

壶瓶碎米茅多糖的提取、分离及抗氧化活性研究

李美东, 黄秀芳, 罗凯*

(湖北民族大学生物科学与技术学院 湖北恩施 445000)

摘要 研究壶瓶碎米茅多糖的提取、分离纯化方法,并分析其体外抗氧化活性。试验结果表明,通过超声波、酶辅助提取壶瓶碎米茅多糖的最佳工艺条件:液料比 30:1,超声时间 25 min,纤维素酶添加量 2%,提取温度 90 ℃,提取时间 120 min,测得实际值为 48.53 mg/g。采用 Svage 法脱蛋白 7 次,多糖的损耗率较小。经 DEAE-52 纤维素层析得到 4 种组分多糖。体外抗氧化活性分析表明,壶瓶碎米茅粗多糖具有一定的还原能力,对 ABTS 自由基、羟基自由基的清除能力较强。

关键词 壶瓶碎米茅; 多糖; 分离纯化; 抗氧化

文章编号 1009-7848(2022)04-0196-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.04.019

多糖 (Polysaccharide) 是由大量通过糖苷键 (α -或 β -) 脱水聚合相互连接而成的单糖残基组成的一种生物大分子物质^[1]。自然界中,几乎所有活的生物体中都含有多糖。人们习惯上把从生物体中提取的并通过研究证明具有一定生理活性的多糖称为生物活性多糖 (Bioactive polysaccharides)。近年来,由于人们日常生活水平的提高和对身体健康知识的逐步了解,生物活性多糖因本身的低毒性、广泛性和高效性等特点而被作为营养补充剂被大量的研究。多糖的生物活性主要包括增强免疫调节^[2-3]、抗氧化^[4-5]、抗病毒^[6-7]、抗肿瘤^[8-9]、降血糖^[10]、降血脂^[11]、抗凝血^[12]等。

壶瓶碎米茅 (*Cardamine hupingshanensis*), 十字花科碎米茅属, 别名雀儿菜、白带草, 1 年到 2 年生草本植物, 常见于海拔 1 km 以下的低地草丛中, 在全中国分布广泛^[13]。壶瓶碎米茅具有较强富硒能力。现有研究中, 对碎米茅属的基因组学研究主要有: ①基因组学研究, 如: Bleeker 等^[14]对德国的碎米茅种属的 DNA 序列进行研究, 得出结论: 此种碎米茅是来自于亚洲的物种; ②蛋白质组学研究, 如: Both 等^[15]通过检测壶瓶碎米茅中的无机硒、有机硒, 得出壶瓶碎米茅生物体内无机硒占 20%, 有机硒以硒代半胱氨酸和硒代甲硫氨酸的

形式存在; ③硒耐受能力测试^[16-17], Zhou 等^[2]从壶瓶碎米茅中组装 48 989 个单基因, 分别在根和叶中表达 39 579 个和 33 510 个。通过差异表达分析鉴定出位于 4 个不同路径中的 25 个基因, 这些路径对壶瓶碎米茅中的亚硒酸盐有显著响应; ④品种改良^[18]等方面研究。

本试验中采用超声波与酶辅助提取壶瓶碎米茅多糖, 采用 Sevag 法除蛋白, 通过 DEAE-52 纤维素分级醇沉, 采用 Sephadex G-100 和紫外光谱法进行纯度鉴定, 并研究其体外抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壶瓶碎米茅, 采自湖北省恩施市新塘乡渔塘坝。自然风干后粉碎过 100 目筛, 贮存于试剂瓶中保存备用。

纤维素酶、标准葡萄糖、DEAE-52 纤维素、Sephadex G-100 葡聚糖、乙醇、苯酚、硫酸、三氯甲烷、正丁醇均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

Nicolet iS5 红外分析仪, 赛默飞世尔公司; KQ5200 型超声波仪, 北京中仪汇丰科技有限公司; BS-100A 自动部分收集器、HL-2 恒流泵, 北京佳航博创科技有限公司; BC-W203 旋转蒸发仪, 上海耀特仪器设备有限公司; 真空冷冻干燥箱, 上海启前电子科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 提取 称取 1.0 g 壶瓶碎米茅粉末, 适当条件下经超声波、酶处理后进行热水提取, 收集滤液

收稿日期: 2021-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860066); 湖北省教育厅项目 (B2017093)

作者简介: 李美东 (1996—), 男, 硕士生

通信作者: 罗凯 E-mail: luokai_79@163.com

后,4 000 r/min 离心 15 min,旋转蒸发,加入 95% 乙醇 4 ℃醇沉至少 10 h,4 000 r/min 离心 10 min,冷冻干燥得到壶瓶碎米茅粗多糖。

1.3.2 单因素实验设计 液料比:15:1,20:1,25:1,30:1,35:1;纤维素酶添加量:0%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%;超声波时间:10,15,20,25,30 min;提取时间:30,60,90,120,150 min;提取温度:60,

70,80,90,100 ℃。

1.3.3 响应面试验设计 根据单因素实验结果,选择料液比、纤维素酶添加量、超声波时间、提取时间、提取温度为考察因素,以碎米茅多糖得率为考察目标,利用 Design-Expert.V8.0.6 软件进行 5 因素 3 水平的响应面试验设计,因素水平表见表 1。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Level table of experimental factors for response surface

水平	A(料液比/g·mL ⁻¹)	B(超声时间/min)	C(纤维素酶添加量/%)	D(提取温度/℃)	E(提取时间/min)
-1	1:20	15	1.0	70	60
0	1:25	20	1.5	80	90
1	1:30	25	2.0	90	120

1.3.4 多糖含量的测定 多糖含量测定均使用苯酚-硫酸法^[19]。以葡萄糖为标准品,葡萄糖浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y),测得标准曲线为 $y = 0.0089x - 0.0003$, $R^2 = 0.9961$ 。

1.3.5 除蛋白

1.3.5.1 蛋白质含量测定 以牛血清白蛋白为标准品,牛血清白蛋白浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y),测得标准曲线为 $y = 0.006x + 0.0085$, $R^2 = 0.9979$ 。

1.3.5.2 方法 Sevag 法:将正丁醇与三氯甲烷按照 1:4 的体积比配制 Sevag 试剂,将壶瓶碎米茅粗多糖溶液与 sevag 试剂以 4:1 的体积比混合后,封口,置于摇床上剧烈振荡 30 min 后,转置于分液漏斗中静置 30 min。收集上层液,待用。

1.3.6 分级 将 DEAE-52 纤维素层析柱用去离子水平衡,将样品溶液上样至层析柱中,以 0,0.1,0.2,0.4,0.7 mol/L 的 NaCl 溶液进行洗脱,流速为 1 mL/min,每管收集 10 mL,多糖浓度由苯酚-硫酸法在波长 490 nm 处测定,以管数为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y)绘制曲线。

1.3.7 纯度鉴定 将 Sephadex G-100 层析柱用去离子水平衡,将样品溶液上样至层析柱中,用蒸馏水洗脱,流速为 0.1 mL/min,每管收集 2 mL,多糖浓度由苯酚-硫酸法在波长 490 nm 处测定,以管数为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y)绘制曲线。

1.3.8 体外抗氧化能力测定

1.3.8.1 ABTS 自由基清除能力测定 参考文献

[20]的方法,并对试验步骤稍作修改。配制 0.007 mol/L 的 ABTS 溶液和 0.14 mol/L 的过硫酸钾溶液,按 1:1(体积比)混合后在 25 ℃下避光反应 12 h,为 ABTS 自由基储备液。使用 PBS(pH 7.4)将储备液在波长 734 nm 处的吸光值调整为 0.70 ± 0.02 ,备用。取不同浓度的壶瓶碎米茅粗多糖溶液 1 mL(空白组取等量的纯水),加 3 mL 调整吸光值后的储备液,于暗处反应 1 h,在波长 734 nm 处测定其吸光度,VC 作为阳性对照,每组重复 3 次。

1.3.8.2 羟基自由基清除能力测定 参考文献[21]的方法,并对试验步骤稍作修改。量取不同浓度的壶瓶碎米茅粗多糖溶液 1 mL 于具塞试管中(空白组取等量的纯水),加入 2 mL 3 mmol/L 硫酸亚铁溶液和 1.5 mL 1.8 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液,再加入 0.1 mL 0.03% H_2O_2 溶液启动反应,在 37 ℃下水浴 30 min 后,在波长 510 nm 处测定吸光值,VC 作为阳性对照,每组重复 3 次。

1.3.8.3 总还原能力测定 参考文献[22]的方法,并对试验步骤稍作修改。量取不同浓度的壶瓶碎米茅粗多糖溶液 1 mL 于具塞试管中(空白组取等量的纯水),加入 1.0 mL 1.0 mol/L pH 6.6 PBS 和 2.5 mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液,50 ℃下水浴 20 min,冷却后向其中加入 2.0 mL 10% TCA 溶液,5 000 r/min 离心 5 min 后,取 2.5 mL 上层清液,再加入 2.5 mL 超纯水和 0.5 mL 1% $FeCl_3$ 溶液,混匀后在波长 700 nm 处测定吸光值,VC 作为阳性对照,每组重复 3 次。

1.4 统计分析

所有试验重复3次,统计结果均为平均值。响应面试验利用 Design-Expert.V8.0.6 软件进行分析,细胞学试验利用 SPSS 24 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 液料比对壶瓶碎米茅多糖得率的影响 在植物多糖提取过程中,原料与溶剂的比例是十分

关键的参数,本试验探究了不同液料比对碎米茅多糖得率的影响,所得结果如图 1a 所示。结果表明,当提取溶剂用量达到 300 mL,原料为 10 g 时,碎米茅多糖的得率达到最大值,若继续增加溶剂用量,壶瓶碎米茅多糖的得率反而呈缓慢下降的趋势。分析其原因可能是当液料比达到 30:1 时,糖类物质已基本溶出,再增加溶剂的用量,使多糖的损失率提高,因此,确定液料比为 30:1 比较合适。

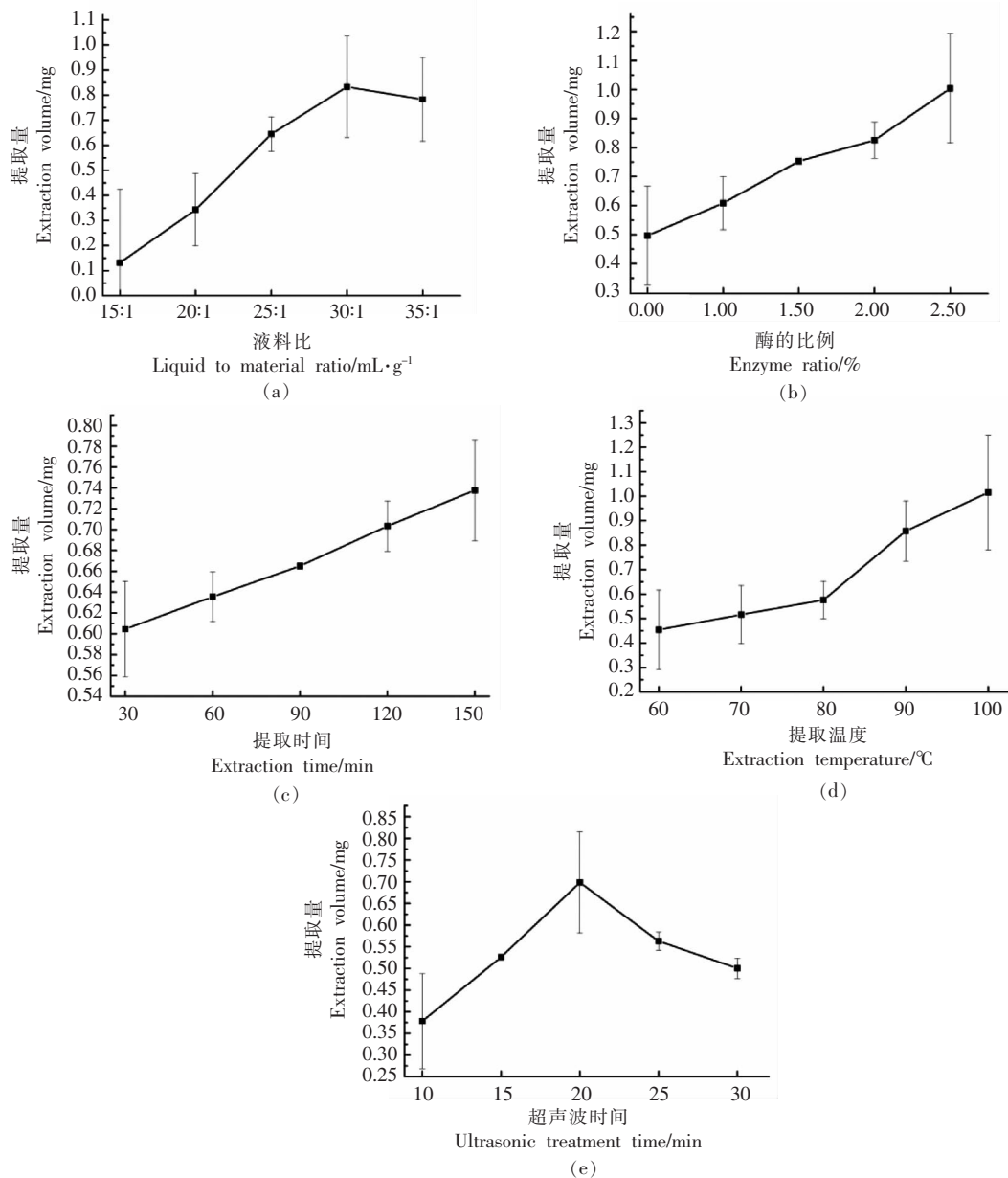


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Single factor experiment results

2.1.2 纤维素酶添加量对壶瓶碎米芥多糖得率的影响 植物体内含有大量的纤维素,利用适量的纤维素酶对植物原料进行处理,能提高多糖的得率。本试验探究了纤维素酶添加量对碎米芥多糖得率的影响规律,结果如图 1b 所示。结果表明,添加纤维素酶能明显提高多糖得率,而且随着添加量的增加,多糖得率也在增加,在 2.5% 时最大。

2.1.3 提取时间对壶瓶碎米芥多糖得率影响 提取时间作为提取多糖的另一个重要的影响因素,本试验对不同提取时间下壶瓶碎米芥多糖的得率进行探究,结果如图 1c 所示。结果表明,随着提取时间的延长,多糖得率在逐渐上升,然而多糖的绝对增长量不高,在考虑到节约时间成本的情况下,选择 120 min 比较合适。

2.1.4 提取温度对壶瓶碎米芥多糖得率影响 提取温度是对多糖得率的一个重要的影响因素,本试验探究不同提取温度对壶瓶碎米芥多糖得率的影响,结果如图 1d 所示。结果表明,随着温度的升高,多糖得率在逐渐上升,在 80~90 °C 之间,多糖

量有一个大的提升,故选择 90 °C 比较合适。

2.1.5 超声波时间对壶瓶碎米芥多糖得率的影响

超声波通过对细胞膜通透性的改变和破坏,能刺激细胞将细胞液内物质释放,因此能够有利于植物细胞中生物活性物质的提取,本试验探究了不同超声时间对碎米芥多糖得率的影响规律,结果如图 1e 所示。结果表明,随着超声时间的逐渐延长,碎米芥多糖的得率呈先上升后下降的趋势,在超声时间到 20 min 时达到最大值,此时继续增加超声时间,碎米芥多糖得率呈下降趋势。分析其原因可能是超声时间过长,溶液温度也变高,导致多糖类物质稳定性下降,部分被氧化,得率降低。因此,超声时间选择 20 min 为宜。

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面分析 根据 Design-Expert 软件中的 Box-Behnken 进行响应面设计,料液比、纤维素酶添加量、超声时间、提取温度、提取时间为响应面因变量,碎米芥粗多糖为响应值,进行响应面试验。所得试验结果见表 2。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

编号	多糖得率/mg·g ⁻¹	编号	多糖得率/mg·g ⁻¹	编号	多糖得率/mg·g ⁻¹
1	50.3464	16	43.8314	31	33.4636
2	49.8754	17	58.4354	32	52.9184
3	60.0034	18	44.4723	33	47.8176
4	50.2541	19	35.4177	34	52.9184
5	50.516	20	57.1239	35	52.9184
6	50.7993	21	42.1229	36	48.2484
7	48.7676	22	52.3375	37	60.7147
8	48.4392	23	55.7105	38	52.9184
9	50.9753	24	38.1466	39	52.9184
10	45.0026	25	46.4723	40	39.0854
11	55.7743	26	38.6097	41	48.2152
12	50.3483	27	49.2184	42	50.8556
13	58.7019	28	45.0859	43	62.1197
14	38.331	29	58.9025		
15	45.9508	30	45.0019		

2.2.2 回归模型的方差分析 如表 2 所示,BBD 设计试验进行了 46 次,以优化 5 个单独的提取参数。结果表明,在以下试验条件下能取得最大收益:料液比 1:30,超声时间 24.80 min,纤维素酶添加量 2%,提取温度 90 °C,提取时间 120 min,多糖

提取量为 44.54 mg/g。通过对试验数据进行多元回归分析,响应值与变量之间以下列二阶多项式方程式关联:

$$Y=5.44+0.25A-0.12B-0.21C-0.024D-0.31E-0.048AB+0.047AC-0.012AD+0.20AE+0.11BC-$$

$$0.076BD - 0.0021BE - 0.16CD - 0.37CE + 0.30DE - 0.49A^2 - 0.34B^2 - 0.42C^2 - 0.37D^2 - 0.23E^2$$

式中, Y ——多糖的质量(mg); A, B, C, D, E ——液料比、超声波时间、纤维素酶酶量、提取温度、提取时间。

把响应面分析所得数学模型进行方差分析, 以检验方程的有效性, 回归模型的方差分析如表

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P -值 $P > F$
模型	1 613.626	20	80.68128	5.01299	0.0001**
A	66.08145	1	66.08145	4.105855	0.0535
B	120.4676	1	120.4676	7.485045	0.0113*
C	198.6	1	198.6	12.33966	0.0017**
D	137.2459	1	137.2459	8.527534	0.0073**
E	74.41003	1	74.41003	4.623337	0.0414*
AB	35.58123	1	35.58123	2.210777	0.1496
AC	6.588206	1	6.588206	0.409347	0.5281
AD	162.8686	1	162.8686	10.11956	0.0039**
AE	110.0034	1	110.0034	6.834867	0.0149*
BC	29.69651	1	29.69651	1.84514	0.1865
BD	144.2713	1	144.2713	8.964046	0.0061**
BE	11.20776	1	11.20776	0.696375	0.4119
CD	20.85201	1	20.85201	1.295603	0.2658
CE	112.7037	1	112.7037	7.002647	0.0139*
DE	168.2209	1	168.2209	10.45211	0.0034**
A^2	135.1366	1	135.1366	8.396477	0.0077
B^2	0.729909	1	0.729909	0.045352	0.8331
C^2	76.33609	1	76.33609	4.743009	0.0391
D^2	79.17716	1	79.17716	4.919534	0.0359
E^2	12.29054	1	12.29054	0.763651	0.3905
残差	402.3611	25	16.09444		
失拟项	331.327	20	16.56635	1.166085	0.4739(不显著)
纯误差	71.03409	5	14.20682		
总和	2 015.987	45			

注: A . 料液比, B . 超声时间, C . 纤维素酶添加量, D . 提取温度, E . 提取时间。* $P < 0.05$ 具有显著性; ** $P < 0.01$ 具有极显著差异。

为了更直观的预测自变量与响应值的关系, 使用 Design-Expert 绘制出如图 2 所示的 3D 响应图和轮廓图, 这些图能明显的看出各个变量之间两两存在的联系。由图可知, 两两因素交互在可选范围内均有最大值。从图 2 中 AB 交互项 3D 轮廓图中分析可知, 在其它因素都恒定时, 随着超声波时间的延长, 提取壶瓶碎米芥多糖量先增加后下

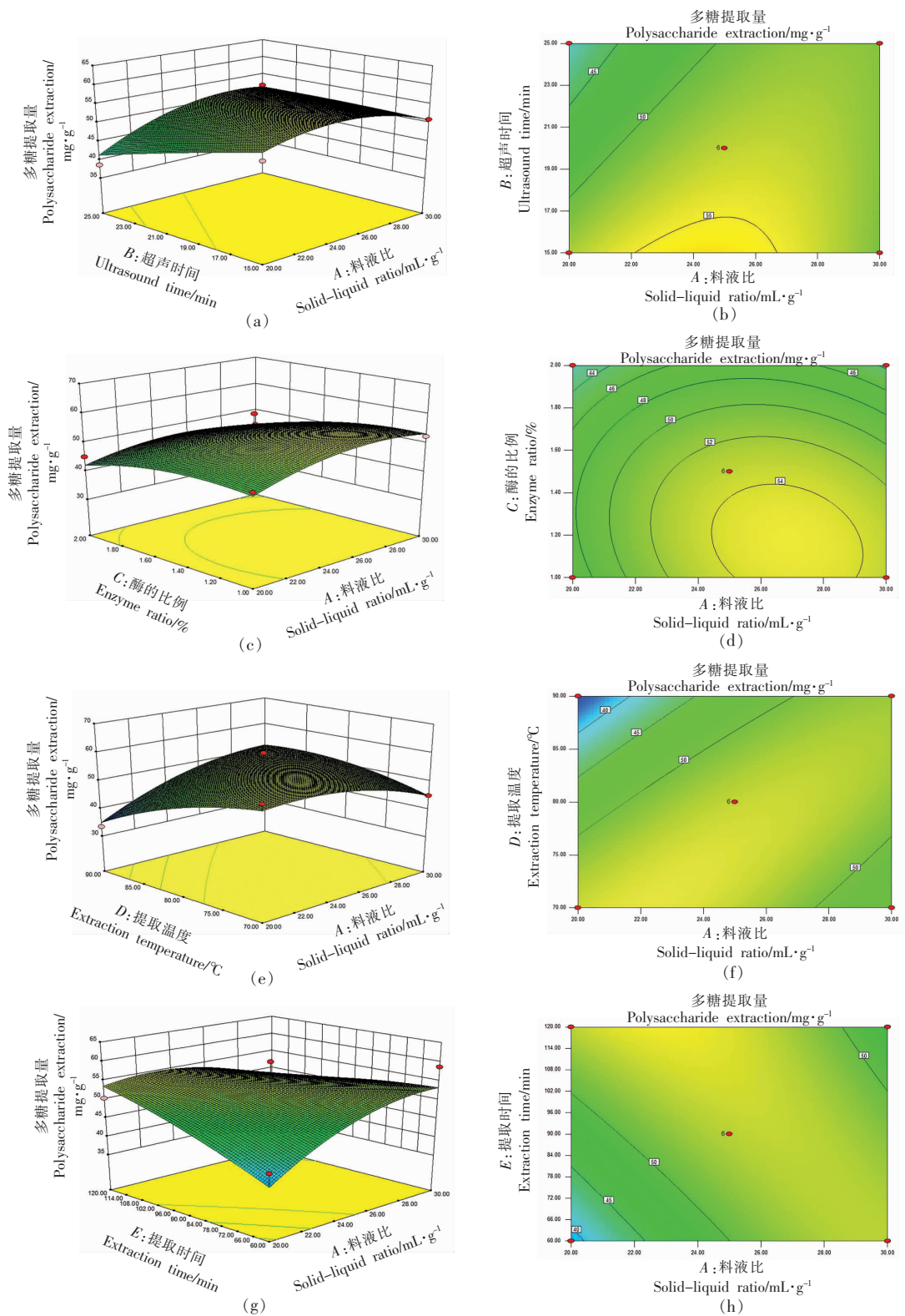
3 所示。通常模型中有较高的 F 值和较低的 P 值会使模型更加的显著, 在本试验中二次回归模型的 $F=5.013, P < 0.01$, 表明模型极显著; 失拟项是所得数学模型中的数据变异, 本试验中失拟项 $F=0.4739, P > 0.05$, 表示模型无失拟项的存在, 已然能充分说明实际情况, 回归模型是合适的。

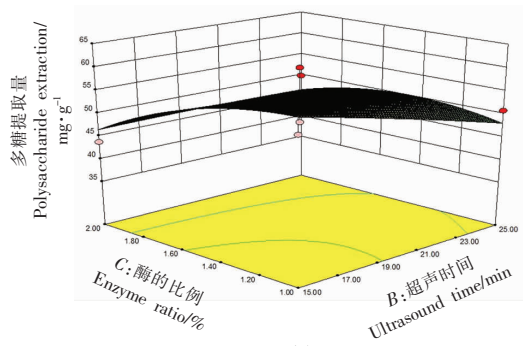
降, 液料比同之, 说明在这两个因素的交互作用下, 多糖提取有最大值, 同时等高线图形为椭圆形, 曲面陡峭, 说明这两个因素交互时有显著影响。同理可分析其它因素之间的显著性。

使用此模型方程对各因素选择最佳条件: 液料比 30:1, 超声时间 24.80 min, 纤维素酶添加量 2%, 提取温度 90 °C, 提取时间 120 min, 多糖提取

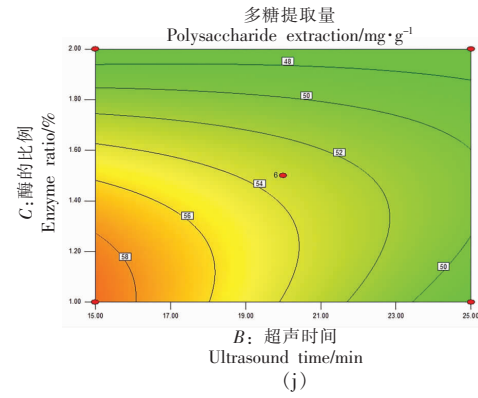
量为 44.54 mg/g。为了验证预测结果不偏离试验值且能正常实施,将最佳条件修改为:液料比 30:1,超声时间 25 min,纤维素酶添加量 2%,提取温度 90 °C,提取时间 120 min,并进行验证试验。测得实

际值为 48.53 mg/g,与预期并无显著性差异,说明此设计可用于超声波酶法提取壶瓶碎米芥粗多糖的预测和分析。

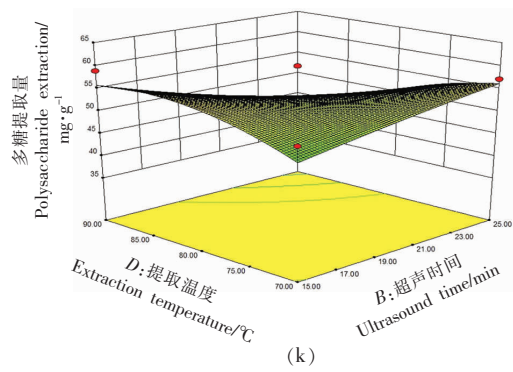




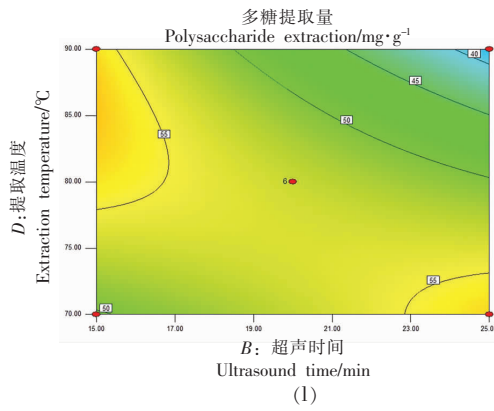
(i)



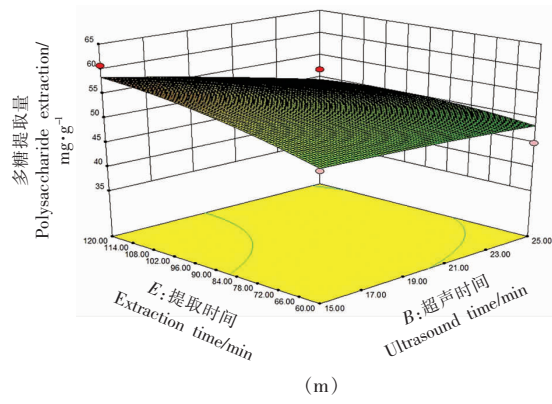
(j)



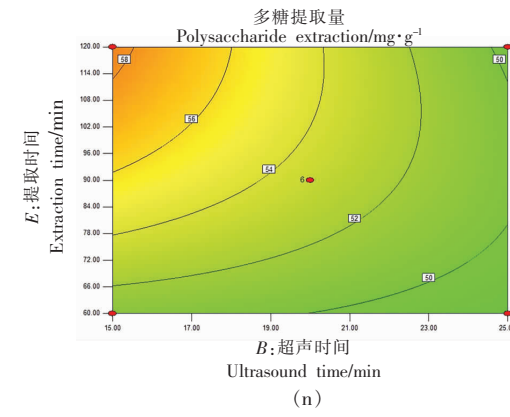
(k)



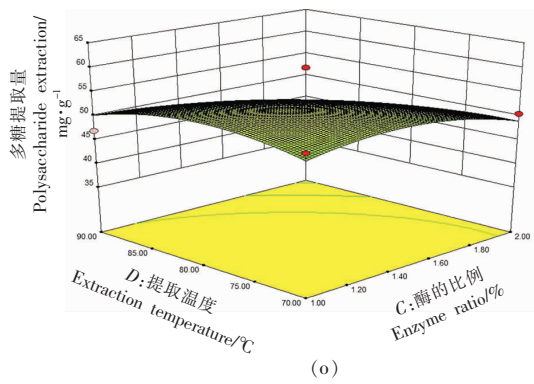
(l)



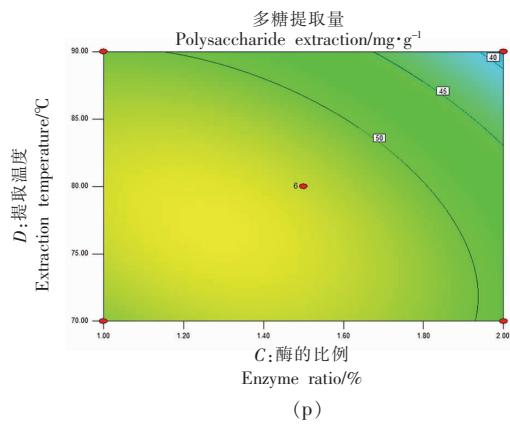
(m)



(n)



(o)



(p)

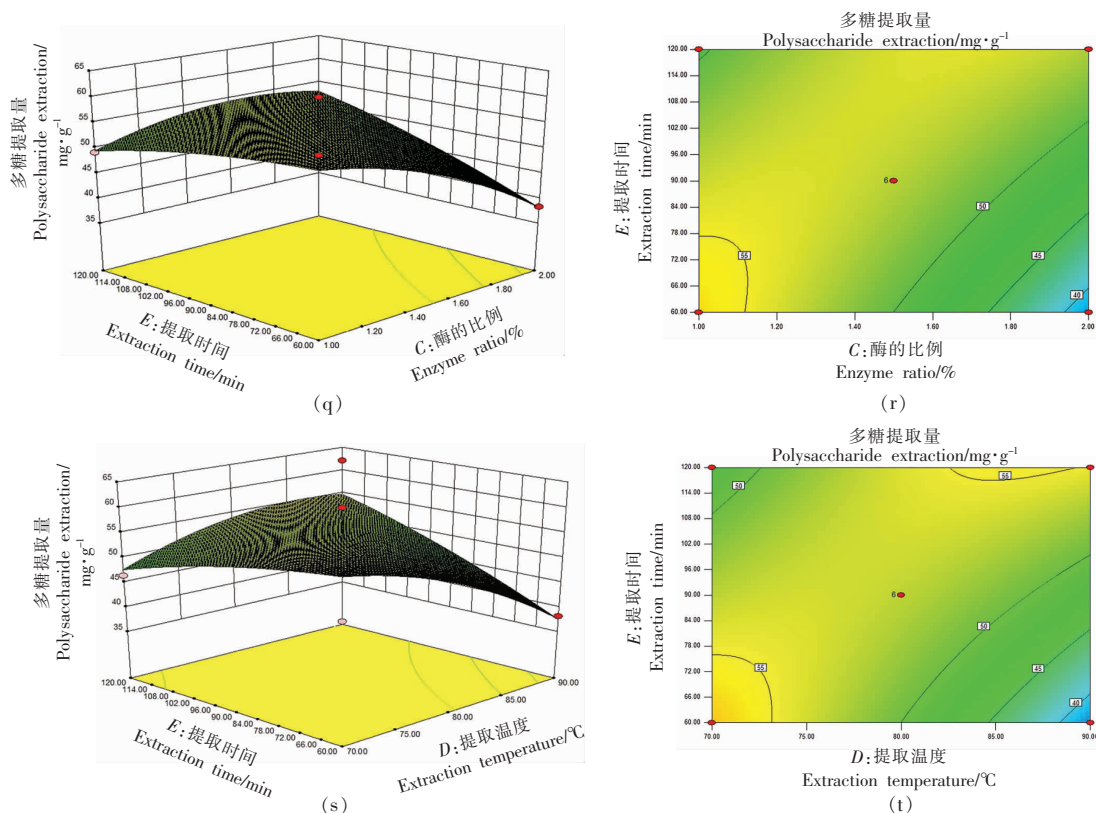


图 2 各因素交互作用响应面与等高线图

Fig.2 Response surface and contour map of the interaction of various factors

2.3 除蛋白结果

通过重复使用 Svage 法对壶瓶碎米芥多糖溶液进行除蛋白, 在每次步骤完成后对溶液的蛋白质含量以及多糖含量进行测定, 根据标准曲线计算, 得到如图 3 所示的蛋白去除率和多糖保留率图。从图中可知, 随着使用 Svage 法次数的增加,

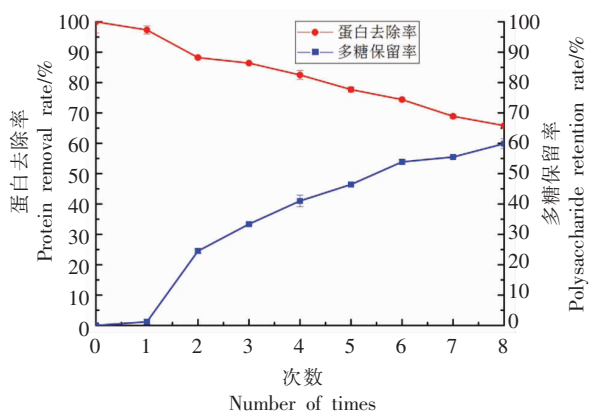


图 3 蛋白去除率和多糖保留率

Fig.3 Protein removal rate and polysaccharide retention rate

蛋白质含量明显降低, 然而多糖的损耗也随之增多, 到第 8 次时蛋白质的去除率趋于平缓, 而多糖的损耗量却没变化, 故选择使用 Svage 法除蛋白 7 次。

2.4 碎米芥多糖纯化工艺

由图 4 可知, 在第 30~37 管处出现了第 1 个

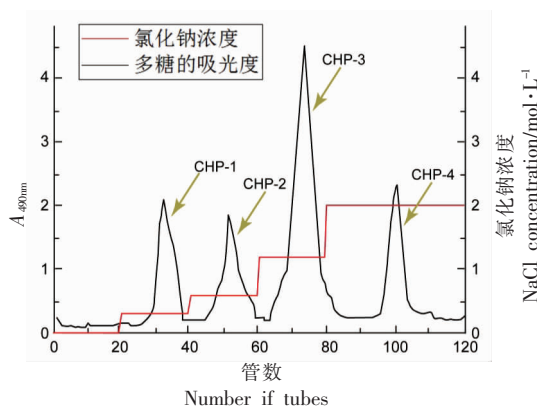


图 4 DEAE-52 纤维素层析柱试验结果

Fig.4 Experimental results of DEAE-52 cellulose column

峰,第48~58管处出现了第2个峰,第70~79管处出现了第3个峰,第96~102管处出现了第4个峰,且这4处峰都比较对称,证明利用NaCl溶液浓度梯度洗脱能将壶瓶碎米茅多糖较好的分离,将4种组分分别命名为CHP-1、CHP-2、CHP-3、CHP-4。

2.5 纯度鉴定结果

由图5可得,4种组分经Sephadex G-100层析柱洗脱后呈现单一且对称的峰,说明纯化过后的各组分壶瓶碎米茅多糖相对分子质量较均匀且纯度较高。

2.6 抗氧化试验结果

2.6.1 ABTS 自由基清除能力测定

ABTS 自由基清除能力通常作为抗氧化物质的总抗氧化能力测定的指标。不同质量浓度的壶瓶碎米茅粗多糖对ABTS 自由基清除率如图6a所示。结果显示,壶瓶碎米茅粗多糖的质量浓度与ABTS 自由基清除率

呈正相关,随着壶瓶碎米茅粗多糖质量浓度的升高,对ABTS 自由基的清除率也随之升高;在相同质量浓度下,壶瓶碎米茅粗多糖的清除能力远小于VC。

2.6.2 羟基自由基清除能力测定

羟基自由基在所有自由基中具有最强的氧化能力,人体内产生大量的羟基自由基,会对机体中的生物大分子(蛋白质、脂质、核酸)造成严重的破坏,严重会导致细胞产生癌变^[23]。不同质量浓度的壶瓶碎米茅粗多糖对氧基自由基的清除率如图6b所示。结果显示,壶瓶碎米茅粗多糖的质量浓度与羟基自由基的清除率呈正相关,并且随着浓度的升高,清除能力也越来越强;而对羟基自由基的清除能力还是远小于同质量浓度的VC。

2.6.3 总还原能力测定

通过不同质量浓度的壶瓶碎米茅粗多糖对总还原力的测定,结果如图6c所示。结果显示,壶瓶碎米茅粗多糖的质量浓度与

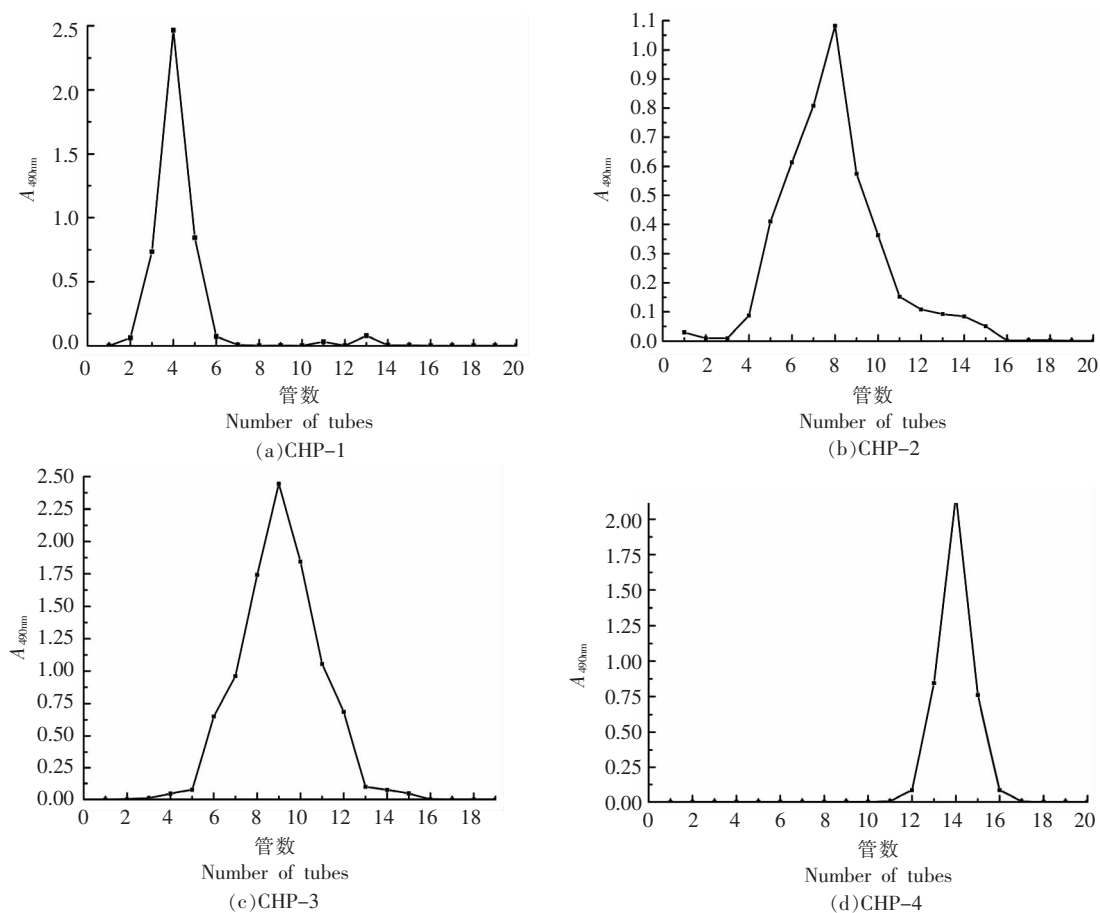
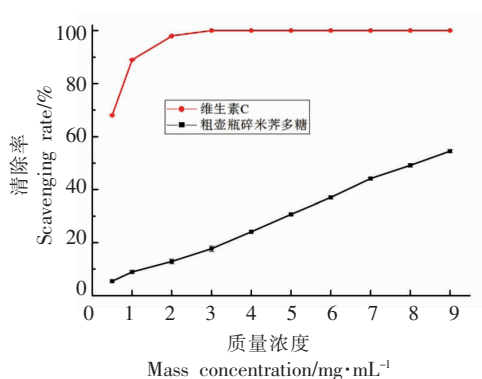
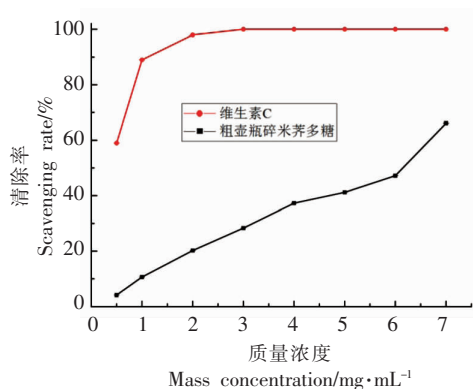


图5 Sephadex G-100层析柱洗脱曲线

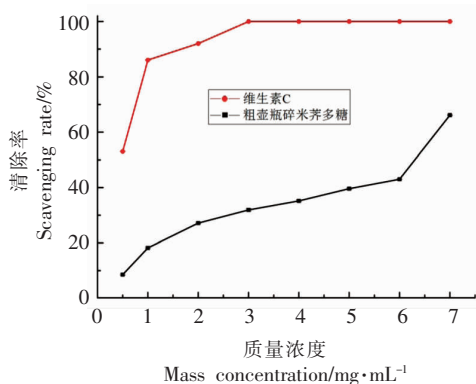
Fig.5 Experimental results of Sephadex G-100 column



(a) 壶瓶碎米茅多糖对 ABTS 自由基清除能力



(b) 壶瓶碎米茅多糖对羟基自由基清除能力



(c) 壶瓶碎米茅多糖总还原能力测定

图 6 抗氧化活性试验结果

Fig.6 Antioxidant capacity test results

总还原力呈正相关,并且随着质量浓度的升高,还原能力也越强;而还原能力还是远小于同质量浓度的 VC。

3 结论

通过单因素实验及响应面试验结果,得到壶瓶碎米茅最佳的提取工艺:液料比 30:1,超声时

间 25 min,纤维素酶添加量 2%,提取温度 90 ℃,提取时间 120 min,并进行验证试验,测得实际值为 48.53 mg/g,与预期并无显著性差异。通过对 Svage 法除蛋白次数的简单探究,得到使用 Svage 法 7 次能使蛋白的去除率达到最大的同时多糖损失率最小。通过 DEAE-52 纤维素柱层析柱对多糖溶液浓度梯度洗脱,可得到 4 种组分多糖(CHP-1、CHP-2、CHP-3、CHP-4),并通过 Sephadex G-100 层析柱验证其纯度,壶瓶碎米茅粗多糖具有较好的体外抗氧化活性。

参 考 文 献

- [1] DELATTRE C, FENORADOSOA T A, MICHAUD P. Galactans: An overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2011, 54(6): 1075-1092.
- [2] ZHOU Y, CHEN X, YI R, et al. Immunomodulatory effect of tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Molecules, 2018, 23(2): 239.
- [3] YU Z, KONG M, ZHANG P, et al. Immune-enhancing activity of extracellular polysaccharides isolated from *Rhizopus nigricans* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 318-325.
- [4] LI H, YAN J, QIN S, et al. Extraction and antioxidant functions of polysaccharides from seaweed [J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(6): 73.
- [5] CHEN S J, LI J Y, ZHANG J M. Extraction of yellow pear residue polysaccharides and effects on immune function and antioxidant activity of immunosuppressed mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 1273-1281.
- [6] WITVROUW M, DE CLERCQ E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs [J]. General Pharmacology: The Vascular System, 1997, 29(4): 497-511.
- [7] PUJOL C A, RAY S, RAY B, et al. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 1(51): 412-416.
- [8] NAZEAM J, GAD H A, ESMAT A, et al. Aloe arborescens polysaccharides: *In vitro* immunomodulatory activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 1273-1281.

- lation and potential cytotoxic activity[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2017, 20(5): 1–11.
- [9] SYNYTSYA A, KIM W-J, KIM S-M, et al. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81(1): 41–48.
- [10] CHEN Y Q, LIU D, WANG D Y, et al. Hypoglycemic activity and gut microbiota regulation of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa* in type 2 diabetic mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 126: 295–302.
- [11] HUANG M, WANG F Q, ZHOU X H, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic properties of polysaccharides from *Enterobacter cloacae* Z0206 in KKAY mice[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117: 91–98.
- [12] LIU S Z, MAJIDA A-W, NIU L R, et al. Degradation enhances the anticoagulant and antiplatelet activities of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. leaves[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 133: 674–682.
- [13] 中国植物志, 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第33卷十字花科[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 30.
Flora of China, Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China, Vol. 33, Cruciferae[M]. Beijing: Science Press, 1990: 30.
- [14] BLEEKER W, KLAUSMEYER S, PEINTINGER M, et al. DNA sequences identify invasive alien *Cardamine* at Lake Constance[J]. *Biological Conservation*, 2008, 141(3): 692–698.
- [15] BOTH E B, SHAO S, XIANG J, et al. Selenolanthionine is the major water-soluble selenium compound in the selenium tolerant plant *Cardamine violifolia*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2018, 1862(11): 2354–2362.
- [16] SHAO S, DENG G, MI X, et al. Accumulation and speciation of selenium in *Cardamine* sp. in Yutangba Se Mining Field, Enshi, China[J]. *Chinese Journal of Geochemistry*, 2014, 33(4): 357–364.
- [17] ZHOU Y, TANG Q, WU M, et al. Comparative transcriptomics provides novel insights into the mechanisms of selenium tolerance in the hyperaccumulator plant *Cardamine hupingshanensis*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1–17.
- [18] HAY A, TSIANTIS M. *Cardamine hirsuta*: A comparative view[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2016, 39: 1–7.
- [19] 张媛媛, 张彬. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J]. *食品科学*, 2016, 37(4): 158–163.
ZHANG Y Y, ZHANG B. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in green tea[J]. *Food Science*, 2016, 37(4): 158–163.
- [20] 李旭东, 孙彦峰, 冯佳, 等. 绿球藻多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(5): 47–53.
LI X D, SUN Y F, FENG J, et al. Studies on isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Chlorococcum* sp. GD[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(5): 47–53.
- [21] 高珍珍, 张超, 景丽荣, 等. 7种硒化多糖抗氧化活性的比较[J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52(3): 112–119.
GAO Z Z, ZHANG C, JING L R, et al. Comparison of seven selenium polysaccharides in antioxidant activities [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020, 52(3): 112–119.
- [22] 郑加嘉, 林英, 曾繁涛. 牛磺酸清除超氧阴离子和羟自由基的实验研究[J]. *宜春学院学报*, 2013, 35(6): 76–78.
ZHENG J J, LIN Y, ZENG F T. Experimental study on taurine clearing superoxide anion radical and hydroxyl free radical[J]. *Journal of Yichun College*, 2013, 35(6): 76–78.
- [23] SAKAI T, IMAI J, ITO T, et al. The novel antioxidant TA293 reveals the role of cytoplasmic hydroxyl radicals in oxidative stress-induced senescence and inflammation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 1183–1189.

Extraction, Isolation and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Cardamine hupingshanensis*

Li Meidong, Huang Xiufang, Luo Kai*

(College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei)

Abstract The extraction, separation and purification methods of polysaccharides from *Cardamine hupingshanensis* were studied, and simply analyzed its anti-oxidant activity *in vitro*. The results showed that the optimal process conditions for extracting polysaccharides from *Cardamine hupingshanensis* by ultrasonic and enzyme were the liquid-to-material ratio of 30:1, ultrasonic time 25 min, cellulase addition 2%, extraction temperature 90 °C, extraction time 120 min, the actual value measured was 48.53 mg/g. After 7 times of deproteinization by Svage method, the loss rate of polysaccharide was small, and then DEAE-52 cellulose chromatography to obtain 4 polysaccharides. *In vitro* antioxidant activity analysis showed that the crude polysaccharides of *Cardamine hupingshanensis* had a certain reducing ability, and had strong scavenging ability to ABTS radicals and hydroxyl radicals.

Keywords *Cardamine hupingshanensis*; polysaccharide; separation and purification; antioxidant