

曹剑锋,任朝辉,芦静波,等. 百尾参多糖的提取工艺及其抗氧化性评价[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):343-346.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.099

# 百尾参多糖的提取工艺及抗氧化性评价

曹剑锋<sup>1,2</sup>, 任朝辉<sup>3</sup>, 芦静波<sup>4</sup>, 王自布<sup>1</sup>, 夏慧芳<sup>1</sup>, 夏丽莎<sup>1</sup>, 刘 丹<sup>1</sup>

(1. 贵州师范学院贵州省生物资源开发利用特色重点实验室, 贵州贵阳 550018; 2. 贵州师范学院转化与分离研究所, 贵州贵阳 550018;  
3. 贵州师范大学, 贵州贵阳 550001; 4. 皖南医学院, 安徽芜湖 241002)

**摘要:**水提醇沉法提取百尾参多糖,以多糖得率为指标,考察提取时间、提取温度、料液比、提取次数对多糖提取量的影响,在单因素试验基础上以正交试验优化提取工艺参数。通过测定百尾参多糖清除 1,1-二苯基-2-苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基和 ·OH 自由基能力、还原力及螯合力来评价其抗氧化活性。结果表明,百尾参多糖水提取的最佳工艺条件为提取温度 100 ℃、提取时间 4 h、料液比 1 g : 50 mL、提取次数 4 次,在此条件下,百尾参多糖的提取率为 15.68%,以正交试验极差分析得出,温度对百尾参多糖提取影响最大。百尾参多糖清除 DPPH 自由基和 ·OH 自由基、还原力及螯合力的 IC<sub>50</sub> 值分别是 4.8、1.8、3.9、0.24 mg/mL,百尾参多糖具有显著体外抗氧化活性。

**关键词:**百尾参;多糖;提取;抗氧化

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0343-04

百尾参为百合科(Liliaceae)万寿竹属(*Disporum*)植物万寿竹[*Disporum cantoniense*(Lour.) Merr.]的根及根茎,别称白味参、白龙须等。百尾参为多年生草本药用植物,在中国南北均有分布,具有润肺止咳、健脾消积的功效,传统用于虚损咳嗽、痰中带血、肠风下血、食积胀满等症状<sup>[1-2]</sup>。以百尾参为主药的市售复方制剂有贵州百灵生产的咳速停系列药物。陈磊等对其化学成分研究发现,百尾参含有多种活性成分,如黄

酮类化合物以及糖苷类化合物、萜类以及挥发油、有机酸等<sup>[3-6]</sup>。现代药理学研究表明,百尾参具有止咳、抗菌、抗炎等多种药理作用<sup>[7-8]</sup>;关于百尾参多糖提取的工艺研究未见报道。本研究以百尾参为原料,水提醇沉法提取多糖。在单因素试验基础上以正交试验对百尾参多糖提取工艺进行优化,通过测定百尾参多糖清除 1,1-二苯基-2-苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基和 ·OH 自由基能、还原力及螯合力来评价其抗氧化活性。为百尾参多糖在食品及相关领域的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

百尾参药材采自贵州省安顺市,经贵州师范学院鉴定为百合科(Liliaceae)万寿竹属(*Disporum*)植物万寿竹[*Disporum*

收稿日期:2016-03-08

基金项目:贵州省教育厅自然科学基金(编号:黔教合 KY 字[2015]374);贵州省科技厅自然科学基金(编号:黔科合 J 字[2013]2233);贵州省应用化学特色重点学科建设项目(编号:黔教科研发[2012]442)。

作者简介:曹剑锋(1971—),男,甘肃天水人,博士,副教授,研究方向为天然药物。Tel:(0851)-85816647;E-mail:cj266@126.com。

[2]彭志兵,吴正平. 高效液相色谱-质谱法分析金花葵中金丝桃苷[J]. 安徽农业科学,2008,36(23):10028-10029.

[3]夏文宽. 菜芙蓉花中黄酮的提取及抗氧化性分析[D]. 镇江:江苏大学,2007.

[4]蔡碧琼. 稻壳黄酮类化合物的提取、精制及抗氧化活性研究[D]. 福州:福建师范大学,2008.

[5]严志慧. 芹菜黄酮的分离与纯化技术研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2009.

[6] Li W X. Standardization of method for determination of flavone in tartary buckwheat and its products[M]. Beijing:China Agricultural Science & Technology Press,2006:38-45.

[7]吴亚琼. 柑橘皮黄酮提取、纯化和抗氧化性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.

[8]王克勤,严志慧,罗军武,等. 聚酰胺树脂分离纯化芹菜黄酮的工艺研究[J]. 食品与机械,2009,25(3):46-50.

[9]董珂. 大孔树脂技术在中药研究中的应用概况[J]. 药学实践杂志,2006,24(1):13-16.

[10]李 萍. 大孔吸附树脂在中草药有效成分研究中的应用[J]. 天津药学,2002,14(3):9-11.

[11]郭永学,李 楠,杨美燕,等. 大孔吸附树脂在中草药研究中的应用进展[J]. 药品评价,2004,1(5):378.

[12]吴名全,雷 波. 金花葵中总黄酮的提取纯化及含量测定[J]. 农技服务,2009,26(10):127,138.

[13]陆志科,谢碧霞. 大孔树脂对竹叶黄酮的吸附分离特性研究[J]. 经济林研究,2003,21(3):1-4.

[14]肖坤福,廖晓峰,于 容,等. HPD-600 树脂对多穗柯总黄酮的吸附性能研究[J]. 广州食品工业科技,2005,19(4):10-11.

[15]王冬梅,李 瑛,杨秀萍,等. 大孔吸附树脂提取分离翅果油树叶总黄酮的研究[J]. 西北植物学报,2003,23(9):1621-1624.

[16]刘锡建,王艳辉,马润宇. 利用大孔吸附树脂精制沙棘总黄酮工艺的研究[J]. 中国油脂,2004,29(5):37-39.

[17]任顺成,丁霄霖. 大孔树脂对玉米须类黄酮的吸附分离特性研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(12):17-21.

[18]钱庭宝. 吸附树脂及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,1990.

cantoniense (Lour. ) Merr. ] ; ferrozine , DPPH , 梯希爱 ( 上海 ) 化成工业发展有限公司 ; 95% 乙醇溶液、苯酚、浓硫酸、铁氰化钾、氯化亚铁、葡萄糖、磷酸氢钾、维生素 C 等均为国产分析纯。

恒温水浴锅,上海梅香仪器有限公司生产;真空抽滤机,郑州长城科工贸有限公司生产;电子天平,上海精密科技仪器有限公司生产;冻干机,河南兄弟仪器设备有限公司生产;分光光度计,上海精密科技仪器有限公司生产;离心机,江苏正基仪器有限公司生产;干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 水提醇沉提取工艺 百尾参干粉→蒸馏水浸提→4 000 r/min 离心 10 min→上清→减压浓缩至原体积 10%→4 倍体积乙醇醇沉→3 500 r/min 离心 10 min→沉淀物→洗涤→百尾参粗多糖。

1.2.2 多糖得率测定与计算 多糖含量以苯酚-硫酸法测定<sup>[9]</sup>。以干燥至恒质量的葡萄糖配制标准液,于 490 nm 波长处测得的吸光度,绘制标准曲线,得葡萄糖标准曲线方程,计算多糖得率:

提取率 =  $\frac{\text{比色液浓度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数} \times 250}{\text{供试样品质量}(\text{g}) \times 10^6} \times 100\%$ 。

1.2.3 单因素试验和正交试验设计 参照杨林等的方法<sup>[10]</sup>设置单因素试验:考察提取温度、提取时间、料液比、提取次数对多糖提取率的影响。并对多糖提取率进行计算,每组试验重复 3 次。

在单因素试验的基础上,以百尾参多糖提取率(Y)为响应值,提取温度(A),提取时间(B),料液比(C)、提取次数(D)为试验因素,在 4 因素 3 水平上对百尾参多糖提取工艺进行优化,正交试验因素水平见表 1。

1.2.4 多糖纯化 将百尾参粗多糖以活性炭脱色、savage 法脱蛋白,经醇沉后透析、冷冻干燥<sup>[11-12]</sup>;即得到纯化后的热水浸提的多糖。此纯化的多糖用于后续抗氧化活性评价试验。

表 1 白尾参多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	因素			
	A:提取温度 (℃)	B:提取时间 (h)	C:料液比 (g : mL)	提取次数 (次)
1	80	2	1 : 40	2
2	90	3	1 : 50	3
3	100	4	1 : 60	4

1.2.5 多糖的抗氧化活性

1.2.5.1 DPPH 清除活性测定 参照韦献雅等的方法<sup>[13-14]</sup>,稍有改动,用 95% 乙醇配制浓度为  $2 \times 10^{-4}$  mol/L 的 DPPH 溶液。取“1.2.4”节制备的多糖样品配制 40、80、160、320、640、1 280、2 000  $\mu\text{g/mL}$  百尾参糖溶液,在 8 支试管中分别加入各质量浓度的样品糖溶液和蒸馏水 2 mL,精确加入 2 mL DPPH 溶液,混匀 30 min 后 517 nm 测定吸光值,以维生素 C 为对照,每份样品平行操作 3 次,根据公式(1)计算 DPPH 清除率:

DPPH 清除率 =  $(D_0 - D_{\text{样品}}) / D_0 \times 100\%$ 。 (1)

式中: $D_0$  为 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水混合后的吸光度; $D_{\text{样品}}$  为 2 mL DPPH 乙醇溶液与样品混合后的吸光度。

1.2.5.2 清除·OH 能力的测定 参照葛霞等、吴向阳等的方法<sup>[15-16]</sup>,取“1.2.4”节制备的多糖样品配制 80、160、320、640、1 280、2 560、4 000  $\mu\text{g/mL}$  的糖样品溶液,在 8 支 10 mL 的试管中分别加入 3 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液 1 mL,3 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL,0.05% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 1 mL,立即混匀,再分别加入各质量浓度样品糖溶液 1 mL,蒸馏水管为空白对照。37℃反应 30 min 后 510 nm 测量吸光度。以维生素 C 为对照,每份样品平行操作 3 次,根据公式(2)计算·OH 清除率:

清除率 =  $(D_0 - D_{\text{样品}}) / D_0 \times 100\%$ 。 (2)

式中: $D_0$  为空白对照液的吸光值; $D_{\text{样品}}$  为加入不同浓度糖溶液的吸光值。

1.2.5.3  $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力的测定 参照文献[17]的方法将“1.2.4”节制备的多糖样品配制成 80、160、320、640、1 280、2 560、4 000  $\mu\text{g/mL}$  的溶液,在 9 支试管中分别再加入 3.7 mL 蒸馏水,0.1 mL 2 mmol 的  $\text{FeCl}_2$  溶液,分别加入各质量浓度样品液 1 mL,混合均匀后加入 0.2 mL 5 mmol/L 的 ferrozine 启动反应,空白管为不加糖液蒸馏水管,标准管用蒸馏水代替  $\text{FeCl}_2$  溶液,室温放置 30 min 后 562 nm 处测定吸光度,以 EDTA 做对照,每份样品平行操作 3 次。根据公式(3)计算金属螯合能力(%):

金属螯合能力 =  $[D_0 - (D_{\text{样品}} - D_{\text{标准}})] / D_0 \times 100\%$ 。 (3)  
式中: $D_0$  为空白对照的吸光值; $D_{\text{样品}}$  为加入不同浓度糖溶液的吸光值; $D_{\text{标准}}$  为蒸馏水代替  $\text{FeCl}_2$  溶液的吸光值。

1.2.5.4 总还原能力的测定 参照文献[18]的方法加以适当改进,在 8 支试管中分别加入 0、80、160、320、640、1 280、2 560、4 000  $\mu\text{g/mL}$  “1.2.4”节制备的多糖样品溶液 0.2 mL,再加入 0.5 mL 磷酸缓冲液(0.2 mol/L,pH 值 6.6)和 0.5 mL 1% 铁氰化钾。混匀后在 50℃放置 20 min,加入 0.5 mL 10% 三氯乙酸后 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 1 mL,加入 1 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁,混匀后在 700 nm 波长下测定吸光度  $D$ 。以维生素 C 为对照。平行测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

对葡萄糖标准溶液与对应的吸光度,绘制葡萄糖标准曲线,拟合线性方程为  $y = 0.016 11x, r^2 = 0.9992$ ,可根据方程计算多糖得率。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对粗多糖提取率的影响 从图 1 可以看出,开始随着料液比的增加,多糖的得率随之增加,当料液比为 1 g : 60 mL 时多糖得率达到最高,随后随着料液比的继续增加,多糖提取得率并没有明显增加,并呈稍下降趋势。

2.2.2 温度对粗多糖提取率的影响 从图 2 可以看出,起初随着温度的升高,百尾参多糖的得率相应增加。当温度达到 90℃时多糖提取率达到最高,到 100℃时则稍有降低。

2.2.3 时间对粗多糖提取率的影响 从图 3 可以看出,随着时间延长,百尾参多糖的得率增加,3.0 h 达到最高值,当提取时间大于 3.0 h 时,多糖的得率有所下降。

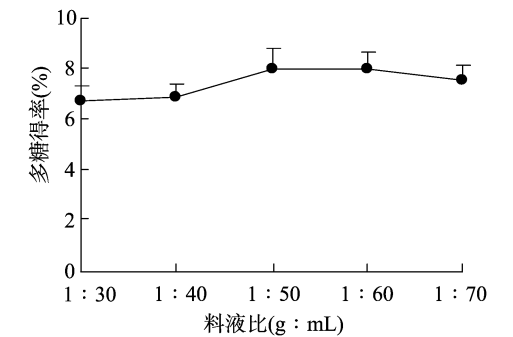


图1 料液比对多糖得率的影响

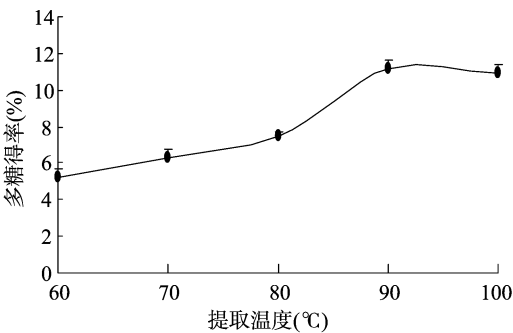


图2 提取温度对多糖提取量的影响

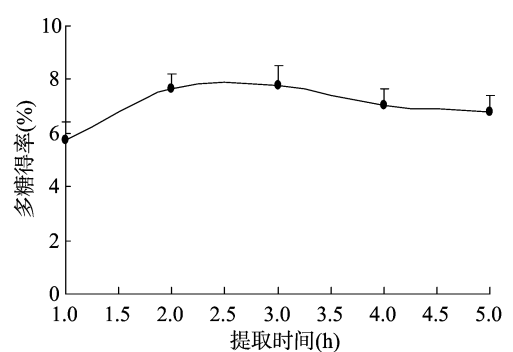


图3 提取时间对多糖得率的影响

2.2.4 提取次数对多糖提取率的影响 从图4可以看出,随着提取次数的增多,多糖得率逐渐增加。但是从第3次开始,随着提取次数增多,百尾参多糖的得率虽有继续增加趋势,但增加量不明显。

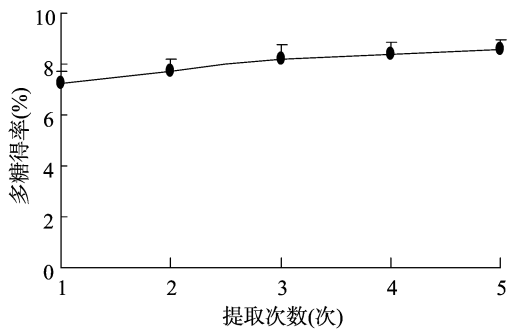


图4 提取次数对多糖得率的影响

2.3 正交试验设计优化百尾参多糖提取工艺

百尾参多糖提取工艺正交试验结果见表2,影响总多糖得率的因素主次顺序为A>B>C>D。通过分析4个因素的

影响,最优提取工艺组合为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即浸提温度为100℃,浸提时间4h,料液比1g:50mL,浸提次数4次。在此条件下重复进行验证试验3次,多糖得率分别为15.67%、15.63%、15.76%,多糖的平均提取率为15.68%。说明此提取条件稳定可靠,多糖得率高。

表2 百尾参多糖提取工艺正交试验设计与结果

试验号	A:提取温度(℃)	B:提取时间(h)	C:料液比(g:mL)	D:提取次数(次)	多糖提取率(%)
1	80	2	1:40	2	9.30
2	80	3	1:50	3	12.90
3	80	4	1:60	4	13.54
4	90	2	1:50	4	11.38
5	90	3	1:60	2	12.99
6	90	4	1:40	3	14.30
7	100	2	1:60	3	12.41
8	100	3	1:40	4	14.26
9	100	4	1:50	2	15.56
k <sub>1</sub>	11.91	13.36	12.62	12.62	
k <sub>2</sub>	12.89	13.38	13.28	12.87	
k <sub>3</sub>	14.08	14.47	12.98	13.06	
R	2.18	1.11	0.66	0.44	

百尾参多糖极差分析结果见表3,可知提取温度对试验结果具有极显著影响,其次是提取时间有显著影响,而提取次数和料液比对试验结果没有显著性影响。

表3 正交试验方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	7.665	2	11.271	**
B	2.421	2	4.248	*
C	0.655	2	0.736	
D	0.310	2		
误差	0.615			

注:“\*”“\*\*”分别表示影响显著、极显著。

2.4 百尾参多糖的抗氧化能力

2.4.1 羟自由基清除能力 从图5可以看出,百尾参多糖随着质量浓度增加对羟自由基清除率逐渐升高,IC<sub>50</sub>为2.7mg/mL。说明百尾参多糖具有清除羟自由基的能力,但较维生素C的清除能力低。

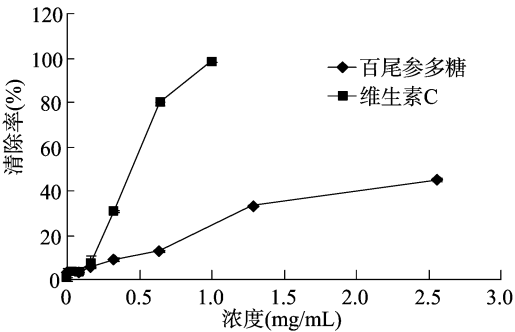


图5 百尾参多糖对羟自由基的清除能力

2.4.2 DPPH 自由基清除能力 从图6可以看出,百尾参多糖对DPPH自由基具有一定的清除作用,其清除能力随样品质量浓度增加而增强(半数抑制浓度IC<sub>50</sub>为8.4mg/mL),相比之下百尾参多糖对DPPH自由基的清除作用较维生素C弱。

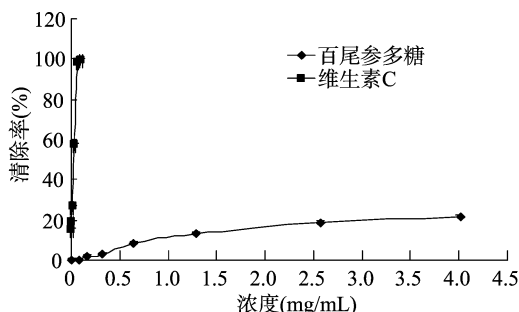


图6 百尾参多糖对DPPH自由基的清除能力

2.4.3 百尾参多糖的金属螯合力 从图7可以看出,百尾参多糖在较小浓度时随着质量浓度增加对金属的螯合力迅速升高,当多糖质量浓度为0.32 mg/mL时,对金属螯合力达80%以上,显示了较强的螯合金属离子或惰化金属离子的能力,IC<sub>50</sub>值为0.24 mg/mL。

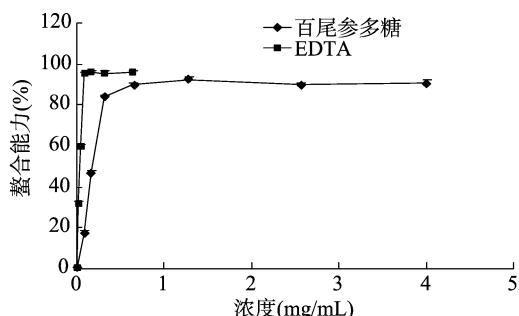


图7 百尾参多糖的螯合能力

2.4.4 百尾参多糖的还原能力 从图8可以看出,维生素C的吸光度随着质量浓度的增加明显上升,与维生素C的吸光度相比百尾参多糖随浓度增加吸光度增加缓慢,但呈现较好的量效关系,表明还原能力逐渐增强,抗氧化能力也增强。IC<sub>50</sub>为3.9 mg/mL。

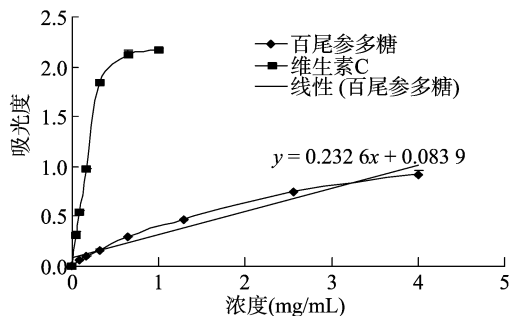


图8 百尾参多糖的还原能力

### 3 结论

通过正交设计得出百尾参多糖的最佳工艺条件为:提取温度 100 ℃,提取时间 4 h,提取次数 4 次,料液比 1 g : 50 mL,在此条件下多糖得率 15.68%,该优化结果对百尾参多糖开发利用和生产有重要的参考价值。体外抗氧化试

验结果表明,百尾参多糖对羟自由基和 DPPH 自由基都有一定的清除能力,且具有一定的还原力和较强的金属螯合能力,表明百尾参多糖具有较好的抗氧化活性。因而百尾参多糖在天然抗氧化剂和功能食品的开发方面都有良好的应用潜力。

### 参考文献:

- [1] 邱德文,杜江. 中华本草(苗药卷)[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:54-55.
- [2] 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]. 2003年版. 贵阳:贵州科技出版社,2003:162.
- [3] 吴文利,张雁萍,王道平,等. 野生和人工栽培百尾参挥发油 GC-MS 分析[J]. 贵阳医学院学报,2011,36(3):255-258.
- [4] 甘秀海,赵超,梁志远,等. 百尾参化学成分研究[J]. 贵州师范大学学报:自然科学版,2014,32(1):64-66.
- [5] 陈磊. 百合科两种药用植物化学成分及生物活性研究[D]. 天津:天津大学,2009.
- [6] Chen L, Su Y F, Yin Z Y, et al. Flavonoids from *Disporum cantoniense* (Liliaceae) [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2009, 37(5):609-612.
- [7] 任朝辉,曹剑锋,夏丽莎,等. 百尾参祛痰止咳、抗炎作用研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(11):116-118.
- [8] 甘秀海,梁志远,王瑞. 百尾参抑菌活性研究[J]. 贵阳学院学报:自然科学版,2012,7(1):43-44,52.
- [9] 王文平,郭祀远,李琳,等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学,2007,28(4):276-279.
- [10] 杨林,刘翠花,刘刚,等. 西藏野生尊麻水溶性多糖提取工艺的优化设计[J]. 食品工业科技,2013,34(2):35-37.
- [11] Chen Y, Xie M Y, Li W J, et al. An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from lingzhi (*Ganoderma atrum*) [J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(1):191-198.
- [12] 程超,李伟,汪兴平. 平菇水溶性多糖结构表征与体外抗氧化作用[J]. 食品科学,2005,26(8):55-57.
- [13] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学,2014,35(9):317-322.
- [14] Li W, Liang H, Zhang M W, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp from different commercially available cultivars [J]. Molecules, 2012, 17(12):14954-14967.
- [15] 葛霞,陈婷婷,蔡教英,等. 青钱柳多糖抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报,2011,11(5):59-64.
- [16] 吴向阳,范群艳,仰榴青,等. 匙羹藤粗多糖的提取及其清除羟自由基活性研究[J]. 食品科学,2008,29(1):107-110.
- [17] 杨少辉,宋英今,王清华,等. 雪莲果体外抗氧化和自由基清除能力[J]. 食品科学,2010,31(17):166-169.
- [18] Tung Y T, Wu J H, Huang C Y, et al. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(1):509-514.