

林志奎,金晓怀,张传海,等. 超声辅助提取多花黄精多糖工艺及生物活性研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):221-225.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.052

超声辅助提取多花黄精多糖工艺及生物活性研究

林志奎¹, 金晓怀², 张传海³, 李宝银⁴, 华伟平³

(1. 武夷学院分析测试中心,福建武夷山 354300; 2. 武夷学院玉山健康管理学院,福建武夷山 354300;
3. 福建省生态产业绿色技术重点实验室,福建武夷山 354300; 4. 福建江夏学院,福建福州 350108)

摘要:以多花黄精为材料,采用超声波辅助法提取粗多糖,研究超声波处理时间、料液比、超声功率对多糖含量的影响,并对多花黄精多糖的羟基自由基清除能力和牛血清荧光淬灭能力进行评价。结果表明,最佳的提取工艺为料液比为 1:20(g:mL),超声时间为 20 min,超声功率为 810 W;在此条件下,测得杉木林多花黄精多糖含量为 108.57 mg/g。采用吡啶红比色法测得毛竹林多花黄精多糖对羟基自由基的清除率为 97.72%;利用牛血清蛋白荧光淬灭效应测得天然阔叶林多花黄精的多糖对 BSA 蛋白淬灭能力为 85.38%。

关键词:多花黄精;林下套种;多糖;牛血清;自由基;提取工艺;生物活性

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)20-0221-05

多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua)为百合科(Liliaceae)黄精属多年生草本植物,是百合科黄精属中质量最佳、药效最好的药材之一。现代药理学研究证明,多花黄精具有抗衰老、抗肿瘤、降血糖、降血脂、防动脉硬化、抗病毒、抗菌、提高机体免疫力等多种药理作用^[1]。其中,多糖含量是多花黄精根茎的有效药用成分,也是衡量其药材质量的主要指标之一^[2]。

目前,国内学者对多花黄精进行了组培方面的研究工作。如黄云鹏等对在毛竹林、阔叶树林、杉木林、马尾松 4 种林分类型下套种的多花黄精的根茎多糖含量及生长量进行了分析^[3];樊艳荣等研究了毛竹林下套种的多花黄精生长情况^[4-5];郑林森分析了杉木林上层密度对多花黄精根茎产量的影响^[6]。这些主要是考察多花黄精的多糖类成分检测。

用超声波辅助提取多花黄精多糖与生物活性的研究还未见报道,本研究采用正交法对多花黄精超声波辅助提取工艺进行优化,并探讨多糖提取物对羟基自由基的清除情况和牛血清的淬灭情况,为福建地区的多花黄精开发利用提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

原料:2017 年 10 月于福建省邵武市朱山村(福建南武夷药博园)中 4 种林(杉木林、天然阔叶林、毛竹林、人工阔叶林)林下采得多花黄精块茎,经武夷学院张传海教授鉴定为多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua),百合科,黄精属。取

其块茎,洗净,烘干,粉碎,过 60 目筛。

试剂:*D*-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-201205,含量 99.5%),牛血清蛋白(上海展云化工有限公司,批号:1408207,分子量:67000),硫酸、苯酚、三氯乙酸、吡啶红、罗丹明 B、十二烷基苯磺酸钠、七水合硫酸亚铁、30%过氧化氢、三氨基甲烷、浓盐酸、氯化钠、正丁醇,以上试剂为分析纯。水为二次蒸馏水(自制)。

仪器:电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9070A(上海福玛实验设备有限公司),超声波清洗机 S10H(致微(厦门)仪器有限公司),荧光分光光度计 F-4500(日立公司),高速药物粉碎机 WK-400A(山东省青州市精诚医药制造有限公司),循环真空泵 SHB-II(河南省郑州长城科工贸有限公司),电子天平 BS224SS(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 多花黄精多糖含量方法的建立

1.2.1.1 显色反应 准确移取 1.00 mL 样品溶液于具塞比色管中,加入 1.00 mL 6% 的苯酚,迅速加入 5.00 mL 98% 硫酸,静置 10 min,定容到 25 mL,于 80 ℃ 水浴中加热 30 min,即显色完成^[7]。用荧光分光光度计在激发波长 200~700 nm、发射波长 200~700 nm 下进行 3D 同步扫描,仪器工作条件:电压为 700 V;激发狭缝为 5 nm;发射狭缝为 5 nm;扫描速度为 1 200 nm/min。并采用荧光分光光度计自带软件 flsol.exe 进行 3D 数据处理。

1.2.1.2 标准曲线的制作 吸取 0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 mL 的 2.00 mg/mL 葡萄糖标准溶液,分别置于 7 支 25 mL 比色管中。参考“1.2.1.1”节步骤显色完毕后,在激发波长 $\lambda_{ex}=376$ nm 和发射波长 $\lambda_{em}=390$ nm 下测定其荧光值 *A*。以浓度(mg/mL)为横坐标、荧光值为纵坐标作图,并进行线性回归,得到回归方程。

1.2.1.3 多花黄精多糖含量的测定 准确称取多花黄精粉末 0.500 0 g,按照确定的优化条件,进行超声提取;提取液经过抽滤和减压浓缩后,将浓缩液与三氯乙酸-正丁醇溶液 1:1 混合,在 -10 ℃ 下以 12 000 r/min 离心,除去蛋白,取下

收稿日期:2018-06-29

基金项目:福建科技厅项目(编号:2017Y00076);中央引导地方科技发展专项(编号:2018L3018);福建省生态产业绿色技术重点实验室资助项目(编号:WYKF2017-8);武夷学院校级课题(编号:XP201807)。

作者简介:林志奎(1981—),男,福建永泰人,硕士,实验师,主要从事天然产物研究与开发研究。E-mail:158843453@qq.com。

通信作者:张传海,博士,教授,研究方向为天然产物研究与开发。E-mail:190070900@qq.com。

层清液 10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中定容,按“1.2.1.1”步骤显色后,测定其荧光值 A 。然后根据“1.2.1.2”节的多糖标准曲线和回归方程,得到各样品测试液的多糖浓度 (mg/mL);再按式(1)计算不同样品的多糖含量。

$$\text{多糖含量} = \frac{C \times N \times V}{m \times 1\,000} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为稀释后样品溶液多糖的浓度,mg/mL; N 为稀释倍数; V 为最初定容体积,mL; m 为样品质量,g。

1.2.1.4 单因素试验 以多花黄精提取液的多糖含量为指标,分别对料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30, g: mL),超声功率(60%、70%、80%、90%、100%),超声时间(10、15、20、25、30 min)等有关因素进行考察和分析,确定适宜的水平,每组试验重复3次。

1.2.1.5 正交试验 本研究在单因素优化的基础上,设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,进一步考察了料液比(g: mL)、超声功率(W)、超声时间(min)等3个影响因素,以确定最优提取工艺条件。因素与水平见表1。

表1 $L_9(3^3)$ 正交试验因素水平

水平	因素		
	A:料液比 (g: mL)	B:超声功率 (W)	C:超声时间 (min)
1	1:15	720	20
2	1:20	810	25
3	1:25	900	30

1.2.2 多糖提取的方法学考察

1.2.2.1 验证试验 准确称取多花黄精粉末5份,每份0.500 0 g,按照最佳提取工艺提取,显色完成后立即测荧光值,计算多花黄精多糖平均提取率和含量。

1.2.2.2 精密度试验 准确称取多花黄精粉末0.500 0 g,按照最佳提取工艺提取,显色完成后立即连续6次测定溶液的测荧光值,计算其RSD值。

1.2.3.3 稳定性试验 准确称取多花黄精粉末0.500 0 g,按照最佳提取工艺提取,显色完成后立即测吸光度,之后每隔1 h测1次荧光值,考察6 h内多糖的稳定性。

1.2.2.4 加样回收试验 准确称取多花黄精粉末5份,每份0.500 0 g,按照最佳提取工艺提取,得到多花黄精待测液。取该待测液0.50 mL于具塞试管中,再加入2.00 mg/mL葡萄糖标准液0.50 mL,显色完成后测其荧光值。计算多花黄精糖平均加样回收率。

1.2.3 羟基自由基的清除作用

1.2.3.1 激发波长与发射波长的确定 参照吖啶红光度法^[8]进行测定,取2支10 mL具塞比色管,在1支中加入 2.40×10^{-5} mol/L 吖啶红溶液、 9.60×10^{-5} mol/L 罗丹明B溶液、 5.00×10^{-2} mol/L DBS溶液、0.80 mol/L H_2SO_4 溶液、 8.00×10^{-4} mol/L $FeSO_4$ 溶液各0.50 mL,在另1支多加0.50 mL H_2O_2 (质量分数0.6%),定容到10 mL,反应30 min后,测定其荧光强度,分别记为 A_a 、 A_b ,则自由基产生量可用 $\Delta A = A_a - A_b$ 表示。荧光工作参数测定与“1.2.1.1”节相同。

在该体系中,未加Fenton试剂及多糖体系的荧光值记为 A_1 ;未加多糖体系的荧光值记为 A_2 ;加入多糖提取液、葡萄糖标准溶液或者维生素C对照液1.00 mL后,测定体系的荧光

值为 A_3 。按公式(2)计算多糖对羟基自由基的清除率:

$$\text{清除率} = \frac{A_3 - A_2}{A_1 - A_2} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 牛血清蛋白荧光淬灭效应的测定 参照李丽萍等的方法^[9-10]进行。吸取0.50 mL浓度为 2×10^{-5} mol/L的牛血清蛋白(BSA)溶液,1.00 mL pH值7.40 Tris-HCl缓冲液(含0.30 mol/L NaCl),各自加入1.00~10.00 mL的葡萄糖试液、多花黄精多糖试液,用纯水定容至25.00 mL,25℃恒温静置5 min后,测定其荧光强度,荧光工作参数的测定与“1.2.1.1”节相同。同时考察BSA蛋白淬灭方程关系,并计算牛血清蛋白的荧光淬灭率。按公式(3)计算多糖提取液对BSA蛋白淬灭率:

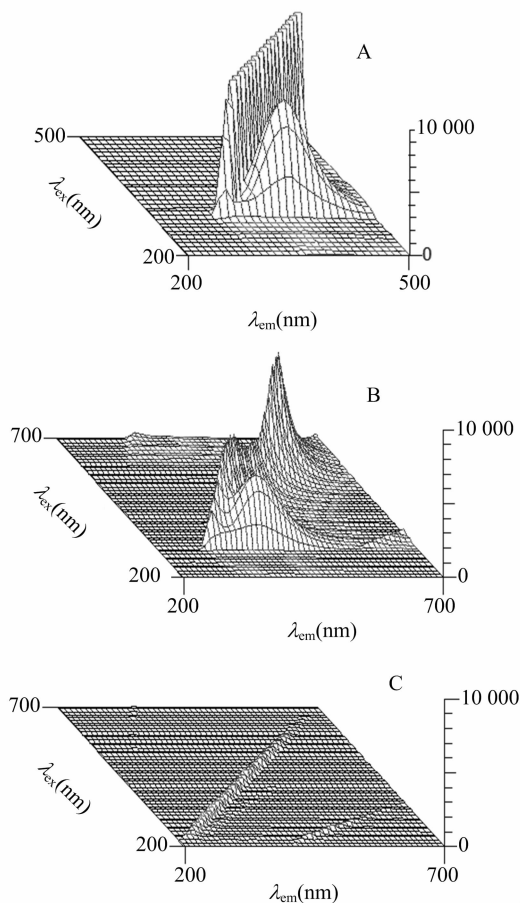
$$\text{淬灭率} = \frac{A_1' - A_2'}{A_1'} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_1' 为加入多糖提取液荧光值, A_2' 为不加入多糖提取液荧光值。

2 结果与分析

2.1 荧光测定多糖含量的最大激发波长与发射波长确定

运用荧光分光光度计分别对多糖、葡萄糖标样和空白试样进行3D扫描,以确定多花黄精多糖的最佳激发波长和发射波长,结果见图1。确定本试验的检测条件为激发波长 $\lambda_{ex} = 376$ nm,发射波长 $\lambda_{em} = 390$ nm。



A—多糖提取液; B—葡萄糖标样; C—空白样

图1 荧光激发波长和发射波长

2.2 葡萄糖标准曲线的绘制

依照“1.2.1.2”节所描述的步骤方法测定葡萄糖的荧光值,得到回归方程 $y = 19\ 206x + 49.636$, $r = 0.996\ 6$ 。线性范围:0 ~ 64 $\mu\text{g/mL}$ 。

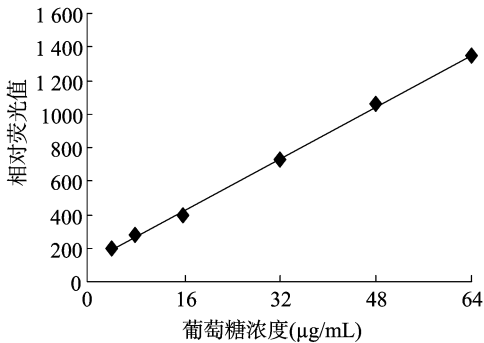


图2 葡萄糖标准曲线

2.3 单因素试验

2.3.1 提取功率对多糖提取率的影响 固定料液比

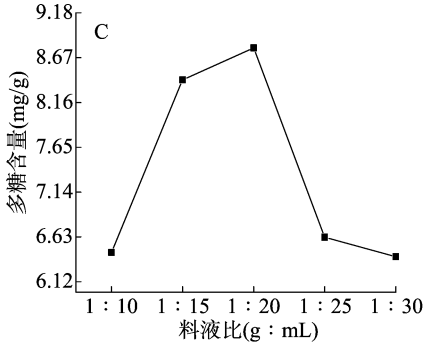
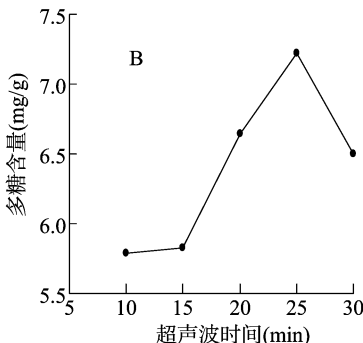
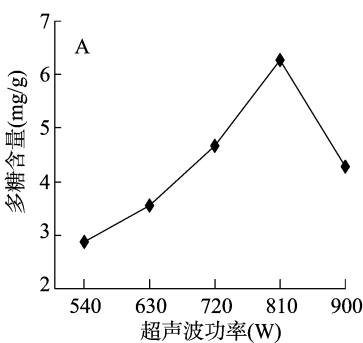


图3 超声功率、超声时间、料液比对多糖提取的影响

2.4 正交试验

在单因素试验的基础上设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,进一步考察超声时间、料液比、超声功率对多糖含量的影响,以确定最佳的提取工艺条件。正交试验结果见表2。

由表2正交试验结果可以看出,A、B、C 3种因素中,因素C极差值最大,因素A极差值最小,3种因素中对试验影响的主次顺序依次是超声时间 > 超声功率 > 料液比。多糖最佳提取工艺组合是 $A_2B_2C_1$,即料液比为 1 g : 20 mL、超声时间为 20 min、超声功率为 810 W,此时多花黄精的多糖提取率最高。

2.5 多花黄精多糖最佳提取工艺的方法学考察

验证试验:多花黄精多糖含量为 93.06 mg/g ($n = 5$)。

精密度试验:连续6次所测吸光度的 $RSD = 1.97\%$ ($n = 6$),说明仪器精密度好。

稳定性试验:多花黄精吸光度的 $RSD = 1.74\%$ ($n = 6$),说明在6 h内,多花黄精样品溶液中的多糖采用本研究的显色方法比较稳定。

加样回收试验:多花黄精多糖的平均加样回收率为 105.35%, $RSD = 1.33\%$ ($n = 5$)。

2.6 不同林分类型多花黄精多糖含量测定

按照“1.2.1.3”节试验步骤准确称取4种不同类型林分的多花黄精根茎粉末0.500 0 g,按照最佳提取工艺条件提取

1 g : 20 mL、提取时间 25 min,选择一定提取功率(540、630、720、810、900 W)进行多花黄精多糖提取,平行测定3次,其多糖含量如图3-A所示。在超声波功率为810 W时候,多花黄精多糖的含量达到6.28 mg/g ,而后下降,因此最适宜的超声波功率为810 W。

2.3.2 提取时间对多糖含量的影响 固定超声功率810 W、料液比 1 g : 20 mL,选择一定提取时间(10、15、20、25、30 min)进行多花黄精多糖提取,平行测定3次,其多糖含量如图3-B所示。在超声波时间为25 min时候,多花黄精多糖的含量达到7.72 mg/g ,而后下降,因此最适宜的超声波时间为25 min。

2.3.3 料液比对多糖含量的影响 固定超声功率810 W、超声时间25 min,选择不同的料液比(1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30, $\text{g} : \text{mL}$)进行多花黄精多糖提取,平行测定3次,其多糖含量如图3-C所示。在料液比为1 g : 20 mL时候,多花黄精多糖的含量达到8.78 mg/g ,而后下降,因此选择料液比1 g : 20 mL为佳。

表2 $L_9(3^3)$ 正交试验设计与结果

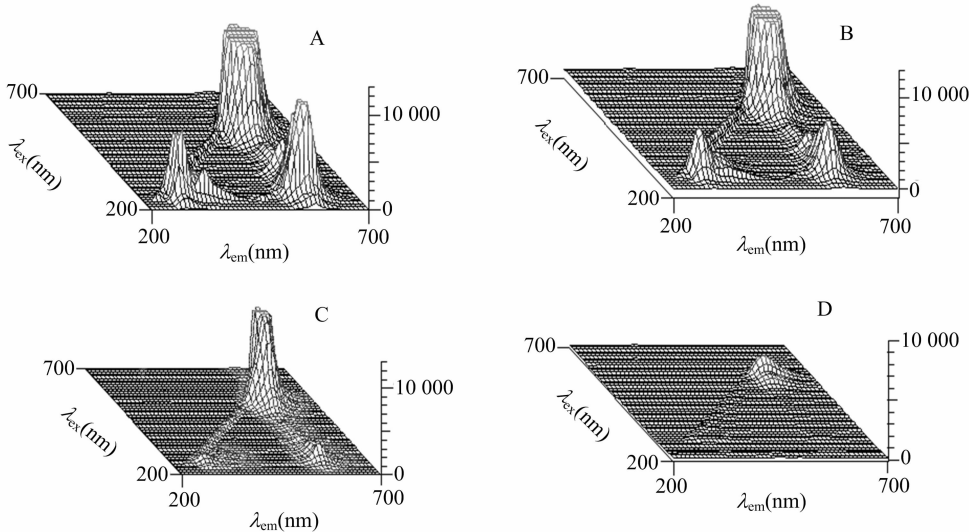
编号	因素			多糖含量 (mg/g)
	A:料液比 ($\text{g} : \text{mL}$)	B:超声功率 (W)	C:超声时间 (min)	
1	$A_1(1 : 15)$	$B_1(720)$	$C_1(20)$	7.89
2	$A_2(1 : 20)$	$B_2(810)$	$C_2(25)$	8.19
3	$A_3(1 : 25)$	$B_3(900)$	$C_3(30)$	7.13
4	$A_1(1 : 15)$	$B_2(810)$	$C_3(30)$	8.34
5	$A_2(1 : 20)$	$B_3(900)$	$C_1(20)$	8.61
6	$A_3(1 : 25)$	$B_1(720)$	$C_2(25)$	8.47
7	$A_1(1 : 15)$	$B_3(900)$	$C_2(25)$	7.42
8	$A_2(1 : 20)$	$B_1(720)$	$C_3(30)$	7.50
9	$A_3(1 : 25)$	$B_2(810)$	$C_1(20)$	8.26
k_1	7.88	7.95	8.25	
k_2	8.10	8.26	8.03	
k_3	7.95	7.72	7.66	
极差 R	0.22	0.54	0.59	

多花黄精多糖,并测定多糖的含量,结果见表3。

由表3可见,杉木林的多花黄精的多糖含量为108.57 mg/g ,明显高于其他3组,而天然阔叶林、毛竹林、人工阔叶林3组之间差异不大。

表 3 4 种林分类型多花黄精的多糖含量

编号	林分类型	荧光强度	多糖含量 (mg/g)
1	人工阔叶林	447.90	93.06
2	天然阔叶林	464.90	97.48
3	毛竹林	470.70	98.99
4	杉木林	507.50	108.57



A—A₁ 3D 扫描; B—A₂ 3D 扫描; C—葡萄糖标样 3D 扫描; D—V_c 样品 3D 扫描

图4 羟基自由基清除试验

2.7.2 多花黄精多糖对·OH 的清除率 按上述“1.2.3.1”节试验步骤,测定多花黄精多糖提取液对·OH 的清除作用,并代入公式(2)计算其清除率,结果见表 4。试验表明,对羟基自由基的清除能力表现为毛竹林>人工阔叶林>杉木林>天然阔叶林,其中,毛竹林下套种的多花黄精的多糖对·OH 的清除率最高,达到 97.72%。

表 4 不同林分类型多花黄精多糖对羟基自由基的清除作用

编号	测试体系	荧光强度	清除率 (%)
1	A ₁	2 450.00	
2	A ₂	703.30	
3	A ₃₋₁ 人工阔叶林	2 314.27	92.23
4	A ₃₋₂ 天然阔叶林	2 033.39	76.15
5	A ₃₋₃ 毛竹林	2 410.17	97.72
6	A ₃₋₄ 杉木林	2 126.32	81.47

2.7.3 多糖提取液、葡萄糖标液、维生素 C 对照液对·OH 清除作用比较 测试体系中分别加入 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.50、2.00、3.00 mL 葡萄糖标准溶液、多花黄精多糖提取液、维生素 C 标准溶液,进行体外羟基自由基清除能力检测,试验结果见图 5。由图 5 可知,随着样品加入量的增多,对于羟基自由基的清除率也在增大。当多糖提取液加入量超过 2.00 mL 后,其羟基自由基清除能力超过 97%。

2.8 牛血清蛋白的淬灭试验

2.8.1 激发波长与发射波长的确定 通过荧光分光光度计

2.7 多花黄精多糖对羟基自由基的清除能力

2.7.1 激发波长与发射波长的确定 运用荧光分光光度计分别对“1.2.3.1”节中的 A₁、A₂、葡萄糖标准溶液或者维生素 C 对照液进行 3D 扫描,以确定清除·OH 的最佳激发波长和发射波长,结果见图 4。确定本试验的检测条件为激发波长 λ_{ex}=561 nm,发射波长 λ_{em}=575 nm。其中,A₁ 的荧光强度为 2 450.00,A₂ 的荧光强度为 703.30。

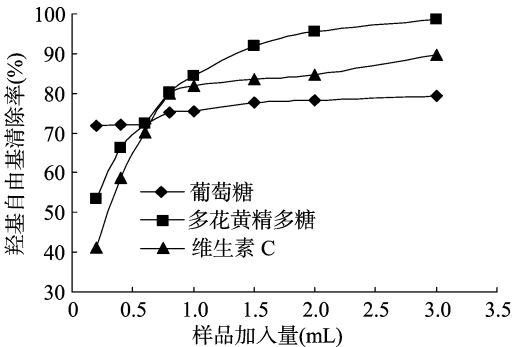
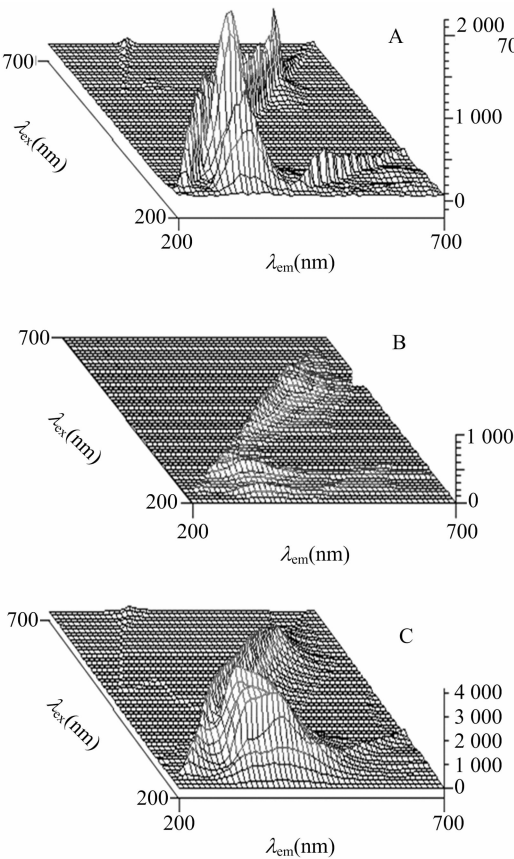


图5 多花黄精多糖提取液与葡萄糖、维生素 C 对羟基自由基清除能力的比较

分别对多糖、维生素 C 和空白试样进行 3D 扫描,确定多花黄精多糖与 BSA 相互作用的最佳激发波长和发射波长,结果如图 6。根据 3D 预扫描的结果和多次试验,最终确定测试条件为 λ_{ex}=282 nm,λ_{em}=353 nm。

2.8.2 多糖含量与 BSA 蛋白淬灭作用 试验体系中分别加入 1.00~10.00 mL 葡萄糖标准溶液、多花黄精多糖提取液,考察各自与 BSA 的相互作用,结果见图 7。代入公式(3)计算其淬灭率,结果见表 5。

由图 7 可知,随着葡萄糖和多花黄精多糖提取液加入量的增加,由于与 BSA 之间产生了结合反应,体系中的荧光强度都呈规律性递减,对 BSA 起到了一定的荧光淬灭作用。葡萄糖与 BSA 相互作用的指数方程是 y = -454.6ln(x) +



A—空白样 3D 扫描; B——多糖提取液 3D 扫描;
C——葡萄糖标样 3D 扫描
图6 BSA 蛋白淬灭试验

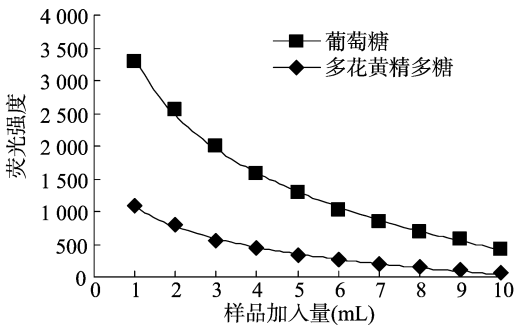


图7 葡萄糖和多花黄精多糖提取液与 BSA 结合作用的荧光淬灭效应

表 5 4 种不同林分类型多花黄精多糖对 BSA 淬灭率

编号	多糖来源	荧光强度	淬灭率 (%)
1	A ₁ '	1 731.00	
2	A ₂₋₁ '人工阔叶林	355.60	79.46
3	A ₂₋₂ '天然阔叶林	253.00	85.38
4	A ₂₋₃ '毛竹林	262.50	84.84
5	A ₂₋₄ '杉木林	280.60	83.79

1 085.3($r=0.997\ 6$);多花黄精多糖提取液与 BSA 结合作用的指数方程为 $y=-1\ 278\ln(x)+3\ 359.7(r=0.999\ 1)$ 。

由表 5 可知,对 4 种林分类型淬灭率进行对比,表现为天然阔叶林>毛竹林>杉木林>人工阔叶林,天然阔叶林的多花黄精的多糖对 BSA 蛋白淬灭能力最强,达到 85.38%。

3 结论与讨论

本研究以多花黄精为研究对象,探讨并优化超声波辅助提取多花黄精多糖的提取工艺,对多花黄精多糖的羟基自由基清除率和牛血清蛋白淬灭率进行评价。结果表明,在料液比为 1 g:20 mL、超声时间为 20 min、超声功率为 810 W 的条件下,测得杉木林、天然阔叶林、毛竹林、人工阔叶林下套种多花黄精多糖含量为 108.57、97.48、98.99、93.06 mg/g;采用吡啶红比色法在最佳波长 $\lambda_{\text{ex}}=561\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=575\text{ nm}$ 下,测得毛竹林、人工阔叶林、杉木林、天然阔叶林多花黄精多糖对羟基自由基的清除率为 97.72%、92.23%、81.47%、76.15%;利用牛血清蛋白荧光淬灭效应在最佳波长 $\lambda_{\text{ex}}=282\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}}=353\text{ nm}$ 下,测得天然阔叶林、毛竹林、杉木林、人工阔叶林多花黄精的多糖对 BSA 蛋白淬灭能力为 85.38%、84.84%、83.79%、79.46%。

杉木林多花黄精多糖含量最高,为 108.57 mg/g;毛竹林多花黄精的多糖对·OH 的清除率最高,为 97.72%;天然阔叶林多花黄精的多糖对 BSA 蛋白淬灭能力最强,为 85.38%。造成多花黄精多糖含量、自由基清除率、BSA 蛋白淬灭率差异的机制可能还与栽培方式、施肥状况、种植年限等因素有关,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2009.

[2] 陈 晔,孙晓生. 黄精的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):328-330.

[3] 黄云鹏,王邦富,范繁荣,等. 林分类型及郁闭度对多花黄精根茎多糖含量的影响[J]. 中国农学通报,2016,32(10):102-105.

[4] 樊艳荣,陈双林,杨清平,等. 毛竹材用林林下植被群落结构对多花黄精生长的影响[J]. 生态学报,2014,34(6):1471-1480.

[5] 樊艳荣,陈双林,杨清平,等. 毛竹林下多花黄精种群生长和生物量分配的立竹密度效应[J]. 浙江农林大学学报,2013,30(2):199-205.

[6] 郑林森. 杉木林下多花黄精种植试验研究[J]. 林业勘察设计,2012,1(1):155-157.

[7] 张晓鹤,谢 红,张泗达,等. 吡啶红-罗丹明 B 体系光度法测定马蹄皮提取物清除羟自由基作用[J]. 化学工程师,2012(11):15-17,25.

[8] 罗杨合,范 瑜,蒋治良,等. 吡啶红光度法测定荸荠皮的抗氧化活性[J]. 江西师范大学学报(自然科学版),2008,32(3):277-280.

[9] 李丽萍,杨雪滢,单香丽,等. 芦丁与牛血清蛋白在不同条件下的相互作用研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2012,34(1):72-76,83.

[10] 张传海,林志奎,李宝银,等. 闽北林下种植多花黄精的总黄酮含量分析及其生物活性评价[J]. 天然产物研究与开发,2017,30(2):1-10.