

青蒿渣中总多糖提取工艺及其抗氧化活性

郑宇翔¹, 肖凤霞^{1*}, 林励¹, 陈康¹, 王振华¹, 田军², 宋健平¹, 王琪^{2,3}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州中医药大学科技产业园有限公司, 广州 510445;
3. 广东新南方青蒿药业有限公司, 广东 梅州 514300)

[摘要] 目的: 优选青蒿渣中总多糖的提取工艺参数并探究其抗氧化能力。方法: 以液料比、提取温度、提取时间为自变量, 总多糖得率为因变量, 利用响应面法优选青蒿渣总多糖的超声提取工艺。通过清除 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基、清除羟自由基及油脂抗氧化试验, 与抗坏血酸的抗氧化能力进行比较, 评价青蒿渣总多糖的抗氧化能力。结果: 最佳提取工艺条件为液料比 30:1, 提取时间 30 min, 提取温度 70 ℃; 青蒿渣总多糖提取率 1.773 3%。青蒿渣总多糖的抗氧化能力随质量浓度的增大而增强, 其清除羟自由基的能力较抗坏血酸强, 两者的半抑制浓度分别为 (164.26 ± 0.84), (214.89 ± 0.18) mg·L⁻¹。结论: 优选的提取工艺稳定可靠, 青蒿渣总多糖具有一定抗氧化能力, 为青蒿资源的综合利用提供参考。

[关键词] 青蒿渣; 总多糖; 超声提取法; 抗氧化能力; 过氧化值

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0008-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140008

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1033.009.html>

[网络出版时间] 2015-05-27 10:33

Optimization of Extraction Process for Total Polysaccharides from Artemisiae Annuae Herba Residue by Response Surface Methodology and Evaluation of Its Antioxidant Activity ZHENG Yu-xiang¹, XIAO Feng-xia^{1*}, LIN Li¹, CHEN Kang¹, WANG Zhen-hua¹, TIAN Jun², SONG Jian-ping¹, WANG Qi^{2,3}
(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Sci-tech Industrial Park, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China; 3. Guangdong New South Artep pharm Co. Ltd., Meizhou 514300, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total polysaccharides from Artemisiae Annuae Herba residue and investigate its antioxidant activity. **Method:** Response surface methodology was employed to optimize extraction process of total polysaccharides from Artemisiae Annuae Herba residue by taking liquid-solid ratio, extracting temperature and time as factors. Antioxidant activity of total polysaccharides was evaluated through several *in vitro* antioxidant assays, such as 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity and anti-lipid peroxidation with vitamin C as a reference. **Result:** Optimum extraction conditions of total polysaccharides were as follows: liquid-solid ratio of 30:1, extraction time of 30 min and extraction temperature of 70 ℃. Under these conditions, yield of total polysaccharides could be up to 1.773 3%. Antioxidant capacity of total polysaccharides increased with the concentration of total polysaccharides increased, its scavenging ability towards hydroxyl free radical was stronger than vitamin C. **Conclusion:** Optimized extraction process is stable and reliable, total polysaccharides from Artemisiae Annuae Herba residue has antioxidant capacity, which can provide a reference for comprehensive utilization of Artemisiae Annuae Herba.

[收稿日期] 20141106(001)

[基金项目] 广东省科技厅省部产学研结合示范基地(新版)项目(2012B090700015);广州市科信局广州市对外科技合作专项(2013J4500038)

[第一作者] 郑宇翔,在读硕士,从事中药资源开发利用与新药研究,Tel:13560191139,E-mail:223191139@qq.com

[通讯作者] *肖凤霞,博士,教授,从事中药资源开发利用与新药研究,Tel:020-39358250,E-mail:xfx92@163.com

[Key words] Artemisiae Annuae Herba residue; total polysaccharides; ultrasonic-assisted extraction; antioxidant activity; peroxide value

青蒿功效清虚热、除骨蒸、解暑热、截疟、退黄,用于治疗温邪阴伤、阴虚发热、湿热黄疸等证^[1]。青蒿素为有效抗疟药物,需求旺盛,导致作为其主要来源的青蒿药材需求量急剧攀升。目前,青蒿药材工业化提取青蒿素后的残渣(青蒿渣)主要用作农业肥料,国内药企未对其进行开发利用,造成了青蒿渣中活性成分的极大浪费^[2]。工业提取青蒿素主要采用极性较小的有机溶剂,因此极性较大的成分能较好地残渣中保留下来,例如糖类成分。前期研究发现青蒿渣中含有糖类成分并具有一定抗氧化能力。本实验利用响应面法优选青蒿渣总多糖的提取工艺并探讨其抗氧化活性,为青蒿渣的工业化再利用提供参考,以提高青蒿渣经济效益并拓宽青蒿的深加工路线,促进青蒿资源的综合开发利用。

1 材料

8453E 型紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司),BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),XS 225A 型分析天平(瑞士 Precisa 公司)。青蒿渣(青蒿药材购自广东新南方青蒿药业有限公司,经广州中医药大学林励研究员鉴定为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* 的干燥地上部分,根据广东新南方青蒿药业有限公司提供的青蒿素制备工艺,在实验室提取青蒿素后的药材残渣,于 60 °C 烘箱中烘 24 h,过 3 号筛,置干燥器中备用),D-葡萄糖对照品(美国 Amresco 公司,批号 57-09-0),抗坏血酸对照品(美国 Sigma 公司,批号 20130907),1,1-二苯基-2-苦基肼自由基[DPPH,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,批号 D0909],猪油(实验室湿法熬制),试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 青蒿渣总多糖的制备及测定

2.1.1 青蒿渣总多糖的制备及定性试验 精确称取青蒿渣 1.0 g,加入适量水,置于超声波清洗器中(超声频率 40 kHz,100% 输出功率)超声一定时间,抽滤,用水定容至 50 mL,得青蒿渣总多糖样品溶液。通过斐林试剂(生成砖红色沉淀,阳性), α -萘酚-浓硫酸试剂(产生紫红色环,阳性)及氨性硝酸银试剂(生成黑色沉淀,阳性)证明制备的溶液含糖类成分。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取于 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 10.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得葡萄糖对照品

溶液。精密吸取该对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL,分别置于具塞试管中,加水补至 2 mL,各加入 5% 苯酚 1.0 mL,混匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,混匀,沸水浴 15 min,在冷水中冷却至室温,于 490 nm 处测定吸光度 A。以水 2.0 mL 做空白对照。以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得标准曲线方程 $A = 0.0547C - 0.0249 (R^2 = 0.9992)$,线性范围 2.5 ~ 15.0 mg·L⁻¹。

2.1.3 总多糖的含量测定 精密吸取青蒿渣总多糖样品溶液 2.0 mL,按 2.1.2 项下方法显色和测定,计算总多糖得率。

2.2 青蒿渣总多糖提取工艺优化 根据中心组合试验设计原理,在预试验基础上,选择液料比、提取温度、提取时间为自变量,每个自变量确定 3 个水平,分别以 -1,0,1 进行编码,以青蒿渣总多糖得率为响应值进行响应面优化组合设计三因素三水平试验,试验安排及结果见表 1。

表 1 青蒿渣总多糖提取工艺响应面试验分析

Table 1 Response surface analysis of extraction process for total polysaccharides from *Artemisiae Annuae Herba residue*

No.	A 液料比 /mL·g ⁻¹	B 超声时间 /min	C 超声温度 /°C	总多糖得率 /%
1	20:1	30	70	1.634
2	20:1	40	60	1.364
3	30:1	40	70	1.664
4	40:1	40	60	1.441
5	30:1	20	70	1.721
6	30:1	20	50	1.246
7	40:1	30	50	1.304
8	30:1	30	60	1.533
9	40:1	20	60	1.353
10	20:1	30	50	1.247
11	30:1	30	60	1.565
12	20:1	20	60	1.410
13	40:1	30	70	1.680
14	30:1	40	50	1.259
15	30:1	30	60	1.546
16	30:1	30	60	1.533
17	30:1	30	60	1.561

利用 Design Expert 8.0.6 软件将表 1 中试验数据进行多元回归拟合,得青蒿渣总多糖得率对各自变量的二元多项回归方程 $Y = 1.55 + 0.015A -$

$$2.750 \times 10^{-4} B + 0.21C + 0.033AB - 2.700 \times 10^{-3} AC - 0.017BC - 0.081A^2 - 0.074B^2 - 0.03150 \times 10^{-4} C^2, \text{结果见表 2。}$$

表 2 回归模型的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression model

方差来源	SS	f	F	P
模型	0.400	9	70.990	<0.000 1
A	1.897×10^{-3}	1	3.040	0.124 9
B	6.050×10^{-7}	1	9.683×10^{-4}	0.976 0
C	0.340	1	540.190	<0.000 1
AB	4.476×10^{-3}	1	7.160	0.031 7
AC	2.916×10^{-5}	1	0.047	0.835 1
BC	1.204×10^{-3}	1	1.930	0.207 6
A ²	0.028	1	44.120	0.000 3
B ²	0.023	1	37.370	0.000 5
C ²	4.178×10^{-7}	1	6.687×10^{-4}	0.980 1
残差	4.374×10^{-3}	7		
失拟项	3.446×10^{-3}	3	4.950	0.078 1
纯误差	9.275×10^{-4}	4		
总变异	0.400	16		

由表 2 可知,该模型 $P < 0.000 1$,表示响应面回归模型达极显著水平,失拟项不显著 ($P = 0.078 1$),决定系数 0.989 2,校正决定系数 0.975 2,总变异系数 1.70%,说明该回归方程拟合度和可信度较高,试验误差较小。显著性分析可知一次项 C 和二次项 A², B² 的回归系数均达到极显著水平,交互项 AB 回归系数达显著水平,其他回归系数均未达显著水平。两两交互因素响应面见图 1。

根据 Design-Expert 8.0.6 软件分析回归方程,得青蒿渣总多糖的最佳提取工艺条件为液料比 30.56:1,超声时间 28.94 min,超声温度 70 °C,总多糖得率预测值 1.753 8%。结合实际操作考虑,将条件修改为液料比 30:1,超声时间 30 min,超声温度 70 °C。在此条件下进行 3 组平行试验,结果总多糖得率平均值 1.773 3% (RSD 0.7%),与预测值的偏差较小。说明该回归方程能较真实地反映各因素对青蒿渣总多糖得率的影响,证明该模型用于优化青蒿渣总多糖提取工艺是可行的。

2.3 青蒿渣总多糖的纯化^[3-4] 将青蒿渣总多糖提取液浓缩至一定体积,加入 4 倍量无水乙醇,置于冰箱 24 h 后抽滤,得总多糖沉淀。沉淀用水溶解,配制成总多糖溶液 200 mL,以 1 mL·min⁻¹ 的流速过已湿法装柱的 AB-8 型大孔树脂柱,用 10% 乙醇以 2 mL·min⁻¹ 的流速洗脱,收集洗脱液,直到流出的洗脱液检测不出糖类成分后停止。洗脱液浓缩并置于干燥箱中干燥至恒重,按 2.1.3 项下方法测得青

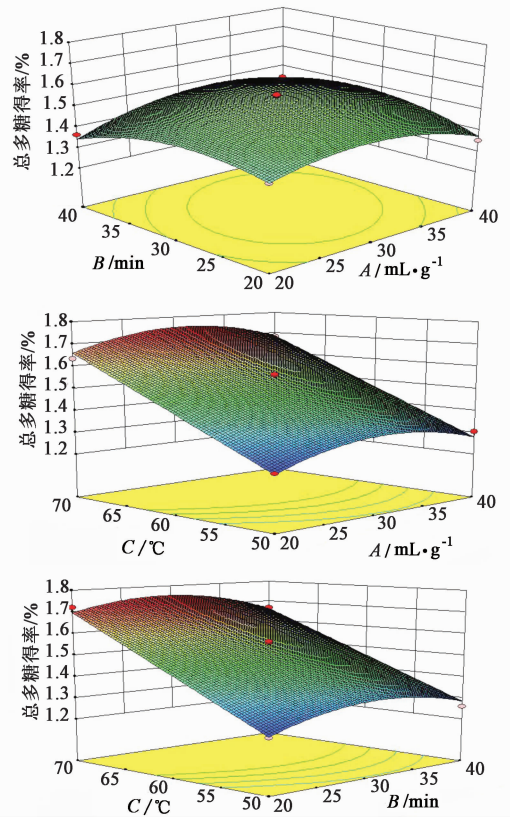


图 1 液料比、超声时间及超声温度交互作用对青蒿渣总多糖得率的影响

Fig. 1 Effects of extraction parameters on yield of total polysaccharides from Artemisiae Annuae Herba residue

蒿渣总多糖质量分数 51.39%。

2.4 青蒿渣总多糖的抗氧化能力测定

2.4.1 清除 DPPH 自由基能力^[5-6] 精密称取 DPPH 7.9 mg,用无水乙醇定容至 100 mL 量瓶中,得 0.079 g·L⁻¹ DPPH 溶液(避光保存,现用现配)。分别精密吸取不同质量浓度(2.41, 4.81, 9.62, 19.24, 38.48, 76.95 mg·L⁻¹)的样品溶液 2.0 mL,加入 DPPH 溶液 2.0 mL,摇匀,室温避光放置 30 min。以水代替 DPPH 溶液为对照组,以水代替样品溶液作空白组,在 515 nm 处测定吸光度 A,按清除率 = 1 - (A₁ - A₂)/A₀ × 100% 计算,式中 A₀ 为空白组的吸光度, A₁ 为样品溶液吸光度, A₂ 为对照组的吸光度。以抗坏血酸(2.03, 4.06, 8.13, 16.26, 32.52, 65.04 mg·L⁻¹)为阳性组。结果青蒿渣总多糖对 DPPH 自由基的清除率分别为 17.01%, 22.56%, 29.55%, 45.14%, 57.97%, 61.62%, 抗坏血酸的清除率则依次为 16.98%, 22.60%, 66.08%, 100%, 100%, 100%;根据 Logistic 回归计算两者的半抑制浓度(half-inhibitory concentration, IC₅₀)分别为(30.69 ± 0.04), (6.39 ± 0.12) mg·L⁻¹,

表明青蒿渣总多糖具有清除 DPPH 自由基的能力,且呈剂量依赖性,但其能力较抗坏血酸弱。

2.4.2 清除羟基自由基能力^[7-8] 在 10 mL 量瓶中加入 7.5 mol·L⁻¹ FeSO₄ 溶液,7.5 mol·L⁻¹ 水杨酸-乙醇溶液,0.3% H₂O₂ 溶液和不同质量浓度的样品溶液各 1.0 mL,于 37 ℃ 水浴中反应 30 min,取出后用水定容至刻度。在 518 nm 处测定 A,按 1 - (A₁ - A₂)/A₀ × 100% 计算羟基自由基清除率(A₀ 为空白溶液的吸光度,A₁ 为加入样品溶液后的吸光度,A₂ 为不加 H₂O₂ 溶液时样品溶液的吸光度),以抗坏血酸为阳性对照。结果青蒿渣总多糖(60.12,120.29,240.48,480.96,961.92,1 702.93 mg·L⁻¹)和抗坏血酸(70.95,141.91,283.81,567.64,1 135.24,2 270.48 mg·L⁻¹)对羟基自由基的清除率分别为 31.02%,38.82%,51.06%,72.47%,91.59%,100% 和 4.42%,22.59%,51.95%,87.77%,100%,100%。计算两者的 IC₅₀ 分别为(164.26 ± 0.84),(214.89 ± 0.18) mg·L⁻¹,表明青蒿渣总多糖具有较强的清除羟基自由基的能力,随总多糖质量浓度的增加,清除羟基自由基的效果越强,其清除能力比抗坏血酸更强。

2.4.3 抗油脂过氧化活性能力^[9] 采用 Schaal 烘箱储藏法^[10]。往每份 15.0 g 的温热猪油中按质量比分别加入 0.01%,0.03%,0.05% 的总多糖提取物,搅匀,以猪油为空白对照,在 60 ℃ 烘箱中强化保存,定时搅拌,一定时间后测定猪油的过氧化值(peroxide value,POV)^[11],见表 3。结果显示青蒿渣总多糖对猪油具有明显的抗氧化作用,且该作用随总多糖用量增加而增强,尤其在试验第 5 天,猪油氧化速率明显降低;与抗坏血酸比较,青蒿渣总多糖的抗氧化能力相对较弱。

表 3 青蒿渣总多糖对猪油的抗氧化作用(n=3)

Table 3 Effect of total polysaccharides from Artemisiae Annuae Herba residue on anti-oxidation of lard oil (n=3)

样品	POV/mmol·kg ⁻¹				
	0 d	1 d	2 d	3 d	5 d
空白	0.044 8	0.057 1	0.066 0	0.089 8	0.457 3
0.01% 总多糖	0.044 0	0.059 7	0.057 3	0.088 2	0.186 9
0.03% 总多糖	0.044 2	0.056 9	0.066 5	0.079 2	0.178 4
0.05% 总多糖	0.044 2	0.054 5	0.059 1	0.079 8	0.172 4
0.01% 抗坏血酸	0.044 8	0.047 3	0.053 0	0.053 6	0.065 7

3 讨论

提取青蒿素后,青蒿残渣和浓缩母液中仍含有大量的其他次生物质、生理活性物质等^[11],如挥发

油、黄酮类和糖类成分等。目前,除青蒿素外,青蒿化学成分研究更多关注于挥发油和黄酮类成分,而对青蒿糖类成分研究极少,只停留在其含量测定上。青蒿中糖类成分含量较高^[12],部分地区青蒿中总多糖质量分数高达 17.12%^[13-14],而植物多糖在抑制肿瘤、增强免疫力、抗氧化等方面具有独特功效。通过抗氧化能力的测定,发现青蒿渣总多糖具有一定的抗氧化能力,其中清除羟基自由基的能力比抗坏血酸更强,是潜在的天然抗氧化剂。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:184,附录 104.

[2] 王三根,梁颖. 中药青蒿的生态生理及其综合利用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(4):47-50.

[3] 季志红,阻力皮亚·艾山,周晓英. 大孔吸附树脂分离纯化毛头牛蒡子多糖的工艺研究[J]. 环球中医药,2013,6(2):81-83.

[4] 陶遵威,张岩,王文彤. 大孔吸附树脂对苦豆子多糖纯化工艺研究[J]. 现代药物与临床,2013,28(4):515-518.

[5] 戴喜末,熊子文,罗丽萍. 响应面法优化野艾蒿多糖的超声波提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学,2011,32(8):93-97.

[6] 陈地灵,吴祎,林励,等. 沉香茶提取物的体外抗氧化和体内降血脂作用评价[J]. 现代食品科技,2013,29(6):1198-1201,1242.

[7] 陈金娥,赵金玲,张海容. 青蒿中黄酮、多酚和 V_c 含量测定及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(4):1-4.

[8] 刘玉芬,夏海涛. 响应面法优化碱蒿黄酮提取工艺及其体外抗氧化作用[J]. 食品科学,2012,33(12):63-68.

[9] 孟令峰. 茉莉花渣总黄酮抗氧化、抑菌活性及提取优化研究[D]. 成都:四川农业大学,2008.

[10] 石锦芹,黄绍华,谌乐礼,等. 柿叶乙醇提取物在猪油中的抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,1999,20(5):22-23.

[11] 王三根,梁颖. 中药青蒿的生态生理及其综合利用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(4):47-50.

[12] 邓小云,丁登峰,戴美红,等. 植物多糖药理作用研究进展[J]. 中医药导报,2006,12(9):86-88.

[13] 石俊仙. 超声法测定不同产地青蒿多糖含量[J]. 太原科技,2007(2):65-66.

[14] 张海容,刘露琛. 超声提取青蒿多糖的工艺优化[J]. 食品研究与开发,2006,27(5):46-48.

[责任编辑 刘德文]