

高河菜根茎多糖的提取工艺优选及抗氧化作用考察

林春榕*, 张翠香, 董莎莎, 左绍远

(大理学院基础医学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的: 优选高河菜根茎多糖的提取工艺条件并考察其抗氧化作用。方法: 采用水提醇沉法从高河菜根茎中提取多糖, 以多糖提取率为指标, 通过正交试验优选多糖的提取工艺条件, 采用硫酸-苯酚法测定多糖含量, 并考察高河菜根茎多糖对清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)与超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的作用。结果: 高河菜根茎多糖的最佳提取工艺为提取温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$, 提取时间 12 h, 料液比 1:15; 多糖平均得率 1.973% (RSD 1.87%), 高河菜根茎多糖与葡萄糖的换算因子为 1.127 ($n=5$), 高河菜根茎粗多糖中多糖质量分数 80.17% (RSD 2.13%)。体外抗氧化试验表明, 高河菜根茎多糖对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有一定清除作用, 且呈剂量效应关系。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 提取效率高; 高河菜根茎多糖具有一定的体外抗氧化作用。

[关键词] 高河菜根茎多糖; 提取工艺; 正交实验; 含量测定; 抗氧化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0046-04

[doi] 10.11653/syfy2013100046

Optimization of Extraction Technology and Investigation of Anti-oxidant Effects of Polysaccharides from Stems of *Megacarpaea delavayi*

LIN Chun-rong*, ZHANG Cui-xiang, DONG Sha-sha, ZUO Shao-yuan

(College of Basic Medicine, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extracting conditions of polysaccharides from stems of *Megacarpaea delavayi*, and investigate its anti-oxidation effects. **Method:** Polysaccharide in stems of *M. delavayi* was isolated by water extracting-alcohol precipitating method, taking extraction rate of polysaccharides as index, optimal extracting conditions were studied by orthogonal test. The content of polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid method, moreover, *in vitro* activities on scavenging free radicals of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ of the polysaccharide were also observed. **Result:** Optimal extraction conditions of polysaccharides were as followings: extracted 12 h with 15 times the amount of water at $80\text{ }^\circ\text{C}$; under these conditions, the average yield of polysaccharides was 1.973% (RSD 1.87%), the conversion factor between glucose and the polysaccharides was 1.127 ($n=5$), the content of polysaccharides was 80.17% (RSD 2.13%) in the crude polysaccharides. In addition, the polysaccharides had a certain effect on scavenging free radicals of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ *in vitro* and exhibited the dose-effect relation. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible with high extraction rate; Polysaccharides in stems of *M. delavayi* possessed a certain anti-oxidant effect.

[Key words] polysaccharides from stems of *Megacarpaea delavayi*; extraction technology; orthogonal test; content determination; anti-oxidant

高河菜为多年生草本植物。该属植物全世界约 7 种, 我国有 3 种, 主要分布于云南、西藏、四川、甘

肃等地, 云南产 1 种, 即高河菜, 主要分布于滇西北的大理、丽江、中甸等海拔 $>3\ 800\text{ m}$ 的高山草甸地区^[1-3]。高河菜味辛, 性凉, 具有清热、健胃、消食之功效, 为大理白族传统药用野生植物, 全草入药。民间用其治疗肺热咳嗽、体虚、胃热积滞、痢疾和消化不良等症^[4]。目前对高河菜的生药学特征^[5]、人工

[收稿日期] 20121117(006)

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究项目(2009ZC121m)

[通讯作者] * 林春榕, 硕士, 副教授, 从事生化药理学研究, Tel:0872-2257150, E-mail:dalijcyx@163.com

引种驯化^[6]、组织培养繁殖^[7]、治疗积滞化热证^[8]及其脂溶性成分分析^[9]等方面的研究已有报道,但有关其根茎多糖的研究尚未见报道。多糖是一类结构复杂的生物大分子物质,具有增强机体免疫力、调节血糖、降血脂及抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等多种活性^[10-14],目前其已成为新药资源研究的热点之一。因此,本实验对高河菜根茎多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性进行研究,为云南野生高河菜药用资源的开发与利用提供实验依据。

1 材料

HH-W420/600 型恒温水浴箱(金坛市瑞华仪器有限公司),AG 135 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康技术有限公司),UV2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津苏州仪器有限公司),TDL-5-A 型低速台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂)。

D-葡萄糖对照品(上海酶联生化试剂公司,批号 1772-03-4),二乙基氨基乙基-葡聚糖 A-50 色谱柱(DEAE-Sephadex A-50 色谱柱,Sigma 公司),试剂均为国产分析纯。高河菜采自云南大理苍山,经大理学院左绍远教授鉴定为十字花科高河菜属植物高河菜 *Megacarpaea delavayi* Franch 的根茎。

2 方法与结果

2.1 苯酚试剂的配制 称取苯酚 100 g,加铝粉和 NaHCO₃ 各 0.1 g,蒸馏,收集 182 ℃ 馏分,精确称取该馏份 6.0 g,加双蒸水 100 mL,得 6.0% 苯酚试液,置棕色瓶内,放 4 ℃ 冰箱保存,备用。

2.2 标准曲线的绘制 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 100 mg,置 100 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至 100 mL,得葡萄糖对照品储备液。吸取该储备液 10 mL 置 100 mL 量瓶中,用水定容,精密吸取该溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mL,分别置于具塞试管,各加水至 2.0 mL,加 6.0% 苯酚试剂 1.0 mL,迅速加浓 H₂SO₄ 5.0 mL,摇匀,沸水加热 10 min,迅速流水冷却;另取水 2.0 mL,同法操作,加入试剂作空白对照,于 490 nm 测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,得标准曲线 $Y = 0.009X + 0.035$ ($R^2 = 0.996$),表明葡萄糖质量浓度在 20 ~ 70 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.3 粗多糖的制备 高河菜根茎洗净后自然晾干,切碎,过 40 目筛后称取 1 kg,用石油醚回流 2 h,过滤;滤渣自然晾干,用 95% 乙醇回流 2 次,每次 2 h,过滤;滤渣室温晾干后加 20 倍量水于 80 ℃ 水浴提

取 12 h,过滤,收集滤液。滤渣加 10 倍量水于 80 ℃ 水浴提取 8 h,过滤;合并滤液,减压浓缩至适当体积,加 95% 乙醇至乙醇体积分数 75%,置 4 ℃ 冰箱过夜,离心取沉淀。沉淀用 Sevage 法脱蛋白(三氯甲烷-正丁醇 4:1)至 280 nm 无明显吸收峰,加 95% 乙醇至乙醇体积分数 75%,置 4 ℃ 冰箱过夜,离心取沉淀。沉淀分别用蒸馏水、去离子水透析过夜,同法醇沉,离心,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次,冷冻干燥后溶于适当体积水中,上 DEAE-Sephadex A-50 色谱柱(2.5 cm × 28 cm),用水洗脱,硫酸-苯酚法跟踪检测,收集于 490 nm 处的吸收峰部分,加 95% 乙醇至乙醇体积分数 80%,置 4 ℃ 冰箱过夜,离心取沉淀,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次,冷冻干燥至恒重,即得高河菜根茎粗多糖,置玻璃干燥器中备用。

2.4 换算因子的测定 精密称取高河菜根茎粗多糖 10 mg 置 100 mL 量瓶中,加双蒸水溶解并稀释至刻度,得粗多糖样品溶液(100 mg·L⁻¹)。精密吸取该样品溶液 5 份,每份 1.0 mL,置于具塞试管中,加水至 2.0 mL,按 2.2 项下自“加水至 2.0 mL”起,同法操作,测定 A,按 $f = W / (C \times D)$ 计算换算因子(f)。式中 W 为称取粗多糖的质量,C 为粗多糖溶液中葡萄糖质量浓度,D 为多糖的稀释因素。结果测得高河菜根茎多糖与葡萄糖的平均换算因子 1.127。

2.5 稳定性试验 精密吸取 2.4 项下制备的样品溶液 1.0 mL 于具塞试管中,按 2.2 项下方法于 4 h 内每隔 30 min 测定 1 次 A,结果 RSD 1.87%,表明样品溶液与反应试剂在 4 h 内显色稳定。

2.6 精密度试验 精密吸取 2.4 项下制备的样品溶液 0.50 mL 于具塞试管中,按 2.2 项下方法于 490 nm 连续测定 6 次 A,结果 RSD 1.13%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密吸取 2.4 项下制备的样品溶液 5 份,每份 1.0 mL,分别置于具塞试管中,按 2.2 项下方法操作,结果多糖含量的 RSD 2.41%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密吸取 2.4 项下制备的样品溶液 9 份,每份 0.20 mL,各加入已知含量的葡萄糖对照品溶液 0.1,0.15,0.20,0.25,0.30,0.35,0.40,0.45,0.50 mL,按 2.2 项下方法测定 A,计算葡萄糖加样回收率。结果平均加样回收率 100.78%,RSD 1.73%。

2.9 样品测定 精密吸取高河菜根茎粗多糖样品

溶液 5 份, 每份 1.0 mL, 分别置于具塞试管中, 按 2.2 项下方法测定 A, 计算葡萄糖含量, 并推算多糖含量。结果多糖质量分数 80.17%, RSD 2.13%。

2.10 提取工艺优选 选择提时间、提取温度, 料液比为考察因素, 多糖提取率为评价指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 高河菜根茎多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取时间/h	B 提取温度/℃	C 料液比
1	8	60	1:10
2	10	70	1:15
3	12	80	1:20

表 2 高河菜根茎多糖提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	1.209
2	1	2	2	2	1.551
3	1	3	3	3	1.754
4	2	1	2	3	1.379
5	2	2	3	1	1.809
6	2	3	1	2	1.883
7	3	1	3	2	1.749
8	3	2	1	3	1.975
9	3	3	2	1	1.978
K_1	1.505	1.446	1.689	1.665	
K_2	1.690	1.778	1.636	1.728	
K_3	1.901	1.872	1.771	1.703	
R	0.396	0.426	0.135	0.062	

表 3 多糖提取率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.236	2	0.118	39.333	<0.05
B	0.301	2	0.151	50.167	<0.05
C	0.028	2	0.014	4.667	>0.05
D(误差)	0.010	2	0.005		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

由直观分析可知, 各因素对多糖提取率的影响顺序为 $B > A > C$ 。方差分析表明, 提取温度、提取时间对提取率的影响有显著性差异, 而料液比影响则不显著。结合生产实际考虑, 选择最佳提取条件为 $A_3B_3C_2$, 即提取温度 80℃, 浸提时间 12 h, 料液比 1:15。为验证优选的提取条件, 按此工艺进行 3

次平行试验, 结果多糖提取率分别为 1.968%, 1.977%, 1.973%, 表明优选的工艺稳定可行。

2.11 高河菜根茎多糖对清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的作用^[15] 配制质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多糖样品溶液, 各精密吸取 1.0 mL, 分别加入 9.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 和 9.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇各 1.0 mL, 对照组以水 1.0 mL 代替多糖溶液。加 8.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 启动反应, 于 37℃ 水浴反应 0.5 h, 用水调零, 于 510 nm 测定 A。为扣除多糖溶液本身可能产生的 A, 以不加 H_2O_2 的多糖溶液作为本底管。以 Vc 作阳性对照品, 临用前用水配制成与多糖溶液相同的质量浓度, 同法操作, 进行对照试验, 计算清除率(图 1)。结果表明高河菜根茎多糖对清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用有剂量依赖性, 在 0.60~40.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 表现出一定的剂量效应关系。

$$\text{清除率} = (A_0 - A_x - A_{x_0}) / A_0 \times 100\%$$

式中 A_0 为对照组吸光度, A_x 为多糖样品吸光度, A_{x_0} 为本底管吸光度。

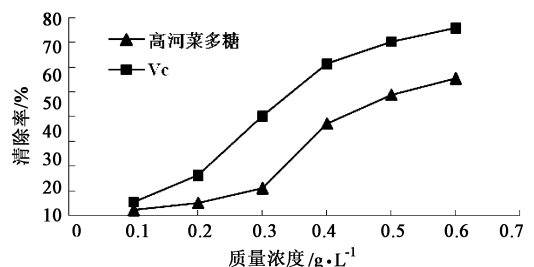


图 1 不同质量浓度高河菜根茎多糖和 Vc 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率

2.12 高河菜根茎多糖对清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的作用 采用邻苯三酚自氧化法^[16-17]进行测定, 多糖样品配制同 2.11 项。取 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 0.50 mL, 置于具塞试管中, 加不同质量浓度的多糖液 1.0 mL, 置 25℃ 水浴保温 20 min, 加入于 25℃ 预热的 5.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液 0.5 mL, 混匀, 置于 25℃ 水浴中 4 min, 快速摇匀, 于 325 nm 处以 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液调零, 每隔 30 s 测定 1 次 A, 连续测定 4 min, 计算加入多糖样品后的自氧化速率(ΔA_x)。 $\Delta A_x = (\text{最后 1 次 A 测定值} - \text{第 1 次 A 测定值}) / 4$ 。空白对照组以 1.0 mL 水代替多糖样品, 同法操作, 测定自氧化速率(ΔA_0)。同法以 Vc 作为阳性对照试验, 计算清除率(图 2)。结果表明随多糖质量浓度的增加, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率逐渐增加, 且呈一定的剂量效应关系; 于质量浓度 0.60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 清除率达最大值(41.43%), 为阳性对照品

Vc 相同质量浓度清除率的 0.558 倍。

$$\text{清除率} = (\Delta A_0 - \Delta A_x) / \Delta A_0 \times 100\%$$

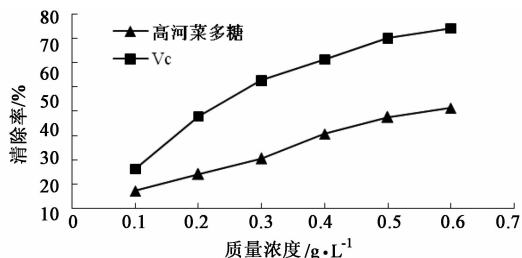


图2 不同质量浓度高河菜根茎多糖和 Vc 对 $O_2\cdot^-$ 的清除率

3 讨论

为提高试验结果的准确度与可靠性,本实验在提取过程中,先用石油醚回流去除脂类,再用乙醇回流,透析,DEAE-SephadexA-50 柱色谱纯化,以除去单糖、低聚糖、生物碱、苷类及色素等干扰成分,从而防止其影响多糖纯度及含量的测定。

体外抗氧化活性实验表明,高河菜根茎多糖具有一定的清除 $\cdot OH$ 和 $O_2\cdot^-$ 的作用,且随多糖质量浓度的增加,清除能力逐渐增加,呈现出一定的剂量效应关系。但在相同的质量浓度下,多糖对 $\cdot OH$ 自由基和 $O_2\cdot^-$ 自由基的清除率 $<$ Vc,表明多糖在体外的抗氧化能力弱于 Vc,但作为一种纯天然抗氧化物质,多糖具有毒副作用小、来源广等特点,因而可长期使用。体外抗氧化活性试验结果虽不一定能完全代表体内清除自由基的作用,但对药物功效的初步筛选仍具有重要参考价值。有关高河菜根茎多糖的生物学活性、药理学作用及单糖组成、结构等尚待进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志. 第6卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 27.
 [2] 中国科学院青藏高原综合科学考查队. 横断山区维管植物. 上册 [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 619.
 [3] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第2册

[M]. 北京: 科学出版社, 1972: 41.

[4] 朱兆云, 罗天浩, 寸润林, 等. 大理中药资源志 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1991: 83.
 [5] 夏从龙, 李龙星, 周浓. 白族药高河菜根茎的生物学研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2005, 11(4): 18.
 [6] 董晓东, 李继红. 高河菜根茎种子生物学特性及其降海拔栽培的初步研究 [J]. 特产研究, 2002, 24(3): 21.
 [7] 苏寿琴, 王玉兴, 李晓茅. 高河菜根茎的组织培养和快速繁殖 [J]. 云南农业, 2009, 24(1): 17.
 [8] 沈磊, 刘晓波, 施贵荣, 等. 高河菜根茎提取物对积滞化热模型大鼠消化液成分的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(3): 1.
 [9] 罗建蓉, 钱金楸, 肖怀. 高河菜根茎脂溶性化学成分分析 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 2087.
 [10] 罗珍, 黄萍, 郭重仪, 等. 猴头菇多糖增强免疫功能的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 182.
 [11] 张峰, 高永峰, 张继国. 四叶参多糖对糖尿病大鼠血糖及免疫功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 184.
 [12] 吕及华, 王会敏, 韩红霞, 等. 猫爪草多糖免疫调节及抗氧化活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1862.
 [13] 王忠, 厉彦翔, 骆新. 桑葚多糖抗疲劳作用及其机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 234.
 [14] 石学魁, 阮殿清, 王亚贤, 等. 红花多糖抗肿瘤活性及对 T739 肺癌鼠 CTL, NK 细胞杀伤活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 215.
 [15] 王德才, 高丽君, 高艳霞. 泰山四叶参多糖体外抗氧化活性的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 104.
 [16] 范三红, 周立波. 油松花粉多糖提取及其清除羟自由基活性研究 [J]. 食品科学, 2009, 29(12): 274.
 [17] 张泽庆, 田应娟, 张静. 防风多糖的抗氧化活性研究 [J]. 中药材, 2008, 31(2): 268.

[责任编辑 全燕]