

木贼麻黄多糖的提取及体外抗氧化活性研究

齐佳慧, 韩秋菊*, 王菲, 李薇, 王战勇(辽宁石油化工大学, 辽宁 抚顺 113001)

摘要: 目的 优化木贼麻黄多糖的提取工艺, 初步研究木贼麻黄多糖的体外抗氧化活性。方法 采用热水浸提法提取木贼麻黄多糖, 利用单因素试验结合响应面法对提取条件进行优化, 并研究木贼麻黄多糖的体外抗氧化活性。结果 木贼麻黄多糖的最佳提取条件为: 提取时间 2.5 h, 提取温度 73 ℃, 液料比 25:1, 在此条件下多糖提取率为(5.57±0.072)%。木贼麻黄多糖对 DPPH 自由基和羟基自由基具有较强的清除能力, IC₅₀ 分别为 703.9 μg·mL⁻¹ 和 2 135.1 μg·mL⁻¹; 对超氧阴离子自由基具有一定的清除能力, 对 Fe³⁺ 有一定的还原能力。结论 该提取工艺能较好地提取木贼麻黄多糖, 所得木贼麻黄多糖具有一定的体外抗氧化能力, 但活性低于同浓度的维生素 C。

关键词: 木贼麻黄; 多糖; 提取; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2018)09-1342-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.09.016

引用本文: 齐佳慧, 韩秋菊, 王菲, 等. 木贼麻黄多糖的提取及体外抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1342-1346.

Research of Polysaccharides Extraction from *Ephedra Equisetina* Bunge. and Its Antioxidant Activity *in Vitro*

QI Jiahui, HAN Qiuju*, WANG Fei, LI Wei, WANG Zhanyong(Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction condition of the polysaccharides from *Ephedra equisetina* Bunge. and study its antioxidant activity *in vitro*. **METHODS** The polysaccharides were extracted from *Ephedra equisetina* Bunge. by hot water extraction. The single factor tests and response surface methodology were used to optimize the extraction condition. The antioxidant activity *in vitro* was evaluated by artificial free radicals in detail. **RESULTS** The optimum extraction condition was: extraction time 2.5 h, extraction temperature 73 ℃, ratio of liquid to material 25:1. Under the optimum condition, the yield was (5.57±0.072)%. The antioxidant activity *in vitro* showed that the polysaccharide from *Ephedra equisetina* Bunge. had a better scavenging effect on DPPH radical and hydroxyl radical with IC₅₀ of 703.9 μg·mL⁻¹ and 2 135.1 μg·mL⁻¹ respectively, and had a lower scavenging effect on superoxide anion radical and weak reductive effect on Fe³⁺. **CONCLUSION** The extraction condition is suitable to extract the polysaccharides from *Ephedra equisetina* Bunge. and the polysaccharide has certain antioxidant capacity *in vitro* but less than vitamin C.

KEY WORDS: *Ephedra equisetina* Bunge.; polysaccharide; extraction; antioxidant activity

木贼麻黄(*Ephedra equisetina* Bunge.)是麻黄科植物, 产于河北、山西、内蒙古、陕西西部、甘肃及新疆等省区, 为常用中药材。麻黄类中药应用历史悠久, 资源丰富, 具有发汗解表, 宣肺平喘, 利尿消肿的功效^[1-2], 其化学成分主要有生物碱类、挥发油类、黄酮类、萜类、多糖类、氨基酸类、鞣质类、有机酸类以及一些酚类化合物^[3-4]。目前对麻黄碱的研究较多, 但关于麻黄碱的不良反应报道日益增加, 影响了麻黄资源的开发利用。

已有研究表明麻黄多糖具有降血糖、降血压、抗凝血、调节机体免疫^[5-7]等作用, 且不良反应小,

因此已经越来越受到研究者的重视。本实验通过单因素试验结合响应面优化试验确定木贼麻黄多糖的最佳提取条件, 并初步研究木贼麻黄多糖的体外抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

木贼麻黄(2014 年采收, 批号: 1409001), 产自内蒙古, 经辽宁石油化工大学韩秋菊副教授鉴定为麻黄科麻黄属木贼麻黄的干燥草质茎。

浓硫酸、苯酚购自北京鼎国生物技术有限公司; 葡萄糖, 无水乙醇、氯化钠、蛋白酶 E 购自美国 Sigma 公司; 硝酸银、三氯甲烷、正丁醇、

基金项目: 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2014040)

作者简介: 齐佳慧, 女 Tel: (024)56861617 E-mail: 29173393@qq.com
E-mail: hanqj280@163.com

*通信作者: 韩秋菊, 女, 博士, 副教授 Tel: 15898330898

二甲苯、抗坏血酸(VC)、1,1-二苯基-2-苦基苯肼、邻苯三酚、水杨酸钠、硫酸亚铁、过氧化氢、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三羟基氨基甲烷、铁氰化钾、三氯化铁、盐酸等购自国药集团化学试剂有限公司。

DUG-9021A 电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); UV-2600 分光光度计(上海龙尼克仪器有限公司); SHB-II 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); ALPHA1-2LD PLUS 型冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司); Fw800 型高速万能粉碎机(常州国旺仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 木贼麻黄多糖的提取 将木贼麻黄材料粉碎, 过 80 目筛, 60 °C 烘干至恒重。用 80%乙醇在 75 °C 下回流脱脂 6 h, 过滤, 真空干燥, 得木贼麻黄样品粉末。称取 5.0 g 木贼麻黄粉, 加入一定量的蒸馏水, 在不同的提取条件下提取多糖。提取液离心去除固体粉末, 上清液加入 3 倍体积无水乙醇进行沉淀, 离心收集沉淀, 沉淀物用无水乙醇和无水乙醇交替洗涤 3 次, 置于干燥阴凉处晾干得粗多糖样品。用蒸馏水溶解粗多糖, 检测多糖含量。

1.2.2 木贼麻黄多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法^[8]测定多糖含量, 葡萄糖标准曲线: $y=0.0071x+0.0100$, $R^2=0.9990$ 。根据标准曲线计算样品中多糖含量, 根据下式计算木贼麻黄多糖提取率: 木贼麻黄多糖提取率(%)=样品多糖质量×100%/样品质量。

1.2.3 木贼麻黄多糖提取单因素试验 预实验结果显示提取次数对木贼麻黄多糖提取率影响较小, 所以单因素试验设定各可变因素的参数分别为: 提取时间 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h; 提取温度 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C; 液料比 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1。固定因素设定为: 提取时间 2.0 h、提取温度 80 °C、液料比 20:1。

1.2.4 响应面优化试验设计 根据单因素试验结果, 对提取时间(A)、提取温度(B)、液料比(C)3 个因素进行 3 水平 Box-Behnken 试验设计, 取值范围及试验水平见表 1。以各条件下木贼麻黄多糖提取率为响应值进行统计学回归分析。

表 1 Box-Behnken 试验因素与水平设计表

Tab. 1 Factors and levels of Box-Behnken experiment

试验水平	因素		
	提取时间(A)/h	提取温度(B)/°C	液料比(C)
-1	2.0	60	20:1
0	2.5	70	25:1
1	3.0	80	30:1

1.2.5 木贼麻黄多糖除蛋白杂质^[9] 将提取得到的木贼麻黄多糖充分溶于蒸馏水中, 按照酶:蛋白为 1:50 的比例加入 50 mg·mL⁻¹蛋白酶 E 进行酶解。按 1%的比例加入 NaCl 作为蛋白酶 E 的激活剂, 然后将溶液分装于透析袋内, 加 2 滴二甲苯防腐, 于 37 °C 1%的 NaCl 溶液中酶解 24 h。酶解后使用蒸馏水透析, 直至透析液里滴加 AgNO₃ 溶液不产生沉淀为止。然后加入 Sevag 试剂(三氯甲烷:正丁醇=4:1), 样品与 Sevag 试剂的比例为 4:1, 充分震荡混匀至液体浑浊, 离心, 收集上层多糖溶液, 如此反复萃取, 直至上层糖液和下层有机相之间无蛋白层为止。最后冷冻干燥得到木贼麻黄多糖。

1.2.6 木贼麻黄多糖体外抗氧化活性检测

1.2.6.1 清除 DPPH 自由基能力的测定^[10] 取 2 mL 0.2 mmol·L⁻¹的 DPPH 溶液, 加入 1 mL 待测样品及 1 mL H₂O, 混匀, 室温反应 30 min, 在 517 nm 处测定样品吸光值 A_i 。空白组用 H₂O 代替样品, 其余同样品组, 测得空白组吸光值 A_0 。维生素 C(VC)作为阳性对照。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%$$

1.2.6.2 清除超氧阴离子自由基能力的测定^[11]

取 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.5 mL, 加入 4.2 mL H₂O, 混匀后于 25 °C 恒温水浴中保温 20 min, 同时将样品和 25 mmol·L⁻¹邻苯三酚溶液一起放入 25 °C 水浴中预热。保温 20 min 后加入 1 mL 待测样品和 0.4 mL 邻苯三酚溶液, 迅速混匀后于 25 °C 反应 5 min, 之后加入 1 mL 8 mmol·L⁻¹ HCl 终止反应, 于 320 nm 处测得样品吸光值 A_i 。空白组用 H₂O 代替样品, 其余同样品组, 测得空白组吸光值 A_0 。VC 作阳性对照。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%$$

1.2.6.3 清除羟基自由基能力的测定^[12] 取 10 mmol·L⁻¹水杨酸钠-乙醇溶液、10 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 溶液、待测样品各 1 mL, 混匀后 37 °C 恒

温水浴反应 30 min, 之后加入 1 mL 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 溶液终止反应, 于 510 nm 处测得样品吸光值 A_t 。空白组用 H₂O 代替样品, 其余同样品组, 测得空白组吸光值 A_0 , A_0 为不加 H₂O₂ 的本底吸光值。VC 作为阳性对照。清除率计算公式为:

$$\text{清除率/\%} = 1 - \frac{A_t - A_0}{A_0} \times 100\%$$

1.2.6.4 总还原力的测定^[13] 取 2.5 mL 0.2 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲溶液, 2.5 mL 1% 的 K₃Fe(CN)₆ 溶液和 2 mL 待测样品, 混匀后 50 ℃ 水浴保温 30 min, 之后加入 2.5 mL H₂O 和 0.5 mL 0.1% 的 FeCl₃ 溶液, 混匀, 于 700 nm 处测得样品吸光值 A_t 。空白组用 H₂O 代替样品, 其余同样品组, 测得空白组吸光值 A_0 。VC 作为阳性对照。总还原力计算公式为: 还原力= $A_t - A_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

提取时间对木贼麻黄多糖提取率的影响见图 1。木贼麻黄多糖的提取率随着提取时间的延长而增加, 提取 2.5 h 时, 提取率达到最大值, 继续增加提取时间则提取率有所下降。因此选择提取时间为 2.5 h 左右。

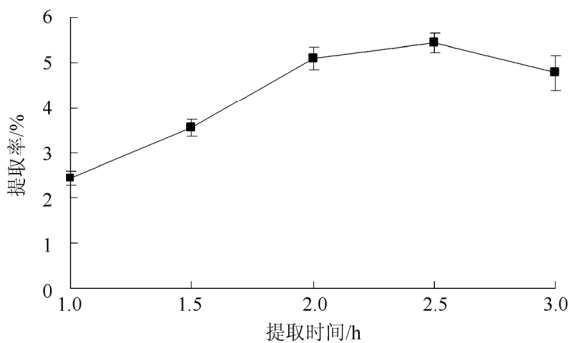


图 1 提取时间对木贼麻黄多糖提取率的影响

Fig. 1 The effect of extraction time on the polysaccharides yield

提取温度对木贼麻黄多糖提取率的影响见图 2。随着提取温度增加, 木贼麻黄多糖提取率上升, 在提取温度为 70 ℃ 时多糖提取率达到最大值。当温度 > 70 ℃ 时, 提取率开始下降, 温度达到 90 ℃ 以上提取率下降明显。因此选择提取温度为 70 ℃ 左右。

液料比对木贼麻黄多糖提取率的影响见图 3。液料比增加木贼麻黄多糖的提取率也增加, 当液料比为 25 : 1 时多糖提取率达到最大值, 继续增

加溶剂的量, 提取率有所下降。因此液料比选择在 25 : 1 左右。

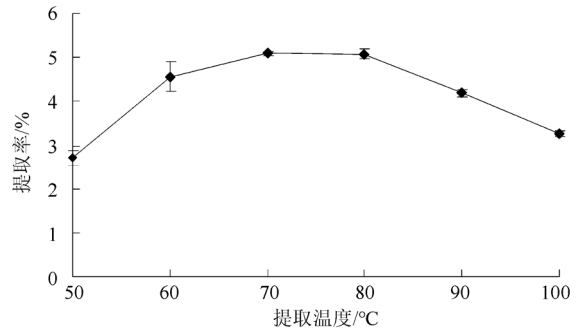


图 2 提取温度对多糖提取率的影响

Fig. 2 The effect of extraction temperature on the polysaccharides yield

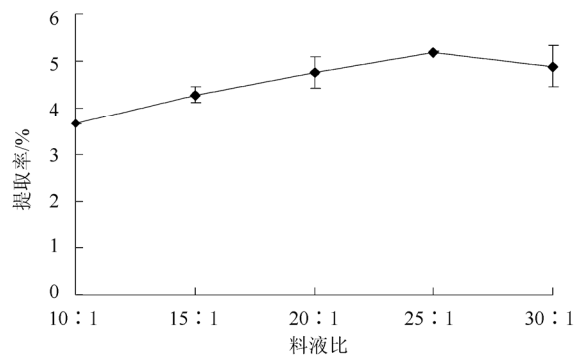


图 3 液料比对多糖提取率的影响

Fig. 3 The influence of liquid-to-material rate on the polysaccharides yield

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验设计与结果及方差分析 Box-Behnken 试验设计与结果见表 2, 方差分析见表 3。结果表明, 响应值与测试变量之间的关系可以用多元二次回归方程来描述: $Y = 5.46 + 0.14A + 0.13B + 0.025C - 0.14AB - 0.035AC - 0.063BC - 0.55A^2 - 0.22B^2 - 0.11C^2$ 。

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of Box-Behnken experimental

No.	A	B	C	提取率/%	No.	A	B	C	提取率/%
1	-1	-1	0	4.35	10	0	1	-1	5.32
2	1	-1	0	4.80	11	0	-1	1	5.07
3	-1	1	0	4.87	12	0	1	1	5.23
4	1	1	0	4.75	13	0	0	0	5.55
5	-1	0	-1	4.54	14	0	0	0	5.38
6	1	0	-1	4.99	15	0	0	0	5.37
7	-1	0	1	4.68	16	0	0	0	5.54
8	1	0	1	4.96	17	0	0	0	5.48
9	0	-1	-1	4.92					

表 3 Box-Behnken 试验回归方程的方差分析
Tab. 3 Analysis of variance for Box-Behnken test of regression equation

方差来源	SS	DF	MS	F	P
模型	2.03	9	2.03	28.70	0.000 1
A	0.15	1	0.15	18.69	0.003 5
B	0.13	1	0.13	16.80	0.004 6
C	4.860E-003	1	4.860E-003	0.62	0.457 6
AB	0.083	1	0.083	10.60	0.013 9
AC	4.959E-003	1	4.959E-003	0.63	0.453 2
BC	0.016	1	0.016	2.04	0.196 0
A ²	1.29	1	1.29	163.80	<0.000 1
B ²	0.19	1	0.19	24.78	0.001 6
C ²	0.054	1	0.054	6.84	0.034 7
残存项	0.055	7	7.866E-003		
失拟项	0.026	3	8.646E-003	1.19	0.420 1
纯误差	0.029	4	7.280E-003		
总和	2.09	16			

$R^2=0.9736$

由表 3 的分析可知, 试验选用模型极显著 ($P=0.000\ 1$), 失拟项($P=0.420\ 1$)不显著, 表明非试验因素对试验结果无明显影响。模型的决定系数 $R^2=0.973\ 6$, 变化系数值 2.64%, 说明该模型与实际试验拟合情况较好, 误差小。因此, 该模型方程在试验范围内能够适用于木贼麻黄多糖提取率的分析预测。一次项因素 A(提取时间)和因素 B(提取温度)对木贼麻黄多糖提取率影响极显著。3 个因素影响强弱依次为: 提取时间>提取温度>液料比。平方项 A²、B²对提取率影响极显著, 平方项 C²和交互项 AB 对提取率影响显著。

2.2.2 响应面图解析 提取温度、提取时间、液料比中任意一个变量取零时, 其余 2 个变量对多糖得率的影响见图 4。曲线走势越陡, 反映出各因素之间的两两交互作用越显著。同样, 等高线的形状也可反映出交互效应的强弱。由图 4 可知, 交互项 AB, 即提取时间和提取温度的响应面图走势较陡, 影响显著。这说明提取温度的改变会显著影响提取时间, 反之也成立, 提取温度和提取时间对提取率的影响存在明显的二次关系。此结果与 P 值分析结果一致。

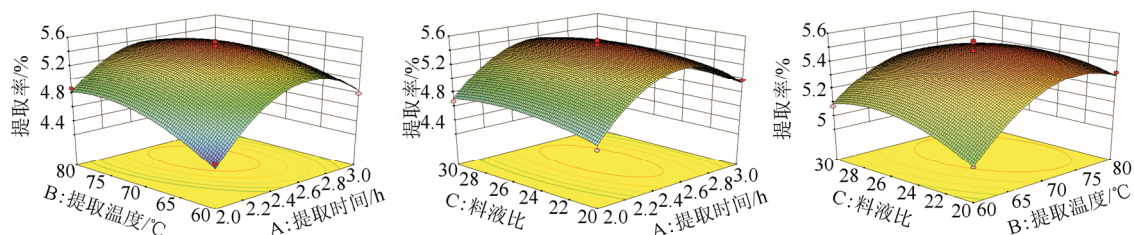


图 4 各因素交互作用的响应面图和等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plots showing the effects of various factors on the yield of polysaccharide

2.2.3 验证试验 根据响应面分析软件的预测, 最佳提取条件为: 提取时间 2.54 h, 提取温度 72.66 °C, 液料比 25.1:1。模型预测多糖提取率 5.59%。为试验实际操作的可行性, 最佳条件修正为: 提取时间 2.5 h, 提取温度 73 °C, 液料比 25:1, 在此条件下进行 3 次验证试验, 得到木贼麻黄多糖的实际平均提取率为 $(5.57 \pm 0.072)\%$, 实际值与预测值很接近, 证明该模型能较好地预测试验结果。采用蛋白酶法和 Sevag 法去除粗多糖样品中的蛋白杂质后, 测得样品中糖含量为 83.23%。

2.3 木贼麻黄多糖的体外抗氧化试验研究

2.3.1 木贼麻黄多糖清除 DPPH 自由基能力的研究 木贼麻黄多糖和 VC 对 DPPH 自由基的清除效果见图 5。木贼麻黄多糖和 VC 对 DPPH 自由基的清除率与其浓度均表现出明显的正比关系。实验范围内测得木贼麻黄多糖的 IC₅₀ 值为 703.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, VC 的 IC₅₀ 值为 29.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明木贼麻黄多糖对 DPPH 自由基清除效果较好, 但低于同浓度下的 VC。

2.3.2 木贼麻黄多糖清除超氧阴离子自由基能力的研究 木贼麻黄多糖和 VC 对超氧阴离子自由基的清除效果见图 6。结果显示木贼麻黄多糖和 VC 对超氧阴离子自由基的清除效果均与浓度正相关。VC 的 IC₅₀ 值为 722.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而木贼麻黄多糖在实验范围内未检测到 IC₅₀ 值。结果表明木贼麻黄多糖对超氧阴离子自由基有一定的清除能力, 但清除效果远低于同浓度下的 VC。

2.3.3 木贼麻黄多糖清除羟基自由基能力的研究 木贼麻黄多糖和 VC 对羟基自由基的清除效果见图 7。VC 和木贼麻黄多糖对羟基自由基的清除率均随着浓度增加而增强, 具有较明显的量效关系。VC 的 IC₅₀ 值为 189.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而木贼麻黄多糖的 IC₅₀ 值为 2 135.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明木贼麻黄多糖对羟基自由基具有一定的清除能力, 但效果低于同浓度下的 VC。

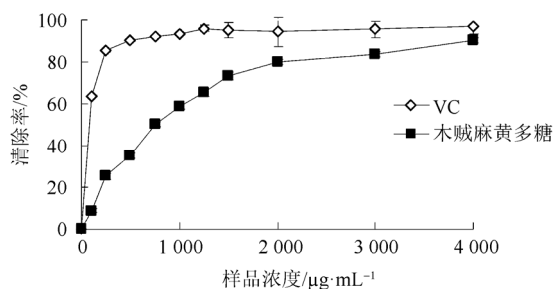


图5 木贼麻黄多糖和VC对DPPH自由基的清除效果
Fig. 5 Scavenging effects of *Ephedra equisetina* Bunge. polysaccharide and VC on DPPH radicals

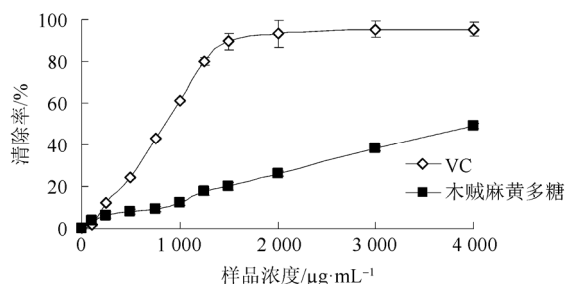


图6 木贼麻黄多糖和VC对超氧阴离子自由基的清除效果
Fig. 6 Scavenging effects of *Ephedra equisetina* Bunge. polysaccharide and VC on superoxide anion radicals

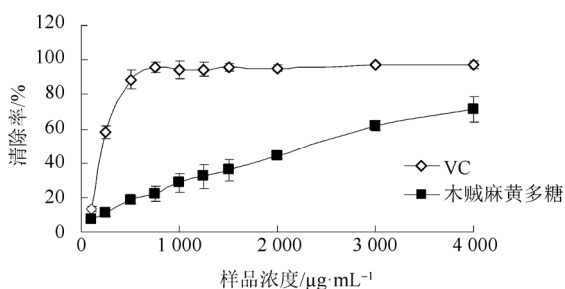


图7 木贼麻黄多糖和VC对羟基自由基的清除效果
Fig. 7 Scavenging effects of *Ephedra equisetina* Bunge. polysaccharide and VC on hydroxyl radicals

2.3.4 木贼麻黄多糖的还原力的研究 木贼麻黄多糖和VC对 Fe^{3+} 的还原力检测结果见图8。在一定浓度范围内,VC和木贼麻黄多糖的还原力随浓度增大而增强,具有明显的量效作用。但相同浓度下木贼麻黄多糖的还原力远低于VC。

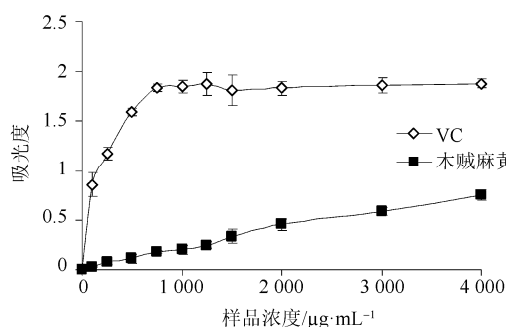


图8 木贼麻黄多糖和VC总还原力测定
Fig. 8 Reducing power assay of *Ephedra equisetina* Bunge. polysaccharide and VC

3 结论

木贼麻黄多糖的最佳提取条件为:提取时间2.5 h,提取温度73℃,液料比25:1,在此条件下多糖得率为 $(5.57 \pm 0.072)\%$ 。木贼麻黄多糖的体外抗氧化活性低于同浓度的VC,其对DPPH自由基和羟基自由基具有较好的清除能力,对超氧阴离子自由基的清除能力较弱,对 Fe^{3+} 有一定的还原能力。总之,木贼麻黄多糖具有一定的体外抗氧化活性,且活性具有明显的量效关系,说明木贼麻黄多糖可以作为潜在的抗氧化剂应用于功能食品和药品。

REFERENCES

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 2349-2357.
- [2] DING L L, SHI S S, CUI J. Advances in research of chemical constituents and pharmacological activities of Ephedra [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(20): 1661-1664.
- [3] LI Z J, YANG Y, DING M Y, et al. Analysis of flavonoids, alkaloids and organic acids in the non-ephedrine alkaloids of the extract of Ma Huang [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2005, 24(4): 67-69.
- [4] AN L N, ZHANG P, HAN G R. Determination for three ephedrine alkaloids in *Ephedra sinica* Stapf. and its preparations by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(10): 1230-1233.
- [5] XIU L M, MIURA A B, YAMAMOTO K, et al. Pancreatic islet regeneration by ephedrine in mice with streptozotocin-induced diabetes [J]. Am J Chin Med, 2001, 29(3/4): 493-500.
- [6] 刘敏, 程发峰, 王庆国, 等. 麻黄免疫调节作用研究进展[J]. 河北中医, 2015, 37(7): 1104-1106.
- [7] 严士海, 朱萱萱, 孟达理, 等. 麻黄多糖对EAT小鼠甲状腺激素及相关抗体水平的影响[J]. 江苏中医药, 2008, 40(10): 111-113.
- [8] XIA Y G, LIANG J, YANG B Y. The research on the determination of polysaccharide contents of ephedra by phenol-sulfuric acid method [J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2011, 28(1): 33-35.
- [9] LIANG J, XIA Y G, YANG B Y, et al. Determination of contents of protein in polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf and comparison of different methods for deproteinization [J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医学报), 2011, 39(2): 73-75.
- [10] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA, K T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40(6): 945-948.
- [11] YEN G C, CHEN H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in reaction to their antimutagenicity [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(1): 27-32.
- [12] WINTERBOURN C C, SUTTON H C. Hydroxyl radical production from hydrogen peroxide and enzymatically generated paraquat radicals: catalytic requirements and oxygen dependence [J]. Arch Biochem Biophysics, 1984, 235(1): 116-126.
- [13] DENG P, ZHANG G, ZHOU B, et al. Extraction and *in vitro* antioxidant activity of intracellular polysaccharide by *Pholiota adiposa* SX-02 [J]. J Biosci Bioengineering, 2011, 111(1): 50-54.

收稿日期: 2017-11-28

(本文责编: 曹粤锋)