

[文章编号] 1003—4684(2022)05-0071-05

茯苓枸杞饮提取工艺及其对黄嘌呤氧化酶作用

陈安利, 陈艳熙, 马 卓

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为了研发一种对痛风具有预防作用的保健产品,以茯苓、枸杞等药食同源中药材为主要原料,以多糖得率和干膏得率为评价指标,采用正交实验对茯苓枸杞饮的加水倍数、煎煮时间和煎煮次数进行优化。检测茯苓枸杞饮与苯溴马隆对黄嘌呤氧化酶(XOD)活性的体外抑制作用,通过紫外分光光度法确定最佳检测条件。结果表明,最佳水提工艺为加 8 倍水、浸提 3 次、每次 90 min,重复性实验证明,按此工艺参数,可制备品质稳定的茯苓枸杞饮。且在 290 nm 处、酶浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 条件下,茯苓枸杞饮相对于苯溴马隆,对 XOD 一定的抑制作用,且抑制率为 $(43.79 \pm 0.685)\%$, IC_{50} 为 $(87.25 \pm 0.254)\text{mg/mL}$ 。该制备工艺设计合理,操作简单可行,且对 XOD 有一定的抑制作用,可起到预防痛风的作用,可为生产提供可靠试验依据。

[关键词] 茯苓; 枸杞; 黄嘌呤氧化酶; 抑制作用

[中图分类号] TS275.5 [文献标识码] A

长期体内嘌呤代谢活跃、摄入嘌呤量过多或尿酸无法正常排泄,均会导致高尿酸血症,从而诱发痛风等疾病^[1]。黄嘌呤氧化酶(XOD)主要参与体内嘌呤的代谢,通过催化次黄嘌呤和黄嘌呤的氧化羟基化反应产生尿酸(UA),是产生 UA 的关键酶^[2]。XOD 活性过高会导致产生 UA 增多,从而引发高尿酸血症。XOD 抑制剂是治疗痛风的主要药物,国内使用最多的 XOD 抑制剂为别嘌呤醇、苯溴马隆、非布司他等^[3]。这类药物虽对痛风有很大的缓解作用,但是对肾脏的损伤也较大。因此,有待研发新的对 XOD 有抑制作用且对人体伤害较小的 XOD 抑制剂。

茯苓是多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,药典记载茯苓味甘、淡、平,归肺、脾、肾经,有利水消肿的功效,是一种较为常见的利尿中药^[4]。且有关研究表明,茯苓中含有大量的多糖和三萜酸类化合物,具有抗炎、保肝、利尿等生理活性^[5-7]。郭花斌^[7]等研究发现,茯苓提取液可减少肾小管对尿酸的重吸收,并通过抑制 XOD 的酶活性达到降低尿酸的作用;枸杞属于茄科枸杞属的落叶灌木植物^[9],其中含有多种生物活性成分,主要有多糖、类胡萝卜素、类黄酮、甜菜碱等,具有补肾、补脏、抗氧化和抗肿瘤等作用^[10-11];桑葚作为药食同源中药材,含有黄酮、多糖、花色苷、多酚等生物活性成分,具有抗氧化、防衰老、补肝肾益肾等保健作用^[12-13]。均可作为研发 XOD 抑

制剂的参考。

本实验通过考察茯苓、枸杞、桑葚等药食同源中药材的最佳提取工艺,得到其最佳提取工艺,并通过体外 XOD 活性检测,判断茯苓枸杞饮的抑制效果。旨在为开发预防和治疗痛风药食同源产品提供基础和思路,也是为茯苓枸杞饮的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茯苓、枸杞、桑葚等(均购于武汉市一家中药药店,经湖北省中医院冯汉鸽主任药师鉴定符合《中国药典》2020 版标准)。

葡萄糖标准品(HP,博美生物科技有限公司);黄嘌呤氧化酶(50 U/mg,上海麦克林生物科技有限公司);黄嘌呤(色谱纯 $\geq 99.5\%$,上海麦克林生物科技有限公司);苯酚、浓硫酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、甲醇(均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

RE-2000A 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);YH02211805025 双光束紫外分光光度计(上海佑科科技有限公司);鼓风干燥箱;DK-8D 电热恒温水浴锅(予华仪器有限公司);TEG16G 高速台式离心机(上海精宏有限公司);DS-5510 超声波清洗器

[收稿日期] 2021—07—21

[第一作者] 陈安利(1996—),女,湖北襄阳人,湖北工业大学硕士研究生,研究方向为中药制剂

[通信作者] 马 卓(1962—),女,湖北武汉人,湖北工业大学教授,研究方向为中药制剂

(予华仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取方法选择 对于中药材,煎煮法是最为传统的提取方式^[14],是药食同源中药材最安全、较经济的提取方法,该方式在现代食品、药品加工中也有广泛的应用,适合食品药品加工生产大规模进行。并且茯苓枸杞饮中含有丰富的多糖、黄酮类化合物、萜类化合物等,这些有效成分均可溶于水。所以本实验选择水煎煮法对茯苓枸杞饮进行提取制备。

1.3.2 提取液制备 按照给定的处方量,称取一定比例的茯苓、枸杞、决明子等药材,共 85 g,加入一定量的水煎煮,合并浸提液后趁热用 200 目滤布过滤,减压浓缩,根据药典规定提取液的相关要求,浓缩至所得提取液的相对密度为 1.08 左右。

1.3.3 茯苓枸杞饮中多糖得率的测定 由于茯苓枸杞饮中茯苓及枸杞含有大量的多糖,且研究表明^[15],茯苓多糖可以通过上调 rOAT1 的表达以及下调 r URAT1 的表达,从而增加了尿酸的排泄,起到治疗痛风的作用。因此,可选用测定多糖含量作为指标,采用苯酚-硫酸法^[16]进行测定。

1)标准曲线的建立 精密称取葡萄糖标准品,用紫外分光光度计进行测定。以吸光值为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线(图 1),得线性回归方程为 $y=0.012x-0.0128$, $R^2=0.9995$,表明葡萄糖标准曲线在 10~50 mg 范围内线性关系较好。

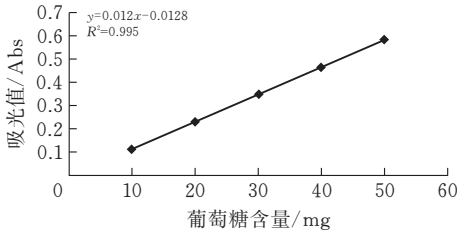


图 1 葡萄糖标准曲线

2)多糖得率的计算 多糖得率

$$X=\frac{m_1-m_0}{M\times1000}\times100\%$$

式中: m_1 表示总糖含量,mg; m_0 表示还原糖含量,mg; M 表示药材干重,g。

1.3.4 干膏得率的测定 将蒸发皿干燥至恒重 m_0 ,精密吸取提取液置于恒重的蒸发皿中,精密称定质量 m_1 ,水浴上蒸干提取液得浸膏,于 105 ℃ 下干燥 3 h,取出,置干燥器中冷却 30 min,快速精密称定质量 m_2 。干膏得率

$$Y=\frac{m_2-m_0}{m_1-m_0}\times100\%$$

1.3.5 单因素实验设计

1)加水倍数:按照处方量称取茯苓枸杞饮,共 85 g,加入 4、6、8、10、12 倍水,煎煮 2 次,每次 2 h;

2)煎煮时间:按照处方量称取茯苓枸杞饮,共 85 g,加入 6 倍水,煎煮 2 次,每次煎煮 30、60、90、120、160 min;

3)煎煮次数:按照处方量称取茯苓枸杞饮,共 85 g,控制煎煮次数为 1、2、3 次,加入 6 倍水,每次煎煮 60 min。

通过对多糖得率和干膏得率进行比较,得最佳单因素条件。

1.3.6 正交实验设计 根据前期单因素实验,选择加水倍数、煎煮时间、提取次数为水提工艺的主要因素,按三因素三水平表进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,以多糖得率、干膏得率为评价指标进行实验(表 1)。

表 1 茯苓枸杞饮正交实验设计

水平	因素			
	A 加水倍数/倍	B 煎煮时间/min	C 浸提数/次	D 空白
1	6	30	1	1
2	8	60	2	2
3	10	90	3	3

1.3.7 验证实验 按照最终优化工艺条件,做 3 份平行实验,分别测定多糖得率和干膏得率,若实验结果与正交试验结果相近,说明优化的工艺条件具有可行性。最终得到由 85 g 药材制成 300 mL 溶液。

1.3.8 茯苓枸杞饮与苯溴马隆对 XOD 酶活力的影响 黄嘌呤在 XOD 的作用下可以产生 UA,产物 UA 在特定的波长下可作为检测 XOD 抑制率的依据。参考陈雨涪等采用的方法^[17-18],对实验条件进行优化。

1)检测波长的确定 利用紫外分光光度计在 250~350 nm 波长范围内扫描波长,来检测黄嘌呤与 XOD 的反应产物的最佳检测波长。

2)酶浓度与吸光值的关系 配置不同浓度的 XOD,酶浓度分别为 50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$,加入 1 mL 黄嘌呤启动反应,在最佳反应波长下进行检测,以酶浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘图,确定最适酶溶液浓度。

3)茯苓枸杞饮与苯溴马隆对 XOD 酶活力的检测 样品的配置:在最佳工艺条件下,取 0.1 mL 茯苓枸杞饮加入在 0.2 mL 最佳浓度的 XOD 中,再取 2 mL 缓冲溶液混匀,36 ℃ 静置 2 h,加入 1 mL 黄嘌呤启动反应,进行检测;阳性对照的配置:将苯溴马隆取 2.0 mg,用 1 mL 缓冲溶液溶解后,同上取 0.1 mL 后进行处理检测;空白对照排除试剂本身对实验的干扰。

对 XOD 的抑制率

$$Z=1-\frac{A_1-A_2}{A_0-A_3}\times100\%$$

式中: A_0 表示阴性对照组吸光值; A_1 表示阳性(样品)对照组吸光值; A_2 表示阳性(样品)空白组吸光值; A_3 表示阴性空白组吸光值。

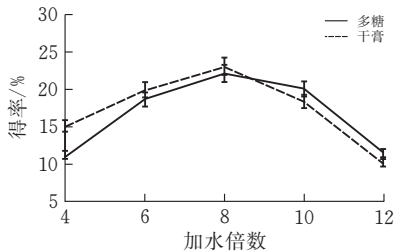
根据 85 g 药材制成 300mL 的茯苓枸杞饮合剂。分别测定浓度为 283,200,100,50,15. 625 mg/mL 的茯苓枸杞饮合剂对 XOD 的抑制率,将茯苓枸杞饮合剂浓度与抑制率进行回归,得到回归方程,计算抑制率为 50% 时的药物浓度,即半数抑制浓度 (IC_{50})。

2 结果与分析

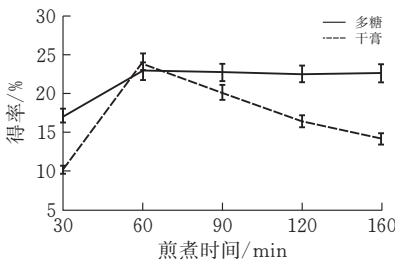
2.1 单因素实验结果分析

根据图 2 可知,茯苓枸杞饮的最佳工艺条件为加水倍数为 8 倍、浸提时间 60 min、浸提次数 2 次。分析可知:

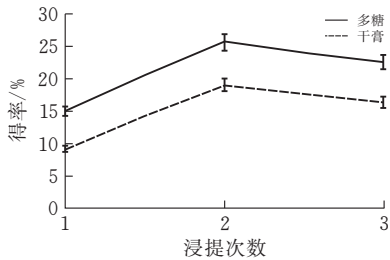
- 1)随加水倍数的增加,多糖得率和干膏得率呈先增加后下降趋势,可能原因是当加水量过少,饮片未能浸泡完全,有效成分及其他物质溶出率低;当加水量过多,饮片中的有效成分已充分溶出,加水只能改变体积,起到稀释作用,从而降低。当加水倍数为 8 倍水时,多糖得率和干膏得率达到最大值。
- 2)随着煎煮时间的增加,多糖得率和干膏得率呈现先增加后下降的趋势,可能是提取时间太短使得饮片中溶出的成分过少;长时间提取会使溶出的成分被破坏。多糖得率和干膏得率在提取 1 h 时达到最大值。
- 3)多糖得率和干膏得率在提取 2 次后达到最大值,可能原因是提取次数过少,饮片成分不能充分溶出;提取次数过多,溶出的成份被破坏或成分之间发生相互作用使含量降低。



(a)加水倍数



(b)煎煮时间



(c)浸提次数

图 2 单因素实验结果

2.2 正交实验结果分析

2.2.1 正交结果分析 根据上述单因素实验结果,选择加水倍数、煎煮时间、提取次数为水提工艺的主要因素,按单因素考察结果设置的水平进行正交试验。

根据主观权重赋权法,参考相关文献^[17],得出综合评分的权重系数为:多糖得率(70%)、干膏得率(30%),试验结果如表 2 所示。

表 2 正交实验结果

编号	加水 倍数	浸提 时间	浸提 次数	空白	多糖得 率/%	干膏得 率/%	综合 得分
1	6	30	1	1	18.89	26.15	21.07
2	6	60	2	2	14.66	33.82	20.41
3	6	90	3	3	28.1	23.98	26.86
4	8	30	2	3	15.64	33.73	21.07
5	8	60	3	1	25.66	30.9	27.23
6	8	90	1	2	19.48	25.07	21.16
7	10	30	3	2	27.48	21.32	25.63
8	10	60	1	3	14	22.57	16.57
9	10	90	2	1	17.05	29.32	20.73
k_1	22.78	22.59	19.60				
k_2	23.15	21.40	20.74				
k_3	20.98	22.92	26.58				
R	2.17	1.52	6.98				

R 值的大小反映了实验中各因素对所测指标的影响程度, R 值越大则表示该因素对实验结果的影响越大。由表 2 可知,根据综合权重比较,浸提次数对实验指标的影响最大的,其次是加水倍数和浸提时间。初步分析得最佳工艺为:加 8 倍水、浸提 3 次、每次 90 min。

2.2.2 方差分析 方差分析结果见表 3,可知浸提次数有显著差异,与上正交分析表结果相同。考虑成本等因素,综合考虑最佳提取工艺为:8 倍水先浸泡 30 min 后,浸提 3 次,每次 90 min。

表 3 综合方差分析

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值
加水倍数	8.112	2	4.056	2.345
浸提时间	3.804	2	1.902	1.099
浸提次数	84.089	2	42.044	24.304

浸提次数有显著性差异 $p<0.05$

2.3 验证实验

按照正交实验最优条件(加 8 倍水,提取 3 次,每次 90 min),做 3 次平行,测得多糖得率及干膏得率,结果如表 4 所示。实验结果综合评分为 31.22±0.026 分,比正交结果好且数据稳定,说明该工艺条件具有可行性。

表 4 验证实验结果			
组号	多糖得率/%	干膏得率/%	综合评分/分
1	30.12	33.76	31.212
2	29.78	34.71	31.259
3	30.07	33.83	31.198

2.4 茯苓枸杞饮与苯溴马隆对 XOD 酶活力的影响结果分析

2.4.1 最佳检测波长的确定

由图 3 可知,黄嘌呤和尿酸分别在 270 nm 和 290 nm 处有最大吸收波长,将不同浓度的 XOD 中加入黄嘌呤启动反应,如图 4 所示,均在 290 nm 处有最大吸收波长,且证明黄嘌呤与 XOD 反应后的产物为 UA。

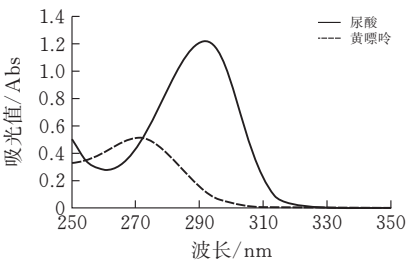


图 3 黄嘌呤与尿酸扫描波长

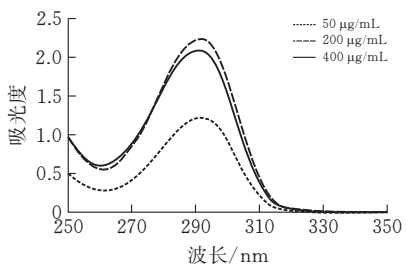


图 4 不同浓度 XOD 底物扫描波长

2.4.2 最佳 XOD 浓度的确定 由图 5 可知,在 10~100 µg/mL 范围内,加入黄嘌呤的 XOD 反应体系的吸光度随着浓度的增加而不断增加。当浓度达到 200 µg/mL 时,吸光度达到最大,为 1.884,之后随着浓度的增大吸光值在 1.884 范围上下波动。综上,最佳 XOD 浓度为 200 µg/mL。

2.4.3 茯苓枸杞饮对 XOD 活力的影响

根据表 5 可知,茯苓枸杞饮对 XOD 活力的抑制率可达到 43.79%,与苯溴马隆抑制率 62.99%较接近,由此可作为预防痛风,抑制尿酸生成的预防型保健品。

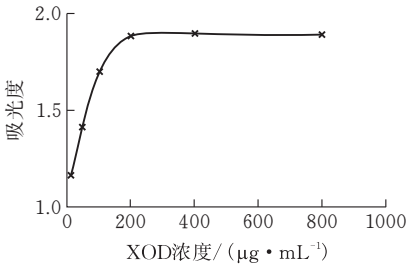


图 5 吸光值与 XOD 浓度关系

表 5 抑制率表		
	抑制率/%	IC50/(mg·mL ⁻¹)
茯苓枸杞饮	43.79±0.685	87.25±0.254
苯溴马隆	62.99±0.604	18.28±0.125

3 结论

通过单因素和正交实验可知,茯苓枸杞饮的最佳工艺条件为加 8 倍量的水、浸提时间 60 min、浸提次数 2 次。且通过重复性实验验证,按此工艺参数,可制备品质稳定的茯苓枸杞饮饮品。且在 290 nm 处、酶浓度 200 µg/mL 条件下,茯苓枸杞饮相对于苯溴马隆,对 XOD 一定的抑制作用,且抑制率为(43.76±0.685)%。该实验为后期研发具有预防痛风的功能性食品提供了实验基础和思路。

[参 考 文 献]

[1] BUPPARENOO P, PAKCHOTANON R, NARONGROEKNAWIN P, et al. Effect of curcumin on serum urate in asymptomatic hyperuricemia: a randomized placebo-controlled trial[J]. Journal of Dietary Supplements, 2020(6):1-13.

[2] 李安,肖小年.黄嘌呤氧化酶抑制剂研究进展及发展前景[J].江西食品工业,2012,48(1):43-45.

[3] 王琤.高尿酸血症和痛风患者用药有讲究[J].开卷有益-求医问药,2021(2):16-18.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:240-241.

[5] 田婷,陈华,殷璐,等.茯苓和茯苓皮水和乙醇提取物的利尿作用及其活性成分的分离鉴定[J].中国药理学与毒理学杂志,2014,28(1):57-62.

[6] LEE S R, LEE S, MOON E, et al. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory triterpenoids from the sclerotia of Poria cocos using LPS-stimulated Raw264.7 cells[J]. Bioorganic Chemistry, 2016, 70 (Complete):94-99.

[7] 梁丹灵. 树舌灵芝和茯苓提取物改善高尿酸血症作用研究[D].广州:广州中医药大学,2019.

[8] 郭花斌,辛宝.药食两用中草药在防治高尿酸血症上的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(86):

50-51,53.

[9] 张喜康,赵宇慧,刘军,等.枸杞不同生长期多糖的理化特性及结构分析[J].食品科学,2020,41(16):158-164.

[10] WU D T, GUO H, SHANG L, et al. Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of Lycium barbarum polysaccharides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 79:171-183.

[11] 侯学谦,祝婉芳,曲玮,等.枸杞化学成分及药理活性研究进展[J].海峡药学,2016,28(8):1-7.

[12] 刘亚飞,彭新颜,贺红军,等.桑葚浓缩汁对 D-半乳糖诱导氧化损伤大鼠脾脏的保护作用[J].食品科学,2018, 39(1):192-199.

[13] CHEN C, YOU L J, ABBASI A M, et al. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 130: 122-132.

[14] 魏晓楠,郝铁成.中药提取新技术研究进展[J].中国野生植物资源,2020,39(9):47-50.

[15] 邓未娇,闫洁熙,王沛,等.茯苓多糖对高尿酸血症大鼠肾小管转运体 rURAT1、rOAT1 和 rOCT2 表达的影响[J].西部中医药,2019,32(6):10-14.

[16] 罗春萍,陆友利,王星星.苯酚-硫酸法快速测定多糖方法的优化[J].化工管理,2021(3):90-91,94.

[17] 赵婷婷,何承辉,谭梅娥,等.基于多指标权重分析和单因素-正交实验优选前列爽颗粒醇提工艺[J].化学与生物工程,2020,37(12):45-50.

[18] 方天仪,李曼曼,丁雪东,等.16 种中药水提物和醇提物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J].黑龙江畜牧兽医, 2019(7):112-115.

Study on Extraction Technology of Poria Cocos and Medlar Drink and Its Effect on Xanthine Oxidase

CHEN Anli, CHEN Yanxi, MA Zhuo

(College of Bioengineering and Food, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China)

Abstract: Objective of this paper is to develop a health care product with preventive effect on gout. By taking Poria cocos, Lycium barbarum and other Chinese medicinal materials with homologous medicine and food as main raw materials, taking polysaccharide yield and dry extract yield as evaluation indexes, orthogonal experiment was used to optimize the water addition multiple, decoction time and decoction times of Poria cocos Lycium barbarum drink. The inhibitory effects of Fuling Lycium barbarum Decoction and benzbromarone on xanthine oxidase (XOD) activity in vitro were detected, and the best detection conditions were determined by ultraviolet spectrophotometry. The results showed that the best water extraction process was to add 8 times of water, extract for 3 times, each time for 90 minutes. The repeatability experiment proved that according to this process parameter, Poria cocos Lycium barbarum drink with stable quality could be prepared. And at 290 nm, under the condition of enzyme concentration of 200 g/mL, Fuling Lycium barbarum drink has a certain inhibitory effect on XOD compared with benzbromarone, and the inhibitory rate is $43.79 \pm 0.685\%$, IC_{50} is $87.25 \pm 0.254\text{mg/mL}$; Conclusion the preparation process is reasonable in design, simple and feasible in operation, and has a certain inhibitory effect on XOD, which can prevent gout and provide reliable experimental basis for production.

Keywords: poria cocos; lycium barbarum; xanthine oxidase; inhibitory effect

[责任编辑: 张 众]