

王不留行多糖的提取工艺及其抗氧化活性研究

李芸达¹, 颜祖弟¹, 黄涛¹, 张照平¹, 黄莹¹, 李远辉¹, 黄锁义^{2*}

¹右江民族医学院临床学院; ²右江民族医学院药学院, 百色 533000

摘要:通过单因素实验和正交实验, 研究料液比、超声功率、超声提取温度和超声作用时间对王不留行多糖提取效果的影响。分别采用紫外分光光度法和邻苯三酚自氧化法测定其清除 DPPH· 和 O₂⁻ 的作用进行试验, 根据试验结果评价其体外抗氧化活性。得出优化工艺条件为: 料液比 (g: mL) 1: 50, 提取温度 60 °C, 超声功率 100 W, 作用时间 40 min。王不留行多糖的得率为 9.60%, 优选王不留行多糖的超声提取工艺, 省时、高效、可靠、重现性好; 体外抗氧化性试验显示王不留行多糖对 DPPH· 和 O₂⁻ 具有较强的清除能力, 且在一定范围内其抗氧化作用与浓度呈现良好的量效关系。

关键词: 王不留行; 正交设计; 超声提取; 多糖; 抗氧化性

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.015

Study on the Extraction Process and Antioxidation Activities of Cowherb seed Polysaccharide

LI Yun-da¹, YAN Zu-di¹, HUANG Tao¹, ZHANG Zhao-ping¹,
HUANG Ying¹, LI Yuan-hui¹, HUANG Suo-yi^{2*}

¹College of Clinical Medicine, Youjiang Medicine University for Nationalities;

²College of Pharmacy, Youjiang Medicine University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China

Abstract: Through single factor and orthogonal experiment, the effect of solid-liquid ratio, ultrasonic temperature, ultrasonic power and ultrasonic action time on the extraction of cowherb seed polysaccharide were studied. UV spectrophotometry and pyrogallol autoxidation method were used to determine the effect of cowherb seed polysaccharide on scavenging DPPH· and O₂⁻. According to the result of these tests, the antioxidant activity *in vitro* of cowherb seed polysaccharide was evaluated. The optimum ultrasonic extraction conditions were as follows: solid-liquid ratio (g: mL) 1: 50, ultrasonic temperature 60 °C, ultrasonic power 100 W and ultrasonic action time 40 min. Under these conditions, the extraction rate of the cowherb seed polysaccharide was 9.60%. Preferable ultrasound extraction process of cowherb seed polysaccharide was time-saving, highly efficient, reliable and reproducible. The antioxidant test *in vitro* indicated that cowherb seed polysaccharide had strong ability of scavenging on DPPH· and O₂⁻, and its antioxidative effect and concentration showed good dose-effect relationship in a certain range.

Key words: cowherb seed; orthogonal design; ultrasonic extraction; polysaccharides; antioxidation

王不留行为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子。味甘性温, 有活血通经, 下乳消肿之功效。用于乳汁不下, 经闭, 痛经, 乳痈肿痛^[1]。文献报道王不留行中主要含有三萜皂苷、黄酮苷、环肽、类脂和脂肪酸、单糖等成分^[2-4]。

多糖 (polysaccharide) 是一类存在于植物和动物

中的主要的天然活性物质, 具有调节机体免疫力^[5]、抗肿瘤^[6]等广泛的药理作用, 且不同来源多糖表现出不同的生物学活性, 因此有效提取王不留行多糖具有重要意义, 超声提取多糖可以明显降低提取温度、缩短提取时间、提高提取产量, 便于产品纯化, 对提取产物的结构和理化性质无影响^[7], 而测定可溶性糖的含量可采用苯酚-浓硫酸法^[8], 操作简便, 重现性好。本实验通过优化超声法提取王不留行多糖, 并对提取的多糖进行分离纯化和抗氧化性研究, 检测其体外抗氧化活性, 以期对日后的研究工作者在针对性的使用王不留行时提供参考依据。

收稿日期: 2013-08-20 接受日期: 2013-12-04

基金项目: 国家中医药管理局“十二五”中医药重点学科建设项目 (2012-32); 广西重点学科建设项目 (2013-16); 右江民族医学院民族医药协会资助项目 (20120815)

* 通讯作者 Tel: 86-776-2850590; E-mail: huangsuoyi@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器

高速万能粉碎机(FW100):天津泰斯特仪器有限公司;KQ5200DB型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱:上海精宏实验设备有限公司;电热式恒温水浴锅 HHS-21-4:江苏金坛宏凯仪器厂;SHZ-D(III)循环水式多用真空泵:巩义市子华仪器有限公司;电子天平:上海民桥精密科学仪器有限公司;752型紫外分光光度计:上海精密科学仪器有限公司。

1.1.2 试剂

王不留行(购于广西百色,由右江民族医学院民族医学门诊部覃道光副教授鉴定为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Nec.) Garcke 的干燥成熟种子);苯酚、浓硫酸、95%乙醇、无水乙醇、活性炭、氯仿、正丁醇、丙酮、乙醚、DPPH(美国 Signe 公司)、三羟甲基氨基甲烷、邻苯三酚、盐酸等均为分析纯。葡萄糖标准品:J&K CHEMICAL LTD。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

精密称取干燥(105℃)至恒重的葡萄糖标准品 50 mg,加蒸馏水定容至 100 mL,得标准葡萄糖溶液。取标准葡萄糖溶液 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL,分别定容至 50 mL,得不同浓度的稀释液。精密吸取上述稀释液 0.5 mL 按苯酚-硫酸法^[8]显色,测定吸光度值。以标准品浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标做标准曲线,进行回归,结果见图 1。

1.2.2 单因素实验

王不留行经干燥,粉碎制成王不留行干粉。称取 1.000 g 王不留行干粉若干份,分别在不同料液比、超声功率、超声提取温度、超声作用时间的单因素条件下进行提取。提取液过滤后定容,取适量上液稀释一定的倍数,按苯酚-硫酸法^[8]显色,测定吸光度值,确定正交因素水平,因素水平表见表 1。

1.2.3 正交实验

根据单因素实验结果可知,料液比、超声提取温度、超声功率、超声作用时间等因素都影响王不留行多糖的提取效果。为确定这 4 个因素的综合影响,以多糖提取率为指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验确定最佳提取工艺条件,正交实验结果见表 2。

1.2.4 验证试验

取王不留行干粉 3 份,每份各 1.000 g,按优选出的最佳工艺进行提取,提取液过滤后转入 100 mL 的容量瓶中得样品液,取适量样品液稀释一定的倍数,作为待测液,按苯酚-硫酸法^[8]显色,测定吸光度值,进行验证,验证试验结果见表 4。

1.2.5 王不留行多糖的纯化

精密称取王不留行干粉 15.000 g,按最优工艺提取,得多糖粗提液。粗提液减压浓缩后离心,上清液加入 5 倍的无水乙醇醇沉,置冰箱中 4℃ 过夜,收集沉淀,沉淀再依次用 95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤 3 次,干燥得王不留行粗多糖,干燥物再用热蒸馏水复溶,按 Sevag 法^[9]多次脱蛋白,再用活性炭回流 1 h,过滤,离心,得上清液。上清液浓缩,用无水乙醇调节滤液的醇浓度为 80%,置冰箱中 4℃ 沉淀过夜,过滤收集沉淀,沉淀再用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次,干燥得精制多糖。

1.2.6 换算因素测定

精密称取王不留行精制多糖 50 mg,置 100 mL 容量瓶中,加少量蒸馏水溶解并定容至刻度。精密吸取 5.0 mL,定容至 50 mL,按苯酚-硫酸法^[8]显色,测定吸光度,按下式计算:换算因素 $f = W/CD$, W 为多糖质量(mg), C 为多糖中葡萄糖的浓度(mg/mL), D 为多糖的稀释因素。测得 $f = 4.54$ 。

1.2.7 多糖含量测定

精密吸取“1.2.4”中的待测液 0.5 mL,按苯酚-硫酸法^[8]显色,测定吸光度。通过回归方程求出待测液中葡萄糖含量。按下式计算样品中多糖含量。多糖含量(%) = $CDf/W \times 100\%$ 式中 C 为供试液葡萄糖浓度(mg/mL), D 为供试液的稀释因素, f 为换算因素, W 为供试样品质量(mg)。

1.3 抗氧化性研究

1.3.1 清除 DPPH· 能力

取 5 支 10 mL 具塞比色管,分别加入新配制的 DPPH 溶液(0.6 mmol/L)0.50 mL 和不同体积的“1.2.4”中的样品液,无水乙醇定容至 5 mL,室温暗光下反应 30 min,用蒸馏水做空白对照(未设置阳性对照),在 517 nm 波长测定其吸光度。清除率(%) = $[(A_1 - A_2)/A_1] \times 100\%$; 式中 A_1 :空白吸光度($t = 0$ min) A_2 :反应 30 min 后吸光度。

1.3.2 O_2^- 的清除(邻苯三酚自氧化法^[10])

取 pH8.2 的 Tris-HCL 缓冲液 4.5 mL 于 20 mL 具塞比色管中,加入 3.20 mL 蒸馏水,混匀后和

“1.2.4”中的样品液以及 3 mol/L 的邻苯三酚一起放在 25 ℃ 水浴中保温 20 min,取出后再加入上述样品液 1.00 mL 和上述邻苯三酚 0.30 mL,混匀静置 4 min 后加入 10 mmol/HCL 两滴终止反应,混匀后立即倒入比色杯,蒸馏水调零,于特征波长 321 nm 处测定其吸光度 A,依据此法测定加入不同体积样品液(所加样品液体积与所加入的蒸馏水体积之和为 4.20 mL)时的吸光度 A。其清除率(%)计算公式:清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$,式中 A_0 为加入邻苯三酚但不加入样品液时的吸光度; A_1 为加入邻苯三酚和样品液时的吸光度; A_2 为加入样品液但不加入邻苯三酚时的吸光度。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准液浓度(C)与吸光度值(A)的测定结果

见图 1,可得出回归方程为: $A = 4.843C - 0.0306$, $r^2 = 0.9964$,表明对照品葡萄糖含量在 0.010 ~ 0.100 mg/mL 范围内与对应吸光度值有良

好线性关系。

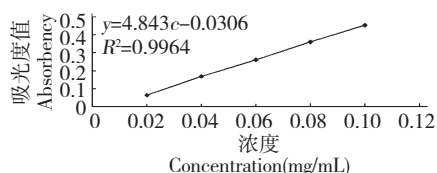


图 1 葡萄糖标准液浓度(C)与吸光度值(A)的测定结果

Fig. 1 Concentration of glucose as corresponding absorbency

2.2 优化实验结果

以多糖提取率为指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验确定最佳提取工艺条件,因素水平表见表 1,正交实验结果见表 2,方差分析见表 3。通过分析上述结果可知,各因素对王不留行多糖提取率影响的顺序为 $A > C > D > B$,即料液比 > 超声功率 > 超声作用时间 > 超声提取温度,其中料液比在超声提取王不留行多糖中有显著意义。因此,在保证王不留行多糖提取较充分的前提下,优选出的最佳提取工艺为 $A_3B_1C_1D_3$,即按 1:50 料液比,以 100 W 的超声功率在 60 ℃ 下提取 40 min 为最优。

表 1 正交因素水平

Table 1 Design for factors and levels of orthogonal test $L_9(3^4)$

水平 Level	因素 Factor			
	A 料液比 Material liquid ratio(g. ml ⁻¹)	B 提取温度 Extraction temperature(℃)	C 超声功率 Ultrasonic power(W)	D 超声时间 Ultrasonic time (min)
1	1:40	60	100	20
2	1:45	70	120	30
3	1:50	80	140	40

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验及结果

Table 2 $L_9(3^4)$ Results of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor				多糖含量 Content (%)
	A 料液比 Material liquid ratio (g. ml ⁻¹)	B 提取温度 Extraction temperature(℃)	C 超声功率 Ultrasonic power(W)	D 超声时间 Ultrasonic time (min)	
1	1	1	1	1	8.64
2	1	2	2	2	8.23
3	1	3	3	3	8.71
4	2	1	2	3	9.12
5	2	2	3	1	8.99
6	2	3	1	2	9.08
7	3	1	3	2	9.41
8	3	2	1	3	9.61
9	3	3	2	1	9.12

K1	25.58	27.17	27.33	26.75
K2	27.19	26.83	26.47	26.72
K3	28.14	26.91	27.11	27.44
R	2.56	0.34	0.86	0.72

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源 Sources of variance	SS	v	F	显著性 Significant
A	1.1165	2	52.99684	*
B	0.0211	2		
C	0.1331	2	6.316456	
D	0.1106	2	5.25	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$; $F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19$; $F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

2.3 验证实验结果

按最佳提取条件进行提取,多糖提取率平均为 9.60%, RSD 为 1.43%, 见表 4, 结果与正交试验中的 8 号试验的多糖提取率相近, 因此可以认为正交试验得出的结果是可靠的且工艺稳定可行。

表4 验证试验结果

Table 4 Results of verification test

试验序号 No.	多糖得率 Extract rate (%)	平均得率 Average (%)	RSD (%)
1	9.75		
2	9.57	9.60	1.43
3	9.48		

2.4 清除 DPPH· 能力

DPPH· 是一种稳定的自由基, 与氧化剂发生反应, 提供 H 被还原, 颜色发生变化, 由深紫色变为淡黄色, 可用紫外分光光度法测定。以高浓度逐渐稀释的方式检测不同样品溶液对自由基的清除率, 以自由基清除率为 50% 时样品的浓度 (IC_{50}) 来衡量样品对自由基的清除能力。 IC_{50} 越小, 表明样品清除

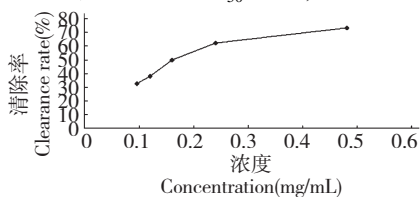


图2 王不留行多糖对 DPPH· 的清除率

Fig. 2 DPPH free radical scavenging effect of crude polysaccharides from cowherb seed

自由基的能力越强, 结果见图 2。从图 2 中看出, 随着提取液浓度的增加, 对 DPPH· 的清除率呈上升趋势, 当 DPPH· 清除率接近 50% 时样品的浓度 (IC_{50}) 仅为 0.064 mg/mL, 浓度很小, 表明王不留行多糖清除 DPPH· 的能力比较强。

2.5 清除 $O_2^{\cdot -}$ 能力

采用邻苯三酚自氧化法研究王不留行多糖对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除能力, 结果见图 3。从图 3 可看出, 当提取液浓度为 0.096 mg/mL 时, 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率为 32.76%; 当提取液浓度为 0.481 mg/mL 时, 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率可达 73.38%。不同浓度王不留行多糖提取物对 $O_2^{\cdot -}$ 均有较强的清除作用, 清除率与浓度存一定的量效关系, 随着王不留行多糖提取液浓度的增加, 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率呈明显的上升趋势。

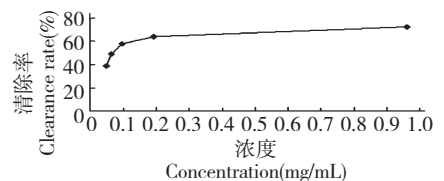
图3 王不留行多糖对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率

Fig. 3 Superoxide anion radical scavenging effect of crude polysaccharides from cowherb seed

3 讨论

本试验通过优化王不留行多糖的超声提取工艺, 采用正交设计法, 超声提取法的优化工艺条件为: 料液比 (g: mL) 1: 50, 提取温度 60 °C, 超声功率

100 W,作用时间 40 min。在此条件下,王不留行多糖的得率为 9.60%,RSD:1.43%,优选王不留行多糖的超声提取工艺,省时、高效、可靠、重现性好,可为日后王不留行多糖的提取提供实验参考。将按最优工艺提取的王不留行多糖进行分离纯化,再分别采用紫外分光光度法和邻苯三酚自氧化法测定其清除 DPPH· 和 O₂⁻ 的作用,以检测其体外抗氧化活性,检测结果显示,王不留行多糖具有较强的抗氧化活性,且在一定范围内其抗氧化作用与浓度呈现良好的量效关系。目前,对抗氧化多糖的研究表明,多糖抗氧化作用与其结构有关,含羟基的药物抗氧化能力大多大于不含羟基的药物,而且羟基数越多抗氧化能力越强,但其作用的具体大小并不仅依赖于羟基数,还与羟基的活性有关^[11]。因此,王不留行多糖的抗氧化性可能与其多糖分子直接或间接作用于自由基本身有关;王不留行多糖结构中的羟基可以络合产生活性氧所必需的金属离子,最终抑制活性氧的产生,也可与超氧阴离子自由基发生氧化反应,达到清除的目的。因此本实验可以为日后的研究工作者在针对性的使用王不留行时提供一定的基础实验依据,但有关王不留行多糖抗氧化的具体机理还有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2005. 80.
- 2 Li F(李帆),Liang JY(梁敬钰). Research progress of Vaccaria segetalis. *Strait Pharm J* (海峡药理学),2007,19(3):1-5.

- 3 Sang SM(桑圣民),Lao AN(劳爱娜),Wang HC(王洪诚),*et al.* Studies on Chemical Constituents of Cowherb seed (II). *Chin Trad Herb Drugs*(中草药),2000,31:169-171.
- 4 Zhang YL(张艳玲),Xiao TS(肖同书),Jiang LL(蒋骊龙),*et al.* Chemical constituents of *Vaccaria segetalis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26L211-214.
- 5 Yang H(杨虹),Wang ZT(王峥涛),Hu ZB(胡之璧). Structural analysis of polysaccharides from *Dendrobium candidum*. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),2004,39(4):54-56.
- 6 Xu C(徐程),Chen YL(陈云龙),Zhang M(张铭). Structural characterization of the polysaccharide DMP2a-1 from *Dendrobium moniliforme*. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),2004,39:900-902.
- 7 Wang H(王桓),Pan Y(潘杨),Jing SQ(敬思群). Study on extraction of small jujube in kashi polysaccharide by ultrasonic. *Food Res Dev*(食品研究与开发),2009,30(11):40-43.
- 8 Zhong FX(钟方晓),Ren HH(任海华),Li Y(李岩). Comparison of methods in determination of polysaccharide content. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药),2007,18:1916-1917.
- 9 Wang JZ(王建壮),An J(安洁),Lv HC(吕华冲). Study on the determination method of polysaccharide content of plants. *Strait Pharm J*(海峡药理学),2008,20(5):59-60.
- 10 Wang ZJ(王宗君),Liao DK(廖丹葵). Study on the antioxidant activity of polysaccharide in *Agrocybe aegerita*. *Food Res Dev*(食品研究与开发),2010,31:50-55.
- 11 Zhang J(张健),Cao EH(曹恩华),Ma WJ(马文建),*et al.* Influence of antioxidant functions of drugs on kinetics of DNA chemiluminescence. *Photograp Sci Photochem*(感光科学与光化学),1997,15:114-119.

(上接第 421 页)

- 13 Seo BR, Min KJ, Cho IJ, *et al.* Curcumin significantly enhances dual PI3K/Akt and mTOR inhibitor NVP-BEZ235-induced apoptosis in human renal carcinoma Caki cells through down-regulation of p53-dependent Bcl-2 expression and inhibition of Mcl-1 protein stability. *PLoS One*, 2014, 9

(4):e95588.

- 14 Mehdi S, Ali M, Cora L, *et al.* Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF-κB and Src protein kinase signaling pathways. *PLoS One*, 2013, 8(2):e57218.