

川牛膝多糖抗氧化活性测定和微波提取工艺优化

陈艾萌, 潘洁, 胡博, 陈郡雯, 吴卫*
(四川农业大学农学院, 四川 成都 611130)

摘要: **目的** 测定川牛膝 *Cyathulae Radix* 多糖抗氧化活性, 并优化其微波提取工艺。**方法** 微波提取多糖后进行微波干燥, 硫酸-苯酚法测定其含有量, 评价该成分清除 DPPH、ABTS、 $\text{OH}\cdot$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基作用以及总还原能力。在单因素试验基础上, 以提取时间、提取温度、料液比为影响因素, 多糖提取率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。**结果** 多糖对 DPPH、ABTS、 $\text{OH}\cdot$ 自由基的清除能力以及总还原能力均较强, 但对 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基无清除能力。微波提取最佳条件为提取功率 640 W, 料液比 1:16, 提取温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间 4 min, 多糖提取率 60.67%。**结论** 微波提取川牛膝多糖时, 可在提高其提取率的同时缩短提取时间, 节约能源, 并增强该成分抗氧化活性。
关键词: 川牛膝; 多糖; 抗氧化活性; 微波提取; Box-Behnken 响应面法
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)01-0080-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.015

Determination of antioxidant activities of polysaccharides from *Cyathulae Radix* and optimization of microwave extraction

CHEN Ai-meng, PAN Jie, HU Bo, CHEN Jun-wen, WU Wei*
(Agronomy College of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

KEY WORDS: *Cyathulae Radix*; polysaccharides; antioxidant activities; microwave extraction; Box-Behnken response surface method

川牛膝为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根, 具有逐瘀通经、通利关节、利尿通淋的作用^[1], 其含有的水溶性多糖是一种重要活性物质, 目前相关研究主要集中在体内外免疫活性、抗肿瘤、抗病毒、多糖分离纯化、提取工艺优化等方面^[2-3]。研究表明, 多糖的抗氧化活性可能是其抗衰老、抗炎、降血脂、抗肿瘤等功效的药理基础^[4], 如大枣多糖治疗慢性疲劳综合征和调节机体免疫能力与其抗氧化能力有关^[5], 麦冬多糖肝保护机制也可能与抗氧化通路有关^[6], 故对川牛膝多糖抗氧化活性的研究有较高的价值。

常规方法提取多糖时, 存在成分损失大、周期长、工序多、提取率低等缺点, 而微波提取选择性好、时间短、操作简便、能耗低、提取率高, 故本实验采用该方法提取川牛膝多糖, 然后测定该成分清除 DPPH、ABTS、 $\text{OH}\cdot$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基作用以及

总还原能力以评价抗氧化活性, 再通过 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺, 旨在为新型天然抗氧化剂开发及川牛膝多糖应用提供理论依据及技术参考。

1 材料、仪器和试剂

川牛膝(3年生)于2013年11月采自四川省雅安市宝兴县川牛膝种植基地, 经四川农业大学吴卫教授鉴定为正品。将其除去芦头, 清水快速洗净, 自然晾干后于50 $^{\circ}\text{C}$ 下烘至半干, 堆放回润后再烘至全干, 粉碎, 过40目筛, 保存于干燥器中。MCR-3微波化学反应器、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); A65312906真空冷冻干燥器117(捷克制造); RE2000A旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); SG8200HPT超声仪(上海冠特超声仪器有限公司); KMD控温电热套(山东鄞城华鲁仪器公

收稿日期: 2016-08-07

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX09304006)

作者简介: 陈艾萌(1989—), 女, 硕士, 研究方向为药用植物学。E-mail: 1140311614@qq.com

*通信作者: 吴卫(1970—), 女, 教授, 研究方向为药用植物学。E-mail: ewuwei@sicau.edu.cn

司); ESJ120-4 电子天平 (沈阳龙腾电子有限公司); SHZ-82 水浴恒温振荡器 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); HH-4 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司); TDL-40B 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。DPPH、ABTS 自由基、2, 4, 6-三吡啶基三嗪 (TPTZ)、水溶性维生素 E (Trolox) (美国 Sigma 公司); L-谷胱甘肽 (GSH) (日本东京化成工业株式会社)。苯酚 (加入碳酸氢钠和铝片重蒸馏, 收集 182 ℃ 馏分); 浓硫酸为优级纯; 葡萄糖等其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 多糖提取与含有量测定 称取川牛膝干燥粉末 2.000 g, 置于圆底烧瓶中, 加 10 mL 石油醚脱脂 6 h, 旋蒸浓缩后挥干, 加入 40 mL 蒸馏水, 微波提取 (480 W、15 min) 多糖, 离心, 过滤, 滤液定容至 100 mL, 硫酸-苯酚法测定其含有量^[7]。以葡萄糖质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (Y) 进行回归, 得到标准曲线 $Y = 0.016\ 3X - 0.005\ 3$ ($r = 0.999\ 3$), 在 10.00 ~ 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.2 多糖干燥 称取川牛膝干燥粉末 30.00 g, 加 150 mL 石油醚脱脂 6 h, 旋蒸浓缩后挥干, 加入 600 mL 蒸馏水, 按“2.1”项下方法提取多糖, 加纱布和脱脂棉抽滤, 滤液旋蒸浓缩至 100 mL 左右, Sevage 法脱蛋白 5 次, 95% 乙醇沉淀过夜, 沉淀用 95% 乙醇和丙酮反复洗涤多次, 真空冷冻干燥, 用于抗氧化活性测定。同法微波提取川牛膝多糖后进行微波干燥 (480 W、60 ℃, 约 10 min), 4 ℃ 下保存备用。

2.3 DPPH·清除能力测定 参考文献[8], 吸取 1 mL “2.2”项下多糖溶液 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL), 加入 2.0 mL 0.004% DPPH 溶液, 摇匀, 37 ℃ 下水浴避光反应 30 min, 516 nm 波长处测定吸光度。以维生素 C 和维生素 E 为对照, 计算清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A_s - A_r) / A_0] \times 100\%$, 其中 A_0 为 2 mL DPPH 溶液与 1 mL 样品溶液的吸光度, A_s 为 2 mL DPPH 溶液与 1 mL 样品溶液的吸光度, A_r 为 2 mL 和 1 mL 样品溶液的吸光度。

2.4 OH·自由基清除能力测定 参考文献[9], 反应体系中含 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL、9 mmol/L FeSO_4 1 mL、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL, 不同质量浓度 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL) 样品溶液各 1 mL, 最后加 H_2O_2 启动

反应, 37 ℃ 下反应 30 min, 以蒸馏水为对照, 在 510 nm 波长下测定各质量浓度溶液吸光度。以维生素 C 和维生素 E 为对照, 计算清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100\%$, 其中 A_0 为空白对照溶液吸光度, A_x 为加入样品溶液后吸光度, A_{x_0} 为不加显色剂 H_2O_2 样品溶液本底吸光度。

2.5 总还原能力 (FRAP 值) 测定 参考文献 [10] 配制工作液, 移取不同质量浓度 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL) 样品溶液各 1 mL, 加入 2 mL 37 ℃ 预热工作液, 摇匀, 37 ℃ 下反应 30 min, 593 nm 波长处测定吸光度, 以无水乙醇代替样品加入 FRAP 工作液作为空白。以 FeSO_4 溶液浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (Y) 进行回归, 得到标准曲线 $Y = 0.007X + 0.108\ 5$ ($R^2 = 0.999\ 5$), 在 25 ~ 1 600 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好。求得相应 FeSO_4 溶液浓度后, 以多糖相当于 100 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 清除能力所需的含有量为评价指标, 维生素 C 和维生素 E 为对照。FRAP 值越大, 抗氧化活性越强。

2.6 ABTS 自由基清除能力测定 参考文献 [10] 并稍作调整, 将 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合, 室温下避光放置 16 h, 形成 ABTS 母液, 将其与无水乙醇按照约 1 : 60 比例混合, 于 734 nm 波长下调节吸光度为 0.700 ± 0.02 , 得到 ABTS 工作液, 30 ℃ 下预热备用。移取样品溶液 (0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL) 各 1 mL, 加入 2 mL 工作液, 混匀, 37 ℃ 下避光反应 30 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度, 蒸馏水调零。以无水乙醇代替样品加入 ABTS 工作液为空白, 维生素 C 和维生素 E 为对照, 计算清除率, 公式为清除率 = $(1 - A_{\text{样品}} / A_0) \times 100\%$, 其中 $A_{\text{样品}}$ 表示加入样品后吸光度, A_0 表示 ABTS 吸光度。

2.7 超氧阴离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$) 清除能力测定

参考文献 [11], 加入 0.1 mol/L Tris-HCl ($\text{pH} = 7.3$) 2.8 mL、60 mmol/L 邻苯三酚 0.1 mL、不同质量浓度 (0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL) 样品溶液各 0.1 mL, 于 319 nm 波长处测定吸光度 A_1 。以 10 mmol/L HCl 为对照, 于 319 nm 下测定吸光度 A_0 , 计算吸光度, 公式为清除率 = $[(\Delta A_0 - \Delta A_1) / \Delta A_0] \times 100\%$ (Δ 表示随着时间增加吸光度变化的差值, 本实验取第 30 s 和第 180 s 的差值)。

2.8 单因素试验 选择微波功率 (320 ~ 640 W)、提取时间 (2 ~ 20 min)、提取温度 (40 ~ 80 ℃)、

料液比（1：5～1：25）作为影响因素进行试验，按“2.3”项下方法测定多糖含有量，考察其对多糖提取率的影响。

2.9 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上进行 Box-Behnken 响应面设计，以提取时间（A）、提取温度（B）、料液比（C）为影响因素（由于受仪器自身条件影响，在单因素试验中得到的最佳微波功率是当时仪器最大使用功率，微波功率的峰型不是标准的“馒头形”，故不将其作为响应面设计的影响因素），多糖提取率为评价指标（Y）优化提取工艺，因素水平见表 1。

表 1 因素水平
Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取时间/min	B 提取温度/℃	C 料液比
-1	2	50	1：10
0	4	60	1：15
1	6	70	1：20

3 结果

3.1 抗氧化活性 多糖对 DPPH、ABTS、·OH 自由基清除率的 IC₅₀ 值分别为 0.560、0.117、2.644 mg/mL，并且当维生素 C 和维生素 E 与其质量浓度的数量级相同时，可达到完全清除的效果。多糖相当于 100 μmol/L FeSO₄ 清除能力所需的含有量为 0.814 mg/mL，但其对超氧阴离子自由基没有抗氧化能力，反而显示出微弱的助氧化作用。

3.2 工艺优化

3.2.1 单因素试验 固定提取时间 15 min，料液比 1：20，提取温度 60 ℃。图 1A 显示，多糖提取率在 640 W 时最高，为 39.11%，故确定最佳提取功率为 640 W。固定提取功率 640 W，料液比 1：20，提取温度 60 ℃；图 1B 显示，多糖提取率呈先升后降的趋势，在 4 min 时达到最高，为 59.30%，故确定最佳提取时间为 4 min。固定提取功率 640 W，提取温度 60 ℃，提取时间 4 min；图 1C 显示，随着料液比增加，多糖提取率先升后降，在 1：15 时达到最高，为 60.13%，故确定最佳料液比为 1：15；图 1D 显示，随着提取温度升高，多糖提取率先升后降，在 60 ℃时达到最高，为 59.91%，故确定最佳提取温度为 60 ℃。

3.2.2 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，选择提取时间（A）、提取温度（B）、料液比（C）作为影响因素，多糖提取率为评价指标（Y），结果见表 2。再进行回归拟合，得回归方程 $Y=0.61 -$

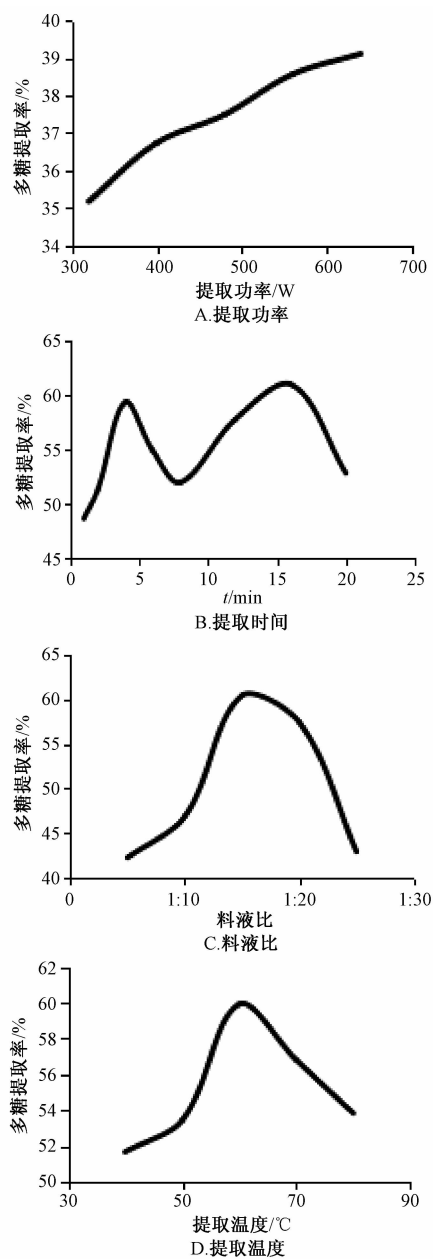


图 1 不同因素对多糖提取率的影响
Fig. 1 Effects of different factors on the extraction rate of polysaccharides

$$0.001\ 297A - 0.006\ 385B + 0.014C - 0.016AB + 0.020AC + 0.019BC - 0.044A^2 - 0.061B^2 - 0.029C^2.$$

对回归模型进行方差分析，结果见表 3。由表可知，回归项 $P < 0.000\ 1$ ，表明模型有显著性意义；失拟项 $P = 0.388\ 41 > 0.05$ ，表明模型拟合情况良好； R^2 为 0.954 0，表明响应值有 95.40% 的变化来源于所选变量。同时，模型中 C、AB、AC、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 有极显著意义（ $P < 0.000\ 1$ ），B 较显著（ $P < 0.05$ ），A 不显著（ $P > 0.05$ ），表明

提取工艺与多糖提取率的影响并不是简单的线性关系，而是各影响因素之间存在相互作用。

表 2 响应面设计结果

Tab. 2 Results of response surface design				
试验号	提取时间(A)	提取温度(B)	料液比(C)	Y 提取率/%
1	0	-1	1	52.11
2	0	0	0	60.52
3	1	0	1	56.06
4	0	-1	-1	52.34
5	0	0	0	60.52
6	-1	0	1	52.39
7	-1	-1	0	49.12
8	-1	0	-1	54.15
9	0	0	0	60.51
10	-1	1	0	51.16
11	0	1	1	54.38
12	1	0	-1	49.98
13	1	-1	0	51.99
14	0	1	-1	47.16
15	0	0	0	59.84
16	1	1	0	47.76
17	0	0	0	61.23

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance					
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.036 23	9	0.004 03	146.513 46	<0.000 1
A	0.000 01	1	0.000 01	0.489 72	0.506 63
B	0.000 33	1	0.000 33	11.869 82	0.010 76
C	0.001 60	1	0.001 60	58.126 71	0.000 12
AB	0.000 98	1	0.000 98	35.769 11	0.000 55
AC	0.001 53	1	0.001 53	55.858 27	0.000 14
BC	0.001 38	1	0.001 38	50.374 09	0.000 19
A ²	0.008 28	1	0.008 28	301.526 80	<0.000 1
B ²	0.015 56	1	0.015 56	566.551 58	<0.000 1
C ²	0.003 65	1	0.003 65	132.925 97	0.000 01
残差	0.000 19	7	0.000 03	—	—
失拟项	0.000 10	3	0.000 03	1.305 03	0.388 41
纯误差	0.000 10	4	0.000 02	—	—
总值	0.036 42	16	—	—	—

根据模型绘制响应面图，结果见图 2，可知各因素影响多糖提取率的程度依次为料液比>提取温度>提取时间。由此得到，最佳微波提取工艺为提取温度 60 ℃，提取时间 4 min，料液比 1：16，多糖提取率 60.70%。

3.3 验证试验 按照优化工艺进行验证试验，平行 3 次，测得多糖平均提取率为 60.67%，与理论值（60.70%）接近，表明该方法稳定可靠，预测性良好。

4 讨论

4.1 提取方法筛选 本实验分别采用超声提取、

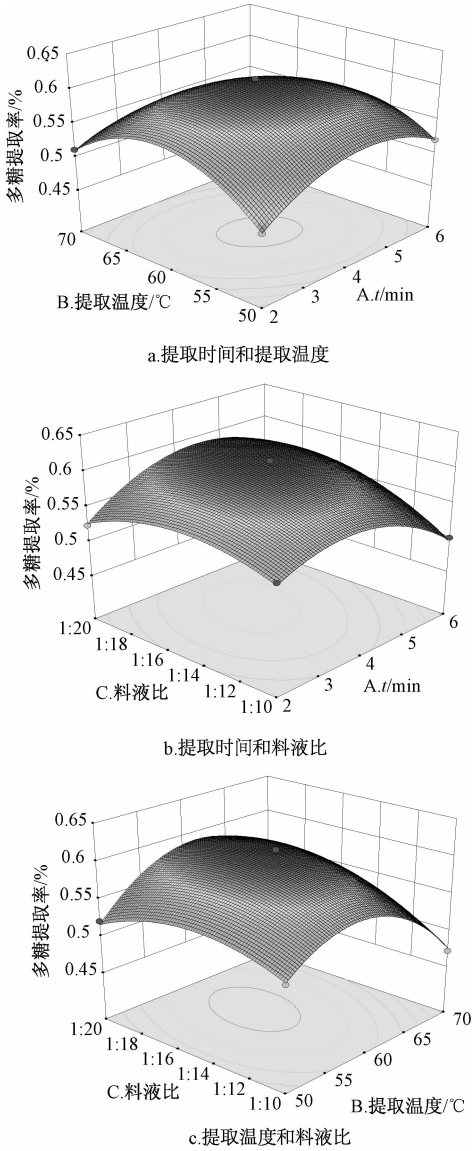


图 2 响应面图
Fig. 2 Response surface graphs

热水浸提、微波提取法提取川牛膝多糖，发现各方法对多糖含有量的影响程度依次为微波提取>超声提取>热水浸提。真空冷冻干燥后，多糖对 DPPH 自由基的清除能力在 3.0 mg/mL 时达到最大，各方法对其的影响程度依次为微波提取>热水浸提>超声提取。陈聪等^[12]报道，微波提取裂褶菌多糖的效果优于热水提取和超声提取，而且所用时间最短，与本实验结果一致。因此，选择微波提取法提取多糖。

4.2 干燥方法筛选 本实验分别采用微波干燥、水浴挥干、真空冷冻干燥、真空干燥法干燥川牛膝多糖，发现微波干燥后，多糖在 1.5 mg/mL 时清除浓度达到最大，而其他 3 种方法下多糖均在 3.0

mg/mL 时才达到最大。王红等^[13]报道，微波干燥能够最大程度保留芡实中总多糖、总酚和总黄酮类物质，并表现出最强的抗氧化活性。因此，选择微波干燥法干燥多糖。

4.3 药材生长年限筛选 本实验取 1、2、3 年生川牛膝，微波提取其多糖后进行微波干燥，测定抗氧化活性，发现 3 年生药材对 DPPH、ABTS、OH·自由基的清除能力以及总还原能力均显著强于 1、2 年生。因此，选择 3 年生川牛膝进行研究。

5 结论

刘传敏等^[14]采用酶解超声法提取川牛膝多糖，并进行正交试验设计，得出最佳提取工艺为样品粒度 20 目，料液比 1：40，超声时间 20 min，超声温度 60 ℃，多糖提取率 46.19%，并需酶解 1 h；赵磊等^[15]采用正交试验法优化了其热水浸提工艺，得到优化工艺为料液比 1：15，提取温度 60 ℃，提取 2 h，浸提 1 次，多糖提取率 49.18%，以上方法所需提取时间均较长，能源消耗均较大。本实验采用微波提取川牛膝多糖，得到最佳条件为提取功率 640 W，料液比 1：16，提取温度 60 ℃，提取时间 4 min，多糖提取率 60.67%，具有一定抗氧化活性。与前期报道相比，该方法在提高提取率的同时大大缩短提取时间，并节约了能源，有利于工业生产上的推广和应用。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[2] Han X, Shen S, Liu T, *et al.* Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from *Radix Cyathulae officinalis* Kuan[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72(6): 544-552.

[3] Feng H, Du X, Tang J, *et al.* Enhancement of the immune re-

sponses to foot-and-mouth disease vaccination in mice by oral administration of a novel polysaccharide from the roots of *Radix Cyathulae officinalis* Kuan (RC) [J]. *Cell Immunol*, 2013, 281(2): 111-121.

[4] 俞慧红, 竺巧玲, 戴 飞, 等. 多糖抗氧化作用的研究现状 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 172-176.

[5] 王 超, 王一民, 郭 飞, 等. 大枣多糖对 CFS 大鼠的免疫调节作用[J]. 西北大学学报：自然科学版, 2015, 45(1): 73-78.

[6] 曹科峰, 黄兵兵, 杨 帆. 麦冬多糖对 CC1₄ 诱导的急性肝损伤的保护作用及其作用机制研究 [J]. 中医导报, 2015, 21(14): 25-28.

[7] 邵金凤, 吴 卫, 蔡文国, 等. 土壤基本养分对川牛膝主要农艺性状和多糖含量的影响 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 215-219.

[8] Jahanbin K, Gohari A R, Moini S, *et al.* Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49(4): 567-572.

[9] 颜 军, 苟小军, 邹全付, 等. 分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟基自由基 [J]. 成都大学学报：自然科学版, 2009, 28(2): 91-93.

[10] Jin L, Guan X, Liu W, *et al.* Characterization and antioxidant activity of a polysaccharide extracted from *Sarcandra glabra* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 524-532.

[11] 韩少华, 朱靖博, 王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究 [J]. 中国酿造, 2009, 28(6): 155-157.

[12] 陈 聪, 钟 葵, 林伟静, 等. 固体发酵裂褶菌多糖提取方法比较 [J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1211-1215.

[13] 王 红, 吴启南, 蒋 征, 等. 干燥方式对芡实功能性成分含量及抗氧化活性的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(7): 19-25.

[14] 刘传敏, 邵 乐, 李金贵. 酶解超声法提取川牛膝多糖的正交试验研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2009, 28(5): 52-54.

[15] 赵 磊, 王书林, 杨 慧, 等. 川牛膝多糖提取工艺研究 [J]. 科技资讯, 2008(25): 5-6.