

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 033

藏红花花瓣粗多糖的体外抗氧化活性研究

陈可, 曲绮雯, 陈霞连, 白洁, 陈放

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 采用水提醇沉法提取藏红花花瓣中的多糖, 得率为 3.75%。联合蒽酮-硫酸法和 DNS 法测得多糖纯度为 68.34%。对粗多糖的体外抗氧化活性进行测定, 结果表明, 粗多糖具有一定的抗氧化活性, 抗氧化能力指数(ORAC)值为 0.572 $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$; 其对 ABTS⁺、DPPH 和羟自由基具有一定的清除能力, 半数清除浓度 EC_{50} 分别为 76.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、165.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 880.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: 藏红花; 多糖; 抗氧化活性

中图分类号: Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2016)02-0448-05

The antioxidant activity *in vitro* of crude polysaccharide from *Crocus sativus* petals

CHEN Ke, QU Qi-Wen, CHEN Xia-Lian, BAI Jie, CHEN Fang

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The yield of polysaccharide from *Crocus sativus* petals was 3.75% by water extraction and alcohol precipitation. The purity of crude polysaccharide was 68.34%, measured by anthrone-sulfuric acid method and DNS method. The antioxidant activity *in vitro* of crude polysaccharide was also determined. The results showed that crude polysaccharide exhibited certain antioxidant activity with the ORAC value of 0.572 $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$, and had effect on scavenging ABTS⁺, DPPH and hydroxyl radical with the half elimination concentration (EC_{50}) of 76.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 165.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 880.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively.

Key words: *Crocus sativus*; polysaccharide; antioxidant activity

1 引言

藏红花(*Crocus sativus* L.)又名西红花、番红花,是鸢尾科番红花属多年生球茎类草本植物,原产南欧及伊朗等国,在我国江浙等地有栽培。自古以来,藏红花就作为药材、香料或染料被东西方广为应用^[1]。我国传统中医认为藏红花性味甘平,入心、肝经,具有活血化瘀、散郁开结之功效,临床上

主要用于治疗心血管病、肝病、中风、瘰疬、痈肿等疾病^[2]。现代医学研究发现,藏红花在抗肿瘤、保护神经系统以及抗心血管系统疾病等方面具有良好功效,尤其是在抗肿瘤方面功效显著^[3]。

藏红花只有柱头部分入药,因其资源有限,产量低,致使其价格昂贵,素有“植物黄金”之称。一直以来,人们对藏红花的研究也主要集中在柱头,而忽略了花瓣、雄蕊等副产品的利用,造成资源的浪

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2012JY0090);西红花规模化生产技术服务(HS20100601105584);四川大学植物标本数字化平台建设及共享(2012JCPT004)

作者简介: 陈可(1990-),男,四川成都人,硕士研究生,研究方向为植物天然产物。E-mail: 710735837@qq.com

通讯作者: 陈放。E-mail: chenfang@scu.edu.cn

费.目前,已有学者对藏红花花瓣和雄蕊混合物的化学成分进行了初步研究,从中分离到黄酮及其苷类化合物^[4]、多糖^[5]、挥发油^[6]等多种有益成分和活性物质,这些物质不仅对心血管疾病有很好的疗效,而且还具有显著的清除人体内自由基、抗衰老、抗突变等药理保健功能.然而同种药用植物不同部位的化学成分不尽相同,活性也不同,这在我们前期藏红花花瓣和雄蕊挥发油的分析研究中也得到印证^[6].本实验以去除雄蕊的藏红花花瓣为材料,采用水提醇沉法从中提取多糖,并对多糖的体外抗氧化活性进行测定,为进一步开发利用藏红花这一珍贵药用植物资源提供科学依据.

2 材料与方法

2.1 材料

藏红花花瓣(去除花柱和雄蕊后的干燥花瓣),产自浙江安吉绿生轩生物科技公司.

ZK-82A型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂),JL-04A型粉碎机,AE240型电子天平,KH-300DB型数控超声清洗器,RM-2000型纯水仪(成都威思达智能科技有限公司),RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),5418型离心机(德国Eppendorf公司),DK-8D型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),SpectraMax M2型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司).

石油醚、无水乙醇、氯仿、正丁醇、丙酮、无水乙醚、无水葡萄糖、蒽酮、浓硫酸、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、氢氧化钠、苯酚、亚硫酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、VC、硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、过硫酸钾均为国产分析纯;FL、AAPH、Trolox、ABTS⁺、DPPH均购自美国Sigma公司.

2.2 方法

2.2.1 材料处理 将藏红花花瓣45℃恒温干燥至恒重,用粉碎机粉碎,过40目筛.

2.2.2 粗多糖提取

(1)石油醚脱脂^[7]:准确称取粉碎后的藏红花花瓣70g,以3.5L石油醚超声(59kHz,30℃,300W)脱脂30min,过滤取滤渣,重复超声两次.将脱脂后的藏红花花瓣45℃恒温干燥至恒重.

(2)超声辅助浸提^[8]:准确称取脱脂后的藏红花花瓣60g,以1.2L超纯水超声(59kHz,60℃,300W)提取50min,过滤取滤液,60℃减压浓缩至200mL,8000r/min离心10min,取上清液定容至250mL,得藏红花花瓣多糖粗提液.

(3)乙醇沉淀^[9]:向藏红花花瓣多糖粗提液中加入4倍体积的无水乙醇,4℃冰箱内静置24h,过滤取絮状沉淀,复溶后以Sevage法除蛋白,二次醇沉.沉淀用90%乙醇洗涤至上清液无色后,再依次用无水乙醇、丙酮和无水乙醚洗涤,45℃恒温干燥至恒重,得藏红花花瓣粗多糖(SPPCE).

2.2.3 多糖含量测定 SPPCE中总糖与还原糖含量的差值,即为其多糖含量.

(1)总糖含量测定:采用蒽酮-硫酸法^[10]测定SPPCE总糖含量.依次吸取120μg/mL葡萄糖溶液0、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8和1mL,分别以超纯水补充体积至1mL,混匀后置于冰浴中,再分别加入5mL10mg/mL蒽酮溶液(浓硫酸配制),混匀后置于96℃水浴中准确加热3min,取出迅速置于冰浴中冷却20min,放至室温后测定OD₆₂₀.以葡萄糖溶液浓度(μg/mL)为横坐标,吸光度OD₆₂₀为纵坐标,绘制总糖标准曲线.准确称取SPPCE5mg,用超纯水充分溶解至50mL,取1mL按上述相同方法测定OD₆₂₀,代入总糖标准曲线方程,求出SPPCE中总糖含量.

(2)还原糖含量测定:采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[11]测定SPPCE还原糖含量.依次吸取1mg/mL葡萄糖溶液0.4、0.6、0.8、1、1.2和1.4mL,分别以超纯水补充体积至2mL,再分别加入2mLDNS试剂^[11],混匀后置于沸水浴中准确加热5min,取出迅速置于冰浴中冷却10min,吸取1mL反应液,加入4mL超纯水稀释5倍,放至室温后测定OD₅₅₀.以葡萄糖溶液浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度OD₅₅₀为纵坐标,绘制还原糖标准曲线.准确称取SPPCE40mg,用超纯水充分溶解至10mL,取2mL按上述相同方测定OD₅₅₀,代入还原糖标准曲线方程,求出SPPCE中还原糖含量.

2.2.4 SPPCE抗氧化能力指数(ORAC)测定^[12]

用75mmol/LPBS缓冲液(pH7.4)依次将FL、AAPH、Trolox(先以少量50%乙醇溶解)、VC和SPPCE配制成浓度为25μmol/L、36mmol/L、31.25μg/mL、31.25μg/mL和31.25μg/mL的溶液.向黑色酶标板中分别加入Trolox、VC和SPPCE溶液各40μL,再向各孔加入FL溶液20μL,37℃温育20min后,用多道移液器迅速向各孔加入140μLAAPH溶液启动反应,并立即置于酶标仪中在37℃下以485nm激发光、538nm发射光连续测定2h,每2min记录一次各孔荧光强度.以测定时间(mins)为横坐标,不同反应体系的

即时荧光强度 RFU 为纵坐标,绘制 FL 荧光衰减曲线.同时设定两种对照,即没有添加自由基的 FL 荧光自然衰减对照(-AAPH,用 140 μL PBS 缓冲液替代 AAPH 溶液),和没有抗氧化剂存在时的自由基作用对照(+AAPH,用 40 μL PBS 缓冲液替代 SPPCE 溶液).由酶标仪自带软件计算出各孔荧光衰减曲线下面积(AUC),抗氧化剂的抗氧化能力指数 ORAC 值以标准抗氧化物质 Trolox 当量表示,其计算公式为:

$$\text{ORAC 值} = [(AUC_{\text{sample}} - AUC_{+\text{AAPH}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{+\text{AAPH}})] \times (\text{amount of substance of Trolox} / \text{mass of sample}) \quad (1)$$

2.2.5 SPPCE 对羟自由基清除能力的测定^[13]

依次吸取 62.5、125、250、500 和 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同质量浓度的 SPPCE 溶液各 1 mL,分别同时加入 1 mL 4 mmol/L 硫酸亚铁溶液和 2 mL 4 mmol/L 双氧水,立即混匀,室温避光反应 10 min,再分别加入 1 mL 4 mmol/L 水杨酸溶液(无水乙醇配制),混匀后室温静置 30 min,10000 r/min 离心 4 min,测定反应上清液在 510 nm 波长处的吸光度 OD_{sample} .空白组以同体积的超纯水(1 mL)替代 SPPCE 溶液,吸光度记为 OD_{blank} ,对照组以同体积的无水乙醇(1 mL)替代水杨酸溶液,吸光度记为 OD_{control} .每组平行测定三次.根据下列公式,计算 SPPCE 对羟自由基的清除率 K.以相同方法测定 VC 对羟自由基的清除能力,作阳性对照.

$$K = [1 - (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{control}}) / OD_{\text{blank}}] \times 100\% \quad (2)$$

2.2.6 SPPCE 对 ABTS^+ 自由基清除能力的测定^[14] 将 7 mmol/L ABTS^+ 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合,室温避光静置 24 h,得 ABTS^+ 储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用.临用前,用 0.2 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)稀释 ABTS^+ 储备液,直至其在 734 nm 波长处的吸光度为 0.7 ± 0.02 ,得 ABTS^+ 工作液.依次吸取 20、40、60、80 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同质量浓度的 SPPCE 溶液各 1 mL,分别同时加入 3 mL ABTS^+ 工作液,立即混匀,室温避光反应 10 min,测定反应产物在 734 nm 波长处的吸光度 OD_{sample} .空白组以同体积的超纯水(1 mL)替代 SPPCE 溶液,吸光度记为 OD_{blank} ,对照组以同体积的 PBS 缓冲液(3 mL)替代 ABTS^+ 工作液,吸光度记为 OD_{control} .每组平行测定三次.根据公式(2),计算 SPPCE 对 ABTS^+ 自由基的清除率 K.以相同方法测定 VC(浓度调整为 2、4、6、8 和

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对 ABTS^+ 自由基的清除能力,作阳性对照.

2.2.7 SPPCE 对 DPPH 自由基清除能力的测定^[15] 依次吸取 50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同质量浓度的 SPPCE 溶液各 2 mL,分别同时加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液(无水乙醇配制),立即混匀,室温避光反应 30 min,测定反应产物在 517 nm 波长处的吸光度 OD_{sample} .空白组以同体积的超纯水(2 mL)替代 SPPCE 溶液,吸光度记为 OD_{blank} ,对照组以同体积的无水乙醇(2 mL)替代 DPPH 溶液,吸光度记为 OD_{control} .每组平行测定三次.根据公式(2),计算 SPPCE 对 DPPH 自由基的清除率 K.以相同方法测定 VC(浓度调整为 1.25、2.5、5、7.5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对 DPPH 自由基的清除能力,作阳性对照.

3 结果与分析

3.1 SPPCE 多糖含量

60 g 脱脂后的藏红花花瓣经浸提、醇沉后得 SPPCE 2.25 g,提取率为 3.75%.以葡萄糖为标准品,绘制出总糖标准曲线(图 1)和还原糖标准曲线(图 2).实测 SPPCE 的 OD_{620} 和 OD_{550} 分别为 0.539 和 0.440,由标准曲线方程可得 SPPCE 中总糖与还原糖的含量分别为 76.78% 和 8.44%,即多糖含量为 68.34%.

3.2 SPPCE 的抗氧化能力指数

SPPCE 对 FL 荧光衰减具有一定的抑制作用(图 3),但弱于 VC 和标准抗氧化物质 Trolox.由酶标仪自带软件计算出 Trolox、VC、SPPCE 和 +AAPH 各孔的 AUC 分别为 56792959、41481735、23782234 和 18263440,根据公式(1), ORAC_{VC} 和 $\text{ORAC}_{\text{SPPCE}}$ 以 Trolox 当量表示分别为 2.408 和 0.572 $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$.

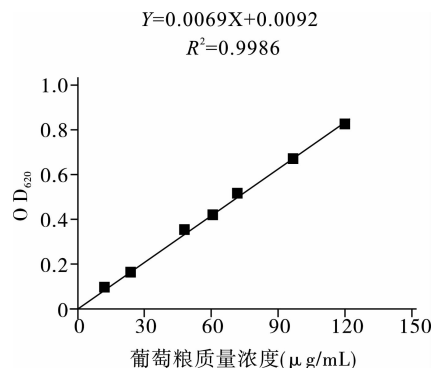


图 1 总糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of total sugar

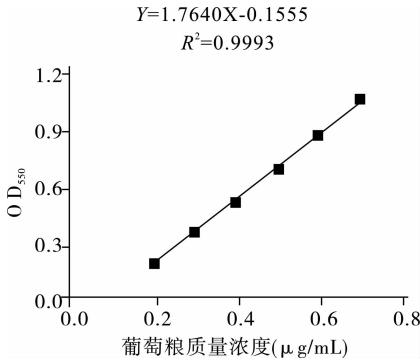


图 2 还原糖标准曲线

Fig. 2 Standard curve of reducing sugar

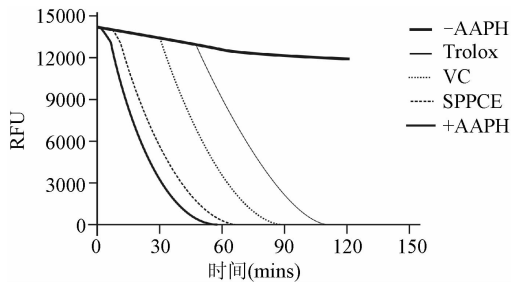


图 3 FL 荧光衰减曲线

Fig. 3 Fluorescence decay curve of FL

3.3 SPPCE 对羟自由基的清除能力

当质量浓度为 62.5 ~ 1000 μg/mL 时, SPPCE 对羟自由基的清除率为 8.82 ± 1.07% ~ 53.90 ± 1.52% (Mean ± SD, 下同), 清除能力随其质量浓度增大而递增, 具有明显的量效关系 (图 4). SPPCE 和 VC 对羟自由基的半数清除浓度 (EC₅₀) 分别为 880.4 μg/mL 和 272.9 μg/mL, SPPCE 对羟自由基的清除能力弱于 VC.

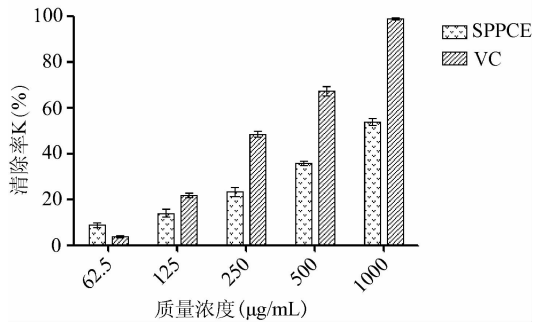


图 4 SPPCE 和 VC 对羟自由基的清除能力

Fig. 4 Hydroxyl radical scavenging activity of SPPCE and VC

3.4 SPPCE 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力

当质量浓度为 20 ~ 100 μg/mL 时, SPPCE 对 ABTS⁺ 自由基的清除率为 16.76 ± 1.44% ~ 60.63 ± 1.11%, 清除能力随其质量浓度增大而递增, 具有明显的量效关系 (表 1). SPPCE 和 VC 对 ABTS⁺ 自由基的 EC₅₀ 分别为 76.26 μg/mL 和 5.627 μg/mL, SPPCE 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力远弱于 VC.

3.5 SPPCE 对 DPPH 自由基的清除能力

当质量浓度为 50 ~ 250 μg/mL 时, SPPCE 对 DPPH 自由基的清除率为 19.02 ± 1.34% ~ 65.58 ± 0.72%, 清除能力随其质量浓度增大而递增, 具有明显的量效关系 (表 2). SPPCE 和 VC 对 DPPH 自由基的 EC₅₀ 分别为 165.5 μg/mL 和 4.225 μg/mL, SPPCE 对 DPPH 自由基的清除能力远弱于 VC.

表 1 SPPCE 和 VC 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力

Tab. 1 ABTS⁺ radical scavenging activity of SPPCE and VC

质量浓度(μg/mL)	SPPCE					VC				
	20	40	60	80	100	2	4	6	8	10
清除率 K(%)	16.76	27.86	41.27	51.08	60.63	19.50	28.33	51.87	64.65	82.53
	±1.44	±1.80	±1.15	±1.49	±1.11	±0.73	±1.29	±1.55	±1.50	±1.19

表 2 SPPCE 和 VC 对 DPPH 自由基的清除能力

Tab. 2 DPPH radical scavenging activity of SPPCE and VC

质量浓度(μg/mL)	SPPCE					VC				
	50	100	150	200	250	1.25	2.5	5	7.5	10
清除率 K(%)	19.02	33.38	44.21	56.02	65.58	10.90	26.73	52.70	76.17	95.27
	±1.34	±1.13	±1.10	±0.83	±0.72	±0.63	±0.92	±0.93	±1.65	±0.81

4 讨论

自由基是生物体正常代谢的产物, 但过量积累

容易引起蛋白质、脂质和核酸的氧化破坏, 从而引发机体损伤^[16]. 研究表明, 许多疾病的发生都与自由基有关, 比如癌症、动脉粥样硬化、老年痴呆症和

帕金森综合症等^[17]. 因此, 将能够捕获及清除自由基的天然产物用于食品添加剂或药物, 可防治因氧化损伤而引发的诸多疾病.

关于藏红花花瓣和雄蕊混合物粗多糖的体外抗氧化活性已有相关报道, 其对 DPPH 自由基、羟自由基、小鼠血清羟自由基、丙二醛、NO 和超氧阴离子具有一定的清除能力^[5,18]. 在该报道中, 花瓣和雄蕊粗多糖对 DPPH 和羟自由基的 EC_{50} 均超过 4 mg/mL; 而本研究中, 花瓣粗多糖对二者的 EC_{50} 分别为 165.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 880.4 $\mu\text{g/mL}$. EC_{50} 值之所以存在较大差异, 主要和实验材料、粗多糖纯度、操作方法及试剂用量等不同有关. 此外, 和上述两篇文献相比, 本研究针对性地以去除雄蕊的藏红花花瓣为材料; 对多糖纯度进行了定量测定; 建立了 ORAC 和清除 ABTS⁺ 自由基两项体外抗氧化指标; 并同时设定 VC 阳性对照, 更客观地反映 SP-PCE 的抗氧化效力.

一系列体外抗氧化实验表明, SPPCE 具有一定的抗氧化活性, 其 ORAC 值 0.572 $\mu\text{mol TE/mg}$ 与部分传统抗氧化保健饮品——茶叶相当^[19]. 由于与不同自由基反应的化学机理不同, SPPCE 对羟自由基具有良好的清除能力, 清除率约为同浓度 VC 的一半, 但对 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基的清除活性较低, 远弱于 VC. SPPCE 所具有的体外抗氧化活性, 为综合利用藏红花资源提供了科学依据, 也为其进一步的生物体内实验奠定了基础.

参考文献:

- [a] Hossein H, Marjan N A. Avicenna's (Ibn Sina) the canon of medicine and saffron (*Crocus sativus*): a review [J]. *Phytother Res*, 2013, 27:475.
- [2] 康文娟, 徐达宇. 藏红花(卡奇鸽尔更)的研究进展 [J]. *青海医学院学报*, 2003, 24(2):123.
- [3] 赵培, 罗春丽. 藏红花抗癌活性物质的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(2):140.
- [4] Jéssica S D, Ana M S, Magdalena M T, et al. Flavonoid determination in the quality control of floral bioresidues from *Crocus sativus* L. [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:3125.
- [5] 赵成刚, 黄一泓, 刘雅莉. 西红花花瓣粗多糖清除自由基的效果 [J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(4):900.
- [6] 王晓萌, 叶扬, 周双, 等. 藏红花花瓣和雄蕊挥发油化学成分 GC-MS 分析及比较 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24:1239.
- [7] 刘锡建, 王艳辉, 李平, 等. 沙棘果渣中总黄酮提取的研究 [J]. *北京化工大学学报*, 2004, 31(1):18.
- [8] 李巧云, 居红芳, 翟春. 五味子粗多糖提取工艺的研究 [J]. *食品科学*, 2004, 25(5):105.
- [9] 徐永良, 王得利, 石学魁. 红花多糖提取纯化方法研究 [J]. *微量元素与健康研究*, 2012, 29(3):17.
- [10] 郭晓蕾, 朱思潮, 翟旭峰, 等. 硫酸蒽酮法与硫酸苯酚法测定灵芝多糖含量比较 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(9):2000.
- [11] 李环, 陆佳平, 王登进. DNS 法测定山楂片中还原糖含量的研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(18):75.
- [12] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数 (ORAC) 测定原理及应用 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(8):1015.
- [13] 江明珠, 颜辉, 闻燕. 马蹄蕨黄酮的纯化及抗氧化活性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(26):15922.
- [14] 罗超, 刘霁明, 邢惟青, 等. 石参总黄酮抗氧化活性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13):198.
- [15] 王蓓蓓, 牛付阁, 段玉峰. 高良姜与大高良姜总黄酮抗氧化活性比较研究 [J]. *食品科学*, 2011, 32(7):117.
- [16] Kaufmann J A, Bickford P C, Tagliatalata G. Free radical-dependent change in constitutive nuclear factor kappa B in the aged hippocampus [J]. *Neuroreport*, 2002, 13(15):1971.
- [17] 张小铁, 朱振勤, 胡天喜, 等. 百藜芦醇对某些自由基性疾病防治的机理研究进展 [J]. *自由基生命科学进展*, 1999, 7:105.
- [18] 赵成刚, 翟伟菁, 黄一泓. 西红花花瓣粗多糖提取纯化工艺及体外抗氧化研究 [J]. *食品工业*, 2012, 1:1.
- [19] 徐维盛, 张桂雨, 刘静, 等. ORAC 法评价 16 种茶叶的抗氧化能力 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(1):241.