

# 箭叶淫羊藿多糖新组分 EP80 的结构表征及其对酒精代谢相关酶活力的影响研究

张梦园<sup>1</sup>, 杨晓华<sup>2,3</sup>, 段梦月<sup>1,4</sup>, 张华峰<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>陕西师范大学食品工程与营养科学学院 中俄食品与健康科学国际联合研究中心  
西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 西安 710119;

<sup>2</sup>西安交通大学医学部, 西安 710061; <sup>3</sup>云南省普洱市院士专家工作站, 普洱 665600; <sup>4</sup>安徽粮食工程职业学院, 合肥 230012

**摘要:**采用乙醇分级分离技术从箭叶淫羊藿中分离得到了多糖新组分 EP80, 应用薄层色谱、热重分析等方法分析了 EP80 的理化性质, 应用傅里叶变换红外光谱、圆二色谱、刚果红实验、扫描电子显微镜等技术研究了 EP80 的结构特征, 考察了 EP80 的体外抗氧化活性及其对酒精代谢相关酶的效应。结果表明, EP80 由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖组成, 其分子量为  $3.2 \times 10^4$  Da, 具有吡喃糖苷骨架, 含有三股螺旋结构, 在 230 nm 附近有正 Cotton 效应, 在 260 nm 附近有负 Cotton 效应, 微观形貌呈不规则片状, 有突出的褶皱结构, 热失重区间主要集中在 240 ~ 350 °C。EP80 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的半有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 分别为 0.029 和 0.235 mg/mL。EP80 对乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶均具有激活作用, 对乙醛脱氢酶的  $EC_{50}$  明显低于乙醇脱氢酶 ( $P < 0.01$ )。本研究为淫羊藿多糖新组分开发利用提供了参考依据。

**关键词:**箭叶淫羊藿; 多糖组分 EP80; 化学结构; 抗氧化; 乙醛脱氢酶; 乙醇脱氢酶

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)9-1539-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.9.011

## Structural characterization of novel fraction EP80 of *Epimedium sagittatum* polysaccharides and its effects on enzymes related to alcohol metabolism

ZHANG Meng-yuan<sup>1</sup>, YANG Xiao-hua<sup>2,3</sup>, DUAN Meng-yue<sup>1,4</sup>, ZHANG Hua-feng<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>National Engineering Laboratory for Resources Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China, International Joint Research Center of Shaanxi Province for Food and Health Sciences, College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China;

<sup>2</sup>Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

<sup>3</sup>Academician and Expert Workstation in Puer City of Yunnan Province, Puer 665600, China;

<sup>4</sup>Anhui Vocational College of Grain Engineering, Hefei 230012, China

**Abstract:** A novel fraction of polysaccharides EP80 was prepared from *Epimedium sagittatum* by grading-alcohol precipitation. Physicochemical properties of fraction EP80 were analyzed by different techniques such as thin-layer chromatography and thermogravimetric analysis. Structural characteristics of fraction EP80 were studied by various methods such as Fourier transform infrared spectroscopy, circular dichroism, Congo red experiment and scanning electron microscopy. Besides, *in vitro* antioxidant activity and effects of fraction EP80 on two enzymes related to alcohol metabolism were investigated. The results indicate that fraction EP80 with triple helix structure has a pyranose-ring skeleton. And its molecular weight was  $3.2 \times 10^4$  Da, which was composed of galactose, arabinose, glucose and xylose. There are a positive Cotton effect near 230 nm and a negative Cotton effect near 260 nm. The micromorphology of fraction EP80 is irregular flakes with prominent fold structure. Fraction EP80 thermally loses weight at the range of 240-350 °C. The effective concentrations ( $EC_{50}$ ) that scavenge DPPH and ABTS

收稿日期: 2021-10-09 接受日期: 2022-07-28

基金项目: 国际科技合作项目 (GJ2021-27); 陕西省重点研发计划 (2018ZDXM-SF-006, 2020ZDLSF05-03, 2022ZDLSF05-11)

\* 通信作者 Tel: 86-29-85310517; E-mail: isaacsau@sohu.com

radicals by 50% are 0.029 and 0.235 mg/mL, respectively. Fraction EP80 obviously activates alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase, and its  $EC_{50}$  on acetaldehyde dehydrogenase is significantly lower than that on alcohol dehydrogenase ( $P < 0.01$ ). These results are helpful to exploitation and utilization of novel fractions of *E. sagittatum* polysaccharides.

**Key words:** *Epimedium sagittatum*; fraction EP80 of polysaccharides; chemical structure; antioxidant activity; acetaldehyde dehydrogenase; alcohol dehydrogenase

中药淫羊藿 (*Epimedium Folium*) 是小檗科 (*Berberidaceae*) 淫羊藿属 (*Epimedium*) 药用植物的干燥叶<sup>[1,2]</sup>, 含有多糖、黄酮类化合物、生物碱等活性成分<sup>[3,4]</sup>, 与肝脏健康密切相关<sup>[5,6]</sup>。据清代刘善述《草木便方》记载, 淫羊藿“辛味甘温”, 可用于“补肝肾”。汪昂《本草备要》认为淫羊藿“辛香甘温, 入肝肾”, “补命门”。黄宫绣《本草求真》也认为淫羊藿“专入命门, 兼入肝肾”。中国医学科学院陕西分院中医研究所<sup>[7]</sup>主编的《陕西中药志》指出, 淫羊藿“入肝、肾二经”, 可以“补肝肾”。在临床上, 淫羊藿已被添加到“益肝解毒胶囊”等中成药或院内制剂中, 用于消除肝损伤病征<sup>[5]</sup>。近年来, 酒精过度消耗 (饮酒过量) 对人体健康的影响特别是酒精性肝损伤日益得到全世界的关注<sup>[8]</sup>。酒精进入人体后在肝脏中分解代谢, 先由乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ALD) 氧化成乙醛, 再由乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ACD) 氧化成乙酸, 最终分解成二氧化碳和水<sup>[9]</sup>。如果酒精摄入过量或者酒精代谢相关酶活力较低, 可能出现乙醛积累现象, 干扰线粒体呼吸作用, 生成蛋白质加合物 (protein adducts), 引起肝毒性<sup>[9]</sup>。从药用植物中筛选具有解酒保肝作用的活性成分, 解析其化学结构, 成为中药化学领域的重要研究课题。

植物多糖可能具有调节免疫、保肝、抗氧化等功能<sup>[10]</sup>。Deng 等<sup>[11]</sup>采用酶提取法从桑葚 (*Fructus Mori*) 中分离制得了具有乙醇脱氢酶激活作用和自由基清除活性的粗多糖。Zhang 等<sup>[12]</sup>采用乙醇分级分离 (grading-alcohol precipitation) 技术从方竹 (*Chimonobambusa quadrangularis*) 中分离制得了 3 种多糖组分: CPS70、CPS75 和 CPS80, 其中 CPS75 具有较高的体外抗氧化作用和金属螯合活性。Pan 等<sup>[13]</sup>采用超声波提取法制得了朝鲜淫羊藿 (*Epimedium koreanum*) 总多糖, 并利用小鼠模型考察了其对酒精性肝损伤的预防效果。本实验室发现, 心叶淫羊藿 (*Epimedium brevicornu*) 总多糖能够清除自由基, 防止 DNA 氧化损伤<sup>[10]</sup>。乙醇分级分离技术能够利用不同浓度的乙醇溶液将总多糖分成不同分子大小的

多糖组分, 从而获得均一度更高、活性更强、性质更优的新组分<sup>[12,14]</sup>。然而, 迄今未见采用乙醇分级分离技术从淫羊藿多糖中筛选具有酒精代谢相关酶 (乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶) 激活作用的新组分的研究报道。本研究以箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*) 为植物材料, 采用乙醇分级分离技术从淫羊藿中分离得到了多糖新组分 EP80, 运用傅里叶变换红外光谱、圆二色谱、刚果红实验、扫描电子显微镜等方法表征了其化学结构, 并研究了其抗氧化活性及对乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的效应, 以期对淫羊藿资源的科学开发和综合利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

材料与试剂: 淫羊藿于 2020 年 7 月 15 日采自秦岭南麓, 经西安交通大学杨晓华博士鉴定为箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH, 批号: 101408373, 纯度  $\geq 98\%$ , 美国 Sigma 公司)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS, 批号: C11838739, 纯度  $\geq 98\%$ , 上海麦克林生化科技有限公司); 乙醇脱氢酶 (批号: S10195, 上海源叶公司); 乙醛脱氢酶活性检测试剂盒 (批号: BC0750, 北京索莱宝公司); 薄层层析硅胶板 (批号: 1.05559.0001, 西安晶博公司); 半乳糖 (Gal, 批号: 190090-201501, 纯度  $\geq 98\%$ )、阿拉伯糖 (Ara, 批号: 111506-200202, 纯度  $\geq 98\%$ )、木糖 (Xyl, 批号: 111508-201605, 纯度  $\geq 98\%$ )、鼠李糖 (Rha, 批号: 111683-201502, 纯度  $\geq 98\%$ )、葡萄糖 (Glu, 批号: 110833-201707, 纯度  $\geq 98\%$ ) 标准品, 以及碘化钾、正丁醇等均为国产分析纯试剂。

仪器设备: Chirascan 型圆二色光谱仪 (英国 Applied Photophysics 公司); Q1000DSC + LNCS + FACS Q600SDT 型热分析系统 (美国 TA 公司); S-3400N 型扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); Multiskan Sky 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Electron 公司); DV3TLVTJ0 型粘度计 (美国 Brookfield 公司); S1801544 型紫外可见分光光度计 (上海仪迈公司); Tensor 27 型红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); FDU-

1200 型冷冻干燥机(日本 EYELA 公司);5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);SPD-16 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 糖组分制备方法

#### 1.2.1.1 提取纯化

参考 Yang 等<sup>[10]</sup>的水提醇沉方法,将淫羊藿叶干燥、粉碎、过筛,所得淫羊藿粉与蒸馏水按照 1:20 (g/mL) 固液比混匀后煮沸 20 min, 过滤后取上清液。将上清液减压浓缩至原体积的 1/3, 收集浓缩液, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 静置 12 h, 离心后收集沉淀并回收乙醇。除去沉淀中的蛋白质并进行纯化精制, Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析的多糖溶液上样浓度为 5 mg/mL, 收集单一洗脱峰流出液, 使用冷冻干燥机将其冷冻干燥后制得淫羊藿总多糖<sup>[10,15,16]</sup>。

#### 1.2.1.2 乙醇分级分离

参考 Long 等<sup>[14]</sup>的方法, 将淫羊藿总多糖 EP 溶于蒸馏水中, 加入无水乙醇至乙醇终浓度为 40% (V/V), 搅拌后静置 12 h, 离心得到沉淀 I 和上清液 I, 沉淀 I 冻干后得到多糖组分 EP40。以此类推, 制得多糖组分 EP60 和 EP80(见图 1)。

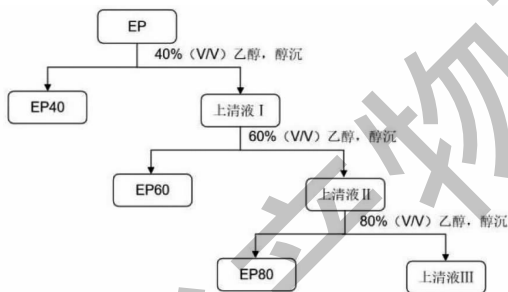


图 1 EP80 的乙醇分级分离

Fig. 1 Grading-alcohol precipitation of EP80

### 1.2.2 多糖定性、定量方法

#### 1.2.2.1 Molish 实验

参考 Ye 等<sup>[17]</sup>的方法, 取淫羊藿多糖组分 EP80 溶液, 加入  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液(质量分数 5%), 摇匀后缓慢加入浓硫酸。分别以蒸馏水和葡萄糖溶液作为阴性和阳性对照。

#### 1.2.2.2 碘-碘化钾实验

参考 Ye 等<sup>[17]</sup>的方法, 向 EP80 溶液中加入碘-碘化钾溶液。分别以蒸馏水和淀粉溶液作为阴性和阳性对照。

#### 1.2.2.3 Fehling 实验

参考 Mayank 等<sup>[18]</sup>的方法, 向 EP80 样液中加入

Fehling 试剂(现配现用), 置 60 °C 温浴。分别以蒸馏水和葡萄糖溶液作为阴性和阳性对照。

#### 1.2.2.4 多糖含量测定方法

采用本实验室优化的苯酚硫酸法对 EP80 进行定量分析<sup>[19]</sup>。以单糖浓度(mg/mL)为横坐标( $x$ )、吸光度为纵坐标( $y$ )绘制标准曲线, 方程为:  $y = 0.0349x + 0.0885$ , 相关系数  $R^2 = 0.9977$ , 测得 EP80 多糖含量为 81.3%。

#### 1.2.3 单糖组成分析方法

采用柱前衍生化高效液相色谱法和薄层色谱法分析 EP80 的单糖组成<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.4 分子量测定方法

采用粘度计方法测定 EP80 的分子量<sup>[21]</sup>。使用 ULA(0)型转子, 温度为 25 °C, 以各浓度下 EP80 的比浓粘度  $\eta_{sp}$  对其浓度作图, 使用 Mark-Houwink 方程计算分子量<sup>[21]</sup>。

#### 1.2.5 热重分析方法

在 10 °C/min 的  $N_2$  气氛下测定 EP80 在 0 ~ 800 °C 区间的质量变化, 研究其热稳定性<sup>[22]</sup>。

#### 1.2.6 光谱分析方法

##### 1.2.6.1 紫外光谱法

将淫羊藿多糖组分 EP80 溶于蒸馏水中, 在 190 ~ 500 nm 波长范围内进行扫描<sup>[23]</sup>。

##### 1.2.6.2 傅里叶变换红外光谱法

将 EP80 与溴化钾按 1:100 比例混合研磨, 然后用压片机压片, 在 500 ~ 4000  $cm^{-1}$  波数范围内进行测定<sup>[21]</sup>。

##### 1.2.6.3 圆二色谱法

将 EP80 溶于蒸馏水中, 在 190 ~ 400 nm 波长范围内测定圆二色谱数据<sup>[24]</sup>。

##### 1.2.6.4 刚果红实验方法

将 EP80 溶液与相同体积的刚果红溶液混合均匀, 加入不同体积氢氧化钠溶液(1 mol/L), 使其终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mol/L。在 300 ~ 800 nm 波长范围内测定各氢氧化钠浓度下液体的最大吸收波长<sup>[25]</sup>。

#### 1.2.7 扫描电子显微镜法

首先剪取导电胶粘于金属托盘上, 然后蘸取 EP80 样品粘于导电胶上, 再用粉尘球吹走多余样品, 而后将托盘置于真空喷镀仪内进行喷金处理, 最后进行电镜观察<sup>[26]</sup>。

#### 1.2.8 体外抗氧化实验方法

##### 1.2.8.1 DPPH 分析

参考 Cao 等<sup>[27]</sup>的方法,配制 DPPH 的乙醇溶液,分别将 1 mL 的 DPPH 和 2 mL 的梯度浓度多糖组分溶液(0.005、0.010、0.020、0.010、0.060、0.080 和 0.100 mg/mL)混合均匀,37 °C 避光反应,之后在 517 nm 处测其吸光度。用等量蒸馏水取代多糖溶液作为空白组,用抗坏血酸(Vc)作为阳性对照组。以多糖组分质量浓度(mg/mL)、DPPH 自由基清除率平均值分别为横、纵坐标绘图。清除率计算公式:

DPPH 的清除率 =

$$[1 - (A_s - A_a) / A_b] \times 100\%$$

式中, $A_s$ :样品或阳性对照吸光度; $A_b$ :空白吸光度; $A_a$ :对照吸光度。

### 1.2.8.2 ABTS 分析

参考 Medlej 等<sup>[28]</sup>的方法,将 ABTS 溶液与过硫酸钾溶液等体积混匀,避光反应 12 h 后,取混合液加入无水乙醇,制得 ABTS 工作液。分别将 4.75 mL 的 ABTS 工作液与 0.25 mL 的梯度浓度多糖组分溶液(0.100、0.200、0.400、0.600、0.800 和 1.000 mg/mL)混合,37 °C 避光反应后,于 734 nm 处测其吸光度。用等量蒸馏水取代多糖溶液作为空白组,用抗坏血酸作为阳性对照组。以多糖组分质量浓度(mg/mL)、ABTS 自由基清除率平均值分别为横、纵坐标绘图。清除率计算公式:

ABTS 的清除率 =

$$[1 - (A_s - A_a) / A_b] \times 100\%$$

式中, $A_s$ :样品/阳性对照吸光度; $A_b$ :空白吸光度; $A_a$ :对照吸光度。

### 1.2.9 酶学实验方法

#### 1.2.9.1 乙醇脱氢酶实验

参考 Madhusudhana 等<sup>[29]</sup>的方法测定 ALD 活力,简述如下:取焦磷酸钠缓冲液 1.5 mL(pH = 8.8),加入乙醇溶液 0.5 mL、氧化型辅酶 I( $NAD^+$ )溶液 1.0 mL 和 EP80 溶液 0.1 mL,混匀后置 25 °C 温浴 10 min。温浴结束后立即加入乙醇脱氢酶溶液 0.1 mL,摇匀后在 340 nm 下测定吸光度并计算酶活力和激活率。以蒸馏水为对照。

#### 1.2.9.2 乙醛脱氢酶实验

使用 ACD 活性检测试剂盒测定酶活力和激活率。以蒸馏水为对照。

#### 1.2.10 试验设计和数据处理方法

每个实验重复 2~3 次,取平均值。用 Microsoft Office Excel 2016 软件对实验数据进行录入、计算,用圆二色光谱仪自带软件分析圆二色谱数据,用

Origin 2018 软件绘图,用热分析系统自带软件进行热重分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 淫羊藿多糖组分 EP80 的理化性质

本研究从箭叶淫羊藿中分离出 3 种不同分子大小的多糖新组分:EP40、EP60 和 EP80(见图 1)。其中,EP80 的抗氧化活性较强,对酒精代谢相关酶乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶的激活作用最好(参见后文),因此对其性质、结构和功能进行了进一步探究。

#### 2.1.1 Moilsh 实验、碘-碘化钾实验与 Fehling 实验分析

EP80 样品为棕褐色固体,凝胶过滤分析呈现单一峰形(见图 2),说明其为均一组分,纯度符合要求<sup>[16]</sup>。Moilsh 实验中,EP80 样品产生了紫色圆环,证明其为糖类化合物。碘-碘化钾实验中,EP80 样品没有呈现蓝色,证明其中不含有淀粉。Fehling 实验中,EP80 样品没有形成砖红色沉淀,证明其为非还原糖。

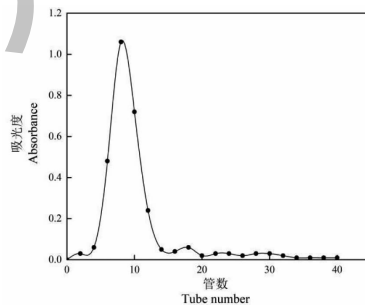


图 2 EP80 的 Sephadex G-100 凝胶层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of EP80 using Sephadex G-100 gel chromatography

#### 2.1.2 单糖组成与分子量测定

采用柱前衍生化高效液相色谱法从 EP80 中鉴定出半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖 4 种单糖,薄层色谱分析也发现 EP80 图谱中存在半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖斑点,这些说明 EP80 由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖 4 种单糖组成。EP80 的比浓粘度随浓度变化趋势如图 3 所示,其分子量为  $3.2 \times 10^4$  Da。

#### 2.1.3 热重分析

由图 4 可见,在 30~200 °C 范围内,随着温度的增加,EP80 样品质量逐渐降低。多糖中通常含有羟基等亲水基团,能够吸附部分水分,当温度增加时,水分会随之蒸发,从而导致样品质量降低。在 247

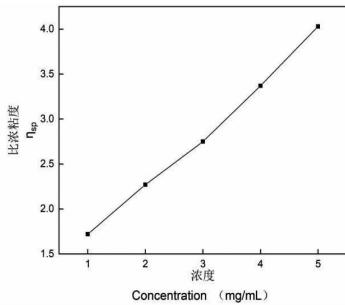


图3 EP80 的比浓粘度与浓度关系

Fig. 3 Relationship of EP80 between viscosity and concentration

~353 °C 范围内,随着温度的增加,样品质量急剧下降,损失率可达 50% 以上。多糖分子在高温下可能出现解聚或分解,生成小分子寡糖、单糖甚至二氧化碳等,气体泄出后样品质量减小。总体上看,EP80 的热失重区间主要集中在 240 ~ 350 °C 范围内,总失重率超过 50%。

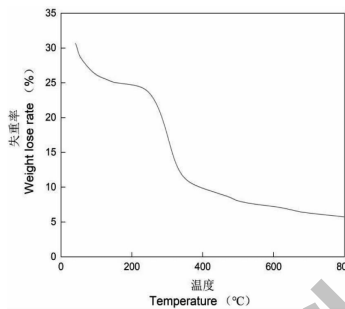


图4 EP80 的热重分析

Fig. 4 Thermogravimetric analysis of EP80

## 2.2 淫羊藿多糖组分 EP80 的结构特征

### 2.2.1 紫外光谱

多糖组分 EP80 在 190 ~ 500 nm 波长范围内的吸收光谱如图 5 所示。可以看出,EP80 样品在 260、280 nm 处无明显吸收峰,说明其中不含游离蛋白质和核酸杂质<sup>[10]</sup>。

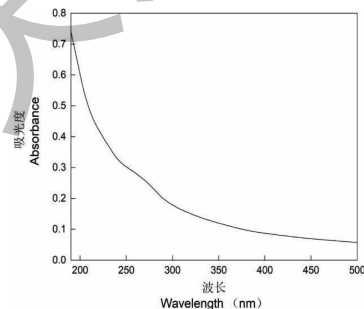


图5 EP80 的紫外光谱

Fig. 5 Ultraviolet spectrum of EP80

### 2.2.2 傅里叶变换红外光谱

由 EP80 的红外光谱可见,该样品具有多糖的特征吸收峰(见图 6)。在波数 3 442  $\text{cm}^{-1}$  附近有较宽的吸收峰,属于多糖环上的 O-H 伸缩振动峰,提示样品分子内和分子间含有氢键<sup>[30]</sup>。波数 2 920  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰属于 C-H 不对称伸缩振动特征峰,而 1 325  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰属于糖类物质的 C-H 变角振动峰,提示样品分子内含有甲基和亚甲基基团(见图 6)。波数 1 145  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰较宽,属于 C-O-C 不对称伸缩振动峰,提示样品分子中含有多糖类物质。波数 1 593  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰属于 C=O 收缩振动峰。波数 1 050 ~ 1 145  $\text{cm}^{-1}$  范围存在较弱的 C-O-C 以及 C-H-O 伸缩振动吸收峰,说明 EP80 样品含有吡喃糖苷结构<sup>[31]</sup>。

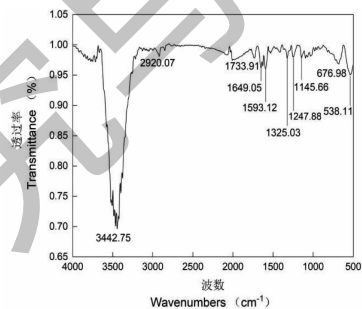


图6 EP80 的傅里叶变换红外光谱

Fig. 6 Fourier-transform infrared spectrum of EP80

### 2.2.3 圆二色谱

圆二色谱可以反映 EP80 的二级结构(见图 7)。可以看出,EP80 在 230 nm 附近有一个较大的正吸收峰,存在正 Cotton 效应,而在 260 nm 附近有一个较大的负吸收峰,存在负 Cotton 效应,提示 EP80 存在不对称结构,并且可能具有螺旋结构<sup>[32]</sup>。

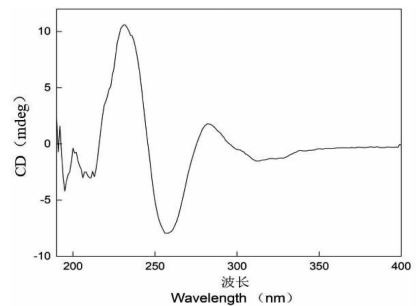


图7 EP80 的圆二色谱

Fig. 7 Circular dichroism of EP80

### 2.2.4 扫描电镜分析

由图 8 可见,EP80 的微观形貌呈不规则片状,

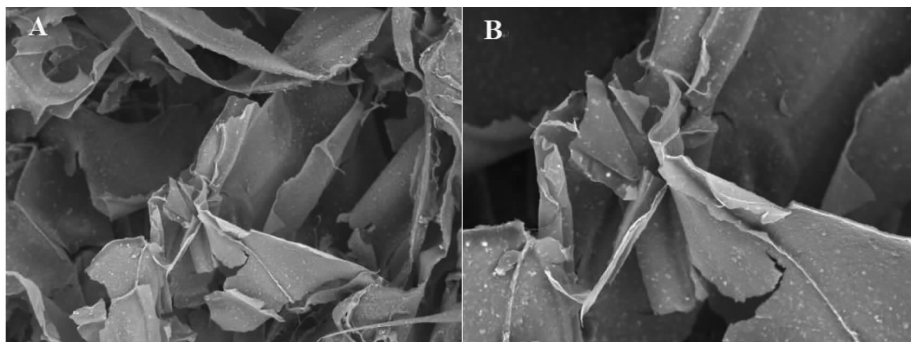


图8 EP80 样品的扫描电镜图谱(×400 和×1 000)

Fig. 8 Scanning electron micrographs of the same sample of EP80 (×400 and ×1 000)

有突出的褶皱结构,说明多糖分子间有一定的排斥力,吸引力较弱。此外,淫羊藿多糖的部分表面呈卷曲状,表面较为粗糙并且存在一些细小的碎屑状颗粒,提示样品可能存在物理吸附现象。

### 2.2.5 刚果红实验分析

由图9可见,刚果红与EP80混合作用后,最大吸收波长发生了明显的红移,这可能是由于具有三股螺旋结构的多糖在碱性条件下发生螺旋卷曲所致<sup>[33]</sup>。刚果红实验结果进一步印证了圆二色谱实验的部分结果,说明EP80具有三股螺旋结构。

## 2.3 淫羊藿多糖组分EP80的抗氧化活性

### 2.3.1 对DPPH自由基的清除能力

如图10所示,EP80对DPPH自由基的清除率随着其浓度的升高而增高,呈现出明显的剂量依赖关系。当EP80浓度超过0.029 mg/mL时,对DPPH自由基的清除率可达50%以上(见表1),当EP80浓度超过0.060 mg/mL时,清除率高达80%以上(见图10),提示EP80具有较好的DPPH自由基清除能力。

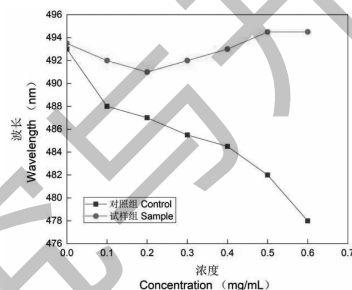


图9 EP80 与刚果红反应体系的最大吸收波长  
Fig. 9 Maximum absorption wavelength of complex of Congo-red reagent and EP80

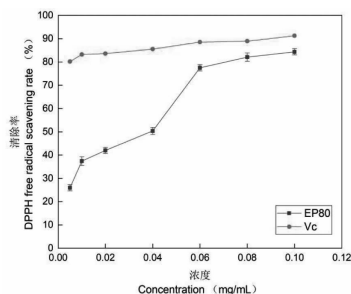


图10 EP80 的DPPH 自由基清除能力

Fig. 10 DPPH radical-scavenging capacity of EP80

表1 EP80 与自由基清除率量效关系数学模型

Table 1 Fitting equation of dose-effect relationship between EP80 and free radical scavenging rate

自由基 Free radical	拟合方程 Fitting equation	相关系数 $R^2$	$EC_{50}$ (mg/mL)
DPPH	$y = -4460x^2 + 1084x + 22.403$	0.960 4	$0.029 \pm 0.001$
ABTS	$y = -126.96x^2 + 208.13x + 8.1436$	0.977 9	$0.235 \pm 0.006$

注:拟合方程中, $x$ 代表多糖组分质量浓度(mg/mL), $y$ 代表自由基清除率(%)。

Note: In fitting equations,  $x$  and  $y$  represent mass concentration (mg/mL) of polysaccharides fraction and free radical scavenging rate (%).

### 2.3.2 对ABTS自由基的清除能力

如图11所示,当EP80浓度在0~0.600 mg/mL范围时,其对ABTS自由基的清除率随着EP80浓度的增加而迅速升高,当浓度在0.600~1.000 mg/mL

范围时,清除率不再明显增加。当EP80浓度超过0.235 mg/mL时,其对ABTS自由基的清除率可达50%以上(见表1),当浓度超过0.600 mg/mL时,其清除率高达90%以上(见图11),提示EP80对

ABTS 自由基具有一定的清除能力。

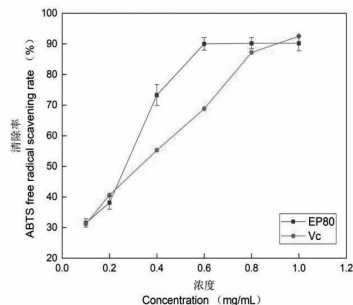


图 11 EP80 的 ABTS 自由基清除能力

Fig. 11 ABTS radical-scavenging capacity of EP80

## 2.4 淫羊藿多糖组分 EP80 对酒精代谢相关酶活力的影响

### 2.4.1 乙醇脱氢酶

淫羊藿多糖组分 EP80 对 ALD 的激活率随着多糖组分浓度的增大而增加,呈现出明显的剂量依赖关系(见图 12)。EP80 浓度与乙醇脱氢酶活性激活

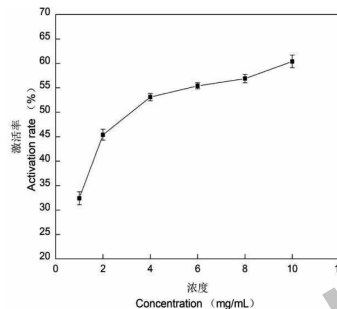


图 12 EP80 对乙醇脱氢酶激活率的影响

Fig. 12 Effect of EP80 on activation rate of alcohol dehydrogenase

率之间量效关系拟合方程的相关系数为 0.9576(见表 2),说明该方程拟合度较好。EP80 的半有效浓度 ( $EC_{50}$ )为 3.75 mg/mL,提示其浓度大于 3.75 mg/mL 时,ALD 的激活率可达 50% 以上。EP80 的  $EC_{50}$  低于 EP40(6.21 mg/mL)和 EP60(7.16 mg/mL) ( $P < 0.05$ ),说明 EP80 对 ALD 的激活作用强于 EP40 和 EP60。

表 2 EP80 浓度与酒精代谢相关酶激活率之间的量效关系

Table 2 Dose-effect relationship between EP80 and enzymes related to alcohol metabolism

酶 Enzyme	多糖组分 Polysaccharides fraction	拟合方程 Fitting equation	相关系数 $R^2$	$EC_{50}$ (mg/mL)	$EC_{75}$ (mg/mL)
ALD	EP40	$y = 2.2748x + 29.664$	0.9332	$6.21 \pm 0.037^b$	-
	EP60	$y = 3.1712x + 27.299$	0.9327	$7.16 \pm 0.042^b$	-
	EP80	$y = 11.355\ln x + 34.98$	0.9576	$3.75 \pm 0.011^a$	-
ACD	EP40	$y = -0.3153x^2 + 4.9863x + 79.704$	0.9703	$< 0.10$	$3.25 \pm 0.01^b$
	EP60	$y = -0.6812x^2 + 11.735x + 45.71$	0.9437	$0.37 \pm 0.055$	$3.03 \pm 0.07^b$
	EP80	$y = -0.8982x^2 + 13.389x + 52.238$	0.9238	$< 0.10$	$1.96 \pm 0.06^a$

注:拟合方程中,  $x$  代表多糖组分质量浓度 (mg/mL),  $y$  代表酒精代谢相关酶激活率 (%);表中不同字母上标代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: In fitting equations,  $x$  and  $y$  represent mass concentration (mg/mL) of polysaccharides fraction and activation rate (%) of enzyme related to alcohol metabolism. Different letter superscripts indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

### 2.4.2 乙醛脱氢酶

由图 13 可见,随着淫羊藿多糖组分 EP80 浓度的增大,ACD 激活率逐渐增加,显示出明显的剂量依赖性。由表 2 可知,当 EP80 浓度超过 6.48 mg/mL 时,ACD 的激活率接近 100%。EP80 对 ACD 的激活作用强于 EP40 和 EP60。ALD 和 ACD 是酒精进入人体后分解代谢的重要酶,EP80 对 ALD 和 ACD 均表现出较好的激活作用,提示其在解酒保肝中具有一定的潜在应用价值。

由表 2 还可看出,EP80 对 ACD 激活作用的  $EC_{50}$  明显低于其对 ALD 的  $EC_{50}$  ( $P < 0.01$ ),提示其对 ACD 的激活作用强于 ALD。在酒精分解代谢过程中,ALD 将酒精氧化成乙醛,ACD 将乙醛进一步氧化成乙酸。乙酸安全性较高,而乙醛在人体积累

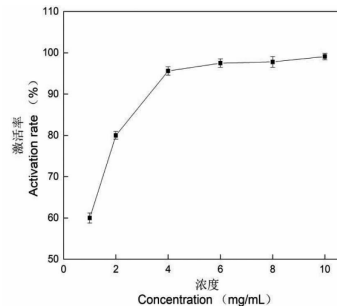


图 13 EP80 对乙醛脱氢酶激活率的影响

Fig. 13 Effect of EP80 on activation rate of acetaldehyde dehydrogenase

可能导致染色体损坏、干细胞突变或肝损伤等<sup>[34]</sup>。一般认为,ACD 在减除酒精毒害中发挥的作用强于 ALD<sup>[9,35]</sup>。本研究发现,EP80 对酒精代谢相关酶具

有激活作用,特别是其对 ACD 的激活作用更强,这样有助于减轻酒精代谢产生的乙醛对人体的伤害。

### 3 结论

本研究从药用植物箭叶淫羊藿中分离制备了多糖新组分 EP80,采用紫外光谱、傅里叶变换红外光谱、圆二色谱、刚果红实验、扫描电镜、热重分析等方法对 EP80 进行了结构表征,并考察了其体外抗氧化能力以及对酒精代谢相关酶乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶活力的影响。结果表明,EP80 由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖和木糖 4 种单糖组成,分子量为  $3.2 \times 10^4$  Da,具有吡喃糖苷骨架,含有三股螺旋结构,在 230 nm 附近有正 Cotton 效应,在 260 nm 附近有负 Cotton 效应,微观形貌呈不规则片状,有突出的褶皱结构,热失重区间主要集中在 240 ~ 350 °C。EP80 具有一定的抗氧化活性,对乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶具有明显的激活作用,对乙醛脱氢酶的激活作用强于乙醇脱氢酶,值得进一步研究。本研究为淫羊藿多糖的开发利用提供了参考。

### 参考文献

- Zhang HF, Yang XH. Asian medicine: protect rare plants [J]. Nature, 2012, 482 (7383) :35-35.
- Zhang HF, Yang XH, Guo YR, et al. Sustainable use of *Epimedium* resources: current status and prospects [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2009, 44:363-370.
- Xue YB, Zhang HF, Yang XH, et al. Rapid determination of total flavonoids in *Epimedium* by near infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2013, 48:65-71.
- Li L, An YJ, Qiao CL, et al. Ultrasound-microwave-assisted extraction of alkaloids from *Epimedium brevicornum* and their inhibitory effect on HeLa cells [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2018, 53:341-352.
- Yang HR, Yang SZ, Xiang RY, et al. Treatment of 125 cases of chronic hepatitis B with Yigan Jiedu capsule [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis (中西医结合肝病杂志), 1998, 8(S1) :332-333.
- Zhang HF, Zhou XX, Yang XH, et al. Application of epimedin C to hepatic injury in diabetic patients(朝藿定 C 治疗糖尿病肝损伤的药物应用): CN202010358967. 2 [P]. 2021-02-12.
- Institute of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Branch of Chinese Academy of Medical Sciences. Records of Shaanxi Traditional Chinese Medicine (陕西中药志) [M]. Xi'an: Shaanxi People's Press, 1962.
- Wood AM, Kaptoge S, Butterworth AS, et al. Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599912 current drinkers in 83 prospective studies [J]. Lancet, 2018, 391 (10129) :1513-1523.
- Pyun CW, Seo TS, Kim DJ, et al. Protective effects of *Ligularia fischeri* and *Aronia melanocarpa* extracts on alcoholic liver disease (in vitro and in vivo study) [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:9720387.
- Yang J, Zhang HF, Cao XY, et al. Enzymatic water extraction of polysaccharides from *Epimedium brevicornu* and their antioxidant activity and protective effect against DNA damage [J]. J Food Biochem, 2017, 41 (1) :e12298.
- Deng Q, Zhou X, Chen H. Optimization of enzyme assisted extraction of Fructus Mori polysaccharides and its activities on antioxidant and alcohol dehydrogenase [J]. Carbohydr Polym, 2014, 111:775-782.
- Zhang F, Ran CX, Zheng J, et al. Polysaccharides obtained from bamboo shoots (*Chimonobambusa quadrangularis*) processing by-products: new insight into ethanol precipitation and characterization [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112:951-960.
- Pan J. Extraction and purification of *Epimedium* leaf polysaccharide and its preventive effect on alcoholic liver injury [D]. Changchun: Jilin Agricultural University (吉林农业大学), 2020.
- Long H, Gu X, Zhou N, et al. Physicochemical characterization and bile acid-binding capacity of water-extract polysaccharides fractionated by stepwise ethanol precipitation from *Caulerpa lentillifera* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150:654-661.
- Cheng H, Feng S, Jia X, et al. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Epimedium acuminatum* [J]. Carbohydr Polym, 2013, 92 (1) :63-68.
- Wei C, He P, He L, et al. Structure characterization and biological activities of a pectic polysaccharide from cupule of *Castanea henryi* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 109:65-75.
- Ye S, Feng L, Wang J, et al. Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6 [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87 (1) :764-770.
- Mayank G, Kumar GM, Kumar SA, et al. Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippensis* fruit extract on human erythrocytes: an in vitro study [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014:279451.
- Zhang HF, Niu LL, Yang XH, et al. Analysis of water-soluble polysaccharides in an edible medicinal plant *Epimedium*: method development, validation, and application [J]. J AOAC



- Int,2014,97:784-790.
- 20 Qi Y, Wang L, You Y, et al. Preparation of low-molecular-weight fucoidan with anticoagulant activity by photocatalytic degradation method[J]. *Foods*,2022,11:822-822.
- 21 Wang Y, He P, He L, et al. Structural elucidation, antioxidant and immunomodulatory activities of a novel heteropolysaccharide from cultured *Paecilomyces cicadae* (Miquel.) Samson [J]. *Carbohydr Polym*,2019,216:270-281.
- 22 Yang X, Huang M, Qin C, et al. Structural characterization and evaluation of the antioxidant activities of polysaccharides extracted from Qingzhuhan brick tea[J]. *Int J Biol Macromol*,2017,101(1):768-775.
- 23 Zhu DY, Ma YL, Wang CH, et al. Insights into physicochemical and functional properties of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Int J Biol Macromol*,2017,105(Pt 1):1192-1201.
- 24 Sun Y, Hou S, Song S, et al. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*,2018,112:985-995.
- 25 Nie C, Zhu P, Ma S, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce[J]. *Carbohydr Polym*,2018,188:236-242.
- 26 Zhu Y, Chen Y, Li Q, et al. Preparation, characterization, and anti-*Helicobacter pylori* activity of Bi<sup>3+</sup>-*Hericium erinaceus* polysaccharide complex [J]. *Carbohydr Polym*,2014,110:231-237.
- 27 Cao M, Wang S, Gao Y, et al. Study on physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Desmodemus armatus* [J]. *J Food Biochem*,2020,44(7):e13243.
- 28 Medlej MK, Cherri B, Nasser G, et al. Optimization of polysaccharides extraction from a wild species of *Ornithogalum* combining ultrasound and maceration and their anti-oxidant properties [J]. *Int J Biol Macromol*,2020,161:958-968.
- 29 Madhusudhana MC, Raghavarao K, Nene S. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction [J]. *Biochem Eng J*,2008,38:414-420.
- 30 Li H, Zhou D, Liu X, et al. Structure characterization of two novel polysaccharides from *Colocasia esculenta* (taro) and a comparative study of their immunomodulatory activities [J]. *J Funct Foods*,2018,42:47-57.
- 31 Hao JW, Chen ND, Fu XC, et al. Predicting the contents of polysaccharides and its monosugars in *Dendrobium huoshanense* by partial least squares regression model using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Lett*,2019,52(5):297-305.
- 32 Phillips-Jones M, Harding S. Tapping into synchrotron and benchtop circular dichroism spectroscopy for expanding studies of complex polysaccharides and their interactions in anoxic archaeological wood [J]. *Heritage*,2019,2(1):121-134.
- 33 Bao X, Liu C, Fang J, et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst [J]. *Carbohydr Polym*,2001,332(1):67-74.
- 34 Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, et al. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells [J]. *Nature*,2018,553(7687):171-177.
- 35 Mello T, Ceni E, Surrenti C, et al. Alcohol induced hepatic fibrosis; role of acetaldehyde [J]. *Mol Aspects Med*,2008,29(1-2):17-21.