分,如酚类化合物、黄酮类化合物以及糖苷类化合物、三萜类以及挥发油、甾体类化合物、脂类化合物、有机酸、鞣质类化合物,除此之外,仙鹤草中还含有铁、锰、铜、锌、钾、镉、钠、铝等多种微量元素以及维生素等成分^[1-2]。现代药理学研究表明仙鹤草具有止血、抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、驱虫作用;能治美尼尔综合症、糖尿

病;可做农药杀虫剂。临床上主要用于治疗咳血、吐血、疟疾、肿瘤等疾病^[3-6]。仙鹤草还用于经济动物养殖^[7-9]。目前对于黔东南州产仙鹤草多糖的提取和含量测定及抗氧化性能尚鲜见报道。多糖是清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂^[10]。因高效、低毒、高生物利用率而被广泛用于食品、饮料、化妆品及保健用品等领域,市场应用前景非常广阔。现以黔东南州的仙鹤草为试材,测定仙鹤草多糖含量和抗氧化能力,以期仙鹤草综合利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试仙鹤草购于贵州省黔东南州凯里市中草药市场,经凯里学院蔡凌云教授鉴定为蔷薇科多年生草本植物仙鹤草 *Agrimonia pilosa* Ledeb var. *japonica* (Miq.) Nakai。

药剂:葡聚糖(Sigma,购于合肥博美生物科技有限责任公司,含量 $\geq 98\%$)、DPPH(Sigma,购于合肥博美生物科技有限责任公司)、DMPD(Sigma,购于合肥博美生物科技有限责任公司)、浓硫酸、苯酚、无水乙醇、正丁醇、氯仿、氢氧化钠、柠檬酸钠、无水硫酸铜、无水硫酸钠均为分析纯、太子参粉末、试验自制蒸馏水。

仪器:MAS-I2 型常用微波合成仪(上海新仪微波化学科技有限公司),RE-5299 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),岛津 UV-2250 紫外分光光度计,德国 Eppendorf Research 移液器,KQ3200DE 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),SHZ-II 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 葡聚糖标准品溶液的制备 精密称取 105℃干

第一作者简介:王云(1966-),女,本科,教授,现主要从事苗药在动物养殖中应用等研究工作。E-mail:1073580243@qq.com。

责任作者:蔡凌云(1972-),女,硕士,教授,现主要从事药用植物活性成分等研究工作。E-mail:125906640@qq.com。

基金项目:贵州省科技厅资助项目(KJT201101);凯里学院重点资助项目(ZX201201);贵州省科技厅资助项目(黔科合 J 字[2013]2258 号);国家自然科学基金资助项目(31201160)。

收稿日期:2015-01-20

燥至恒重的葡聚糖 50.00 mg,置于 250 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,混匀。

1.2.2 仙鹤草多糖的提取与精制 准确称取仙鹤草粉末各 3.000 g(100 目),置于 150 mL 锥形瓶中加入 15 倍蒸馏水,浸泡 20 min,60℃微波提取 2 min,功率 100%,冷却,减压过滤,合并提取液,旋转蒸发浓缩至大约 40 mL,用 savage 法除蛋白质(4 次),加入无水乙醇以沉淀,放置于 4℃冷藏过夜(大约 14 h)。弃上清液,在 4 000 r/min 离心 5 min,残渣用蒸馏水定容于 50 mL 容量瓶中,加入铜试剂等洗液精制多糖,沉淀定容至 250 mL 容量瓶中备用。

1.2.3 最大吸收波长的确定 精密吸取葡聚糖标准品溶液和仙鹤草样品溶液各 1 mL 于试管中,向各自的试管中加入蒸馏水使其达到 2 mL,蒸馏水做空白对照,分别加入 1 mL 苯酚溶液和 10 mL 浓硫酸,充分振荡,在沸水浴中加热 5 min 显色,取出放试管架上,立即用流动冷水冷却至常温,在 300~600 nm 处进行扫描。

1.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取葡聚糖标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 分别放入试管中,按“1.2.3”操作,每个浓度平行测定 3 次,以吸光度值(A) 3 次的平均值为纵坐标,多糖浓度(C)为横坐标绘制标准曲线,计算其回归方程。

1.2.5 精密度测定 精密吸取标准品溶液 0.2 mL 于试管中,共 6 份。按“1.2.3”方法在 485 nm 处测定吸光度,计算 RSD。

1.2.6 稳定性测定 精密吸取标准品溶液、样品溶液各 0.2 mL 于试管中,按“1.2.3”方法在 485 nm 处测定吸光度,每隔 10 min 测定 1 次吸光值,测定 6 次,在 1 h 内完成,计算 RSD。

1.2.7 加样回收率的测定 精密吸取“1.2.2”制备的样品提取液 1 mL 于试管中各 6 份,加入 0.6 mL 葡聚糖标准品溶液,按“1.2.3”方法,测定吸光度,计算回收率和 RSD。

1.2.8 样品含量测定 取“1.2.2”制备的样液,按“1.2.3”分别测定吸光值,取 3 次的平均值代入回归方程计算出仙鹤草粉末中多糖的含量。

1.2.9 样品多糖对 DPPH 自由基清除率的测定 取“1.2.2”制备的提取液,配制成不同质量浓度的仙鹤草多糖提取溶液(52、104、156、208、260、312 $\mu\text{g/mL}$),取样液 2 mL 加入 2 mmol/L DPPH 溶液 2.0 mL,加塞,摇匀,在 25℃避光反应 30 min,取出,于 517 nm 处测定吸光度。用蒸馏水代替 DPPH 溶液测定吸光度^[10]。

1.2.10 样品多糖对 DMPD 自由基清除率的测定 取“1.2.2”制备的样液,配制成不同质量浓度的仙鹤草多糖提取溶液(52、104、156、208、260、312 $\mu\text{g/mL}$),取 20 mL 100 mmol/L DMPD 溶液和 5 mL 0.1 mol/L pH 5.25 醋酸盐缓冲溶液混匀,加入 0.05 mol/L FeCl_3 ,振荡混匀,

取上述溶液 1 mL,混匀,25℃水浴 10 min。在于 505 nm 处测定吸光值。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长

经测定标准溶液与样品溶液的最大吸收波长均在 485 nm。

2.2 标准曲线回归方程

回归方程为 $A=56.148C-0.0078$, $R^2=0.9998$ 。多糖浓度在 0.0031~0.0185 mg/mL 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.3 精密度测定结果

据测定结果计算 RSD 为 2.403%,结果表明仪器的精密度良好。

2.4 稳定性测定结果

在 1 h 内,标准品和样品的吸光度值都基本上没有明显变化,标准品 RSD 为 0.4099%,样品 RSD 为 0.1864%,试验表明标准品溶液和样品溶液在室温下 1 h 内都能保持较好的稳定性。

2.5 加样回收率的测定结果

回收率为 99%、RSD 为 4.8166%。表明含量测定方法准确。

2.6 样品含量测定结果

取 3 次测定的平均值代入回归方程计算出仙鹤草粉末中多糖的含量为 4.98 mg/g。

2.7 样品多糖对 DPPH 自由基清除率

由图 1 可知,随仙鹤草多糖质量浓度的增大对 DPPH 自由基的清除率增强,最高达到 93.9%,相关性分析表明仙鹤草多糖对 DPPH 自由基的清除率与其质量浓度关系极显著,相关系数为 0.729 ($P>0.01$)。差异性分析表明,在所选质量浓度范围内,仙鹤草多糖对 DPPH 自由基的清除率差异不显著($P>0.05$)。仙鹤草多糖在低浓度范围内即对 DPPH 自由基有极高的清除率(52 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率为 64.1%),说明仙鹤草多糖的抗氧化性能强,低浓度即有好的抗氧化能力,是良好的天然抗氧化剂。

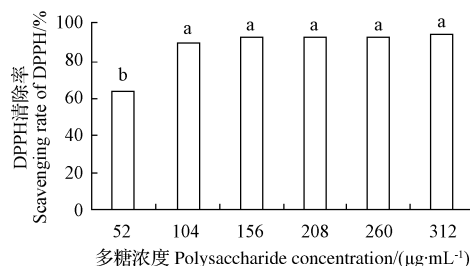


图 1 仙鹤草多糖提取溶液对 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 Scavenging rates of DPPH free radicals from *Agrimonia pilosa* at different polysaccharide concentrations

2.8 样品多糖对 DMPD 自由基清除率

由图 2 可知,随仙鹤草多糖质量浓度的增大,其对 DMPD 自由基的清除率增强,最高达 80%,相关性分析表明仙鹤草多糖对 DMPD 自由基的清除率与其质量浓度关系极显著,相关系数为 0.936($P>0.01$)。差异性分析表明,在所选质量浓度范围内,仙鹤草多糖对 DMPD 自由基的清除率差异不显著($P>0.05$)。仙鹤草多糖在低浓度范围内即对 DMPD 自由基有极高的清除率(52 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率为 53%),说明仙鹤草多糖的抗氧化性能强,低浓度即有好的抗氧化能力,是良好的天然抗氧化剂。

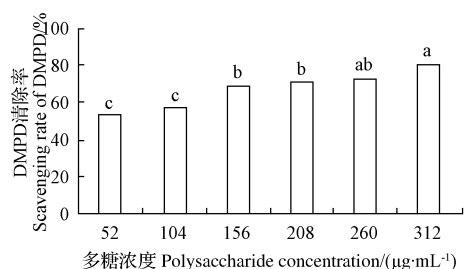


图 2 仙鹤草多糖提取溶液对 DMPD 自由基的清除率

Fig. 2 Scavenging rates of DMPD free radicals from *Agrimonia pilosa* at different polysaccharide concentrations

3 讨论与结论

多糖(Polysaccharides)是生命有机体的重要组成部分,在细胞膜结构中存在,参与生命活动^[3]。多糖有增强免疫、抗肿瘤、抗疲劳等作用。该研究采用苯酚-浓硫酸显色法对仙鹤草多糖含量测定,经精密度、稳定性、加样回收等试验,结果表明苯酚-浓硫酸显色法用于仙鹤草

多糖含量测定准确可行。随着近年相关研究的发展,仙鹤草的相关生物活性不断被发现,最典型的是抗肿瘤、降血糖、增强免疫功能、降血压、镇痛抗炎等生物活性。仙鹤草的抗肿瘤研究已经有了大量的文献报道^[6],这些抗肿瘤机理的研究都很可能利用了仙鹤草活性成分中的抗氧化成分,由此可见仙鹤草是一种极有潜力的天然抗氧化剂中药和天然药用植物资源。该研究表明黔东南产仙鹤草多糖含量为 4.98 mg/g,在 52 $\mu\text{g/mL}$ 时,仙鹤草多糖对 DPPH 自由基的清除率达 64.1%,对 DMPD 自由基的清除率达 53.1%;在 312 $\mu\text{g/mL}$ 时,仙鹤草多糖对 DPPH 自由基的清除率达 93.9%,对 DMPD 自由基的清除率达 80%,是良好的抗氧化剂。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典(1 版)[M]. 上海:上海科技出版社,2001.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 版)[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [3] 王宝庆,金哲雄. 仙鹤草的化学成分及抗氧化研究进展[J]. 北方园艺,2011(10):167-169.
- [4] 赵莹,赵春芳,刘金平. 仙鹤草化学成分及其生物活性的研究[J]. 特产研究,2007(2):57-61.
- [5] 陈笑笑,于海宁,应优敏,等. 仙鹤草内生真菌的分离鉴定与抗菌活性[J]. 浙江工业大学学报,2011,39(1):39-43.
- [6] 封亮,贾晓斌,陈彦,等. 仙鹤草化学成分及抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国药房,2009,20(6):465-467.
- [7] 彭晓英. 仙鹤草在疾病治疗上的应用简介[J]. 贵州畜牧兽医,2002,26(6):31.
- [8] 孙耀华. 仙鹤草汤治疗牦牛红痢[J]. 畜牧与兽医,1995,27(2):89-90.
- [9] 彭强,朱英才,蒋亭亭,等. 仙鹤草乙醇提取物在急性肺损伤中的作用研究[J]. 兽医研究,2010,252(4):22-23.
- [10] 蔡凌云,周江菊,乐利. 空心莲子草多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2011,32(17):186-189.

Determination of the Polysaccharide Content and Antioxidation in *Agrimonia pilosa* Ledeb

WANG Yun¹, MENG Li-xia¹, XUE Bai², LI Dong-ping¹, XIA Xue-mei¹, CAI Ling-yun^{1,2}

(1. Kaili University, Kaili, Guizhou 556011; 2. Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625000)

Abstract: Taking *Agrimonia pilosa* from Southeast of Guizhou province as test materials, the polysaccharide content and antioxidation in *Agrimonia pilosa* were studied, in order to provide reference for utilization and development of *Agrimonia pilosa*. The results showed that the polysaccharide content and antioxidation activity was higher in *Agrimonia pilosa*. The polysaccharide content was 4.98 mg/g, DPPH free radical clearance rate was 64.1% (52 $\mu\text{g/mL}$). DPPH free radical clearance rate was 93.9% (312 $\mu\text{g/mL}$). DMPD free radical clearance rate was 53.1% (52 $\mu\text{g/mL}$). DPPH free radical clearance rate was 80% (312 $\mu\text{g/mL}$). It's polysaccharide content and antioxidation was higher in *Agrimonia pilosa* produced from Southeast of Guizhou province, so it was a kind of medicinal plants with high value for development.

Keywords: *Agrimonia pilosa*; polysaccharide; content; antioxidation