

白花丹参多糖酶法提取条件的响应面优化及其抗氧化活性研究

巩 健

(淄博职业学院 制药与生物工程系, 山东 淄博 255314)

摘 要:研究响应面优化复合酶法提取白花丹参多糖的工艺,并评价其抗氧化活性。以白花丹参多糖提取率为响应值,液料比、酶解温度、酶解时间、复合酶(木瓜蛋白酶:纤维素酶:果胶酶=2:2:1)添加量为实验因素,采用响应面法建立数学模型,优化提取条件,并初步探讨白花丹参多糖的理化性质,考察白花丹参多糖对DPPH和 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力。结果表明,通过二次回归模型响应面分析,液料比、酶解时间、温度、复合酶添加量四因素对白花丹参多糖提取率的影响依次减弱;最佳工艺条件为酶解温度52℃、时间70 min、复合酶添加量8.0 mg/mL、液料比例为45:1 mL/g,在此条件下多糖提取率为13.36%,模型方程理论预测值为13.70%,两者相对误差小于5%。白花丹参多糖为左旋型、酸性多糖,易溶于水,并具有较强的抗氧化活性,对DPPH和 $\cdot\text{OH}$ 自由基的半数抑制浓度分别为0.969 mg/mL和3.114 mg/mL,但抗氧化活性小于 V_c 。采用响应面法优化得到了白花丹参多糖的最佳复合酶提取工艺,得到的多糖具有较强的抗氧化活性。

关键词:白花丹参多糖;复合酶;响应面;提取;抗氧化

中图分类号:R 282;Q 539 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2015)04-0093-05

Study on optimization of extraction condition of polysaccharide from *salvia miltiorrhiza f. alba* by response surface methodology and its antioxidant activity

GONG Jian

(Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Zibo Vocational Institute, Zibo Shandong 255314)

Abstract: The extraction technology of polysaccharide from *salvia miltiorrhiza f. alba* by optimized complex enzyme method was studied to evaluate its antioxidant activity. Taking polysaccharides extraction rate as response value, the ratio of water to material, enzymolysis temperature and time, and complex enzyme concentration (papain: cellulase: pectinase = 2: 2: 1) as experimental factors, the mathematical model was established by response surface method. The extraction conditions were optimized. The physico-chemical characteristics of the polysaccharide and the free radical scavenging activity to DPPH and $\cdot\text{OH}$ were analyzed. The result showed that according to quadratic regression model response surface analysis the effect of the 4 factors on polysaccharide yield was decreased in the order of ratio of water to material, extraction time, extraction temperature and complex enzyme concentration. The optimal conditions were that the concentration of complex enzyme was 8.0 mg/mL, extraction time was 70 min, the ratio of water to material was 45: 1 mL/g, and extraction temperature was 52℃. Under the optimal conditions, the experimental extraction rate was 13.36%, the predicted extraction rate by mathematical model was 13.70%. The difference between them was less than 5%. The sample was levogyration and acidity polysaccharide, and soluble in water easily with relatively strong antioxidant activity, the IC_{50} for DPPH and $\cdot\text{OH}$ were 0.969 mg/mL and 3.114 mg/mL, respectively, which was weaker than those of vitamin C. The polysaccharides from *salvia miltiorrhiza f. alba* extracted by optimal complex enzymatic extraction technology optimized by response surface methodology showed relatively strong antioxidant activity.

Key words: *salvia miltiorrhiza f. alba* polysaccharide; complex enzyme; response surface methodology; extraction; antioxidation

收稿日期:2015-03-07

作者简介:巩健,1967年出生,女,山东桓台人,副教授。

多糖具有多种药理活性,如抗氧化、抗炎性反应、抗肿瘤、增强免疫等,且副作用小^[1],天然产物如铁棍山药^[2]、紫苏^[3]、栀子^[4]、啤酒酵母^[5]等都含有多糖成分。白花丹参(*salvia miltiorrhiza f. alba*)属稀有名贵食药材,富含多种有效活性成分。研究表明,白花丹参提取物通过保护细胞周期与抑制细胞凋亡对脂多糖(LPS)损伤的血管内皮祖细胞发挥保护作用^[6];此外,白花丹参水溶性部位可能通过调节细胞氧化应激抑制由 LPS 导致的血管内皮细胞凋亡^[7]。本研究拟通过响应面法优化白花丹参多糖的复合酶提取工艺,并探讨其体外抗氧化作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白花丹参:购自山东泰联中药饮片公司,烘干至恒重备用;DPPH(1, 1 - 二苯基 - 2 - 三硝基苯肼):北京中生瑞泰科技;木瓜蛋白酶、果胶酶、纤维素酶:上海士锋生物科技;D(+) - 无水葡萄糖(标准品):大连美仑生物技术;维生素 C:Sigma(美国);无水乙醇等常用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 白花丹参多糖的提取

白花丹参药材粉碎后过 100 目筛,称取筛后粉末 5.0 g,按具体实验需要的酶解条件,在摇床上进行酶解提取多糖成分,摇床转速为 200 r/min,酶解完成得到多糖浸提液,浓缩,Sevag 法去除蛋白,上清乙醇沉淀,离心,沉淀用乙醇、丙酮、乙醚依次清洗,真空冷冻干燥。

1.3 多糖测定

通过苯酚—硫酸法测定多糖含量,还原糖测定采用 3, 5 - 二硝基水杨酸法^[8]。以 D(+) - 无水葡萄糖作为标准品,得到标准曲线为 $y = 0.015 1x - 0.039 2, R^2 = 0.994 3$,方程式中 x 为葡萄糖质量浓度,单位为 mg/mL, y 为吸光度 OD 值。

多糖提取率计算公式为: $Q/\% = [(N \times T)/Z] \times 100$,式中: Q 为多糖提取率(%); T 为多糖浸提液的体积(mL); N 为由回归方程求得的多糖浓度(mg/mL); Z 为药材白花丹参粉末质量(g)。

还原糖提取率计算公式: $H/\% = \text{提取液中还原糖质量} / \text{白花丹参粉末质量} \times 100$ 。

1.4 理化性质分析

将样品多糖分别溶于水、丙酮、乙醚、乙醇、正丁醇、二甲基亚砷有机溶剂,观察溶解情况;用 pH 计测定样品溶液 pH 值;采用碘—碘化钾反应检测样

品溶液中有无淀粉的存在,以 1 mg/mL 淀粉溶液作为对照;用自动旋光仪测 1 mg/mL 样品多糖 20 ℃ 时的旋光度;粘度测定具体方法参照文献^[9],使用旋转流变仪(安东帕 MCR302,奥地利)测定不同温度下(20 ℃、50 ℃)样品溶液表观粘度随剪切速率变化的曲线。

1.5 响应面优化设计

酶解 pH 4.5、摇床转速 200 r/min 及复合酶比例(木瓜蛋白酶、纤维素酶、果胶酶的质量比为 2:2:1)^[10]三个条件不变,因素水平设计及数据分析方法参考文献^[11],具体因素水平见表 1。数据分析采用 Design - Expert 软件(Stat - Ease, Inc.)。

表 1 白花丹参多糖提取条件优化的因素水平值

水平	因素			
	A 液料比 /(mL/g)	B 酶解 温度/℃	C 酶解 时间/min	D 酶添加量 /(mg/mL)
-1	20:1	46	30	6
0	40:1	52	60	8
1	60:1	58	90	10

1.6 白花丹参多糖抗氧化活性研究

白花丹参多糖对自由基 DPPH 的清除能力测定:0.2 mmol/L DPPH 溶液与待测样液等体积(各 2 mL)混合反应 0.5 h 后,测其在 517 nm 处的吸光度值,标记为 C_1 ,测 DPPH 溶液与蒸馏水在 517 nm 处的吸光度值,标记为 C_0 ,测乙醇与样液在 517 nm 处的吸光度值,标记为 C_2 ,同法测定对照 V_C 的吸光度值^[12]。

白花丹参多糖对自由基 ·OH 的清除能力测定:详细步骤参考文献^[12],测定波长为 510 nm 的吸光度值,标记为 C_1 ,蒸馏水替代样品溶液后的吸光度值为 C_0 ,蒸馏水代替水杨酸后的吸光度值为 C_2 ,同法测定对照 V_C 的吸光度值,并进行比较。

对两种自由基的清除率计算公式均为:

$Y/\% = [1 - (C_1 - C_2) / C_0] \times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 响应面优化

2.1.1 实验结果

具体结果见表 2~ 表 3。

表 2 实验方案及结果

实验号	A	B	C	D	多糖提取率/%
1	0	0	-1	1	8.85
2	1	-1	0	0	11.65
3	0	1	0	1	9.48
4	-1	0	-1	0	7.15
5	0	1	0	-1	9.35

续表					多糖提取率/%
实验号	A	B	C	D	
6	0	0	1	-1	10.86
7	-1	1	0	0	7.23
8	0	-1	-1	0	9.24
9	1	1	0	0	10.83
10	-1	-1	0	0	8.35
11	1	0	0	1	9.83
12	0	0	0	0	12.63
13	0	-1	1	0	10.41
14	0	1	-1	0	9.12
15	1	0	0	-1	9.47
16	1	0	-1	0	7.57
17	0	0	-1	-1	7.98
18	0	0	0	0	13.85
19	0	-1	0	1	9.41
20	0	0	0	0	13.47
21	-1	0	0	1	7.46
22	0	-1	0	-1	10.01
23	0	0	0	0	13.53
24	-1	0	1	0	9.31
25	0	1	1	0	11.45
26	0	0	0	0	13.39
27	-1	0	0	-1	7.43
28	0	0	1	1	9.66
29	1	0	1	0	11.41

表3 实验结果的方差分析

参数	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	106.80	14	7.63	19.38	<0.000 1	***
A	15.94	1	15.94	40.48	<0.000 1	***
B	0.22	1	0.22	0.55	0.471 1	
C	14.50	1	14.50	36.82	<0.000 1	***
D	0.014	1	0.014	0.036	0.853 1	
AB	0.023	1	0.023	0.057	0.814 5	
AC	0.71	1	0.71	1.79	0.202 0	
AD	0.027	1	0.027	0.069	0.796 4	
BC	0.34	1	0.34	0.85	0.371 0	
BD	0.13	1	0.13	0.34	0.570 0	
CD	1.07	1	1.07	2.72	0.121 3	
A ²	41.80	1	41.80	106.18	<0.000 1	***
B ²	13.33	1	13.33	33.86	<0.000 1	***
C ²	22.77	1	22.77	57.84	<0.000 1	***
D ²	33.61	1	33.61	85.36	<0.000 1	***
残差	5.51	14	0.39			
失拟项	4.70	10	0.47	2.31	0.218 0	
纯误差	0.81	4	0.20			
总误差	112.31	28				

注:变异系数 CV 值为 6.27, $R^2=0.950\ 9$, $R^2_{Adj}=0.901\ 8$; *** 表示差异极显著 ($P<0.001$), ** 表示差异非常显著 ($P<0.01$), * 表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.1.2 方程建立与结果分析

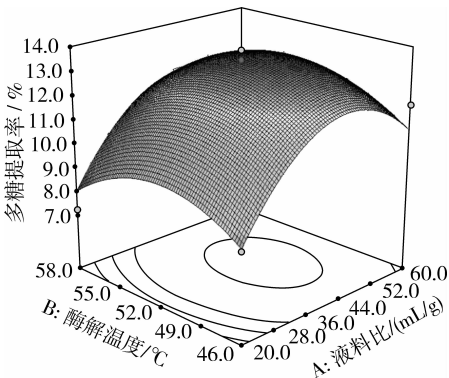
多糖提取率(Q)与自变量的二次多项回归拟合方程:

$$Q = 13.37 + 1.15A - 0.13B + 1.10C - 0.034D + 0.075AB + 0.42AC + 0.082AD + 0.29BC + 0.18BD - 0.52CD - 2.54A^2 - 1.43B^2 - 1.87C^2 - 2.28D^2$$

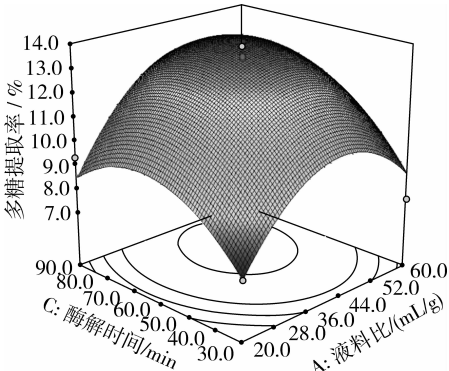
由表3 方差分析结果可知,模型方程达到极显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P=0.218\ 0>0.05$),调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.901\ 8$,总决定系数 $R^2=0.950\ 9$,这些值表明此回归方程模型成立,拟合程度好,实验误差小,可用于白花丹参多糖酶法提取工艺的优化。此外,液料比(A)、酶解时间(C)、酶解温度(B)、复合酶添加量(D) 对白花丹参多糖提取率的影响依次减弱,其中 A、C 达到极显著水平 ($P<0.000\ 1$),两因素间交互作用均不显著 ($P>0.05$)。回归模型方程求解得到的最佳工艺参数为:复合酶酶解温度 51.9℃,酶添加量 7.9 mg/mL,酶解时间为 69.8 min,液料比为 45.1:1 mL/g,此时白花丹参多糖提取率达到 13.70%。

2.1.3 交互作用分析

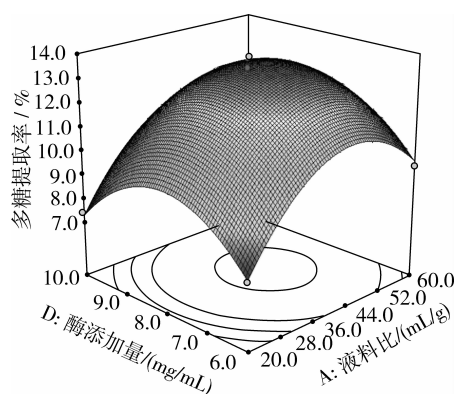
等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示两因素间交互作用显著,而圆形则与之相反。图1 表明各因素间交互作用等高线图均近似圆形,说明交互作用对白花丹参多糖提取率的影响不显著,与方差分析结果一致。



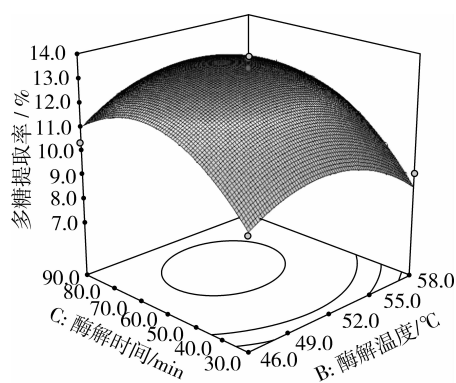
a 酶解温度与液料比交互作用图



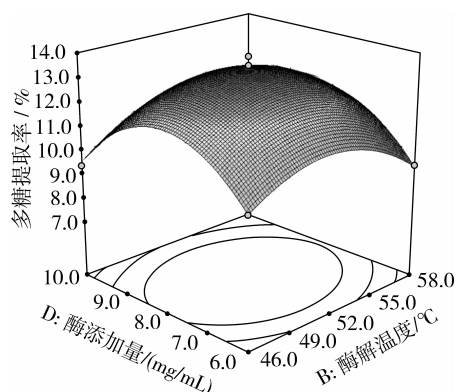
b 酶解时间与液料比交互作用图



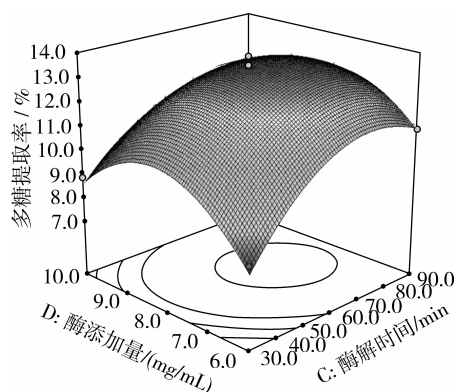
c 酶添加量与液料比交互作用图



d 酶解时间与酶解温度交互作用图



e 酶添加量与酶解温度交互作用图



f 酶添加量与酶解时间交互作用图

图1 交互作用的响应面图

2.2 验证优化后工艺

将白花丹参多糖提取的最佳工艺参数微调为:复合酶酶解温度 52 °C, 酶添加量 8.0 mg/mL, 酶解时间为 70 min, 液料比为 45:1 mL/g, 为检验响应面法优化后的工艺可靠性, 此条件下平行进行 3 组实验, 白花丹参多糖、还原糖提取率的平均值分别为 13.36%、6.17%, 此多糖提取率值与回归方程理论预测值 13.70% 的相对误差为 2.48%。

2.3 理化性质

白花丹参多糖易溶于水, 难溶于乙醚、丙酮等有机溶剂; pH 值等于 6.03, 表明其为酸性多糖; 碘—碘化钾试剂反应为阴性, 无淀粉存在; 在波长 589 nm 处的旋光度值为 -0.101, 计算比旋光度为 -50.5, 提示白花丹参多糖为左旋型。粘度特性结果见图 2, 样品多糖溶液粘度随温度的提高而下降, 随着剪切速度的增大而下降, 表现为剪切稀化现象, 白花丹参多糖水溶液为假塑性流体。

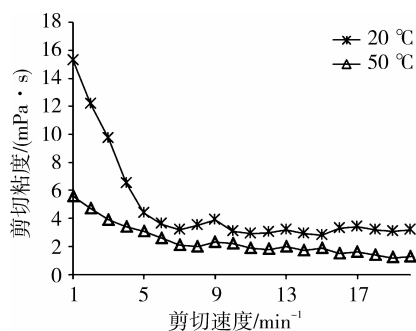


图2 温度与剪切速度对样品溶液粘度特性的影响

2.4 多糖成分抗氧化活性研究

结果如图 3~图 4 所示, 白花丹参多糖浓度为 8 mg/mL 时, 其对 DPPH 自由基的清除率达到 88.51%, 但小于 V_c 。白花丹参多糖清除 DPPH 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.969 mg/mL, V_c 的 IC_{50} 为 0.697 mg/mL。白花丹参多糖浓度达到 10 mg/mL 时, 对自由基 $\cdot OH$ 的清除率达到 88.57%, 但相同浓度的 V_c 对 $\cdot OH$ 的清除率高达 98.04%, 因此与 V_c 比较, 白花丹参多糖清除 $\cdot OH$ 的能力较弱。白花丹参多糖对自由基 $\cdot OH$ 的 IC_{50} 为 3.114 mg/mL, V_c 的 IC_{50} 为 0.403 mg/mL。

3 结论

孟国良等采用正交实验法分别研究了白花丹参

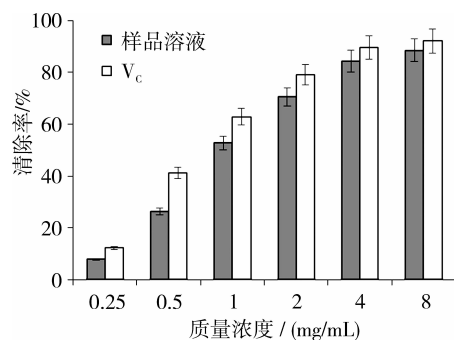


图3 白花丹参多糖对DPPH清除能力的测定

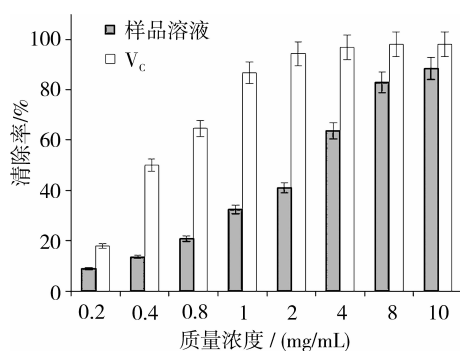


图4 白花丹参多糖对自由基·OH清除能力的测定

多糖微波^[13]和超声波^[14]萃取的工艺条件,得率均小于10%。刘振亮等通过水浴回流法提取白花丹参多糖,多糖提取率为8.536%;当多糖浓度为1 mg/mL时,白花丹参多糖对亚油酸过氧化抑制率为23.05%^[15]。文献查新未见酶法及响应面优化法针对白花丹参多糖提取的工艺优化。本研究通过响应面优化得到白花丹参多糖复合酶提取的最优工艺参数如下:复合酶添加量8.0 mg/mL、酶解时间70 min、酶解温度52℃、液料比45:1 mL/g,此时多糖提取率实际实验值为13.36%,与理论预测值13.70%相对误差小于5%,表明通过响应面法优化得到的模型参数准确可靠,且多糖提取率高于超声波和水浴回流提取法;此外,白花丹参多糖对自由基·OH和DPPH均有清除效应,表明具有一定的体外抗氧化活性,但与V_c比较,其清除这两种自由基的能力较弱。

研究结果提示白花丹参多糖在功能食品或药品添加剂的开发中具有一定的应用价值,如作为保健

营养品、美容护肤品、中药复方的添加剂等,下一步研究将重点探讨白花丹参多糖的化学组成、相对分子质量分布、单糖组成、波谱分析及其体内药理活性,为其研发应用提供更多信息。

参考文献:

- [1] 安晓娟, 冯琳, 宋红平, 等. 植物多糖的结构分析及药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(16): 1271-1275.
- [2] 杨君. 铁棍山药粗多糖提取工艺条件研究[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(6): 20-22.
- [3] 吕长鑫, 李萌萌, 徐晓明, 等. 响应面分析法优化纤维素酶提取紫苏多糖工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 6-10.
- [4] 郑文诚, 官波, 刘军海, 等. 响应面分析法优化栀子多糖提取工艺[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(6): 58-61.
- [5] 游庆红, 尹秀莲. 响应面法优化酶辅助提取啤酒酵母多糖工艺[J]. 食品科学, 2012, 37(7): 191-195.
- [6] 焦鹏, 杨娜娜, 唐瑜菁, 等. 白花丹参提取物对脂多糖损伤内皮祖细胞周期与凋亡的影响[J]. 中成药, 2014, 36(1): 22-25.
- [7] 赵启韬, 王鹏, 杨红, 等. 白花丹参水溶性部位抑制脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡[J]. 中药药理与临床, 2011, 26(6): 56-58.
- [8] 李粉玲, 蔡汉权, 严赞开, 等. 酶法提取芦根多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 156-159.
- [9] 纵伟, 王会晓, 闵婉平, 等. 红枣多糖黏度特性的研究[J]. 食品科学, 2011, 36(2): 69-71.
- [10] 刘红梅, 李栋, 樊梦丹, 等. 灰树花多糖的复合酶-微波提取、超滤纯化及生物学评价[J]. 中成药, 2011, 33(4): 594-599.
- [11] 蒋德旗, 黄利敏, 王艳, 等. 响应面优化纤维素酶法提取桂花多糖工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 35(2): 271-275, 281.
- [12] 郑林龙, 蒋剑平, 许海顺, 等. 响应面法优化土茯苓多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3): 918-922.
- [13] 孟国良. 白花丹参多糖的微波提取工艺研究[J]. 中国现代中药, 2009, 11(2): 39-40.
- [14] 孟国良, 王峰祥. 白花丹参多糖的超声提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(1): 67-68.
- [15] 刘振亮, 张昌军, 刘克, 等. 白花丹参多糖含量测定及其抗氧化性研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2013, 44(3): 357-360. ㉞