

北五味子多糖热水浸提工艺优化及体外抗氧化性能研究

王珊珊,李泰雅,谷 舞,许 汝

(沈阳工学院 生命工程学院,辽宁 抚顺 113122)

摘要:研究热水浸提北五味子多糖的提取工艺优化,采用 sewage 法进行粗多糖脱蛋白处理,并探究北五味子多糖对羟基自由基的清除能力。通过单因素实验和响应面分析,研究不同提取温度、料液比和提取时间对北五味子多糖提取率的影响。结果表明,最佳提取工艺为:85 ℃下按料液比 1:30 提取 3 h,得到最大提取率为 16.13%。获得的粗多糖溶液,用 sewage 法重复处理 5 次,在最大限度地保证多糖含量的同时,使蛋白质清除率达 92.58%。抗氧化性能研究结果表明:北五味子多糖浓度为 10 mg/mL,处理 1 h 时,对羟基自由基的清除率达 96.61%,清除效果较对照 Vc 好。

关键词:响应面分析;多糖;脱蛋白;羟基自由基

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)01-0064-06

Optimization of hot water extraction process of schisandrae chinensis polysaccharide and its *in vitro* antioxidation property study

WANG Shan-shan, LI Tai-ya, GU Wu, XU Ru

(School of Life Engineering, Shenyang Institute of Technology, Fushun Liaoning 113122)

Abstract: The hot water extraction of schisandrae chinensis polysaccharide under different conditions was studied. The crude polysaccharide was deproteinized by sewage method. The scavenging ability of schisandrae chinensis polysaccharide against hydroxyl free radical was researched. The effect of different extraction temperature, solid-liquid ratio and extraction time on extraction yield was researched by single factor and response surface analysis. The results showed that the maximum extraction yield was 16.13% with solid-liquid ratio of 1:30 under 85 ℃ for 3 h. The crude polysaccharide solution was treated by sewage method repeatedly for 5 times, the clearance rate against protein could reach 92.58%, while keeping the polysaccharide in the maximum limit. The result of antioxidant performances showed that as the concentration of fructus schisandrae chinensis polysaccharide was 10 mg/mL and the processing time was 1 h, the clearance rate against hydroxyl free radical was 96.61%, which was much better than that of Vc.

Key words: response surface analysis; polysaccharide; deproteinize; hydroxyl radical

北五味子(*Schisandra chinensis*)是木兰科植物五味子的干燥成熟果实,因其果实甘、酸、辛、苦、咸五味俱全,故名五味子,是著名的滋补性中药。^[1]五味子有南北之分,据《本草纲目》记载“五味子南产者红,北产者黑,入滋补药,必用北者为良”。其药理作用广泛,可保护神经中枢和肝脏。^[2]五味子的主要活性成分有木脂素、多糖、萜类等^[3],早期研究多集中在五味子的脂溶性成分方面^[4-7],但传统用药习惯及许多五味子水提液的药理活性实验结果表

明其水溶性有效成分不能忽视,许多学者从五味子水提液中分离得到多糖,大量结果表明,多糖(polysaccharide)有调节免疫、抗肿瘤、抗氧化、抗疲劳和降血脂等生理功能^[8-12]。北五味子的多糖类型为两种均一多糖,多糖 I 包括 D-甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、阿拉伯糖等单糖组分;多糖 II 包括 D-半乳糖、醛酸、D-甘露糖、D-果糖、鼠李糖等单糖组分,目前,北五味子多糖已成为新药的发展方向之一,北五味子作为具有多种药理作用的传统中药材,适合进行工厂化提取,并用于食品、保健产品、药品等领域,现已有利用其药理作用进行发酵产品的制

收稿日期:2016-07-17

基金项目:省级大学生创新创业项目(201613201000017)。

作者简介:王珊珊,1984 年出生,女,讲师。

作^[13-18],这为未来北五味子药理活性的深入研究^[19-20]和发展提供了更广阔的空间。本文采用传统水浸提法对多糖提取工艺进行优化,并对多糖进行脱蛋白处理,研究其抗氧化性能。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

北五味子干品:购于抚顺市成大方圆连锁药店。

葡萄糖、苯酚、浓硫酸、95%乙醇、咪唑、半乳糖醛酸、氯仿、正丁醇、邻二氮菲、过氧化氢、抗坏血酸、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

721G型可见分光光度计:上海精科仪器有限公司;FW100型高速粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司;恒温水浴锅HH-6:常州国华电器有限公司;RE-52A型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;低速台式离心机TDL-40B:上海安亭科学仪器厂。

1.2 多糖及糖醛酸含量的测定

采用苯酚—硫酸法,以葡萄糖为标准物,在恒温条件下,在490 nm波长处测定标准物质量浓度与吸光度的对应关系,制作标准曲线。

以标准品的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为X轴、吸光度为Y轴绘制标准曲线,见图1,标准曲线方程为: $y = 0.0066x - 0.0094$, $R^2 = 0.9992$ 。

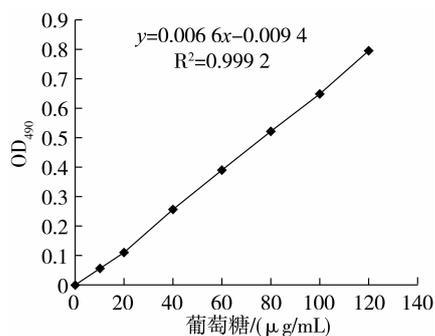


图1 葡萄糖标准曲线

测定糖醛酸含量:采用硫酸—咪唑法对五味子多糖的糖醛酸进行含量测定,在530 nm波长下测定标准物质量浓度与吸光度的对应关系,制作标准曲线。

以糖醛酸标准浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为X轴,吸光度为Y轴绘制标准工作曲线,见图2,标准曲线方程: $y = 0.0106x - 0.0065$, $R^2 = 0.9993$ 。

1.3 粗多糖的提取

将北五味子干品粉碎,过筛。取北五味子粉末5 g,按照实验设计方案,分别在不同的热水浸提条件下进行提取。离心、去沉淀,取上清液并在旋转蒸发器中浓缩到30 mL,加入95%乙醇,使溶液中的乙醇体积分数达到80%,进行沉淀,静置5 h后,将沉淀物离

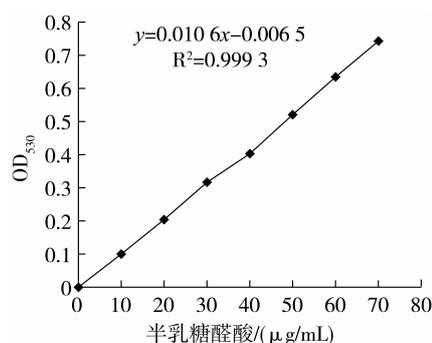


图2 半乳糖醛酸标准曲线

心干燥,即得北五味子粗多糖,多糖提取率为:

多糖提取率/% = (多糖质量浓度 × 稀释倍数 × 换算因子)/原料质量 × 100。

1.4 换算因子测定

精确称取60℃干燥恒重的实验室精制北五味子多糖10 mg,加水定容到100 mL容量瓶中,摇匀,作为多糖储备液。精确量取多糖储备液0.2 mL,加水至1 mL,按测定标准曲线同样的方法测其吸光度。计算换算因子:

$$f = W/CD$$

式中:W为多糖质量,g;C为多糖溶液中葡萄糖的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;D为多糖的稀释因子。测得 $f = 1.75$ 。

1.5 北五味子多糖脱蛋白优化

采用sewage法进行脱蛋白,将1.3步骤中提取的粗多糖配置成2%的粗多糖溶液100 mL,取30 mL,先测其蛋白质及多糖浓度,再加入其体积的1/3的氯仿正丁醇混合液(氯仿:正丁醇=4:1),震荡25 min,离心10 min,取上清测其蛋白质及多糖浓度,重复上述步骤6次。

1.6 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量

1.6.1 配置标准蛋白质溶液

取10 mg牛血清白蛋白,用蒸馏水定容到50 mL,冷藏备用。

1.6.2 蛋白质标准曲线的制作

取100 mg考马斯亮蓝G-250溶于50 mL 90%乙醇中,再加入100 mL 85%磷酸,用蒸馏水定容至1 000 mL。

在恒温条件下,分别吸取标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,并用蒸馏水定容至1 mL,加入考马斯亮蓝溶液5 mL,混匀后,放置2 min,在595 nm波长下进行测定。

以标准品浓度为X轴、吸光度为Y轴绘制标准曲线,见图3,标准曲线方程为: $y = 0.0101x - 0.0231$, $R^2 = 0.9982$ 。

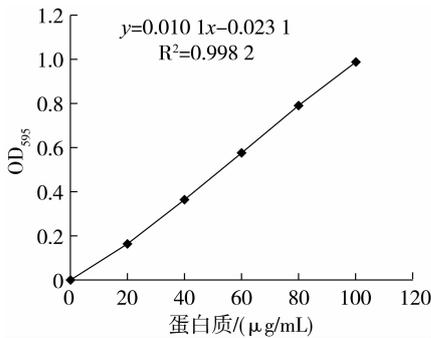


图 3 蛋白质标准曲线

1.7 北五味子多糖对羟基自由基抗氧化性能测定

按照 1.3 和 1.6 步骤提取去蛋白等杂质得北五味子多糖,配置不同浓度的待测样品。采用邻二氮菲-金属铁离子-H₂O₂体系:邻二氮菲 Fe²⁺反应生成 Fe²⁺-邻二氮菲配合物,该配合物在 536 nm 波长处有最大吸收;通过 Fenton 反应产生 ·OH,而当 ·OH 氧化 Fe²⁺-邻二氮菲成 Fe³⁺-邻二氮菲时,536 nm 波长处最大吸收消失或减弱。当反应体系中存在 ·OH 清除剂时,此氧化过程受到抑制,536 nm 处最大吸收降低或不明显,故可通过 536 nm 处吸光度比较抗氧化剂清除 ·OH 的作用。

以 Vc 为参照物,取 1.5 mmol/L 邻二氮菲溶液 1.0 mL,加 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4) 2.0 mL,充分混匀后,加 1.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1.0 mL,加入样品溶液 1.0 mL,每加一管立即混匀,加 0.01% H₂O₂ 溶液 1.0 mL。整个反应体系共 6 mL。反应在 37 °C 恒温水浴中进行,反应 1 h 后,在 536 nm 波长处测定吸光度。损伤组(A₁)中用 1.0 mL 去离子水代替样品溶液;未损伤组(A₀)中用 2.0 mL 去离子水代替样品溶液和 H₂O₂ 溶液。计算样品对 ·OH 的清除率:

$$\text{清除率}/\% = (A_x - A_1) / (A_0 - A_1) \times 100$$

式中:A_x 为样品组吸光度,A₀ 为未损伤组吸光度,A₁ 为损伤组吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取时间对多糖得率的影响

准确称取 6 份北五味子粉末,每份 5 g 分别置于 250 mL 三角瓶中,按料液比 1:20 加入 100 mL 蒸馏水,在 90 °C 下分别水浴 1、2、3、4、5、6 h,离心去沉淀,测定多糖含量。

由图 4 可看出,随着提取时间的延长,多糖提取率先迅速增高后突然降低,之后保持平稳,超过 4 h 后再延长反应时间对多糖的提取率几乎没有影响,在分析响应面时可不考虑后两个水平。当水浴 3 h

时,提取率最高,为 9.24%。

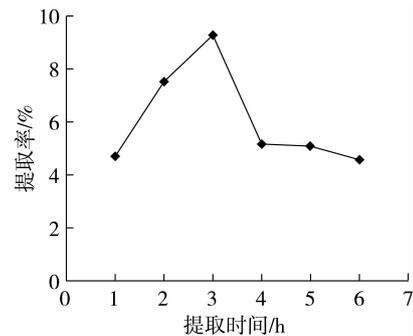


图 4 提取时间对提取率的影响

2.1.2 提取温度对多糖得率的影响

准确称取 6 份北五味子粉末,每份 5 g 分别置于 250 mL 三角瓶中,按料液比 1:20 加入 100 mL 蒸馏水,在 50、60、70、80、90、100 °C 下水浴 3 h。离心,去沉淀,测定多糖含量。

由图 5 可以看出,在 60~70 °C 时,多糖的提取率增长并不明显;当温度由 70 °C 提高至 80 °C 时,提取率迅速提高;80 °C 后再提高温度,提取率又迅速下降。这种突增突降趋势的出现可能是因为温度对提取率影响较大。由图可知最适提取温度为 80 °C,在该温度下提取率为 14.43%。

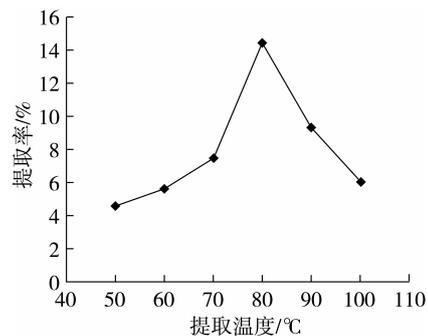


图 5 提取温度对提取率的影响

2.1.3 料液比对多糖得率的影响

准确称取 6 份北五味子粉末,每份 5 g 分别置于 250 mL 三角瓶中,分别按料液比 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 g/mL 的体积加入蒸馏水,90 °C 下水浴 3 h,离心去沉淀,测定多糖含量。

由图 6 可以看出,随着料液比的降低,提取率先增高后突然降低,但整体的提取率变化幅度与考察时间、温度时不同,增幅较平缓,由此推测,料液比可能对多糖提取率的影响不大,由图可知在料液比 1:30 时提取率最高,为 13.13%。

2.2 响应面分析法优化北五味子多糖提取工艺

2.2.1 回归模型的建立及方差分析

根据单因素实验结果和 Central Composite De-

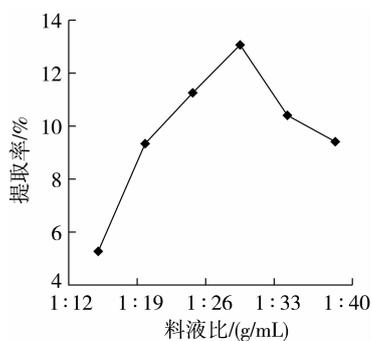


图6 料液比对提取率的影响

sign (CCD)设计原理,运用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面设计,以多糖提取率为响应值,提取时间、提取温度、料液比为考察因素,建立响应值与影响因素间的数学模型,优化北五味子多糖的最佳提取工艺。响应面实验因素水平见表1。

表1 多糖响应面实验因素水平

水平	A 提取时间/h	B 提取温度/°C	C 料液比/(g/mL)
-2	1	60	1:20
-1	2	70	1:25
0	3	80	1:30
1	4	90	1:35
2	5	100	1:40

利用 Design - Expert 8.0.6 软件对实验数据进行多元回归拟合,响应面分析方案与结果见表2。从时间、温度、料液比进行实验优化设计,获得以北五味子多糖提取率为响应值的回归方程:

$$Y = 16.00 + 0.63A + 1.06B - 0.29C - 2.36AB - 1.07AC + 0.84BC - 1.42A^2 - 1.04B^2 - 2.05C^2。$$

表2 响应面分析方案及实验结果

序号	A	B	C	提取率/%
1	2	0	0	11.63
2	0	0	0	15.9
3	-1	-1	-1	7.47
4	1	-1	1	11.01
5	1	-1	-1	15.59
6	0	0	0	15.66
7	-1	-1	1	7.16
8	0	0	0	16.24
9	-2	0	0	9.15
10	-1	1	-1	12.67
11	0	0	0	16.16
12	0	0	2	7.46
13	0	0	0	16.19
14	0	0	-2	8.28
15	-1	1	1	15.74
16	1	1	1	10.14
17	0	2	0	13.99
18	1	1	-1	11.35
19	0	0	0	16.01
20	0	-2	0	9.88

回归模型方差分析结果表明(表3):该模型回归极显著($P < 0.0001$),失拟项不显著($P > 0.05$),回归模型的决定系数 $R^2 = 0.9892$,调整系数 $R^2_{Adj} = 0.9958$,说明该模型与实际实验拟合较好,表明该模型高度显著,可以用于北五味子多糖提取理论预测。从回归方程系数显著性检验可知,各因素对多糖提取率的影响程度依次为:提取温度 > 提取时间 > 料液比;交互项 AB 、 AC 、 BC 极显著($P < 0.01$);二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对多糖提取率有极显著影响($P < 0.01$)。

表3 回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob > F	显著性
模型	221.38	9	24.60	499.68	<0.0001	**
A	6.26	1	6.26	127.22	<0.0001	**
B	17.83	1	17.83	362.19	<0.0001	**
C	1.36	1	1.36	27.69	0.0004	**
AB	44.60	1	44.60	906.09	<0.0001	**
AC	9.14	1	9.14	185.63	<0.0001	**
BC	5.70	1	5.70	115.70	<0.0001	**
A^2	50.99	1	50.99	1035.83	<0.0001	**
B^2	27.08	1	27.08	550.14	<0.0001	**
C^2	106.08	1	106.08	2155.03	<0.0001	**
残差	0.49	10	0.049			
失拟项	0.25	5	0.050	1.04	0.4814	
纯误差	0.24	5	0.048			
总和	221.87	19				

注:**表示极显著($P < 0.01$)。

2.2.2 响应面分析及最佳提取工艺研究

北五味子多糖提取优化的响应面及其等高线见图7。图7列出了自变量中交互作用极显著($P < 0.01$)的三项 AB 、 AC 和 BC 。3组图形直观地反应了各因素对响应值的影响,在响应面图中,曲面越陡峭,则表示该因素对响应值的影响越显著。等高线图与响应面图相对应,越接近等高线图的中心,对应的响应值就越大,且等高线图形状接近椭圆形,表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。比较3组图形可知,提取温度和提取时间对北五味子多糖提取率影响较为显著,表现为曲线较陡峭;而料液比次之,曲线较为平缓。同时,3组图形的交互作用都较明显,等高线趋于椭圆形。

图7a表示提取温度和提取时间两者交互作用对北五味子多糖提取率的影响。可以看出两者交互作用对提取率影响显著,从图7a可以看出,当提取时间保持不变时,提取温度越高越利于多糖的提取,这是因为温度越高,分子热运动越快,更易提取的进

行,提取温度对提取率影响显著;当提取温度保持不变时,多糖提取率随提取时间呈现先增加后降低的趋势。

图 7b 为提取时间和料液比及两者交互作用对多糖提取率的影响。当提取时间不变时,随着料液比的增加,多糖提取率先增大后减小;当料液比不变时,随着提取时间的增加,北五味子多糖提取率先增大后减小。当二者同时增大时有利于提取率的提高。

图 7c 为提取温度和料液比的交互作用对北五味子多糖提取率的影响。当料液比不变时,随着提取温度的增大,北五味子多糖提取率逐渐增大;当提取温度不变时,随着料液比的增加,多糖提取率先增大后减小。两者交互作用显著,提取温度和料液比均处于高水平时,提取率较高。

运用 Design Expert 8.0.6 的响应面分析软件对实验结果进行优化,得到北五味子多糖的最优提取条件:提取时间为 2.7 h、提取温度 84.9 °C、料液比为 1:30.37,该条件下提取率预测可达到最大值 16.32%。为方便实际操作,将最优提取条件简化为:提取时间 3 h、提取温度 85 °C、料液比 1:30,进行 3 次重复实验,得到北五味子多糖提取率的平均值为 16.13%,与预测值接近,说明此响应面法优化得到的多糖热水浸提提取工艺在实践中可行。

所得粗多糖理化指标见表 4。由表 4 可看出,粗多糖中总糖含量较高,含有少量糖醛酸与蛋白质杂质。含糖醛酸是由于粗多糖组成多样,而蛋白质则是用上述方法从植物中提取所产生的杂质。

表 4 粗多糖产品理化指标

组分	总糖/%	糖醛酸/%	蛋白质/%
含量	91.56	5.86	2.58

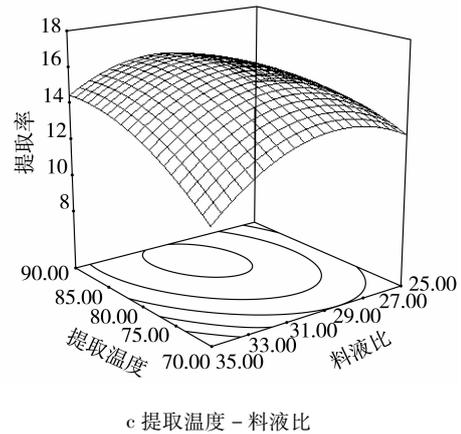
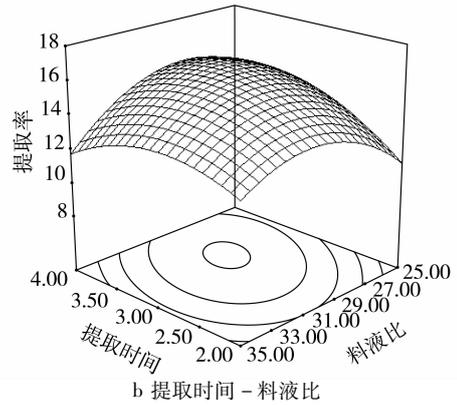
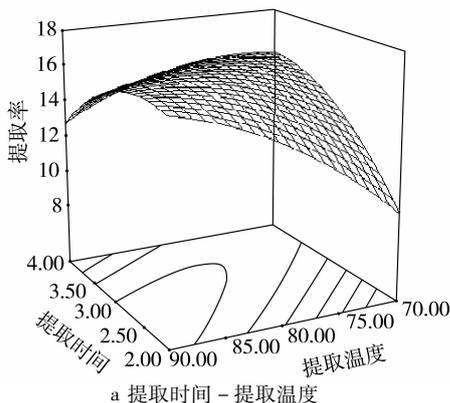


图 7 各因素交互效应对北五味子多糖提取率影响的曲面图
2.3 北五味子多糖脱蛋白优化分析

从图 8 中可以看出第一次脱蛋白效果不是很明显,但从第二次开始蛋白质的含量迅速减少,到第六次时溶液中几乎不含蛋白质;从图 9 中可以看出第一次多糖几乎没有损失而第二次之后多糖开始出现损失,但幅度不大,到第六次时多糖损失达到 70% 以上。综合分析,sevage 法条件温和、处理容易、除蛋白效果明显,对北五味子粗多糖进行脱蛋白处理 5 次既能将大部分蛋白杂质除去,又在一定程度上保护了多糖的得率。不采用等电点法去除蛋白质是由于对北五味子多糖中蛋白质组成成分尚不清楚,无法选择沉淀条件,而 sevage 法在较多文献^[3,19]中被采用。

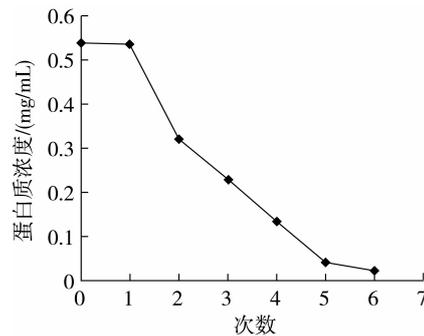


图 8 sevage 法蛋白脱除效果

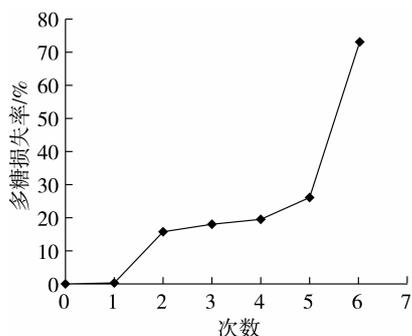


图9 sevage 法对多糖损失的影响

2.4 北五味子多糖对羟基自由基的抗氧化性能分析

从图 10 中可以看出,在实验浓度范围内,所有的北五味子多糖样品都表现出明显的羟基自由基清除能力,并随着北五味子多糖浓度的增加,自由基清除率提高,表现出明显的剂量依赖性。在多糖浓度为 10 mg/mL 时,对羟基自由基的清除率可达到 96.61%。随着对照品 Vc 浓度的增加,清除率提高,但并不是很明显,并且 Vc 在同样浓度 10 mg/mL 时的清除率只有 25.9%。综上分析:北五味子多糖具有较好的清除能力,并且清除能力随着浓度的增大而提高。

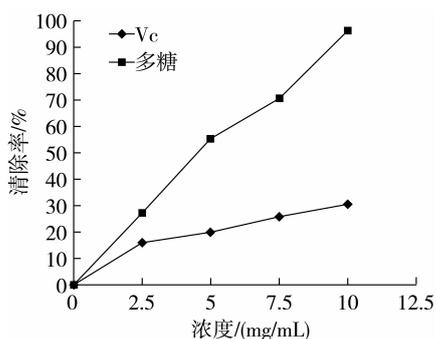


图 10 北五味子多糖对羟基自由基的清除能力

3 结论

通过对水浸提北五味子多糖的单因素实验和响应面分析,考察提取时间、提取温度和料液比对提取率的影响,得出提取温度影响最大,其次为提取时间和料液比。最佳提取工艺为:料液比为 1:30,在 85 °C 下提取 3 h,得到提取率为 16.13%;sevage 法处理 5 次粗多糖溶液,蛋白质清除率达 92.58%;当北五味子多糖浓度为 10 mg/mL 时,对羟基自由基的清除率达 96.61%,并且效果远好于 Vc。

参考文献:

- [1] 应国清, 俞志明, 单剑峰, 等. 北五味子有效组分的研究进展 [J]. 河南中医, 2005, 25(6): 84.
- [2] 李晓博, 胡文忠, 李婧, 等. 五味子果实的功能作用及主要活性成分研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 386(4): 386.
- [3] 许莉, 王晓华, 赵美瑾, 等. 五味子多糖的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(7): 127.
- [4] 贺凤成, 李守信, 赵志全, 等. 一测多评法测定五味子中 4 种木脂素类成分的含量 [J]. 药学学报, 2012, 47(7): 930-933.
- [5] 杨艳辉, 王喆之. 南五味子脂溶性成分的 GC-MS 分析 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(3): 367.
- [6] 王慧竹, 孙玉婷, 李锐, 等. 五味子藤皮脂溶性成分的 GC-MS 分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(35): 74.
- [7] 戴军, 徐佐旗, 赵婷, 等. 超临界 CO₂ 提取五味子木脂素的工艺研究 [J]. 食品与药品, 2010, 12(9): 312.
- [8] 姜帆. 五味子多糖的纯化及其对肠道免疫功能影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [9] 刘容旭, 高辰哲, 姜帆, 等. 五味子多糖对两种肠道肿瘤细胞抑制作用的影响 [J]. 食品科学, 2016, 37(5): 192-196.
- [10] Yuan J F, Zhang Z Q, Fan Z C, et al. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from Ligusticum chuanxiong Hort [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74: 822-827.
- [11] Chi A P, Chen J P, Wang Z Z, et al. Morphological and structural characterization of a polysaccharide from Gynostemma pentaphyllum Makino and its anti-exercise fatigue activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74: 868-874.
- [12] Liao F H, Shieh M J, Chang N C, et al. Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemia patients [J]. Nutrition Research, 2007, 27: 146-151.
- [13] 孙静, 马琳, 吕斯琦, 等. 中药发酵技术研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 49-52.
- [14] 崔瑛. 五味子葡萄酒: 中国, CN104419577 [P]. 2015-03-18.
- [15] 冯昕, 王吉中, 呼玉侠, 等. 五味子酸奶的工艺研究 [J]. 食品工业, 2006(8): 45-47.
- [16] 尚小莹, 饶铖乐, 陈茂彬. 五味子果酒酿造工艺研究 [J]. 酿酒, 2013, 40(1): 73-76.
- [17] 徐辉艳, 刘莎莎. 五味子发酵酒关键工艺研究 [J]. 工艺技术, 2016, 37(4): 143-145.
- [18] 赵坚华, 孟子轩, 李官浩, 等. 凝固型五味子酸奶工艺的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(8): 49-51.
- [19] 郭冷秋, 张鹏, 黄莉莉, 等. 五味子药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2006, 34(4): 51-53.
- [20] 黄谦. 狭叶南五味子内生真菌多样性及其发酵研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015. 完