

# 地乌泡多糖的提取及其抗氧化作用

杨斐玉<sup>1,2,3</sup>, 吴新玉<sup>1</sup>, 雷丹丹<sup>1</sup>, 徐国波<sup>1,3\*</sup>

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学生物与工程学院, 贵州贵阳 550025; 3. 国家苗药工程技术中心及教育部民族药与中药开发应用工程研究中心, 贵州贵阳 550004)

**摘要** [目的] 研究地乌泡多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性。[方法] 采用苯酚-硫酸法作为显色剂, 以地乌泡多糖提取量为评价指标, 通过正交试验确定地乌泡多糖最佳提取条件; 采用 DPPH· 和 ABTS<sup>+</sup>· 清除法评价其抗氧化活性。[结果] 地乌泡多糖的最优提取方案: 提取温度 80 ℃, 料液比 1:15, 提取时间 3 h。在此工艺条件下, 地乌泡多糖平均提取量为 251 μg/g。地乌泡多糖对 2 种自由基都显示出明显的清除能力。[结论] 优选的提取工艺稳定可靠, 地乌泡多糖具有显著的抗氧化活性, 该研究为地乌泡药材综合利用奠定了基础。

**关键词** 地乌泡; 多糖; 提取工艺; 抗氧化

**中图分类号** S-3; R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)07-0001-03

## Extraction and Antioxidation of Polysaccharides from *Rubus irenaeus* Focke

YANG Fei-yu<sup>1,2,3</sup>, WU Xin-yu<sup>1</sup>, LEI Dan-dan<sup>1</sup> et al (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025; 3. National Engineering Research Center of Miao's Medicines & Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Guiyang, Guizhou 550004)

**Abstract** [Objective] To investigate the extraction technology and antioxidant activity of polysaccharides from *Rubus irenaeus* Focke. [Method] Using phenol-sulfuric acid method as chromogenic agent, the extraction condition of polysaccharides was studied by orthogonal test with the evaluating criteria of extraction rate of polysaccharides. The antioxidant activity was evaluated by DPPH· and ABTS<sup>+</sup>· scavenging assay. [Result] The optimal extraction conditions were as follow: extraction temperature 80 ℃, solid-liquid ratio 1:15, extraction time 3 h. Under this extraction conditions, the average extraction content of the polysaccharide from the *Rubus irenaeus* was 251 μg/g. The polysaccharides possessed obviously antioxidant abilities of scavenging the DPPH· and ABTS<sup>+</sup>· radicals. [Conclusion] The optimal extraction process is stable and reliable; the polysaccharide of *Rubus irenaeus* has significant antioxidant activity. This study laid the foundation for the comprehensive utilization of the *Rubus irenaeus*.

**Key words** *Rubus irenaeus* Focke; Polysaccharide; Extraction process; Antioxidation

地乌泡为蔷薇科悬钩子属植物灰毛泡 (*Rubus irenaeus* Focke) 的干燥全株, 全年均可采集。功能主治: 理气止痛, 散毒生肌。用于治疗气滞腹痛、口角炎<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 植物多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、降血糖等多种生物活性<sup>[2]</sup>。研究报道悬钩子属植物多糖具有抗炎、降糖、抗氧化、抗肿瘤等作用<sup>[2-5]</sup>, 如粗叶悬钩子的根部提取物中总多糖具有减轻炎症因子对肝细胞造成损伤的作用<sup>[3]</sup>; 托盘的根多糖具有体外降糖作用<sup>[4]</sup>以及抗氧化作用<sup>[5]</sup>。然而该属药材地乌泡的化学成分及其药理研究报道较少, 仅刘戎等<sup>[6]</sup>对其根部甲醇提取物的乙酸乙酯萃取部分中的化学成分进行报道。前期研究发现地乌泡水提醇沉物粗多糖具有抗氧化作用, 故采用水提醇沉法考察地乌泡多糖的最佳提取条件, 并采用 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除试验评估其体外抗氧化活性, 旨在为充分利用地乌泡药材资源提供试验依据。

## 1 材料与方

**1.1 仪器** DRHH-S6 型数显恒温水浴锅 (上海双捷实验设备公司); FW177 型中草药粉碎机 (天津市泰斯特仪器公司); BT-3000 型电子天平 (上海友声衡器公司); FA2204B 型精密电子天平 (上海天美天平仪器公司); UV-2700 型紫外可见分光光度计 (岛津检测技术公司); PS-40 型超声波清洗器 (巩义市予华仪器公司); DHG-9240A 型电热鼓风干

燥箱 (购自上海一恒科学仪器公司); SHZ-D(III) 型循环水式真空泵 (上海予英仪器公司); 多功能酶标仪 (Biotek, USA)。

**1.2 材料与试剂** 地乌泡为灰毛泡 (*Rubus irenaeus* Focke) 的干燥全株, 2017 年 9 月采自贵州省黔东南雷山县。经贵州医科大学药学院龙庆德副教授鉴定为蔷薇科悬钩子植物灰毛泡。

供试试剂: 抗坏血酸 (四川依科制药); 葡萄糖 (分析纯, 天津市风船化学); 无水乙醇、浓硫酸、正丁醇、三氯甲烷、苯酚均为分析纯; ABTS [2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], DPPH [2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl] 均来自美国 Sigma 公司。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 标准曲线的绘制。**精密称定在 105 ℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖 25.0 mg, 加蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中, 配制成 0.25 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 加蒸馏水稀释至 50 mL 容量瓶中, 摇匀。取稀释液 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中, 加入 6% 苯酚溶液 1.0 mL, 再迅速加入浓硫酸 5.0 mL 混匀, 静置, 于 75 ℃ 恒温水浴锅中加热 15 min, 冷却至室温。以蒸馏水为空白同法操作。在紫外-可见分光光度计全波长范围内进行扫描, 葡萄糖对照品在 490 nm 处有最大吸收。在 490 nm 处测定吸光度, 以葡萄糖浓度 (C) 为横坐标, 所测得的吸光度 (A) 为纵坐标绘制标准曲线。如图 1 所示, 得线性回归方程:  $A = 0.0375C - 0.0447$ ,  $R^2 = 0.9992$ , 线性关系良好。

**1.3.2 地乌泡多糖的提取与测定。**准确称取地乌泡粗粉

**基金项目** 黔科合人字(2015)32号; 贵州省科学技术支撑计划(黔科合支撑[2017]2888); 贵阳市科技局项目(GY2015-5)。

**作者简介** 杨斐玉(1995—), 女, 云南景洪人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物开发与利用。\* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事天然产物开发与利用研究。

**收稿日期** 2017-12-05; **修回日期** 2017-12-21

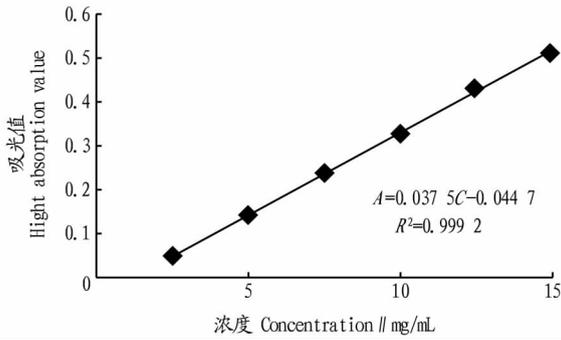


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Glucose standard curve

(过4号筛)10.0 g置于磨口圆底烧瓶中,加热回流提取,抽滤后减压浓缩,浓缩液加乙醇至体积分数为70%,低温静置过夜,抽滤得粗多糖沉淀。取10.0 mg粗多糖加蒸馏水溶解,采用Sevage法进行脱蛋白处理,取上清液置于100 mL容量瓶,用蒸馏水定容,经分光光度法检测,根据葡萄糖标准曲线计算出多糖的提取量。

**1.3.3 正交试验。**参照文献[7-10]方法,采用水提醇沉法,按照表1条件以提取温度、料液比、提取时间为3因素提取地乌泡粗多糖,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验,确定热水浸提法提取地乌泡多糖的最佳工艺。

表1 试验设计因素与水平

Table 1 Factor and level of test design

水平 Level	因素 Factor		
	提取温度(A) Extraction temperature ℃	料液比(B) Solid-liquid ratio g/mL	提取时间(C) Extraction time h
1	90	1:10	1
2	80	1:15	2
3	70	1:20	3

**1.3.4 地乌泡多糖体外抗氧化活性测定。**

**1.3.4.1 地乌泡多糖提取物体外 DPPH· 的清除能力测定。**按照文献<sup>[11]</sup>,取10 μL不同浓度的地乌泡多糖溶液,加入290 μL DPPH溶液,暗处反应30 min,在517 nm处测吸光值( $A_i$ )。以等体积的无水乙醇代替样品溶液作样品空白组( $A_0$ ),以等体积样品溶液代替 DPPH 溶液作为溶剂空白组( $A_j$ ),平行测定3次。DPPH·清除率(%) =  $[1 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$ ,以 $V_c$ 作阳性对照。

**1.3.4.2 地乌泡多糖提取物体外 ABTS<sup>+</sup>· 清除能力测定。**参照文献<sup>[12]</sup>方法,分别取10 μL不同浓度的地乌泡多糖溶液,加入290 μL ABTS溶液,暗处反应6 min,在734 nm处测吸光值( $A_i$ )。同时以等体积无水乙醇代替样品溶液作为样品空白组( $A_0$ ),以等体积样品溶液代替 ABTS 溶液作为溶剂空白组( $A_j$ ),平行测定3次。自由基清除率(%) =  $[1 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$ ,以 $V_c$ 作阳性对照。

## 2 结果与分析

**2.1 正交试验结果** 由表2可知,当地乌泡多糖提取的最佳条件组合为 $A_2B_2C_3$ 时,提取的地乌泡多糖提取量最高。由表3可知,因素C对地乌泡多糖提取的影响最大,因素B

对地乌泡多糖提取的影响最小;各因素作用主次顺序为 $C > A > B$ 。其中,因素A和因素C对提取量均有显著影响( $P < 0.05$ ),因素B无显著性影响( $P > 0.05$ )。故地乌泡多糖最佳提取方案:提取温度80℃,料液比1:15,提取时间3h。

表2 正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal experiment design and its result

试验号 Test No.	因素 Factors			提取量 Extraction content μg/g
	A	B	C	
1	90	1:10	1	173
2	90	1:15	2	217
3	90	1:20	3	244
4	80	1:10	2	212
5	80	1:15	3	251
6	80	1:20	1	190
7	70	1:10	3	196
8	70	1:15	1	144
9	70	1:20	2	155
$K_1$	634	581	507	
$K_2$	653	612	584	
$K_3$	495	589	691	
R	158	31	184	

表3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

因素 Factor	偏差平方和 Sum of deviation square	自由度 df	F值 F value	均方 Mean square	P值 Sig.
A	4 960.667	2	43.515	2 480.333	0.022
B	172.667	2	1.515	86.333	0.398
C	5 692.667	2	49.936	2 846.333	0.020
误差(Error)	114.000	2		52.111	

按照优化工艺进行验证试验,平行3次。由表4可知,地乌泡多糖平均提取量为251 μg/g,RSD为1.79%,说明此方案稳定,地乌泡多糖提取的最佳工艺为 $A_2B_2C_3$ 。

表4 验证试验结果

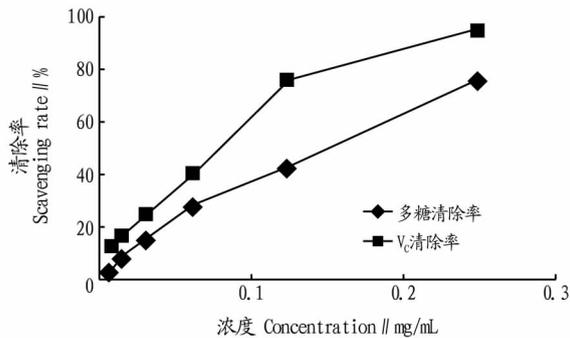
Table 4 Results of verify experiment

样品 Sample	提取量 Extraction content//μg/g	平均值 Average value//μg/g	RSD %
1	251	251	1.79
2	247		
3	256		

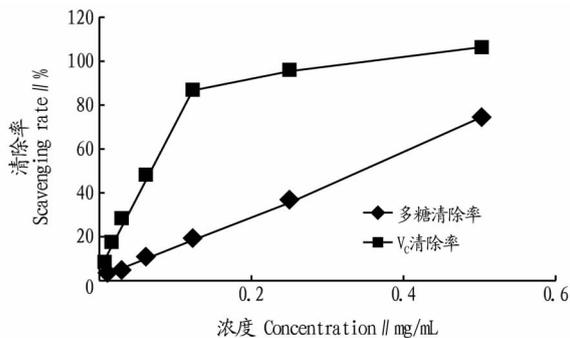
## 2.2 地乌泡多糖体外抗氧化活性测定

**2.2.1 地乌泡多糖体外 DPPH· 的清除能力。**由图2可知,地乌泡多糖质量浓度从0.031 25 mg/mL到0.250 00 mg/mL对DPPH·清除率从16.30%增大到76.90%,而同质量浓度的 $V_c$ 清除DPPH·能力即达96.05%。说明地乌泡多糖具有明显的清除DPPH·能力。

**2.2.2 地乌泡多糖体外 ABTS<sup>+</sup>· 的清除能力。**由图3可知,在浓度为0.031 25~0.500 00 mg/mL时,地乌泡多糖对ABTS<sup>+</sup>·的清除作用随地乌泡多糖浓度的增加而逐步增强,地乌泡多糖对ABTS<sup>+</sup>·清除率从5.68%增大到74.38%。在

图2 多糖和V<sub>c</sub>对DPPH·的清除率Fig. 2 Determination of DPPH free radical by polysaccharide and V<sub>c</sub>

相同质量浓度范围内地乌泡多糖清除率低于V<sub>c</sub>的清除率。

图3 多糖和V<sub>c</sub>对ABTS·<sup>+</sup>的清除率Fig. 3 Determination of ABTS free radical by polysaccharide and V<sub>c</sub>

### 3 结论与讨论

采用水提醇沉法提取地乌泡多糖,影响多糖提取的因素为提取时间 > 提取温度 > 料液比。正交试验设计确定最佳地乌泡多糖的提取方案:提取温度80℃,料液比1:15,提取时间3 h。在此工艺条件下进行验证试验,得到地乌泡多糖

平均提取量为251 μg/g。试验初步建立地乌泡多糖制备方法,为后续地乌泡进一步分离纯化及活性评价奠定研究基础。

目前,国内对悬钩子属植物的研究和利用还比较少,大都是调查资源分布情况<sup>[13]</sup>。通过地乌泡多糖对DPPH·和ABTS·<sup>+</sup>的清除能力研究其抗氧化能力,结果显示地乌泡多糖浓度与自由基清除率间呈正相关。地乌泡多糖具有很好的抗氧化能力,该试验为地乌泡多糖的开发利用提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003, 52.
- [2] 闫文娟, 李秦辉, 唐芳勇, 等. 广东虫草多糖的提取及含量测定[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(4): 53-56.
- [3] 洪振丰, 周建衡, 李天娇, 等. 粗叶悬钩子根部提取物对急性肝损伤大鼠TNF-α IL-1β IL-6的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(6): 1137-1138.
- [4] 雷钧涛, 莫绍凌, 姜艳霞. 托盘根中多糖提取及体外对α-葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 262-263.
- [5] 雷利芳. 覆盆子的抗氧化活性及其与化学成分和显微特征常数的相关性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2013, 9-11.
- [6] 刘戎, 丁立生, 陈能煜, 等. 灰毛泡根部的化学成分[J]. 中草药, 2003, 34(5): 394-396.
- [7] 毛慧玲, 束盈慧, 杨文, 等. 茶树菇多糖提取工艺的优选[J]. 中药材, 2007, 30(2): 217-220.
- [8] 王冬梅, 宋旭辉, 李娟丽, 等. 卷叶黄精多糖提取分离工艺研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(6): 158-161.
- [9] 徐耀, 郁建平. 长叶地榆多糖提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 181-183.
- [10] 杨鑫, 王鑫淼, 高星焯, 等. 红松松塔多糖提取工艺优化及其含量测定[J]. 中成药, 2011, 33(2): 351-353.
- [11] THOO Y Y, HO S K, LIANG J Y, et al. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*) [J]. Food chemistry, 2010, 120(1): 290-295.
- [12] GONZÁLEZ E A, GARCÍA E M, NAZARENO M A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts [J]. Food chemistry, 2010, 119(1): 358-362.
- [13] 刘胜贵, 李路, 左清清, 等. 悬钩子属植物提取物的抑菌效果及抗氧化性研究[J]. 北方园艺, 2014(6): 128-131.

### 名词解释

扩展总被引频次:指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年被引用的总次数。这是一个非常客观实际的评价指标,可以显示该期刊被使用和受重视的程度,以及在科学交流中的作用和地位。

扩展影响因子:这是一个国际上通行的期刊评价指标,是E·加菲尔德于1972年提出的。由于它是一个相对统计量,所以可公平地评价和处理各类期刊。通常,期刊影响因子越大,它的学术影响力和作用也越大。具体算法为:

$$\text{扩展影响因子} = \frac{\text{该刊前两年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该刊前两年发表论文总数}}$$

扩展即年指标:这是一个表征期刊即时反应速率的指标,主要描述期刊当年发表的论文在当年被引用的情况。具体算法为:

$$\text{扩展即年指标} = \frac{\text{该期刊当年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊当年发表论文总数}}$$

扩展他引率:指该期刊全部被引次数中,被其他刊引用次数所占的比例。具体算法为:

$$\text{扩展他引率} = \frac{\text{被其他刊引用的次数}}{\text{期刊被引用的总次数}}$$

扩展引用刊数:引用被评价期刊的期刊数,反映被评价期刊被使用的范围。