

小叶三点金多糖的提取及抗氧化活性研究*

朱晓艳¹, 赵 杨², 李旭东¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 重庆市公安局 高新技术产业开发区分局刑侦支队技术大队, 重庆 401331)

摘要:【目的】优化小叶三点金(*Desmodium microphyllum*)多糖的提取工艺,并对它的体外抗氧化活性进行研究。【方法】在单因素实验的基础上,使用响应面法对小叶三点金多糖的提取工艺进行优化,再利用高效液相色谱和红外光谱对它进行单糖组成和表征分析;采用体外 ABTS 自由基清除实验和还原能力实验对它的抗氧化活性进行检测。【结果】小叶三点金多糖的最佳提取条件是:提取温度为 100 ℃,提取时间为 4.86 h,料液比为 1 g : 60 mL;该条件下多糖提取率为 5.04% ± 0.14%。小叶三点金多糖由甘露糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,摩尔比为 5 : 4.2 : 3 : 1 : 24.6 : 29.6 : 9.8。小叶三点金多糖具有较强的还原能力以及 ABTS 自由基清除能力。【结论】研究结果为小叶三点金多糖的提取及后续应用提供了一定的理论依据。

关键词:小叶三点金;多糖;响应面分析法;抗氧化活性

中图分类号:Q539

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)05-0114-08

小叶三点金(*Desmodium microphyllum*)为豆科(Leguminosae)山蚂蝗属(*Desmodium*)多年生草本植物,别名爬地香、小叶山绿豆、小木通,常见于荒地或灌木丛中,在中国主产于江苏、安徽、江西等省^[1]。小叶三点金以根乃至全草入药,具有健脾利湿、止咳平喘、解毒消肿的功效^[2],主治小儿疳积、黄疸、痢疾、咳嗽、哮喘、支气管炎等症。目前,有关小叶三点金组分的研究报道主要关注黄酮、挥发油、苯丙素等物质^[3-6],而关于小叶三点金多糖方面的研究却较为匮乏。

多糖是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物,广泛存在于生物体中,是维持生命活动正常运转的基本物质之一。研究表明,植物多糖具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌抗病毒、降血糖、免疫调节、降血脂、抗辐射、保护肝脏等多种生物活性^[7-12]。在多糖提取工艺方面,水提法因具有操作方便、成本低廉、对设备要求低等优点,已成为多糖提取的经典方法^[13]。响应面分析法(Response surface methodology)是由统计学和数学的方法组成,用于优化自变量,可分析单一或多个响应值与不同因素之间的关系^[14]。基于上述背景,本研究以多糖提取率为评价指标,在单因素实验的基础上,采用响应面法对通过水提法提取小叶三点金多糖的最佳工艺条件进行优化,并对它的体外抗氧化活性进行了初步研究,希望为小叶三点金多糖的深入研究和实际应用提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

小叶三点金购自安徽亳州,烘干粉碎后备用。阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、葡萄糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、木糖、核糖、氨基葡萄糖、氨基半乳糖等单糖标准品购自美国 Sigma 公司;其他化学品和试剂均为分析纯,购自重庆东方化工玻璃有限公司。

1.2 主要仪器

RVC2-18 型真空离心浓缩仪购自德国 Christ 公司,DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验

* 收稿日期:2020-12-16 修回日期:2021-01-15 网络出版时间:2021-06-30 10:17

资助项目:国家自然科学基金(No. 31300173)

第一作者简介:朱晓艳,女,研究方向为天然产物化学,E-mail:2352283277@qq.com;通信作者:李旭东,男,实验师,E-mail:308234091@qq.com

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210630.0913.016.html

设备有限公司,TGL-20 型高速冷冻离心机购自四川蜀科仪器有限公司,RE-52A 型旋转蒸发器购自上海亚荣生化仪器厂,Agilent1100 型液相色谱仪购自美国 Agilent 公司;Nicolet 380 型 FT-IR 红外光谱仪购自美国尼高力公司。

1.3 小叶三点金多糖的提取

称取一定质量的小叶三点金粉末,按一定的料液比添加去离子水,室温浸泡 1.5 h 后,随后按照一定的时间和温度条件进行水浴提取。提取物经纱布过滤滤后,于 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液。上清液经真空浓缩后,加入 3 倍上清液体积的乙酸乙酯脱脂,取水相,采用 Sevage 法脱蛋白。再加入体积分数为 95% 的乙醇溶液至溶液中乙醇的最终体积分数为 80%,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内静置 24 h,随后以 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取沉淀于真空冷冻干燥器中进行干燥。干燥后的沉淀依次用乙醚、无水乙醇、丙酮各清洗 2 次,得到小叶三点金多糖。多糖提取率用提取到的多糖质量除以提取多糖所用材料质量得到的百分数表示。

1.4 单因素实验

在单因素实验中,重点考察提取温度、提取时间和液料比对小叶三点金多糖提取率的影响,并以此确定 Box-Behnken 响应面设计的自变量合适范围。提取温度水平设置为 60,70,80,90 和 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$;提取时间水平设置为 2,2.5,3,3.5 和 4 h;料液比水平设置为 $1\text{ g}:20\text{ mL}$, $1\text{ g}:30\text{ mL}$, $1\text{ g}:40\text{ mL}$, $1\text{ g}:50\text{ mL}$ 和 $1\text{ g}:60\text{ mL}$ 。

1.5 响应面优化实验设计

以单因素实验结果为基础,将提取温度、提取时间和料液比作为自变量而多糖提取率为响应值,根据 Box-Behnken 响应面设计原理,采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平实验,对小叶三点金多糖的提取工艺参数加以改良。响应面因素与水平设计见表 1。

1.6 小叶三点金多糖的单糖组成及表征分析

1.6.1 单糖组成分析 称取 5 mg 多糖样品于 10 mL 具塞小瓶中,加入 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氯乙酸 1 mL,充氮气后封管于 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 6 h。待反应完全后,反复加甲醇并氮吹以除去样品中的三氯乙酸,再用 $0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液完全溶解残余物,得到多糖水解溶液。采用 PMP 柱前衍生高效液相色谱法^[3]对等摩尔配制的单糖标准品和多糖水解溶液进行衍生,最后用于高效液相色谱分析,色谱条件如下:

表 1 小叶三点金多糖提取工艺优化响应面分析试验因素与水平
Tab.1 Independent variables and their levels used in the response surface design

水平	因素		
	提取温度/ $^{\circ}\text{C}$	提取时间/h	料液比
-1	80	3	$1\text{ g}:40\text{ mL}$
0	90	3.5	$1\text{ g}:50\text{ mL}$
1	100	4	$1\text{ g}:60\text{ mL}$

色谱柱为 C18 柱($250\text{ mm}\times4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相 A 为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钠缓冲液(pH 为 6.6),流动相 B 为乙腈,柱温为 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$,流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$,检测波长为 250 nm 。

1.6.2 红外光谱分析 取 1 mg 干燥的小叶三点金多糖样本与 200 mg 的溴化钾粉末于研钵内反复进行研磨后压成薄片,使用分辨率为 4.0 cm^{-1} 的红外光谱仪并用扫描范围为 $500\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 的 DTGS 检测器进行检测。

1.7 小叶三点金多糖体外抗氧化活性测定

1.7.1 还原力测定 参照文献[15]的方法进行小叶三点金多糖还原力的测定。准确量取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度分别为 1,2,3,4 和 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小叶三点金多糖样品溶液,依次加入 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 且 pH 为 6.6 的磷酸盐缓冲液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 和质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$,混合均匀后,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 20 min。随后加入质量分数为 10% 的三氯乙酸 $200\text{ }\mu\text{L}$ 终止反应,以 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 $200\text{ }\mu\text{L}$,加入蒸馏水 $200\text{ }\mu\text{L}$ 和质量分数为 0.1% 的氯化铁 $50\text{ }\mu\text{L}$ 混合均匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min,在波长为 700 nm 处测定混合液的吸光度。分别以蒸馏水(空白对照)、抗坏血酸(阳性对照)代替小叶三点金多糖样品溶液进行上述实验。

1.7.2 ABTS 自由基清除活性测定 根据 Arnao 等人^[16]的方法进行小叶三点金多糖对 ABTS 自由基的清除活性测定。取 $7.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABTS 储备液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 和 $2.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的过硫酸钾溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$,混合后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 24 h,制得 ABTS 阳离子溶液。随后,将 ABTS 阳离子溶液用乙醇稀释到在波长为 734 nm 处的吸光度为 0.70 ± 0.02 。取上述稀释后的 ABTS 阳离子溶液 $160\text{ }\mu\text{L}$,分别加入 $40\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度为 0.3,0.6,0.9,1.2 和 $1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小叶三点金多糖样品溶液,混合均匀后,室温下避光反应 10 min,检测混合液在 734 nm 波长处的吸光度。分别以无水乙醇(空白对照)、抗坏血酸(阳性对照)代替小叶三点金多糖样品溶液进行上述实验。小叶三点金多糖对 ABTS 自由基的清除活性以 ABTS 自由基清除率表示,具体计算方法为:

$$R = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

其中: R 为 ABTS 自由基清除率, A_0 和 A_1 分别为空白对照和小叶三点金多糖样品溶液加入 ABTS 阳离子溶液后测得的吸光度。

2 结果与分析

2.1 小叶三点金多糖的单因素实验分析

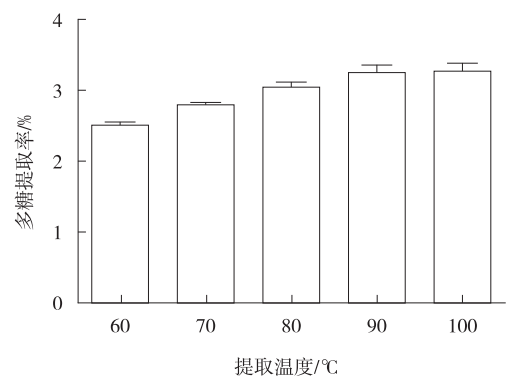
2.1.1 提取温度对小叶三点金多糖提取率的影响 将提取时间和料液比分别设定为 2 h 和 1 g : 20 mL 并保持不变, 评估不同提取温度对小叶三点金多糖提取率的影响。图 1a 显示: 在 60~90 °C 范围内, 随着提取温度的上升, 多糖提取率也明显上升; 当提取温度增加至 100 °C 时, 多糖提取率有所下降。这一结果表明, 提取温度与小叶三点金多糖的提取率密切相关: 提取温度的升高增加了多糖的溶出量; 当提取温度达到 90 °C 时, 多糖溶出量达到最大; 继续提高提取温度不能提升多糖提取率, 反而可能会破坏多糖结构使得多糖提取率下降。因此, 在后续的响应面优化实验中选择 90 °C 作为最佳提取温度。

2.1.2 提取时间对小叶三点金多糖提取率的影响 将提取温度和料液比分别设定为 90 °C 和 1 g : 20 mL 并保持不变, 评估不同提取时间对小叶三点金多糖提取率的影响。研究结果显示: 在 2~3.5 h 范围内, 随着提取时间的延长, 多糖提取率明显上升; 当提取时间延长至 4 h 时, 多糖提取率趋于平缓(图 1b)。上述结果表明: 随着提取时间的延长, 小叶三点金多糖的溶出量会不断增加; 当提取时间达到 3.5 h 时, 大部分多糖已经溶出; 继续延长提取时间, 多糖的提取率不会明显上升。由此可将 3.5 h 作为响应面优化实验中的最佳提取时间。

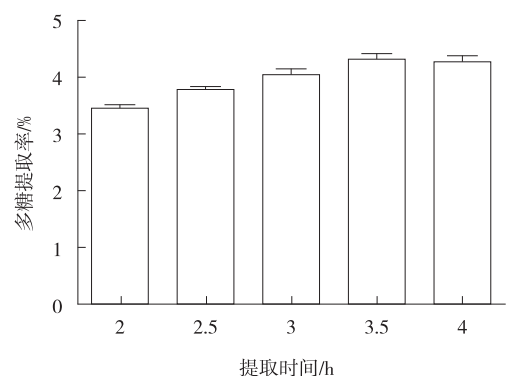
2.1.3 料液比对小叶三点金多糖提取率的影响 将提取温度和提取时间分别设定为 90 °C 和 2 h 并保持不变, 评估不同料液比对小叶三点金多糖提取率的影响。从图 1c 可知: 随着料液比由 1 g : 20 mL 向 1 g : 60 mL 变化, 多糖提取率呈上升趋势, 这主要是因为材料质量一定时提取液用量的增加有助于多糖从材料中溶出; 当料液比从 1 g : 50 mL 调整到 1 g : 60 mL 时, 多糖提取率未因提取液用量的相对增加而明显上升, 这表明多糖溶出量已达到饱和状态, 过量的溶剂并不会促使更多的多糖进一步从材料中溶出。考虑到提取后的浓缩和沉淀工艺, 将响应面优化实验中的最佳料液比定为 1 g : 50 mL。

2.2 响应面分析法优化小叶三点金多糖提取工艺

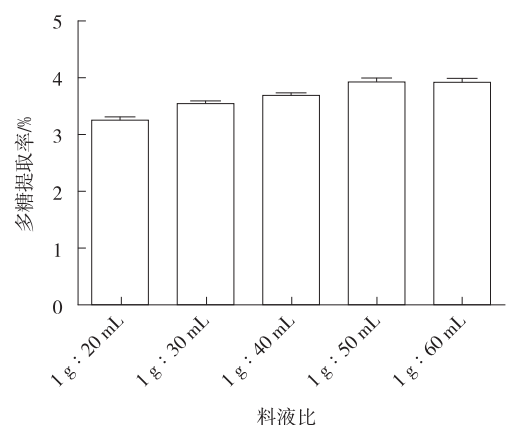
2.2.1 响应面实验设计与结果分析 响应面实验设计方案及结果见表 2。用 Design-Expert V8.0.6.1 软件对表 2 中的数据进行多元回归分析, 每个变量都被编码, 获得小叶三点金多糖提取率对编码自变量的二次多项回归方程为: $Y = 3.87 + 0.60A + 0.15B - 0.045C + 0.030AB + 0.11AC + 0.088BC + 0.040A^2 - 0.050B^2 + 0.12C^2$ 。其中 A, B, C 分别为提取温度、提取时间和料液比。



a 提取温度与多糖提取率



b 提取时间与多糖提取率



c 料液比与多糖提取率

图 1 提取温度、提取时间和料液比对多糖提取率的影响
Fig. 1 Effect of extraction temperature, extraction time, and liquid ratio on the yield of polysaccharide

表 2 小叶三点金多糖提取率的响应面实验方案及结果

Tab. 2 Experimental design and corresponding results for response surface analysis

试验号	提取温度/ ℃	提取时间/ h	料液比	多糖提取率/ %	试验号	提取温度/ ℃	提取时间/ h	料液比	多糖提取率/ %
1	80	3	1 g : 50 mL	3.27±0.04	10	90	3	1 g : 60 mL	3.59±0.02
2	100	3	1 g : 50 mL	4.25±0.14	11	90	4	1 g : 40 mL	4.13±0.06
3	80	4	1 g : 50 mL	3.42±0.05	12	90	4	1 g : 60 mL	4.16±0.05
4	100	4	1 g : 50 mL	4.52±0.03	13	90	3.5	1 g : 50 mL	3.85±0.01
5	80	3.5	1 g : 40 mL	3.49±0.08	14	90	3.5	1 g : 50 mL	3.78±0.03
6	100	3.5	1 g : 40 mL	4.62±0.11	15	90	3.5	1 g : 50 mL	3.89±0.01
7	80	3.5	1 g : 60 mL	3.23±0.05	16	90	3.5	1 g : 50 mL	3.97±0.15
8	100	3.5	1 g : 60 mL	4.81±0.09	17	90	3.5	1 g : 50 mL	3.88±0.04
9	90	3	1 g : 40 mL	3.91±0.13					

对回归模型进行方差分析(表 3),其中对方差来源部分的分析结果显示整个回归模型在 $p<0.01$ 水平上具有统计学意义;对失拟性部分的分析结果显示它对回归模型没有统计学意义上的影响,即实验误差小,同样确定了模型的可行性;该模型具有较低的变异系数值,也表明实验值具有更好的可靠性;此外决定系数 R^2 较高且 R^2_{adj} 与之接近,说明了该模型有充分的准确性和通用性。因此,在本研究范围内可以用此模型预测和分析小叶三点金多糖提取率。此外,自变量的 F 值的大小可以体现出自变量的重要性, F 值越大表明对自变量越重要。从表 3 中可见,影响小叶三点金多糖提取率的 3 个因素中,最重要的是提取温度,然后依次为提取时间和料液比。

表 3 回归模型的方差分析结果

Tab. 3 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	3.23	9	0.36	27.41	0.000 1**	C^2	0.064	1	0.064	4.86	0.063 2
A	2.87	1	2.87	218.94	<0.000 1***	残差	0.092	7	0.013		
B	0.180	1	0.180	13.97	0.0073**	失拟性	0.073	3	0.024	5.13	0.074 1
C	0.016	1	0.016	1.24	0.302 8	纯误差	0.019	4	4.73×10^{-3}		
AB	3.60×10^{-3}	1	3.60×10^{-3}	0.27	0.616 3	总误差	3.32	16			
AC	0.051	1	0.051	3.86	0.09	R^2			0.972 4		
BC	0.031	1	0.031	2.34	0.170 1	R^2_{adj}			0.936 9		
A^2	6.91×10^{-3}	1	6.91×10^{-3}	0.530	0.491 3	变异系数			2.91		
B^2	0.010	1	0.010	0.79	0.404 3						

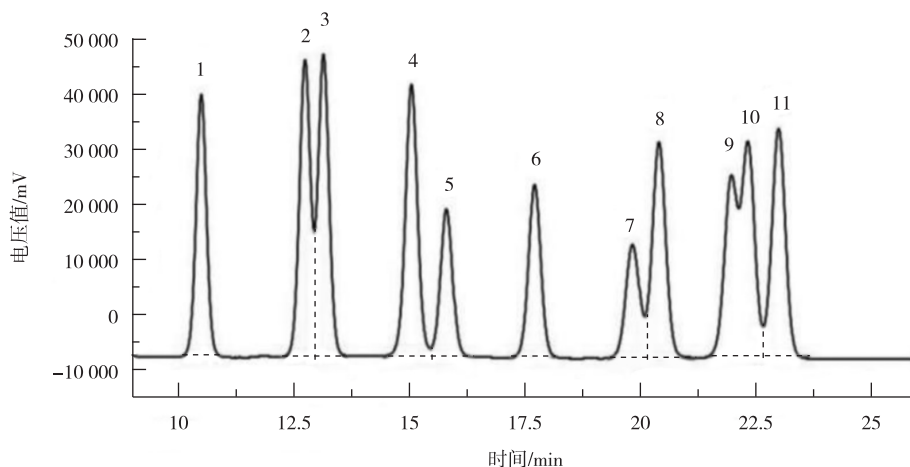
注:A,B,C 分别为提取温度、提取时间和料液比;** ,*** 分别表示统计结果在 $p<0.01$ 和 $p<0.001$ 水平上有统计学意义

2.2.2 响应面交互作用分析 通过 Design-Expert 8.0.6 软件模拟实验所生成的响应面图和等高线图可以很好地分析出各因素和各因素之间的交互协同作用对小叶三点金多糖提取率的影响,还可以确定提取因素的最佳水平^[17]。如封二彩图 2a 所示,当料液比固定在零水平时,多糖提取率随着提取温度上升和提取时间延长而升高。封二彩图 2b 中的多糖提取率变化趋势与封二彩图 2a 中相类似。封二彩图 2c 则显示了当提取温度固定在零水平时提取时间和料液比对多糖提取率的综合效应;较为平坦的响应表面表明了提取时间和料液比之间无明显相互作用。基于以上分析结果,可以发现提取温度和提取时间是影响小叶三点金多糖提取的主要因素。通过使用 Design-Expert 软件,得出小叶三点金多糖的最佳提取条件如下:提取温度为 100 ℃,提取时间为 4.86 h,料液比为 1g : 60 mL。在最佳条件下,小叶三点金多糖的最大预测提取率为 5.068%。

2.2.3 预测模型的验证 用 2.2.2 部分得出的最佳提取条件提取小叶三点金多糖,实验重复 3 次,测得小叶三点金多糖提取率为 $5.04\% \pm 0.14\%$,与预测值相当接近,并且实验重复性较好,从而证实了 2.2.1 部分所得回归模型的准确性。

2.3 小叶三点金多糖的单糖组成及表征分析

2.3.1 小叶三点金多糖的单糖组成 通过各单糖标样与小叶三点金多糖样品的保留时间可以确定后者单糖组成,根据各峰面积计算多糖样品中各单糖组分的摩尔比。综合图 3 和图 4 可知,小叶三点金多糖主要由 7 种单糖组成,包括甘露糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖,摩尔比为 $5:4.2:3:1:24.6:29.6:9.8$ 。从这一数据可以发现,小叶三点金多糖中主要单糖组分为葡萄糖和半乳糖,阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖等组分较少,而氨基葡萄糖组分的含量极低。杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)菇头粗多糖由阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等组成,摩尔比为 $2.06:0.24:1:17.60:0.37$,其中葡萄糖为主要组分,阿拉伯糖和甘露糖组分含量次之,岩藻糖组分含量最低^[18]。羊肚菌(*Morchella esculenta*)多糖 MEP-3 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 $18.25:0.84:1:1.53$,其中甘露糖为主要组分,其次是葡萄糖和半乳糖组分^[19]。黄精(*Polygonatum sibiricum*)多糖由鼠李糖、核糖、木糖、果糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 $1:1.24:2.45:5.14:4.49:0.81$,其中果糖和葡萄糖组分的含量较多,半乳糖组分含量最低^[20]。上述结果表明,不同来源多糖的单糖组成及摩尔比存在较大差异,这也是造成这些多糖功能多样性的原因之一。



注:色谱图中数字 1~11 所代表的物质分别为:甘露糖、核糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、氨基半乳糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖,下同

图 3 单糖标准品的 PMP 柱前衍生液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of the PMP pre-column derivative standard monosaccharide

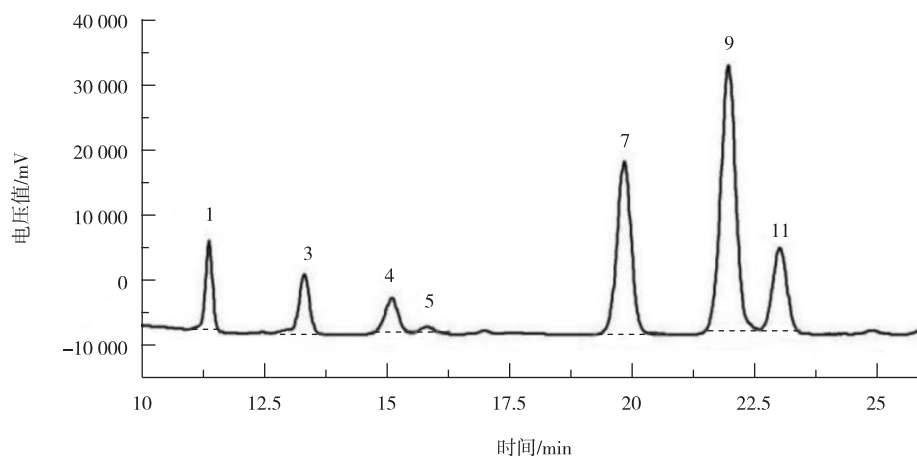


图 4 小叶三点金多糖的 PMP 柱前衍生液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of the PMP pre-column derivative *D. microphyllum* polysaccharide

2.3.2 小叶三点金多糖的 FT-IR 光谱分析 采用傅里叶变换红外光谱在 $4\,000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 的小叶三点金多糖官能团、取代基及结构等相关信息,结果如图 5 所示。在 $3\,384.44\text{ cm}^{-1}$ 处出现宽峰是分子内或分子间羟基伸缩振动的结果^[21], $1\,613.75\text{ cm}^{-1}$ 是羰基的伸缩振动峰, $1\,416.83\text{ cm}^{-1}$ 属碳-氢键的变角振动引起的吸收峰,可在 $1\,091.18\text{ cm}^{-1}$ 处的拉伸峰则表明存在碳-氧键^[22]。

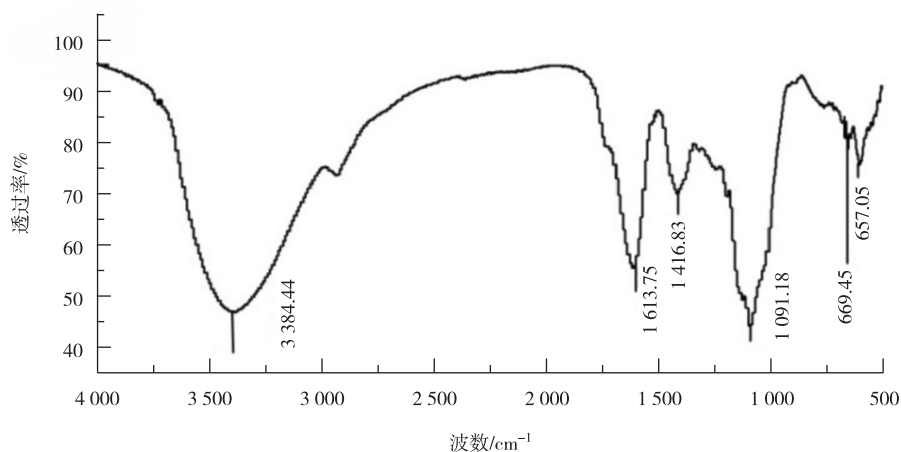


图 5 小叶三点金多糖红外吸收光谱图

Fig. 5 Fourier transform infrared spectrum of *D. microphyllum* polysaccharide

2.4 小叶三点金多糖的抗氧化活性

2.4.1 还原力测定 图 6 显示:随着小叶三点金多糖的质量浓度由 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增加到 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,它的还原力先增强后趋于稳定,但均低于同等质量浓度下抗坏血酸的还原力。 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小叶三点金多糖的还原力为 0.895。前期研究表明,当金剪刀(*Clematis huchouensis*)^[23]多糖和大蒜(*Allium sativum*)^[24]多糖的质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,它们的还原力分别为 0.499 和 0.530,均远低于 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小叶三点金多糖的还原力。因此,虽然小叶三点金多糖在还原力方面低于抗坏血酸,但与上述其他来源多糖相比,仍具有较强的抗氧化活性。

2.4.2 ABTS 自由基清除的能力 小叶三点金多糖和抗坏血酸对 ABTS 自由基的清除能力如图 7 所示。随着小叶三点金多糖和抗坏血酸质量浓度在 $0.3\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内逐渐增加,它们对 ABTS 自由基的清除能力先增加后趋于稳定。在两者质量浓度相同时,抗坏血酸对 ABTS 自由基的清除能力略高于小叶三点金多糖。当质量浓度为 $1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,小叶三点金多糖对 ABTS 自由基的清除率为 90.52%,接近于此浓度下抗坏血酸的清除率(98.58%)。相比之下,当杏鲍菇菇头粗多糖质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 ABTS 自由基的清除率仅达到 70.9%^[18];当羊肚菌多糖 MEP-3 质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 ABTS 自由基的清除率也只有 42.96%^[19]。因此,小叶三点金多糖和上述其他来源多糖相比具有较强的 ABTS 自由基清除能力。

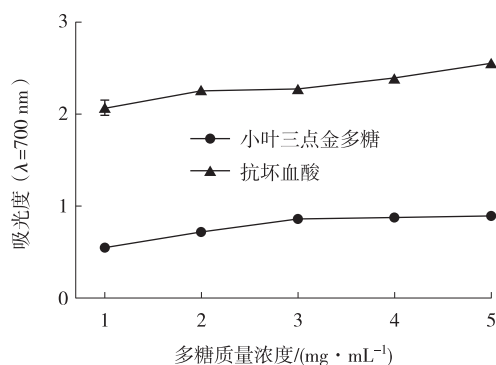


图 6 小叶三点金多糖的还原能力

Fig. 6 The reducing power of *D. microphyllum* polysaccharide as a function of its concentration

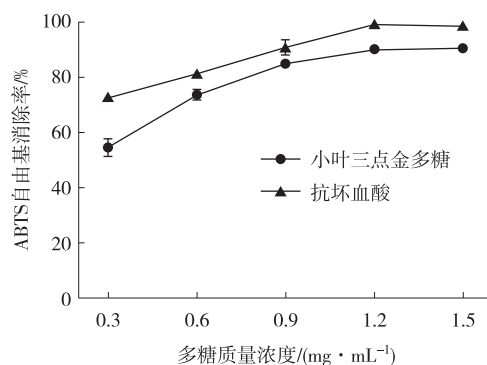


图 7 小叶三点金多糖对 ABTS 自由基清除能力

Fig. 7 Scavenging effect of *D. microphyllum* polysaccharide on ABTS radical

3 结论

本研究采用水提法从小叶三点金中分离提取出了多糖类化合物,并通过响应面分析法建立了最优提取条件,即:提取温度为 100 ℃,提取时间为 4.86 h,料液比为 1 g : 60 mL。在上述条件下,小叶三点金多糖提取率为 5.04%±0.14%。单糖组成分析表明,小叶三点金多糖由甘露糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成,摩尔比为 5 : 4.2 : 3 : 1 : 24.6 : 29.6 : 9.8。体外实验表明,小叶三点金多糖具有较强还原能力以及清除 ABTS 自由基能力。研究结果为小叶三点金多糖提取及后续应用研究提供了一定理论依据。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica[M]. Shanghai:Shanghai Scientific & Technical Publishers,1999.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
Nanjing University of Chinese Medicine. Dictionary of traditional Chinese medicine[M]. Shanghai:Shanghai Scientific & Technical Publishers,1986.
- [3] 田茂军,郭孟璧,张举成,等. 小叶三点金挥发油化学成分的研究[J]. 云南化工,2005,32(5):17-19.
TIAN M J, GUO M B, ZHANG J C, et al. Volatile compounds from *Desmodium microphyllum* [J]. Yunnan Chemical Technology,2005,32(5):17-19.
- [4] 刘小辉,王长虹,俞桂新,等. 小叶三点金的黄酮类成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(6):976-978.
LIU X H, WANG C H, YU G X, et al. Flavonoids of *Desmodium microphyllum* [J]. Natural Product Research and Development, 2010,22(6):976-978.
- [5] 刘小辉,华燕. 小叶三点金的苯丙素类成分分析[J]. 西南林学院学报,2009,29(2):92-93.
LIU X H, HUA Y. Study on thephenylpropanoids composition from *Desmodium microphyllum* [J]. Journal of Southwest Forestry University,2009,29(2):92-93.
- [6] 和七一,余晓东,李博,等. 小叶三点金醇提物对尖吻蝮蛇毒的抑制作用[J]. 中山大学学报(自然科学版),2018,57(4):129-135.
HE Q Y, YU X D, LI B, et al. Inhibitory effects of ethanol extract of *Desmodium microphyllum* on *Deinagkistrodon acutus* venom[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni,2018,57(4):129-135.
- [7] 倪慧艳,陈伟,宋文静. 黄芪多糖抗氧化作用研究[J]. 医学理论与实践,2017,32(9):1705-1707.
NI H Y, CHEN W, SONG W J. Studies onantioxidation capacity of *Astragali* polysaccharide[J]. The Journal of Medical Theory and Practice,2017,32(9):1705-1707.
- [8] 罗凯,黄秀芳,周毅峰,等. 响应面试验优化复合酶法提取碎米荠多糖工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2017,38(4):243-248.
LUO K, HUANG X F, ZHOU Y F, et al. Optimization of multi-enzymatic extraction of polysaccharides from *Cardamine hupingshanensis* and their antioxidant activity[J]. Food Science,2017,38(4):243-248.
- [9] 刘晓鹏,张俊霞,姜宁,等. 响应面试验优化超声辅助提取连钱草多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2017,37(4):14-19.
LIU X P, ZHANG J X, JIANG N, et al. Optimization byresponse surface methodology of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. [J]. Food Science,2017,37(4):14-19.
- [10] 陈艾萌,潘洁,胡博,等. 川牛膝多糖抗氧化活性测定和微波提取工艺优化[J]. 中成药,2017(1):80-84.
CHEN A M, PAN J, HU B, et al. Determination of antioxidant activities of polysaccharides from *Cyathulae Radix* and optimization of microwave extraction[J]. Chinese Tradition Patent Medicine,2017(1):80-84.
- [11] 李雪,王宏伟,郑东然,等. 杜香叶多糖的提取及抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. 林产化学与工业,2017,37(5):133-138.
LI X, WANG H W, ZHENG D R, et al. Extraction andantioxidant, antiproliferative activities of polysaccharide from *Ledum palustre* L. leaves[J]. Chemisty and Induatry of Forest Poute,2017,37(5):133-138.
- [12] 呼永华. 蒲公英的抗癌机理研究[J]. 西部中医药,2018,31(1):132-134.
HU Y H. Research onanti-cancer mechanism of *Dandelion* [J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine,2018,31(1):132-134.
- [13] YUAN, Q X, XIE Y F, WANG W, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity *in vitro* of

- polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 128(5): 52-62.
- [14] PRAKASH M J, MANIKANDAN S K, THIRUGNANASAMBANDHAM K, et al. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 604-611.
- [15] JAYASHREE G V, RACHITHA P, KRUPASHREE K, et al. Antioxidant and DNA damage protective effects of *Asparagus racemosus* in human colon and mice muscle cells[J]. Pharmacognosy Journal, 2015, 7(3): 182-190.
- [16] ARNAO M B, CANO A, ACOSTA M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 239-244.
- [17] WANG J, SUN B G, CAO Y P, et al. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran[J]. Food Chemistry, 2014, 150(1): 482-488.
- [18] 郑恒光, 沈恒胜, 杨道富, 等. 杏鲍菇菇头多糖的结构鉴定及生物活性评价[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 7-13.
- ZHENG H G, SHEN H S, YANG D F, et al. Structural characterization and antitumor activity of crude polysaccharide extracted from the stalk residue of *Pleurotus eryngii*[J]. Food Science, 2019, 40(22): 7-13.
- [19] 范三红, 贾槐旺, 张锦华, 等. 羊肚菌多糖纯化、结构分析及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 65-71.
- FAN S H, JIA H W, ZHANG J H, et al. Purification, structural analysis and antioxidant activity of polysaccharides from *Morchella esculenta*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 65-71.
- [20] 李彦伟. 超高压提取黄精多糖工艺优化、结构分析及抗氧化性研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2019.
- LI Y W. Study on the process optimization, structure and antioxidant activity of *Polygonatum* polysaccharides by ultra-high pressure extraction[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2019.
- [21] XU R B, YANG X, WANG J, et al. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(12): 14262-14277.
- [22] YANG X L, WANG R F, ZHANG S P, et al. Polysaccharides from *Panax japonicus* C. A. Meyer and their antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101(1): 386-391.
- [23] ZHANG J J, MA Z, ZHENG L, et al. Purification and antioxidant activities of intracellular zinc polysaccharides from *Pleurotus cornucopiae* SS-03[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(1): 947-954.
- [24] PAN S K, WU S J. Cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of the polysaccharides from garlic[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(1): 606-609.

Extraction of Polysaccharide from *Desmodium microphyllum* and Its Antioxidant Activity

ZHU Xiaoyan¹, ZHAO Yang², LI Xudong¹

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Technical Brigade of Criminal Investigation Detachment of High-Tech Industry Development Zone Sub-bureau, Chongqing Public Security Bureau, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To optimize the extraction of polysaccharide from *Desmodium microphyllum* and investigate its antioxidant and anticancer activities *in vitro*. [Methods] Based on the analysis of single-factor experiments, response surface methodology was performed to optimize the extraction of polysaccharide from *D. microphyllum*. The polysaccharide was characterized by using high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy. *In vitro*, the antioxidant activity of the polysaccharide was tested by free radical scavenging and reducing ability experiments, and its anticancer activity was evaluated according to CCK8 kit. [Findings] The results showed that the optimal conditions were as follows: extraction temperature 100 °C, extraction time 4.86 h, solid-liquid ratio 1 g : 60 mL. Under these conditions, the experimental yield of *D. microphyllum* polysaccharide was 5.04% ± 0.14%. The polysaccharide was composed of mannose, rhamnose, glucosamine, glucuronic acid, glucose, galactose and arabinose with a molar ratio of 5 : 4.2 : 3 : 1 : 24.6 : 29.6 : 9.8. Meanwhile, *in vitro* experiments indicated that *D. microphyllum* polysaccharide exhibited strong radical scavenging activity on ABTS radical as well as reducing ability. [Conclusions] This study provides a theoretical basis for the extraction and subsequent application of *D. microphyllum* polysaccharide.

Keywords: *Desmodium microphyllum*; polysaccharide; response surface methodology; antioxidant activity

(责任编辑 方 兴)

(接正文77、78页)

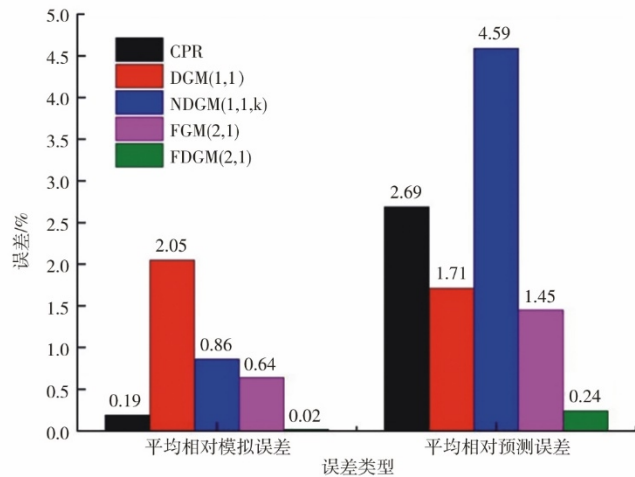


图1 5种模型对测试数据的平均相对误差的比较
Fig. 1 Comparison of the average relative errors of five models for test data

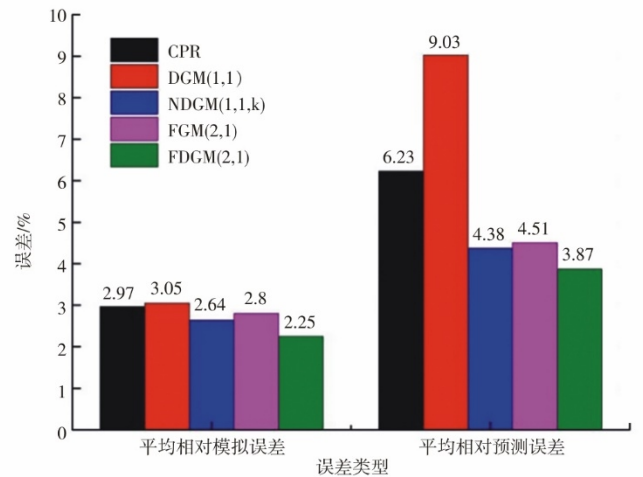


图2 5种模型对重庆市天然气消费量的平均相对误差的比较
Fig. 2 Comparison of the average relative errors of five models for Chongqing's natural gas consumption

(接正文117页)

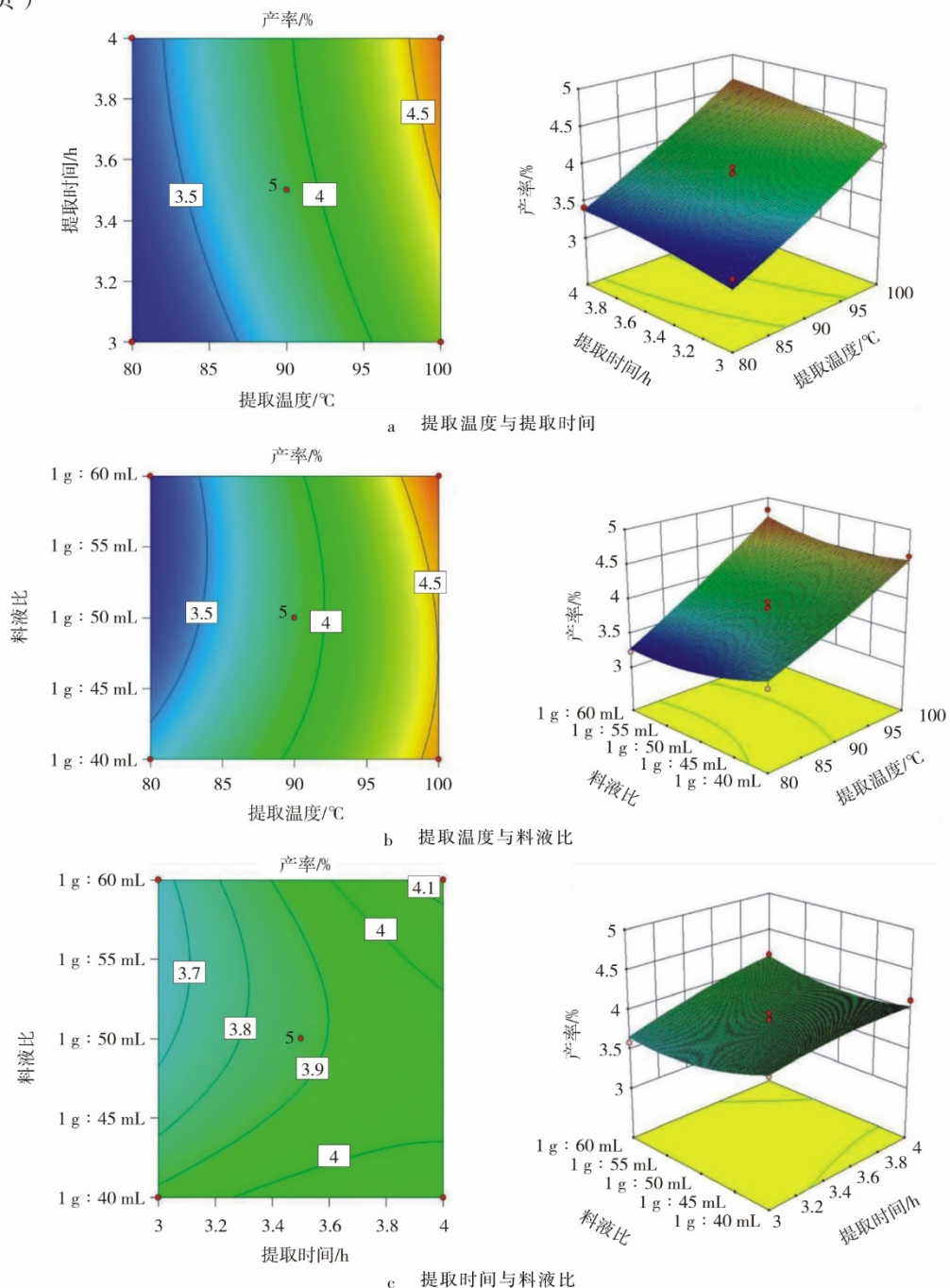


图2 各因素交互作用对多糖提取率影响的响应面与等高线图

Fig. 2 Response surface and contour diagram of the effect of interaction of various factors on polysaccharide yield