

何首乌中多糖的提取及清除羟自由基性能研究

吕丽爽, 周媛, 闫谨

(南京师范大学金陵女子学院食品科学与工程系, 江苏 南京

210097)

摘 要: 本实验探讨了何首乌多糖的提取纯化及其粗多糖对羟自由基的清除能力。考察了影响何首乌多糖的提取的工艺条件, 分别对提取料液比, 提取温度, 提取时间进行了研究。在此基础上利用响应面分析法确定最佳工艺条件为, 料液比 1:12, 温度为 84℃, 时间为 105min, 提取次数两次。此条件下多糖得率可达 19.14%。而后, 测定了经初步纯化的粗多糖清除羟自由基功能, 得到其 IC_{50} 为 0.27mg/ml。

关键词: 何首乌; 多糖; 提取

Study on Extraction and Scavenging Capacity of Hydroxyl Radical Polysaccharide from *Polygonum multiflorum* Thunb

LÜ Li-shuang, ZHOU Yuan, YAN Jin

(Department of Food Science and Technology, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Extraction and scavenging capacity of hydroxyl radical polysaccharide from *Polygonum multiflorum* Thunb were studied in this paper. The factors affecting the extraction of polysaccharide were investigated. Based on the single factors test, factors such as material to solvent ratio, extracting temperature and extracting time were optimized by orthogonal test. The optimum results are: material to ratio 1:12, temperature 84℃ and time 105 min. On these conditions the polysaccharides yield is up to 19.14%. The experimental results demonstrated that polysaccharide can scavenge hydroxyl radical, and IC_{50} is 0.27 mg/ml.

Key words *Polygonum multiflorum* Thunb; polysaccharide; hydroxyl radical

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0272-04

何首乌为 *Polygonum multiflorum* Thunb 是蓼科多年生缠绕草本植物, 喜生于温湿、腐殖质丰富的砂土中。全株都可入药, 尤以根部为佳^[1]。块根细长, 末端肥大, 外表红或暗褐色, 春、秋季采挖, 又称“首乌”, 是名贵中药材, 也是食疗保健佳品。按其炮制方法不同又有生首乌与制首乌之分。生首乌味苦、涩, 性平, 具有润肠、解毒和截疟之功; 制首乌味苦、甘、涩, 性温, 具有补肝肾、益精血、壮筋骨乌须发之效^[2-3]。

已有研究表明何首乌水煎剂、乙醇提取物有较好抗衰老作用^[4]。其多糖类成分在何首乌中含量较高, 制何首乌多糖类成分已有证明为其抗衰老的主要活性成分之一^[5-6]。文献报道, 何首乌多糖和枸杞多糖对各实验指标有显著或极显著的协同作用。多糖联用有显著的协同抗衰老作用, 两药最佳组合为 200mg:50mg。其机制可能与提高免疫功能, 清除氧自由基, 活性氧及抗脂质

过氧化有关^[7]。对于何首乌多糖对氧自由基及抗氧化酶活性的作用, 国内也有过相关研究, 实验利用亚急性衰老小鼠模型, 观察何首乌多糖对模型小鼠体内脂质过氧化产物及抗氧化酶活性的影响。结果表明, 何首乌多糖可显著提高模型小鼠体内抗氧化酶活性, 清除自由基及抑制脂质氧化^[8-9]。另外, 对于痴呆模型小鼠, 制何首乌多糖能够明显提高其学习记忆能力, 降低脑内脂褐质含量及单胺氧化酶活性, 提高脑内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及海马部位一氧化氮合酶活性。因此, 制何首乌多糖具有抗实验性痴呆作用^[10-11]。此外, 何首乌的免疫调节和抑制肿瘤的作用也在现代药理中有所提及^[12-13]。

本研究探讨何首乌中非淀粉多糖的提取工艺, 初步考察粗多糖清除羟自由基的能力。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-05-08

作者简介: 吕丽爽(1969-), 女, 讲师, 博士, 主要从事天然活性成分的分离纯化及功能性研究。

1.1 材料

何首乌 贵州安顺。

无水酒精乙醇、苯酚、浓硫酸、葡萄糖标准品(均为分析纯) 南京化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 预处理

何首乌→粉碎过筛(20目)→80%乙醇溶液提取(料液比1:10, 70℃恒温水浴, 搅拌1h)→抽滤→残渣以同样方法重复提取一次→通风干燥→得到预处理何首乌粉

1.2.2 多糖的测定方法

精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖标准品25mg, 置100ml容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成0.25mg/ml的标准溶液, 然后分别移取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0ml标准溶液, 置于10ml容量瓶中, 以蒸馏水定容至刻度, 摇匀、配成系列标准溶液。准确移取系列标准溶液各0.2ml置于10ml具塞试管中, 加入50g/L苯酚溶液0.4ml混合后, 迅速加入2.0ml浓硫酸, 混合均匀后, 室温放置30min, 在波长490nm测定吸光度, 以蒸馏水代替糖溶液作空白对照。以吸光度(A)为纵坐标、葡萄糖浓度(C)为横坐标作标准曲线。求得标准曲线 $y=4.1186x+0.0645$, $R=0.9956$ 。葡萄糖浓度在0~0.2mg/ml时呈线性关系。

1.2.3 多糖的提取工艺

1.2.3.1 料液比对水提工艺的影响

精确称取10.00g何首乌于锥形瓶中, 分别以料液比为1:7、1:10、1:12、1:15、1:20加入重蒸水于80℃条件下提取, 不断搅拌, 1h后于4000r/min下离心20min, 残渣以上述条件重复提取一次。合并两次上清液, 定容到250ml容量瓶中, 再从250ml容量瓶中吸取1ml到50ml容量瓶中, 测定多糖含量。

1.2.3.2 温度对水提工艺的影响

精确称取10.00g何首乌于锥形瓶中, 以料液比1:12加入重蒸水, 分别在60、70、80、90℃条件下不断搅拌, 1h后于4000r/min下离心20min, 残渣以上述条件重复提取一次。合并两次上清液, 定容到250ml容量瓶中, 再从250ml容量瓶中吸取1ml到50ml容量瓶中, 测定多糖含量。

1.2.3.3 时间对水提工艺的影响

精确称取10.00g何首乌于锥形瓶中, 以料液比1:12加入重蒸水, 于80℃条件下不断搅拌分别提取40、60、90、120、150min, 后于4000r/min下离心20min, 残渣以上述条件重复提取一次。合并两次上清液, 定容到250ml容量瓶中, 再从250ml容量瓶中吸取1ml到50ml

容量瓶中, 测定多糖含量。

1.2.3.4 中心组合试验对水提工艺的优化

指标: Y 为二苯乙烯苷的得率(%)。

因素: X_1 为料液比, 1:10~1:15; X_2 为温度, 75~85℃; X_3 为时间, 60~120min。

表1 中心组合试验方案
Table 1 Project of test scheme

水平	固液比	温度(℃)	时间(min)
1	1:10	75	60
2	1:12	80	90
3	1:15	85	120

1.3 放大验证实验

在最优条件下, 称取500g何首乌粉, 作放大验证实验。

1.4 粗多糖的初步纯化

何首乌粗多糖水提上清液减压浓缩→加4倍95%乙醇沉淀→静置→过滤→所得醇沉物溶于水→加入 α -淀粉酶(50℃)→水解至淀粉-碘化钾溶液不变蓝为止→沸水浴灭酶活→离心(4000r/min, 20min)→取上清液加4倍95%乙醇, 静置, 过滤→沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤→得到水提多糖粗提物→定量去离子水溶解→Sevag法去除游离蛋白质(氯仿:正丁醇=4:1)加入样品后充分振荡→萃取→离心(4000r/min, 20min)→上清液流水透析2d, 去离子水透析1d, →离心(4000r/min, 20min)浓缩, 冷冻干燥, 得到纯化后的多糖。

1.5 羟自由基($\cdot OH$)清除能力测定

选用VC- Cu^{2+} - H_2O_2 -酵母多糖体系^[14-15]产生 $\cdot OH$, 以不同浓度的各样品进行抑制, 用化学发光法测定。发光杯中依次加入2mmol/L的VC溶液200 μ l(现配), 2mmol/L的 $CuSO_4$ 溶液400 μ l, 75mg/ml的调理酵母多糖溶液100 μ l, 0.1mmol/L的鲁米诺溶液50 μ l和0.05mol/ml磷酸盐缓冲液(pH7.8)650 μ l, 30℃预恒温, 测定本底, 后迅速加入68mmol/L的 H_2O_2 溶液600 μ l, 启动发光反应测空白发光强度。样品组加100 μ l的待测样, 加缓冲溶液550 μ l补充到总体积为2ml。同样用68mmol/ml的 H_2O_2 600 μ l瞬时加样、启动发光反应, 立即用XCV程序连续测定, 取稳定值CPS为标准进行计算。清除率的计算如下:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(CP_0 - CP_s) - (CP_s - CP_b)}{CP_0 - CP_b} \times 100$$

式中, CP_0 为空白发光值; CP_s 为样品发光值; CP_b 为本底发光值, 很低, 可忽略不计。

2 结果与分析

2.1 料液比对水提工艺的影响

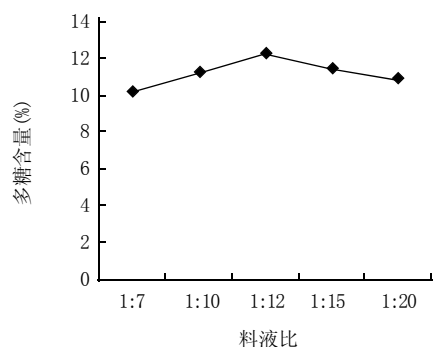


图1 料液比对多糖的得率的影响

Fig.1 Effects of ratio of solution to solid on polysaccharide yield

由图1可知,最适料液比为1:12,在料液比为1:12时,多糖的提取量最大。低于1:12时随料液比的增加多糖的提取量增加,当料液比超过1:12时,随着的料液比的增大,多糖的提取量先减少后趋于平稳。一般来说,溶剂用量越大提取效率越高,但是,过大的料液比会造成溶剂和能源的浪费,并给后工序的浓缩带来困难。当料液比大到一定程度时,溶剂已将有效成分基本溶出完全。再增大料液比,杂质成分会竞争溶出而不利有效成分的提取。

2.2 温度对水提工艺的影响

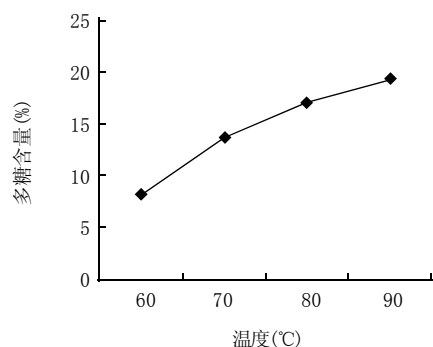


图2 温度对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of temperature on polysaccharide yield

何首乌多糖主要存在于细胞壁中,要提取多糖,首先要使细胞壁成分降解或分离,理论上需要较高的温度。由图2也可看出,随着提取温度的提高,提取得率也逐渐增加,各水平之间的差别达到极显著。提取温度以90℃为最佳。当然,90℃的提取温度正好处在本次实验所设计温度的上临界点上,进一步提高提取温度,多糖提取得率可能还能提高,大于90℃的温度需要压力容器设备投资增加很多,而且提取温度过高也会破坏多糖的生物活性,故可以认为90℃的提取温度就

是最佳的提取温度。

2.3 时间对水提工艺的影响

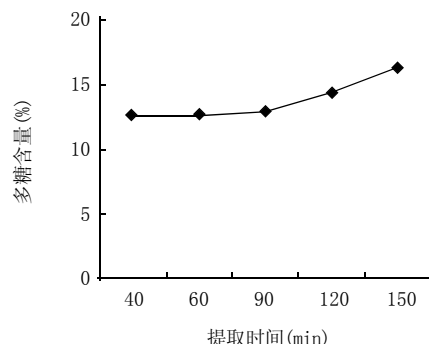


图3 提取时间对多糖得率的影响

Fig.3 Effects of time on polysaccharide yield

从图3结果可知,在90min前,多糖的提取量趋于平稳。而后多糖的提取效率随时间的增加而有所提高,提取时间过短时,多糖则从何首乌细胞中溶出,影响提取率。当提取达到一定时间时,有效成分浓度达到平衡,提取率最高。

2.4 中心组合试验优化多糖的提取工艺条件

表2 优化多糖提取工艺条件中心组合试验
Table 2 Test scheme and results

因素	X ₁ 料液比	X ₂ 温度(°C)	X ₃ 时间(min)	Y (%)
1	0(12)	-1(75)	-1(90)	10.61
2	0(12)	-1(75)	1(150)	17.35
3	0(12)	1(85)	-1(90)	18.52
4	0(12)	1(85)	1(150)	25.11
5	-1(10)	0(80)	-1(90)	18.34
6	-1(10)	0(80)	1(150)	20.02
7	1(15)	0(80)	-1(90)	15.22
8	1(15)	0(80)	1(150)	18.64
9	-1(10)	-1(75)	0(120)	15.64
10	-1(10)	1(85)	0(120)	19.30
11	1(15)	-1(75)	0(120)	11.33
12	1(15)	1(85)	0(120)	19.39
13	0(12)	0(80)	0(120)	17.35
14	0(12)	0(80)	0(120)	18.79
15	0(12)	0(80)	0(120)	17.74

由试验数据计算机程序回归拟合得回归方程为:

$$Y=17.73-0.72X_1+2.05X_2+1.30X_3-0.95X_1^2+1.35X_1X_2-1.11X_2^2+0.94X_1X_3-0.04X_3X_2+1.28X_3^2$$

根据方程得出,最佳工艺条件为:料液比1:12.63,温度为84.83℃,时间为104.63min。在此条件下多糖的得率为19.14%。考虑到实际工艺条件的可操作性,将参数调整为:料液比1:12,温度为84℃,时间为105min。

2.5 放大验证实验

在最优条件下所得实验结果为18.53%,与理论预测

值 19.14%，相差不大。表明采用响应面分析方法优化得到的提取工艺参数准确可靠，具有实用价值。

2.6 羟基自由基清除实验

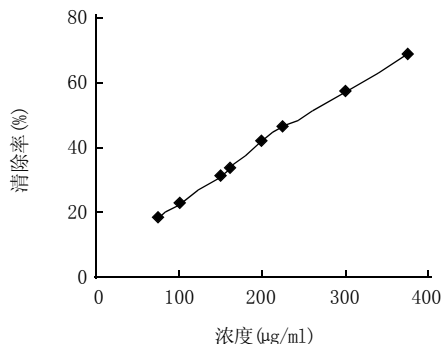


图4 何首乌多糖对羟基自由基的清除能力

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging activity to polysaccharide of PM

羟基自由基是几种自由基中反应活性最高的，羟基自由基的产生主要是通过Fenton 反应形成的，本体系是通过铜离子催化的Haber-Weiss 反应产生羟基自由基的。羟基自由基激发发光剂鲁米诺，使之发光，发光强度与羟基自由基的量呈正相关。由图4 可知，在一定浓度范围内，水提多糖具有羟基自由基清除能力，且随着浓度的增大，其羟基自由基清除能力也随之增强其半抑制率 0.27mg/ml。

3 结论

3.1 通过单因素试验确定影响何首乌粗多糖得率的三个主要因素为料液比、温度和提取时间。经过以中心组合试验优化，运用响应面分析法得出最佳工艺条件为：料液比为1:9，温度为84℃，提取时间为105min，提取次数为两次。在此条件下多糖得率可达18.14%。

3.2 在一定浓度范围内，水提多糖具有清除羟基自由基的能力，且清除率与多糖浓度呈正相关，其半抑制率 IC_{50} 0.27mg/ml。

参考文献：

- [1] 卫培峰, 焦晨莉, 陈丹丹. 何首乌现代药理研究进展[J]. 现代中医药, 2004(1): 57-58.
- [2] 苏玮, 郭群. 何首乌的现代药理研究概况[J]. 中草药, 1997, 28(2): 119-121.
- [3] 李军, 徐国钧, 徐璐珊, 等. 中药何首乌的研究[J]. 中草药, 1994(11): 578-579.
- [4] 中国医学科学院药物研究所, 等. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 487-494.
- [5] 苗明三, 方晓艳. 制何首乌多糖对衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5): 23-25.
- [6] 苗明三. 何首乌多糖对衰老模型小鼠组织的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2001(8): 40-43.
- [7] 许爱霞, 王彩琴, 杨社华, 等. 何首乌多糖和枸杞多糖的协同抗衰老作用机制的实验研究[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2005, 31(2): 13-16.
- [8] 许爱霞, 张振明, 葛斌, 等. 何首乌多糖对氧自由基及抗氧化酶活性的作用研究[J]. 中国药师, 2005, 11(8): 900-902.
- [9] KIMURA Y, OHMINAMI H. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum* spp. on liver injury in peroxidized oil-fed rat[J]. Planta Med, 1983, 49: 51-54.
- [10] 杨小燕. 制何首乌多糖对痴呆模型小鼠学习记忆能力及脑内酶活性的影响[J]. 药学进展, 2005, 29(12): 557-559.
- [11] ARICHI H, KIMURA Y. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* sieb. et Zucc on lipid metabolism[J]. Chem Pharm Bull, 1982, 30(5): 1766-1770.
- [12] 周金黄. 中药淫羊藿、何首乌延缓衰老与免疫调节作用[J]. 军事医学科学院院刊, 1991, 15(4): 295-299.
- [13] MARX J L. Oxygen free radical linked to many disease[J]. Science, 1987, 235: 520-524.
- [14] 曹炜, 尉亚辉, 郭斌. 用化学发光法研究蜂胶对氧自由基的清除作用[J]. 光子学报, 2002, 31(2): 162-164.
- [15] 胡博路, 杭瑚. 核桃壳抗氧化作用的研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(2): 22-23.

信息

纤维素发酵乙醇方法获突破

乙醇通常用玉米制造，何南施博士却认为有更好的方法，不必仰赖可以食用的作物。她的小组发展出一种酵母菌，可以把木屑或干草之类的植物废料变成纤维素乙醇，除了来源之外，性质与乙醇完全相同。这是何博士花了十多年研究的心血结晶。

美国生物科技业组织主管Brent Erickson说，这是这一行的重大突破，不必再靠玉米，能够利用农业纤维废料制造乙醇，也有助于减少仰赖进口石油。

何南施表示，她当前必须克服的一大障碍，就是促进纤维素乙醇的普及。她的小组正开发各种他们希望能够更快速制造更大量乙醇的酵母菌。普度大学今年更获得美国能源部提供500万美元赠款，以协助她的研究工作。