

[制剂]

复合酶提取金樱子根多糖工艺的优化及其抗氧化活性

蒋德旗^{1,2}, 蒋夏荣¹, 夏家朗¹, 臧青民^{1*}

(1. 玉林师范学院生物与制药学院, 广西玉林 537000; 2. 广西农产资源化学与生物技术重点实验室, 广西玉林 537000)

摘要: 目的 优化复合酶提取金樱子根多糖工艺, 并评价其抗氧化活性。方法 在单因素试验基础上, 以酶添加量、酶解 pH、酶解时间、液料比为影响因素, 多糖得率为评价指标, 响应面法优化提取工艺。再测定多糖对 DPPH、·OH、O₂·自由基的清除作用。结果 最佳条件为酶添加量 2.1%, 酶解 pH 4.4, 酶解时间 49 min, 液料比 16:1, 酶解温度 45 ℃, 多糖得率 141.59 mg/g。3.0 mg/mL 多糖对 DPPH、·OH、O₂·自由基的清除率分别为 87.81%、86.14%、86.37%, IC₅₀ 分别为 0.935、1.274、1.521 mg/mL。结论 该方法简便可行, 可用于复合酶提取抗氧化活性较强的金樱子根多糖。

关键词: 金樱子; 根; 多糖; 复合酶提取; 抗氧化活性; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)11-2421-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.012

Polysaccharides from *Rosa laevigata* roots, their compound enzyme extraction technique optimization and the antioxidant activity

JIANG De-qi^{1,2}, JIANG Xia-rong¹, XIA Jia-lang¹, ZANG Qing-min^{1*}

(1. College of Biology and Pharmacy, Yulin Normal University, Yulin 537000, China; 2. Guangxi Key Laboratory for Chemistry and Biotechnology of Agricultural Resources, Yulin 537000, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the compound enzyme extraction technique for polysaccharides from *Rosa laevigata* Michx. roots and to evaluate the antioxidant activity. **METHODS** With enzyme addition, enzymolysis pH, enzymolysis time and liquid-solid ratio as influencing factors, polysaccharides yield as an evaluation index, response surface method was applied to optimizing the extraction on the basis of single factor experiment. Subsequently the scavenging effects of polysaccharides on DPPH, ·OH, O₂· free radicals were determined.

RESULTS The optimal conditions were determined to be 2.1% for enzyme addition, 4.4 for enzymolysis pH, 49 min for enzymolysis time, 16:1 for liquid-solid ratio, and 45 ℃ for enzymolysis temperature, the polysaccharides yield was 141.59 mg/g. The scavenging rates of polysaccharides (3.0 mg/mL) on DPPH, ·OH, O₂· free radicals were 87.81%, 86.14%, 86.37% with the IC₅₀ values of 0.935, 1.274, 1.521 mg/mL, respectively.

CONCLUSION This simple and feasible method can be used for the compound enzyme extraction for polysaccharides with strong antioxidant activity from *R. laevigata* roots.

KEY WORDS: *Rosa laevigata* Michx.; roots; polysaccharides; compound enzyme extraction; antioxidant activity; response surface method

酶提取中药有效成分操作简单, 条件温和, 不需要大型设备, 节约能源, 在有效成分结构研究、

生物活性保持方面具有一定优势^[1]。天然产物多糖具有抗氧化、抗肿瘤、防衰老、降血糖等多种生

收稿日期: 2018-07-19

基金项目: 玉林市科技攻关项目 (玉市科攻 20173104)

作者简介: 蒋德旗 (1986—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药理。Tel: (0775) 2757461, E-mail: jiangdq8@sina.com

*通信作者: 臧青民 (1981—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为医药中间体合成与开发。Tel: (0775) 2757461, E-mail: zangqm2015@hotmail.com

物活性, 可开发为药品、食品、保健品的添加剂, 市场前景十分广阔^[2-3]。

金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 为我国南方民间习用药材, 资源丰富, 广泛分布于广西、广东、湖南等地, 是妇科千金片、金鸡胶囊、三金片、王老吉凉茶等主要原药材^[4-5], 其根部化学成分以三萜皂苷类、黄酮类、碳水化合物等为主^[6-8], 药理作用主要包括抗炎、抗菌、抗氧化等^[9-10], 但目前对其物质基础和作用机制的研究不够深入。前期报道, 酶提取金樱子果实时可得到一定量多糖^[11], 具有较好的抗氧化活性^[12], 但未见该方法提取其根部位多糖及抗氧化作用的报道, 故本实验优化复合酶提取金樱子根多糖工艺, 并评价其抗氧化活性。

1 材料

金樱子根购自广西玉林中草药市场, 经玉林师范学院陈晓白教授鉴定为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥根。维生素 C、D-无水葡萄糖、O₂⁻·(超氧阴离子自由基)、·OH(羟自由基)清除能力检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 纤维素酶(50 000 U/g)、果胶酶(100 000 U/g)、木瓜蛋白酶(80 000 U/g)购自江苏锐阳生物技术公司; DPPH(1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼)购自日本 TCI 公司; 其他试剂均为国产分析纯。5810R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司); Alpha-1506 型紫外分光光度计(上海谱元仪器有限公司); SHA-BA 型双功能水浴恒温振荡器(常州华普达教学仪器有限公司); PHS-25 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); SHB-III型循环水真空泵、2 L-ARE 型旋转蒸发器(上海皓庄仪器有限公司)。

2 方法

2.1 多糖提取^[13] 粉碎→特定酶解条件下提取→高温灭活→分离浓缩→乙醇沉淀→Sevage 法脱蛋白→二次醇沉→真空冷冻干燥。

2.2 多糖得率测定^[13] 采用苯酚-硫酸法测定, 得到葡萄糖标准曲线为 $A = 8.498 \cdot 6X - 0.018 \cdot 5$ ($R^2 = 0.990 \cdot 3$), 其中 A 为 490 nm 下吸光度, X 为葡萄糖质量浓度 (mg/mL)。再计算多糖得率 (mg/g), 公式为得率 = $c n V / m$, 其中 c 为稀释液中多糖质量浓度 (mg/mL), n 为稀释倍数, V 为稀释液体积 (mL), m 为金樱子根粉末质量 (g)。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取葡萄糖对照品溶液 (0.04 mg/mL) 适量, 按“2.2”项下方法测定吸光度 6

次, 测得其 RSD 为 2.1%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 按“2.1”项下方法制备样品溶液, 按“2.2”项下方法测定多糖质量浓度 6 次, 测得其 RSD 为 0.9%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 按“2.1”项下方法制备样品溶液, 室温下放置 0、4、8、12、16、20、24 h 后按“2.2”项下方法测定多糖质量浓度, 测得其 RSD 为 1.7%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品 9 份, 按 50%、100%、150% 水平加入葡萄糖对照品, 平行 3 份, 按“2.2”项下方法测定多糖质量浓度, 计算回收率。结果, 3 个水平下的平均加样回收率分别为 95.4%、99.8%、105.7%, RSD 分别为 1.5%、2.8%、3.4%。

2.4 单因素试验 固定摇床转速为 180 r/min, 复合酶(纤维素酶: 果胶酶: 木瓜蛋白酶)(1: 1: 1)^[14], 考察酶添加量(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)、酶解 pH(3.5、4.0、4.5、5.0、5.5)、液料比(10: 1、15: 1、20: 1、25: 1、30: 1)、酶解时间(30、50、70、90、110 min)、酶解温度(35、40、45、50、55 °C)对多糖得率的影响。结果, 各因素固定水平为酶解 pH 4.5, 液料比 20: 1, 酶添加量 2.0%, 酶解时间 50 min, 酶解温度 45 °C。

2.5 响应面试验 在单因素试验基础上, 以酶添加量(A)、酶解 pH(B)、酶解时间(C)、液料比(D)为影响因素, 多糖得率为评价指标(Y), 响应面法优化提取工艺。因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

| 因素 | 水平 | | |
|------------|-------|-------|-------|
| | -1 | 0 | 1 |
| A 酶添加量/% | 1.5 | 2.0 | 2.5 |
| B 酶解 pH | 4.0 | 4.5 | 5.0 |
| C 酶解时间/min | 30 | 50 | 70 |
| D 液料比 | 15: 1 | 20: 1 | 25: 1 |

2.6 抗氧化活性实验 测定多糖对 DPPH、O₂⁻·自由基的清除作用^[14], 检测波长分别为 517、320 nm; 按照试剂盒说明书, 测定多糖对 ·OH 自由基的清除作用, 检测波长为 536 nm。以上实验均选择维生素 C 作为对照, 质量浓度均分别设置为 0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0 mg/mL。

3 结果

3.1 单因素试验 图 1 显示, 当酶添加量为

2.0%时，多糖得率可达135.08 mg/g，但进一步加大后无显著变化，故选择2.0%作为最佳酶添加量。图2显示，当酶解pH为4.5时，多糖得率达到最大，为134.45 mg/g，但pH偏高或偏低均不利于酶活性发挥，故选择4.5作为最佳酶解pH。图3显示，当液料比为20:1时，多糖得率达到136.12 mg/g，但液料比继续增大后得率反而减小，其原因可能与液料比过高不利于多糖溶出有关，而用水量过大将加重后续浓缩工作负担，不利于工业化实际生产，故选择20:1作为最佳液料比。图4显示，随着酶解温度升高，多糖得率先提高后降低，这是由于温度过高会导致酶活力减弱，故选择45℃作为最佳酶解温度。图5显示，当酶解时间为50 min时，多糖得率为129.51 mg/g，接近于90 min时的最大值，但再进一步延长酶解时间时得率反而减小，其原因可能与时间过长导致酶催化活性减弱有关，故选择50 min作为最佳酶解时间。

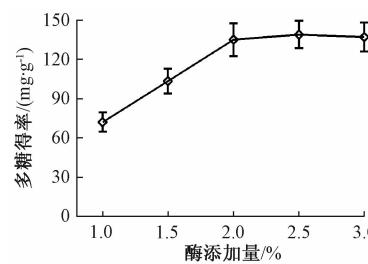


图1 酶添加量对多糖得率的影响

Fig. 1 Effects of enzyme addition on polysaccharides yield

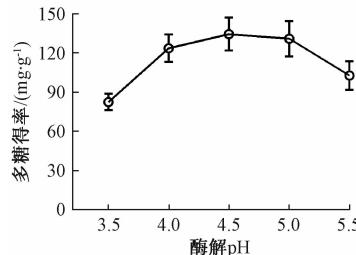


图2 酶解pH对多糖得率的影响

Fig. 2 Effects of enzymolysis pH on polysaccharides yield

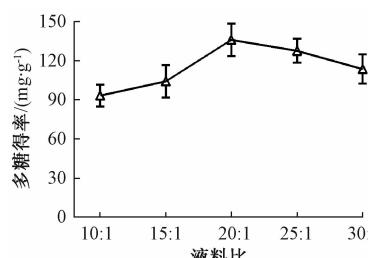


图3 液料比对多糖得率的影响

Fig. 3 Effects of liquid-solid ratio on polysaccharides yield

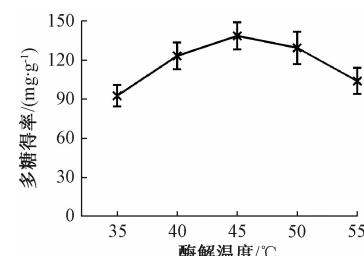


图4 酶解温度对多糖得率的影响

Fig. 4 Effects of enzymolysis temperature on polysaccharides yield

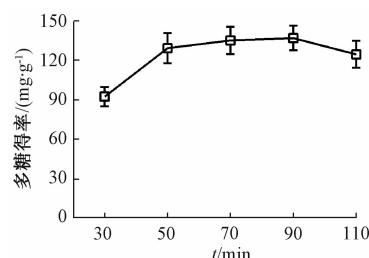


图5 酶解时间对多糖得率的影响

Fig. 5 Effects of enzymolysis time on polysaccharides yield

3.2 响应面法 结果见表2，得到二次多项回归

表2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

| 试验号 | A | B | C | D | Y/(mg·g⁻¹) |
|-----|----|----|----|----|------------|
| 1 | 0 | 0 | -1 | 1 | 133.02 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 0 | 132.53 |
| 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 136.64 |
| 4 | -1 | 0 | -1 | 0 | 115.76 |
| 5 | 0 | 1 | 0 | -1 | 121.65 |
| 6 | 0 | 0 | 1 | -1 | 135.12 |
| 7 | -1 | 1 | 0 | 0 | 124.16 |
| 8 | 0 | -1 | -1 | 0 | 128.56 |
| 9 | 1 | 1 | 0 | 0 | 115.92 |
| 10 | -1 | -1 | 0 | 0 | 114.56 |
| 11 | 1 | 0 | 0 | 1 | 134.75 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 145.72 |
| 13 | 0 | -1 | 1 | 0 | 110.28 |
| 14 | 0 | 1 | -1 | 0 | 107.92 |
| 15 | 1 | 0 | 0 | -1 | 132.24 |
| 16 | 1 | 0 | -1 | 0 | 128.56 |
| 17 | 0 | 0 | -1 | -1 | 133.24 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 140.68 |
| 19 | 0 | -1 | 0 | 1 | 124.00 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 143.48 |
| 21 | -1 | 0 | 0 | 1 | 120.84 |
| 22 | 0 | -1 | 0 | -1 | 136.40 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 143.69 |
| 24 | -1 | 0 | 1 | 0 | 124.88 |
| 25 | 0 | 1 | 1 | 0 | 132.87 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 142.20 |
| 27 | -1 | 0 | 0 | -1 | 132.92 |
| 28 | 0 | 0 | 1 | 1 | 120.40 |
| 29 | 1 | 0 | 1 | 0 | 121.76 |

方程为 $Y = 143.15 + 2.72A - 0.60B - 0.15C - 1.83D - 6.55AB - 3.98AC + 3.65AD + 10.81BC + 6.85BD - 3.62CD - 10.01A^2 - 11.68B^2 - 10.82C^2 - 2.22D^2$, 方差分析见表3。由表可知, 模型 $P < 0.0001$, 失拟项 $P > 0.05$, 总决定系数 $R^2 = 0.9613$, 调整后 $R_{adj}^2 = 0.9225$, 表明该模型与实验数据拟合程度良好, 误差小, 可用于预测; 各因素影响程度依次为酶添加量 (A) > 液料比 (D) > 酶解 pH (B) > 酶解时间 (C), 其中 B、C 影响不显著 ($P > 0.05$), 其他 2 个因素影响显著 ($P < 0.05$), 而且除 D² 外同一因素或两两因素间的交互作用也均有显著影响 ($P < 0.05$)。响应面分析见图 6。

由此可知, 最优工艺为酶添加量 2.1%, 酶解 pH 4.4, 酶解时间 48.99 min, 液料比 16.3:1, 多糖得率 144.07 mg/g, 考虑到实际操作方便, 将其修正为酶添加量 2.1%, 酶解 pH 4.4, 酶解时间 49 min, 液料比 16:1。再进行 3 次验证试验, 测

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

| 来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------|----------|-----|--------|--------|---------|
| 模型 | 2 833.71 | 14 | 202.41 | 24.82 | <0.0001 |
| A | 88.78 | 1 | 88.78 | 10.88 | 0.0053 |
| B | 4.28 | 1 | 4.28 | 0.53 | 0.4806 |
| C | 0.26 | 1 | 0.26 | 0.031 | 0.8621 |
| D | 40.04 | 1 | 40.04 | 4.91 | 0.0438 |
| AB | 171.74 | 1 | 171.74 | 21.06 | 0.0004 |
| AC | 63.36 | 1 | 63.36 | 7.77 | 0.0145 |
| AD | 53.22 | 1 | 53.22 | 6.52 | 0.0229 |
| BC | 467.21 | 1 | 467.21 | 57.28 | <0.0001 |
| BD | 187.55 | 1 | 187.55 | 22.99 | 0.0003 |
| CD | 52.56 | 1 | 52.56 | 6.44 | 0.0236 |
| A ² | 649.67 | 1 | 649.67 | 79.65 | <0.0001 |
| B ² | 885.14 | 1 | 885.14 | 108.52 | <0.0001 |
| C ² | 759.61 | 1 | 759.61 | 93.13 | <0.0001 |
| D ² | 31.83 | 1 | 31.83 | 3.90 | 0.0683 |
| 残差 | 114.19 | 14 | 8.16 | — | — |
| 失拟性 | 100.18 | 10 | 10.02 | 2.96 | 0.1614 |
| 纯误差 | 14.01 | 4 | 3.50 | — | — |
| 总和 | 2 947.90 | 28 | — | — | — |

$$R^2 = 0.9613, R_{adj}^2 = 0.9225$$

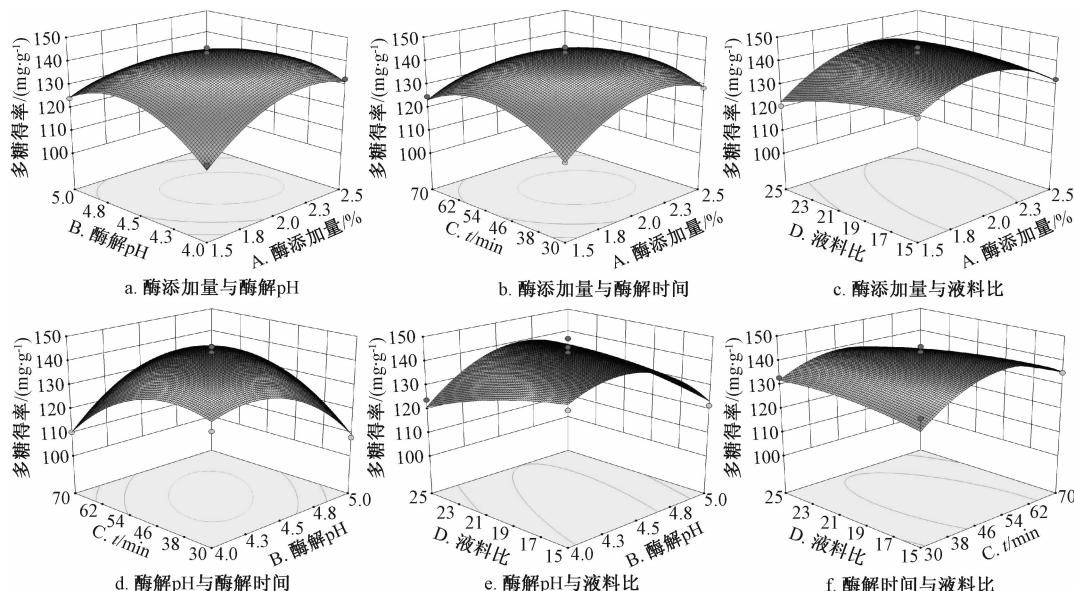


图 6 各因素响应面图

Fig. 6 Response surface plots for various factors

得多糖得率为 141.59 mg/g, 与预测值 144.07 mg/g 相当, 表明该模型稳定可靠。

3.3 抗氧化活性实验

3.3.1 对 DPPH 自由基的清除作用 图 7 显示, 多糖质量浓度为 0.2~3.0 mg/mL 时, 对 DPPH 自由基的清除率逐渐增大, 在 3.0 mg/mL 时最高, 达 87.81%, IC₅₀ 为 0.935 mg/mL。

3.3.2 多糖对 ·OH 自由基的清除作用 图 8 显

示, 多糖质量浓度为 0.2~3.0 mg/mL 时, 对 ·OH 自由基的清除率逐渐增大, 在 3.0 mg/mL 时最高, 达 86.14%, IC₅₀ 为 1.274 mg/mL。

3.3.3 多糖对 O₂⁻·自由基的清除作用 图 9 显示, 多糖质量浓度为 0.2~3.0 mg/mL 时, 对 O₂⁻·自由基的清除率逐渐增大, 在 3.0 mg/mL 时最高, 达 86.37%, IC₅₀ 为 1.521 mg/mL。

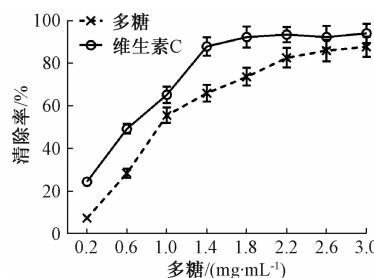


图7 多糖对DPPH自由基的清除作用

Fig. 7 Scavenging effects of polysaccharides on DPPH free radical

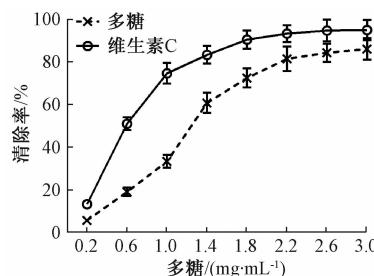


图8 多糖对·OH自由基的清除作用

Fig. 8 Scavenging effects of polysaccharides on ·OH free radical

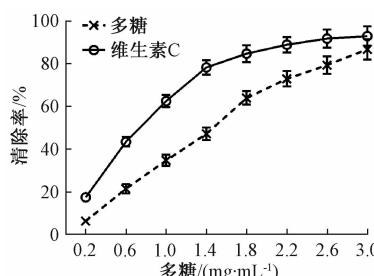


图9 多糖对O₂⁻·自由基的清除作用

Fig. 9 Scavenging effects of polysaccharides on O₂⁻· free radical

4 讨论

前期易运红等^[15]采用超声波辅助水提醇沉法提取金樱子根多糖，在提取温度70℃、提取时间60 min、料液比1:50 g/mL、提取次数4次的条件下，多糖得率为127.75 mg/g；郭巧玲等^[16]采用超声波强化碱水水浴提取该成分，其得率为124.59 mg/g，均低于本实验结果(141.59 mg/g)。同时，本实

验采用复合酶提取，具有提取时间短、操作温度低、有机溶剂用量少、不需要超声设备等优点。

另外，抗氧化活性实验结果显示，金樱子根多糖对DPPH、·OH、O₂⁻·自由基均具有较强的清除作用，与韦玉兰等^[12]报道一致，可为该成分进一步研究开发提供理论基础。

参考文献：

- [1] 李萍,李卫燕,曹蔚.酶解技术在多糖结构和活性研究中的应用进展[J].西北药学杂志,2015,30(4):433-436.
- [2] 李雨虹,董文宾,付瑜,等.药食两用植物多糖的研究进展[J].食品研究与开发,2016,37(9):219-221.
- [3] 陈阳,杨娟.响应面法优化仙茅多糖的酶解工艺及其抗氧化活性研究[J].食品科技,2016,41(9):209-215.
- [4] 代华年,马国需,邹节明,等.中药金樱子根中三萜类化学成分研究[J].中国中药杂志,2016,41(12):2267-2272.
- [5] 龙小琴,戴应和.金樱子根化学成分与药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2017,13(18):68-70.
- [6] 代华年,马国需,邹节明,等.金樱子根三萜类的化学成分研究[J].中草药,2016,47(3):374-378.
- [7] 汪玉梅,苏贤君,符崖,等.金樱根化学成分研究(I)[J].中山大学学报(自然科学版),2016,55(2):76-80,84.
- [8] 陈钰妍,李斌,李顺祥,等.金樱根总皂苷提取和纯化工艺研究[J].中成药,2013,35(5):1095-1098.
- [9] 韦熹苑,卢小玲.金樱根药理作用的研究进展[J].微量元素与健康研究,2017,34(4):80-81.
- [10] 王艳,谢蓉,蔡丹燕,等.金樱根、茎炮制品抗菌抗炎作用研究[J].中药材,2014,37(8):1356-1359.
- [11] 周晔,林泓,王健壮,等.响应面分析法优化金樱子多糖的酶提取工艺[J].广东药学院学报,2014,30(6):702-706.
- [12] 韦玉兰,苏上贵,黄燕军,等.金樱子多糖抗氧化作用的实验研究[J].广西中医药,2015,38(3):61-64.
- [13] 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,2015,36(2):271-275,281.
- [14] 杨佳琦,江洁,冀春阳,等.复合酶法提取云芝多糖及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,38(23):176-181.
- [15] 易运红,吴功庆,庄成建,等.金樱根多糖的超声提取研究[J].天津农业科学,2011,17(1):25-27.
- [16] 郭巧玲,田素英.金樱根多糖含量测定及提取工艺优选[J].亚太传统医药,2011,7(7):28-29.