

秦巴山区中药材藿香枝叶中多糖研究

刘存芳*, 田光辉

(陕西理工学院 化学与环境科学学院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的:对中药材藿香枝叶中的多糖进行提取,并测试其抗氧化活性,为藿香药材资源的综合利用提供科学依据。方法:采用超声法辅助提取藿香枝叶中的多糖,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验考察料液比、pH 和超声提取时间对藿香枝叶中多糖提取的影响,确定其多糖的最佳提取工艺,并对藿香多糖进行清除·OH 试验。结果:藿香多糖的最佳提取工艺为料液比 1:10、超声提取 30 min、pH 为 6,可使藿香多糖的提取率高达 7.50%,藿香多糖对 Fenton 反应产生的·OH 有明显的清除作用。结论:藿香多糖具有抗氧化活性,可从藿香枝叶中提取多糖,其多糖有开发价值。

[关键词] 藿香; 枝叶; 多糖; 正交试验; 抗氧化活性
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0094-03
[doi] 10.11653/syfy2013200094

Study on the Polysaccharide of the Branch and Leaf of Folk Medicine
Agastache rugosa Obtained from Qinba Mountain

LIU Cun-fang*, TIAN Guang-hui

(School of Chemistry and Environmental Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] Objective: *Agastache rugosa* polysaccharide was extracted from the branches and leaves of *A. rugosa*, the research can provide and supply scientific basis for the search of its polysaccharide antioxidant activity to empower *A. rugosa* medicinal materials. Method: The polysaccharide was obtained from *A. rugosa* branches and leaves by ultrasonic extraction method, and tested $L_9(3^4)$ orthogonal experiment on the base of material-liquid ratio, ultrasonic time and pH value, to optimize *A. rugosa* polysaccharide extract technology; *A. rugosa* polysaccharide to remove hydroxyl radical was also studied. Result: The best *A. rugosa* polysaccharide extracting technology assisted by ultrasonic was material-liquid ratio 1:10, ultrasonic time 30 min, and pH value 6, and the extraction rate of polysaccharide was reached up to 7.50%. *A. rugosa* polysaccharide had significant scavenging effect for hydroxyl radical produced by Fenton reaction theory. Conclusion: *A. rugosa* polysaccharide had antioxidant activity. The polysaccharide may be extracted from the branches and leaves of *A. rugosa*, and had development value.

[Key words] *Agastache rugosa*; branch and leaf; polysaccharide; orthogonal experiment; anti-oxidation activity

中药材藿香是唇形科藿香属的一种多年生草本

植物,具有特殊的芳香味^[1],药食共用。藿香全草均能入药,有止呕吐、治霍乱腹痛、驱逐肠胃充气、清暑等作用^[2]。藿香叶和茎中均富含挥发性芳香油,有浓郁的特殊香味,为芳香油原料,由于藿香全草的挥发性物质独特的香味和显著地生理活性被用作香料或当作食品的天然防腐剂,应用于医疗、保健和食品工业,将藿香开发成多种药品或保健品,如藿香正气水、藿香保和丸等。人们对藿香中的萜类、挥发

[收稿日期] 20120801(006)
[基金项目] 陕西省教育厅专项科研计划项目(2010JK471);
陕西省科技厅社会发展科技攻关项目(2012K19-03-03)
[通讯作者] * 刘存芳,硕士,副教授,从事绿色功能食品开发研究, Tel: 15929592234, E-mail: cunfangliu398@yahoo.com.cn

油、维生素、蛋白质和氨基酸、脂肪酸等活性物质的研究较多^[2-5],但对藿香全草中多糖的提取与测定的文献报道较少^[4]。本文用苯酚硫酸法检测藿香枝叶中的多糖,以藿香多糖含量为指标,探讨藿香多糖提取工艺,用水提醇沉法提取藿香多糖,并通过藿香多糖对 Fenton 反应产生羟基自由基的清除作用,考察藿香多糖体外抗氧化活性效果,为藿香多糖的开发利用提供帮助。

1 材料

UV-6300PC 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),SB5200-DT 型系列超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),RE-52 型旋转蒸发仪(上海安亭实验仪器有限公司),电热鼓风干燥箱和电热套(北京科伟永兴仪器有限公司),SHB-III 型循环水式真空泵(郑州长城科学工贸有限公司),HH 系列恒温水浴锅(渤海电器厂),分析天平(上海五金机电有限责任公司),粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),Soxhelt 提取器。

野生藿香在 2010 年 7 月中旬收集于陕西南部的秦巴山区,由陕西理工学院生物科学与工程学院植物学的赵桦教授确认,拉丁名为 *Agastache rugosa*。将野生藿香的枝干和茎叶分出来,置于 45 ℃ 下的烘箱中干燥至恒重,粉碎,低温密封保存备用。*D*-葡萄糖(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200503),水为二次蒸馏水,所用试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 葡萄糖标准曲线的制作 多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法^[6]。将葡萄糖于 105 ℃ 干燥至恒重,用分析天平准确称取 100 mg 定容于 100 mL 的量瓶中,配成 1 g·L 的标准葡萄糖溶液,使用时逐级稀释至所需浓度。精确吸取葡萄糖标准溶液 0.0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 分别置于 7 支比色管中,分别加水至溶液均为 2 mL,精确吸取 1 mL 6% 苯酚溶液,加入摇匀,将 7 支比色管放入冰水浴中,加入 5 mL 浓硫酸,摇匀,然后在沸水浴中加热 10 min 使其充分反应,冷却至室温。在 490 nm 波长下测定葡萄糖溶液的吸光度 *A* 分别为 0.003,0.102 5,0.253 5,0.401,0.591,0.724 5,呈良好线性关系,绘制葡萄糖溶液标准曲线,得标准曲线回归方程为 $Y = 8.019\ 6X + 0.000\ 1 (R^2 = 0.998\ 3)$,其中 *Y* 为多糖溶液的吸光度,*X* 为葡萄糖溶液浓度(g·L)。

2.2 藿香枝叶多糖的提取和纯化 准确称取藿香粉末 100 g 放置于 Soxhelt 提取器的滤纸筒中,以无

水乙醇为溶剂回流至无色,以除去色素、脂溶性物质及其他物质,可提高多糖的溶出率。回收乙醇溶剂,干燥,称量乙醇提取物的质量为 16.25 g,占干藿香重的 16.25%。将藿香粉末晾干,设计正交试验确定提取工艺,重复将藿香粉末提取 2 次,用碳酸钠或浓盐酸调节提取溶液的 pH,合并 2 次的提取液,将提取得到的藿香多糖滤液,减压浓缩至原体积 1/5,用 Seavage 法脱蛋白,向浓缩液中加入无水乙醇使其浓度达到 70%,置于 4 ℃ 冰箱中醇沉,抽滤分离,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤两次低温干燥,得到藿香多糖。

2.3 藿香枝叶多糖提取正交试验设计 采用正交试验对藿香枝叶多糖的提取工艺进行优化,选取 3 个主要因素 A 料液比、B 溶液 pH、C 超声提取时间,每个因素设 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,以多糖含量为指标,确定最佳提取工艺, $L_9(3^4)$ 因素水平设计见表 1,结果见表 2。根据正交试验数据,经过极差分析,各因素对藿香多糖提取的影响程度依次为 $A > C > B$,即料液比影响最大,超声提取时间次之,溶液 pH 最小。藿香多糖提取的最佳工艺条件为 $A_2C_2B_1$,即料液比 1:10、超声提取 30 min、pH 为 6,藿香多糖的提取率高达 7.50%。

表 1 藿香多糖提取的 $L_9(3^4)$ 因素水平

水平	A 料液比/g·mL	B pH	C 时间/min
1	1:5	6	25
2	1:10	7	30
3	1:15	8	35

表 2 藿香多糖提取试验方案

No.	A 料液比 /g·L	B pH	C 时间 /min	多糖含量 /%
1	1	1	1	4.92
2	2	1	2	7.50
3	3	1	3	6.27
4	1	2	3	5.36
5	2	2	1	7.28
6	3	2	2	7.06
7	1	3	2	7.08
8	2	3	3	6.89
9	3	3	1	6.25
K ₁	17.36	18.69	18.45	
K ₂	21.67	19.70	21.64	
K ₃	19.58	20.22	18.52	
k ₁	5.79	6.23	6.15	
k ₂	7.22	6.57	7.21	
k ₃	6.53	6.74	6.17	
R	1.43	0.51	1.06	

2.4 藿香多糖体外抗氧化活性 藿香多糖的体外

抗氧化实验采用邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法,通过清除 Fe²⁺/H₂O₂体系中的羟基自由基来确定藿香多糖抗氧化效果。准确称取 0.06 g 藿香多糖定容于 100 mL 量瓶中,配成 0.6 g·L 的藿香多糖溶液。取 10 支比色管分别加入 0.75 mmol·L 邻二氮菲溶液 1 mL,150 mmol·L pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液 1.5 mL,充分混合后加入 0.75 mmol·L FeSO₄ 溶液 1 mL,0.01% 的 H₂O₂ 溶液 1 mL。然后向 1 至 8 号比色管分别加入 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 mL 的藿香多糖溶液混匀,另 2 支分别为损伤管和未损伤管,这两支比色管不加藿香多糖溶液,而在损伤管中加入 0.01% 的 H₂O₂ 1 mL,未损伤管不加 H₂O₂,10 支比色管加水定容到刻度,摇匀,置于 37 ℃ 的培养箱中保温 1 h,冷却至室温,在 520 nm 处测定其吸光度。羟基清除率计算:·OH 清除率 = (A₂ - A₀) / (A₁ - A₀) × 100%,其中 A₂ 代表藿香多糖溶液的吸光度;A₁ 代表未损伤溶液的吸光度;A₀ 代表损伤溶液的吸光度。藿香多糖溶液对·OH 的清除率分别为 2.78%, 5.56%, 8.33%, 11.11%, 13.89%, 19.44%, 22.22%, 27.78%,表明藿香多糖对 Fe²⁺/H₂O₂体系通过 Fenton 反应产生的·OH 有清除作用,藿香多糖的用量和对·OH 的清除率存在着一定的量效关系,其量效关系如 2 所示,随着藿香多糖量的增加清除作用越强。

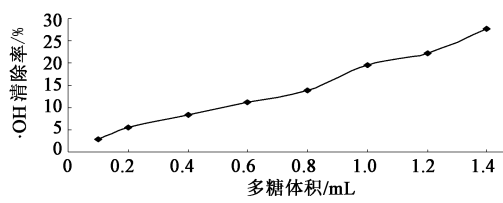


图 2 藿香多糖对·OH 清除量的效关系

3 讨论

采用超声波法提取藿香中的多糖,与传统工艺相比,超声波产生强烈振动、空化效应、搅拌作用等,可加速藿香多糖的溶出,提取效率高,省时节能,避免高温对藿香多糖活性的影响。先用乙醇回流提取色素、脂溶性物质等物质,可减少对接多糖含量检测的影响,同时能够破坏其细胞组织,使细胞壁内壁多糖

充分裸露,也能提高藿香多糖的溶出率^[6]。从正交试验数据可以看出,各因素对藿香多糖提取的影响程度依次为 A > C > B,即料液比 > 超声提取时间 > pH,最佳提取工艺为料液比 1:10、超声提取 30 min、pH 为 6,可使藿香多糖的提取率高达 7.50%。提取溶液的 pH 对藿香多糖的提取率影响较小,溶液酸碱性影响多糖的溶出率,但溶液的 pH 不能太小或太大,酸性或碱性较强都会导致多糖糖苷键的断裂,影响多糖的活性^[7]。通过藿香多糖对 Fenton 反应产生的羟基自由基·OH 的清除作用,藿香多糖用量越大,其清除·OH 的效果越强,表明藿香多糖有抗氧化活性,有望将其开发成为一种具有保健作用的抗氧化剂,应用到保健品、医疗、食品和医药行业中^[8]。随着对多糖生物活性的深入研究,多糖的生物活性机制,功效因子会更加明确,其应用领域也会更加广泛,藿香多糖的开发和应用还需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 第 65 卷. 北京:科学出版社,1997:259.

[2] 田光辉,刘存芳,赖普辉,等. 野生藿香花萼中挥发油的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(10):131.

[3] 朱兆友,汝绍刚,朱庆书. 超声辅助提取藿香挥发油的研究[J]. 化学与生物工程,2010,27(6):85.

[4] 田光辉,刘存芳,辜天琪,等. 野生藿香中多糖的提取与测定及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2010,31(2):249.

[5] 封锡志,徐绥绪,宋少江. 藿香属植物化学及药理活性的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,1998,15(2):144.

[6] 田光辉. 香菇多糖提取工艺的优化[J]. 延安大学学报,2002,21(1):46.

[7] 田光辉. 茶叶枝中的多糖研究[J]. 汉中师范学院学报,2004,22(1):67.

[8] 刘存芳. 芳香植物藿香的开发与应用现状[J]. 内江科技,2010(2):29.

[责任编辑 顾雪竹]