

党参多糖分离纯化及抗氧化活性研究

李启艳¹, 祝清芬¹, 刘春霖¹, 魏霞¹, 朱日然^{2*}

1. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250012

摘要: 目的 分离纯化党参多糖(CPP)并对其结构及抗氧化活性进行研究。方法 加热回流法提取制备党参粗多糖,经中空纤维超滤实验装置分离获得多糖分级,采用体内、外方法考察多糖的抗氧化活性。结果 CPP经分离后获得3个级分CPP1、CPP2、CPP3,体外抗氧化实验表明CPP3对DPPH、羟自由基和超氧阴离子的清除能力最强;体内实验显示,高剂量CPP3(400 mg/kg)对D-半乳糖所致衰老小鼠具有明显的保护作用。结论 CPP具有明显的抗氧化功能,本研究为党参多糖功能性食品的开发提供了理论依据。

关键词: 党参多糖; 分离纯化; 清除自由基; 抗氧化; 中空纤维超滤

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)05-0907-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.011

Isolation and purification of *Codonopsis pilosula* polysaccharide and its anti-oxidant activity

LI Qi-yan¹, ZHU Qing-fen¹, LIU Chun-lin¹, WEI Xia¹, ZHU Ri-ran²

1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To isolate and purify the *Codonopsis pilosula* polysaccharide (CPP) and investigate its structure characterization and anti-oxidant activity. **Methods** CPP was extracted by heating reflux, crud polysaccharide was refined and then isolated by hollow fiber ultrafiltration experimental device, the anti-oxidant activity of polysaccharides was studied by *in vivo* and *in vitro* methods. **Results** CPP was purified and obtained three ingredients named CPP1, CPP2, and CPP3. The anti-oxidant activity *in vitro* showed that CPP3 had the strongest scavenging ability on DPPH, hydroxyl radical, and superoxide anion. *In vivo* study showed that high dose group of CPP3 had obvious protective effect on the mice induced by D-galactose. **Conclusion** CPP has obvious anti-oxidant function. This study provides the theoretical basis for the development of CPP functional food.

Key words: *Codonopsis pilosula* polysaccharide; isolation and purification; free radical scavenging; anti-oxidation; hollow fiber ultrafiltration

党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Farnch.) Nannf.、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 或川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的干燥根,是我国常用的补益药材,具有补中益气、健脾益肺的功效^[1]。研究表明,党参含有多糖类、植物甾醇类、萜类、生物碱类、苯丙素苷类等多种化学成分,其中多糖类所占比例最大^[2-3]。目前,党参多糖(*Codonopsis pilosula* polysaccharide, CPP)的生物活性研究大多

局限于其对免疫系统功能的调节方面,这在某种程度上阻碍了药材党参的相关新药资源开发,致使药材党参的附加值不高,制约了党参种植及相关产业的发展^[4-5]。本课题组曾对CPP提取纯化工艺进行优化,并对其单糖组成和相对分子质量(M_w)分布进行了研究^[6],本研究采用热回流浸提方法对党参中的多糖成分进行提取,并采用单因素和响应面法对其工艺进行优化。在此基础上采用中空纤维超滤^[7]实验装置对提取的党参粗糖多进行分级,并考察不

收稿日期: 2016-10-17

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2013-227)

作者简介: 李启艳(1978—),女,副主任药师,博士,研究方向为中药质量控制。E-mail: 1336504774@qq.com

*通信作者 朱日然(1979—),男,副主任药师,学士,研究方向为中药质量控制。E-mail: zhuriran@163.com

同 M_w CPP 中的单糖组成及体内外抗氧化活性,为进一步探索 CPP 的构效关系及作用机制奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 试剂与试剂

党参,采购于山西潞城,经山东省中医药大学附属医院张学顺教授鉴定为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Farnch.) Nannf. 的干燥根;血清白蛋白,北京恒业中远化工有限公司;葡聚糖,截留 M_w 500 000,上海谷研科技有限公司;考马斯亮蓝,上海迈坤化工有限公司;维生素 C (VC)、D-半乳糖均购自 Sigma 公司;实验测定试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

TU-1901 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Tensor II 傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;中空纤维超滤装置,北京旭邦膜设备有限责任公司;LGJ-10 冷冻干燥机,北京四环科学仪器四厂;ML503 电子天平, Mettler Toledo 仪器(上海)有限公司;德国 Heidolph 旋转蒸发器,艾拓思实验设备(上海)有限公司;Milli QA 纯水处理器, Millipore 公司。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物

1 月龄清洁型雌性 ICR 小鼠,共 60 只,体质量 (20 ± 2) g,购于山东省实验动物中心,许可证号 SCXK(鲁)20140007。饲养环境安静,室温 25°C ,各组小鼠自由进食、饮水。

2 方法

2.1 党参粗多糖的制备

取 60°C 干燥后粉碎的党参药材,加入 3 倍体积的石油醚($30\sim 60^\circ\text{C}$),加热回流 2 次,每次 2 h,弃去提取液,滤渣挥干溶剂。取 500 g 脱脂处理的党参药材粉末,以水为提取溶剂,在提取温度为 85°C ,料液比为 1:12,提取时间为 1.5 h 的情况下回流提取 2 次,合并提取液,经 5 000 r/min 离心 10 min, 60°C 减压浓缩至 2 000 mL,加入 4 倍体积的无水乙醇过夜,沉淀多糖,干燥至恒定质量即得粗多糖样品^[8]。

2.2 CPP 的分离与精制

2.2.1 CPP 的精制与分离操作流程及考察指标 将

党参粗多糖加水溶解,置分液漏斗中,采用 Sevage 法沉淀蛋白。将去除蛋白的多糖溶液加于 DEAE-纤维素柱,经 1 mol/L NaCl 溶液洗脱,洗脱液浓缩后灌入透析袋中,循环透析 24 h,除去残留 NaCl 及其他的小分子物质^[9-11]。

将透析后的多糖旋蒸浓缩,选用合适的超滤膜,在适当的压力和膜通量下,以一定的体积流量进行超滤,工作流程图见图 1。

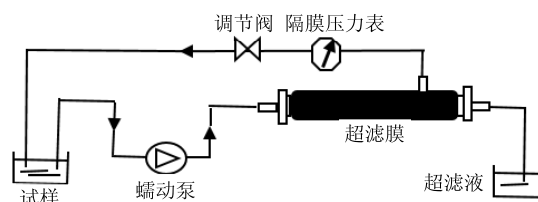


图 1 超滤装置工作流程图

Fig. 1 Ultrafiltration device flowcharts

采用恒流泵提供动力和控制体积流量,调节调节阀控制压力,将试样放入恒温水浴中,透过液采用量筒收集,计算膜通量和截留率。

$$\text{膜通量} = V/(St)$$

$$\text{截留率} = V_2 C_2 / (V_1 C_1)$$

V 为超滤时间内透过的超滤液的体积 (mL), t 为超滤时间 (min), S 为有效膜面积 (cm^2), V_2 和 C_2 分别是截留后超滤液的体积和质量浓度, V_1 和 C_1 分别是储存液的体积和质量浓度

2.2.2 超滤膜的选择 不同规格的超滤膜对截留率和膜通量的影响,截留 M_w 越大,截留率越低,膜通量越大, M_w 30 000 与 M_w 10 000 相比截留率相差不明显,而膜通量显著增加; M_w 5 000 与 M_w 3 000 相比截留率相差不明显,而 M_w 5 000 的膜通量显著增加,因此,选择 M_w 300 000 的超滤膜进行初滤, M_w 30 000 和 M_w 5 000 分别对多糖进行截留,结果见表 1。

2.2.3 超滤压力的选择 适当增加超滤压力,膜通量在一定范围内可以提高,但随着超滤压力的增大,膜表面的质量浓度也会增加,因此导致截留率会相应的降低,由表 2 可以看出,当超滤压力为 0.2 MPa 时,膜通量相对较大,而截留率也不至于太低,因此选择超滤压力为 0.2 MPa 较合适。

2.2.4 超滤温度的选择 多糖的生物活性会随着温度的升高而改变,因此一般情况下超滤的温度不宜超过 50°C 。因此,本实验考察温度为 25°C 、 35°C 、 45°C 时,对截留率和膜通量的影响,结果见表 3。结果显示,膜通量会随着温度的升高而增加,但是随着

表 1 不同规格的超滤膜对截留率和膜通量的影响

Table 1 Effects of different sizes of ultrafiltration membrane on rejection rate and membrane flux

截留 M_w	多糖质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	超滤时间/ min	截留率/ %	膜通量/ ($\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)
300 000	1.208	4	90.45	0.96
150 000	1.254	8	92.96	0.89
30 000	1.648	20	93.28	0.62
10 000	1.845	28	94.65	0.40
5 000	2.000	34	98.53	0.35
3 000	2.225	41	99.26	0.24

表 2 超滤压力对截留率和膜通量的影响

Table 2 Effect of ultrafiltration pressure on retention rate and membrane flux

超滤压 力/MPa	多糖质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	超滤时 间/min	截留率/ %	膜通量/ ($\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)
0.10	1.926	48	95.42	0.34
0.15	1.895	35	95.65	0.38
0.20	1.846	26	94.60	0.42
0.25	1.752	20	90.20	0.43
0.30	1.635	17	85.40	0.44

表 3 超滤温度对截留率和膜通量的影响

Table 3 Effect of ultrafiltration temperature on retention rate and membrane flux

超滤温 度/ $^{\circ}\text{C}$	多糖质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	超滤时 间/min	截留率/ %	膜通量/ ($\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$)
25	1.765	24	93.42	0.39
35	1.780	21	94.50	0.40
45	1.775	20	94.45	0.43

温度的升高,溶液的黏度也会增加,相应的膜的截留率也会下降,因此在保证有一定的膜通量的情况下,选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 作为超滤温度,以便于操作。

2.2.5 超滤法分离 CPP 的流程 将预处理的 CPP 粗提液采用中空纤维超滤实验装置,设定超滤压力为 0.20 MPa,超滤温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,超滤膜选用 CLN-300KD (M_w 300 000)、CLN-30KD (M_w 30 000)、CLN-5KD (M_w 5 000) 3 种滤膜,其中 CLN-300KD 的超滤膜起初滤的作用,CLN-30KD 和 CLN-5KD 分别截留 30 000 以上,30 000~5 000 和 5 000 以下 M_w 的多糖共 3 个组分,即 CPP1、CPP2、CPP3,具体流程见图 2。

2.3 红外光谱分析

取党参多糖各级冻干粉 3.0 mg 与 KBr 混合研磨均匀后压片,使用红外光谱扫描仪在 4 000~400 cm^{-1} 内进行扫描,记录扫描图谱。由图 3 可知,党参多糖组分在 3 418 cm^{-1} 处有一吸收强度较大的峰,是多糖特征的 O-H 的伸缩振动峰,由糖分子内或分子间氢键 O-H 伸缩振动引起的吸收;2 930 cm^{-1} 附近的吸收峰为次甲基 ($-\text{CH}_2$) 中 $-\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动的吸收峰;1 633 cm^{-1} 附近的吸收峰为 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰;1 056 cm^{-1} 附近的吸收峰,此为醇羟基的变角振动;923 cm^{-1} 的吸收,此吸收为吡喃糖环醚键 ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$) 的非对称伸缩振动,为甘露糖的特征吸收。由红外图谱可知 CPP1、CPP2、CPP3 具有明显的糖类化合物的特征。

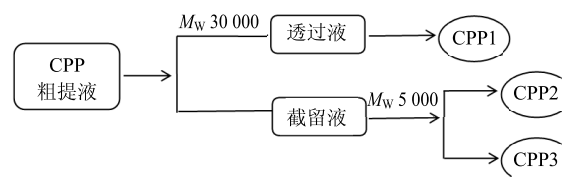


图 2 超滤法分离流程图

Fig. 2 Separation flow chart by ultrafiltration

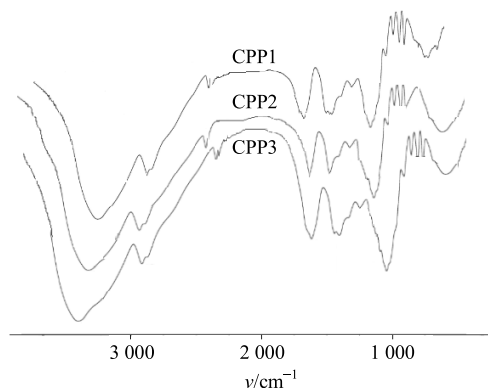


图 3 党参多糖红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectrogram of CPP

2.4 体外抗氧化活性研究^[12-14]

2.4.1 CPP 对 DPPH 自由基清除能力的测定 取 1.0 mg/mL 的多糖溶液 2.0 mL,加入 2.0 mL 现配的 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液,混匀后静置 30 min,以 50%的乙醇作参比,在 517 nm 测定样品的吸光度 (A) 值。以 2.0 mL 蒸馏水代替多糖溶液,其余操作同上作为空白,VC 作阳性对照。样品对 DPPH 的清除率即为自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{DPPH}}$$

CPP1、CPP2、CPP3 对 DPPH 的清除作用结果

如表 4 所示。由表 4 可知, VC 对 DPPH 的清除作用强于 CPP。CPP 各级分随着质量浓度增加清除率增大, CPP3 清除作用强于 CPP1 和 CPP2。

2.4.2 CPP 对羟自由基清除能力测定 取 10 mL 的试管, 每支加入 2 mL 的 FeSO_4 溶液 (6 mmol/L) 以及 2 mL 不同浓度的多糖溶液, 然后加入 2 mL 的 H_2O_2 (6 mmol/L) 溶液, 摇匀后静置 10 min, 再加入 2 mL 的水杨酸 (6 mmol/L) 溶液, 摇匀后静置 30 min, 测定其在 510 nm 处 A 值, 以蒸馏水按同样方法做空白, 以 VC 作阳性对照。每个样品重复试验 3 次, 取其平均值, 计算羟自由基的清除率。

$$\text{清除率} = A_0 - (A_i - A_j) / A_0$$

A_0 为不加样品溶液的 A 值, A_i 为加入样品溶液反应后的 A 值, A_j 为不加水杨酸时溶液的 A 值

各级多糖对羟自由基的清除作用结果如表 5 所示。由表 5 可知, 当 VC 质量浓度达 0.5 mg/mL 时其对羟基自由基清除率达 95.33%。在一定的范围内

多糖清除羟自由基的能力随着浓度的增大而增强, 相同浓度下, CPP3 清除作用强于 CPP1 和 CPP2。

2.4.3 CPP 对超氧阴离子自由基清除能力测定 取 6.0 mL 50 mmol/L、pH 8.12 Tris-HCl 缓冲液, 分别加入不同质量浓度多糖溶液 0.5 mL, 混匀后 37 °C 水浴保温 10 min, 加入 37 °C 预热过的 7 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液 1 mL, 混匀, 测定其在 325 nm 处的 A 值。依照以上方法, 用蒸馏水代替样品, 所得 A_0 为邻苯三酚的吸光度, 以 VC 作为阳性对照, 每个样品重复 3 次, 取其平均值, 计算清除率。

$$\text{清除率} = (A_0 - A) / A_0$$

A_0 为空白邻苯三酚的吸光度, A 为加入样品溶液后邻苯三酚的吸光度

CPP1、CPP2、CPP3 对超氧阴离子的清除作用结果如表 6 所示。由表 6 可知, 党参多糖对超氧阴离子的清除作用弱于阳性对照 VC, 当样品质量浓度为 5 mg/mL 时 VC 的清除率达 99.01%, CPP1 为

表 4 CPP 对 DPPH 自由基的清除能力

Table 4 DPPH free radical scavenging ability of CPP

样品	DPPH 自由基清除率/%					
	0.125 mg·mL ⁻¹	0.25 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹	1.0 mg·mL ⁻¹	2.0 mg·mL ⁻¹	5.0 mg·mL ⁻¹
CPP1	2.57	5.56	11.07	23.03	34.48	48.95
CPP2	3.58	7.56	14.86	29.23	54.25	61.34
CPP3	4.54	8.31	16.07	32.28	65.03	78.72
VC	98.99	98.97	99.04	99.05	99.05	99.06

表 5 CPP 对羟自由基的清除能力

Table 5 Hydroxyl radical scavenging ability of CPP

样品	羟自由基清除率/%					
	0.125 mg·mL ⁻¹	0.25 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹	1.0 mg·mL ⁻¹	2.0 mg·mL ⁻¹	5.0 mg·mL ⁻¹
CPP1	4.56	11.23	20.21	26.32	34.48	42.37
CPP2	5.52	13.57	22.55	27.43	36.55	47.58
CPP3	11.25	17.54	25.43	32.28	45.45	61.68
VC	57.80	73.54	95.33	96.89	98.02	98.81

表 6 CPP 对超氧阴离子的清除能力

Table 6 Superoxide anion scavenging capacity of CPP

样品	超氧阴离子清除率/%					
	0.125 mg·mL ⁻¹	0.25 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹	1.0 mg·mL ⁻¹	2.0 mg·mL ⁻¹	5.0 mg·mL ⁻¹
CPP1	5.52	11.02	20.21	38.29	59.05	71.02
CPP2	7.56	12.43	23.56	42.31	65.24	75.52
CPP3	12.30	15.67	32.28	54.99	89.59	90.33
VC	33.01	78.09	97.30	98.01	98.72	99.01

71.02%, CPP2 为 75.52%, CPP3 为 90.33%。在质量浓度为 0.125~5.0 mg/mL 时, CPP3 清除作用强于 CPP1 和 CPP2。

2.5 CPP3 对 D-半乳糖所致衰老小鼠模型的保护作用^[14-17]

2.5.1 溶液的配制 D-半乳糖溶液的配制: 取 D-半乳糖适量, 溶于生理盐水中配制成 4 mg/mL 的溶液, 储存于 4 °C 冰箱中备用。CPP 溶液的配制: 称取一定量的党参多糖 CPP3, 溶于生理盐水中配制成 20 mg/mL 的溶液, 储存于 4 °C 冰箱中备用。

2.5.2 实验动物分组 将健康清洁级 ICR 雌性小鼠, 经 1 周环境适应性饲养, 随机分为 6 组: 对照组, 模型组, VE 阳性对照组, 党参多糖 CPP3 低、中、高剂量组。每组 10 只, 分笼饲养。

2.5.3 给药 除对照组每天颈背部 sc 生理盐水外, 其他 5 组均按 80 mg/(kg·d) 的剂量颈背部 sc D-半乳糖。与此同时, 党参多糖 CPP3 低、中、高剂量组分别以 100、200、400 mg/(kg·d) ig 给药, VE 阳性对照组以 25 mg/(kg·d) ig 给药, 对照组和衰老模型组小鼠则 ig 相应体积的生理盐水。

2.5.4 组织样品的处理 实验第 48 天(造模与给药均为 48 d), 停止药物干预, 小鼠禁食 12 h, 以眼眶

后静脉丛取血, 取血后颈椎脱臼处死小鼠, 取出肝脏用 0.9%预冷的生理盐水制备 10%的组织匀浆, 备用。分别测定血清及肝组织中 SOD、GSH-Px、GSH 及 MDA 水平。

2.5.5 数据处理 采用 SPSS 16.0 软件进行 ANOVA 单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2.5.6 小鼠血清指标的变化 由表 7 可知, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中 SOD、GSH-Px 和 GSH 的活性均明显降低 ($P < 0.05$), 而 MDA 水平显著增加 ($P < 0.05$), 证明 D-半乳糖致正常小鼠衰老模型造模成功。CPP3 高剂量组能显著升高 SOD、GSH-Px 和 GSH 的活性 ($P < 0.05$), 且显著降低 MDA 水平 ($P < 0.05$), 与 VE 阳性对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 证明 CPP 组分 CPP3 高剂量组对小鼠的抗氧化作用显著; 而中、低剂量组对小鼠的抗氧化作用不明显。

2.5.7 小鼠肝脏指标的变化 由表 8 可知, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织匀浆中 SOD、GSH-Px 和 GSH 的活性均明显降低 ($P < 0.05$), 而 MDA 水平显著增加 ($P < 0.05$), 证明 D-半乳糖致正常小鼠

表 7 CPP3 对小鼠血清 SOD、GSH-Px、GSH 及 MDA 的影响

Table 7 Effects of CPP3 on serum SOD, GSH-Px, GSH, and MDA in mice

组别	SOD/(mU·mg ⁻¹)	GSH-Px/(mU·mg ⁻¹)	GSH/(mU·mg ⁻¹)	MDA/(mmol·L ⁻¹)
对照	1.234 3 ± 0.194 5 ^{a,b}	337.968 7 ± 92.105 1 ^b	50.644 7 ± 36.601 4 ^b	20.675 9 ± 10.861 5 ^c
模型	0.958 4 ± 0.332 8 ^a	244.869 7 ± 27.171 2 ^{a,c}	20.649 2 ± 12.171 0 ^{a,c}	43.235 3 ± 7.778 5 ^{a,c}
VE	1.032 0 ± 0.253 0 ^a	336.797 1 ± 49.287 9 ^b	41.942 2 ± 15.786 3 ^b	27.437 7 ± 1.723 8 ^b
CPP3 低剂量	0.753 0 ± 0.118 1 ^{a,c}	249.189 4 ± 55.610 0 ^{a,c}	22.896 4 ± 3.491 6 ^{a,c}	43.278 7 ± 5.155 3 ^{a,c}
CPP3 中剂量	0.875 0 ± 0.192 8 ^a	274.432 3 ± 69.373 3 ^{a,c}	21.712 6 ± 5.322 5 ^{a,c}	40.228 1 ± 10.675 5 ^{a,c}
CPP3 高剂量	1.027 2 ± 0.149 8 ^a	331.532 6 ± 74.343 9 ^{a,b}	40.114 5 ± 14.328 4 ^b	25.344 2 ± 2.495 6 ^{a,b}

与对照组比较: ^a $P < 0.05$; 与模型组比较: ^b $P < 0.05$; 与 VE 组比较: ^c $P < 0.05$, 下同

^a $P < 0.05$ vs control group; ^b $P < 0.05$ vs model group; ^c $P < 0.05$ vs VE group, same as below

表 8 CPP3 对小鼠肝脏组织匀浆 SOD、GSH-Px、GSH 及 MDA 的影响

Table 8 Effects of CPP3 on SOD, GSH-Px, GSH, and MDA in liver homogenate of mice

组别	SOD/(mU·mg ⁻¹)	GSH-Px/(mU·mg ⁻¹)	GSH/(mU·mg ⁻¹)	MDA/(mmol·L ⁻¹)
对照	1.855 8 ± 0.635 3 ^{b,c}	774.738 3 ± 178.260 7 ^b	217.955 5 ± 17.055 1 ^b	113.082 7 ± 25.008 7 ^c
模型	1.225 9 ± 0.215 0 ^a	470.283 4 ± 39.026 0 ^{a,c}	110.623 6 ± 10.874 3 ^{a,c}	189.804 7 ± 61.524 3 ^{a,c}
VE	1.483 7 ± 0.645 2 ^a	691.039 3 ± 182.041 3 ^b	117.559 6 ± 25.496 1 ^b	113.438 3 ± 31.594 3 ^b
CPP3 低剂量	0.992 7 ± 0.351 0 ^{a,c}	439.942 5 ± 76.424 2 ^{a,c}	117.803 7 ± 13.374 1 ^{a,c}	181.981 4 ± 72.324 5 ^{a,c}
CPP3 中剂量	1.194 0 ± 50.278 2 ^a	476.037 7 ± 153.289 4 ^{a,c}	117.115 0 ± 14.952 8 ^{a,c}	193.271 9 ± 62.393 7 ^{a,c}
CPP3 高剂量	1.425 8 ± 0.365 4 ^{a,b}	623.557 1 ± 164.702 5 ^{a,b}	165.385 0 ± 18.778 4 ^{a,b}	112.727 1 ± 32.659 2 ^b

衰老模型造模成功。CPP3 高剂量组能显著提高小鼠肝脏组织中 SOD、GSH-Px 和 GSH 酶的活性 ($P < 0.05$), 并能显著降低 MDA 水平 ($P < 0.05$), 与 VE 阳性对照组相比, 无显著性变化 ($P > 0.05$); 而中、低剂量组对小鼠肝脏中 SOD、GSH-Px 和 GSH 的活性及 MDA 水平的影响较小 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究采用采用中空纤维超滤实验装置, 以膜通量为指标, 对 CPP 粗提液进行分级、冷冻干燥, 最终筛选出 3 个组分 CPP1、CPP2、CPP3。单糖组成分析和红外光谱数据表明, CPP1 可能是以葡萄糖醛酸为主链组成的杂多糖, 而 CPP2 和 CPP3 可能是以氨基半乳糖为主链组成的杂多糖^[18-19]。体外抗氧化实验结果表明, CPP 对 DPPH、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力弱于 VC, 但在一定浓度范围内, CPP3 的清除作用强于 CPP1 和 CPP2, 表明低 M_w 的 CPP3 抗氧化作用最强。根据体外抗氧化实验结果, 选择考察体外抗氧化力最强的 CPP3 对 D-半乳糖致衰老小鼠的保护作用, 结果 CPP3 高剂量组能显著提高小鼠血清和肝脏组织中 SOD、GSH-Px 和 GSH 酶的活性, 表明 CPP3 对 D-半乳糖所致衰老小鼠具有明显的保护作用。

参考文献

[1] 张雪梅. 党参多糖研究概况 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(12): 127-131.

[2] 郭琼琼. 党参挥发性成分分析及特殊香气研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.

[3] 孙政华, 邵 晶, 郭 玫. 党参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(33): 174-176.

[4] Xu C, Liu Y, Yuan G X, *et al.* The contribution of side chains to antitumor activity of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(4): 891-901.

[5] Liu C, Chen J, Li E T, *et al.* The comparison of antioxidative and hepatoprotective activities of *Codonopsis pilosula* polysaccharide (CP) and sulfated CP [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 299-307.

[6] 李启艳, 胡德福, 张雪梅, 等. 党参多糖提取纯化工艺优化及其组成研究 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2663-2667.

[7] 武 婧, 唐志书, 宋忠兴, 等. 山茱萸水提液超滤工艺优化研究 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3338-3343.

[8] Zou Y F, Chen X F, Malterud K E, *et al.* Structural features and complement fixing activity of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* L. T. Shen roots [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 113(26): 420-428.

[9] 王丽波, 程 龙, 徐雅琴, 等. 南瓜籽多糖热水提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 农业工程学报, 2016, 32(9): 284-287.

[10] 邵 晶, 孙政华, 郭 玫, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化参芪复方总多糖醇沉工艺 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(8): 1012-1016.

[11] 潘悠优, 花 佩, 王允祥, 等. 无花果多糖提取、分离纯化及生物活性的研究进展 [J]. 食品科学, 2016, 37(17): 289-295.

[12] Yang C X, Gou Y Q, Chen J Y, *et al.* Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula* [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(15): 886-895.

[13] Chen Y X, Liu X Y, Xiao Z, *et al.* Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 430(22): 29-38.

[14] Hammi K M, Hammami M, Rihouey C, *et al.* Optimization extraction of polysaccharide from *Tunisian zizyphus* lotus fruit by response surface methodology: Composition and antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2016, 212(1): 476-484.

[15] 伍 春. 党参多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠皮肤抗氧化作用及基因表达谱的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医学院, 2014.

[16] Huang H D, Wu M M, Yang H P, *et al.* Structural and physical properties of sanxan polysaccharide from *Sphingomonas sanxanigenens* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144(25): 410-417.

[17] Xin T, Zhang F B, Jiang Q Y, *et al.* The inhibitory effect of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* on tumor growth and metastasis *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51(5): 788-796.

[18] Cescutti P, De Benedetto G, Rizzo R. Structural determination of the polysaccharide isolated from biofilms produced by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Carbohydr Res*, 2016, 91(8): 505-513.

[19] 何 钢, 刘 晔, 李会萍. 银杏叶多糖分离纯化、结构鉴定及抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 81-85.