

板蓝根多糖活性炭脱色工艺及抗氧化活性研究

肖平,陈建伟,陈亚运,李祥*

南京中医药大学药学院,南京 210023

摘要:采用活性炭对板蓝根多糖进行了脱色研究。在单因素实验的基础上进行了正交实验,得到活性炭脱色的最佳工艺条件为:70 ℃下调节 pH 为 7.0,添加体积分数为 1.0% 的活性炭,搅拌 80 min,脱色率为 92.97%、多糖保留率为 92.45%。采用 DPPH 孤电子配对法测定 DPPH 自由基的清除作用;采用邻苯三酚自氧化法检测超氧阴离子自由基的清除作用。实验结果表明,板蓝根多糖具有一定的清除自由基的能力,但脱色后的多糖清除自由基的能力降低。

关键词:板蓝根;多糖;脱色;活性炭;抗氧化

中图分类号:R917

文献标识码:A

Study on Decoloring Process of Polysaccharide from *Isatidis indigotica* with Active Carbon and Its Antioxidant Activity

XIAO Ping, CHEN Jian-wei, CHEN Ya-yun, LI Xiang*

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: In this study, the experimental condition for decolorization of polysaccharide from *Isatidis indigotica* was optimized. Based on single factor experiments, orthogonal experiment was performed to select the optimal condition for the decolorization of polysaccharide using the decolorization rate and polysaccharide retention rate as indexes. The optimal technological process of decolorization was adding 1.0% (m/v) active carbon to polysaccharide solution at 70 ℃, with pH at 7.0 and decoloring the solution for 80 min. The decolorization rate was 92.97%, and the retention rate of polysaccharide was 92.45%. DPPH lone electron conjugate method was used to detect scavenging effect of DPPH radical; pyrogallol autoxidation method was used to detect scavenging effect of superoxide anion radical. The results indicated *I. indigotica* polysaccharides had certain ability of scavenging free radicals, but the scavenging ability was decreased after decolorization.

Key words: *Isatidis indigotica*; polysaccharide; decoloration; active carbon; antioxidation

板蓝根为十字花科植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 的干燥根,具有清热解毒、凉血利咽等功效^[1]。板蓝根多糖因其具有提高机体免疫力、保肝、抗氧化、抗病毒等药理活性而受到广泛关注^[2,3]。板蓝根醇沉多糖中常含有一些色素,色素直接影响到多糖的质量和美观。多糖的常用脱色方法有过氧化氢、金属络合、离子交换、活性炭等脱色法。活性炭具有较大的比表面积,对杂质吸附能力强,脱色成本较低,且不影响多糖的结构和活性,目

前已广泛应用于多糖的脱色处理。据文献报道板蓝根多糖体外具有清除自由基的能力^[4,5]。本课题组前期对板蓝根多糖进行过分离纯化^[6,7],发现随着多糖的进一步纯化体外清除自由基的能力逐渐降低,分析其原因可能是多糖中的糖蛋白、蛋白、色素分子或其他物质具有清除自由基的能力,故本实验先通过正交实验优选板蓝根多糖活性炭的脱色工艺,然后再比较脱色前后板蓝根多糖的清除 DPPH 自由基和超氧阴离子的抗氧化的能力。以期为板蓝根多糖的质量提高和探究其体外抗氧化活性提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 试剂与设备

紫外可见分光光度计 UV-752(上海光谱仪器有

收稿日期:2013-12-04 接受日期:2014-02-27

基金项目:国家自然科学基金(81073023);江苏省产学研联合创新基金项目(BY2009109);南京中医药大学“康缘中医药科技创新基金”(HZ0808KY);江苏高校优势学科建设工程(YSK-2010);江苏省2013年度普通高校研究生科研创新计划(CXZZ13 0631)

* 通讯作者 Tel:86-25-85811512; E-mail:lixiang_8182@163.com

限公司);旋转蒸发器(上海医械专厂);低速大容量多管离心机;Anke7GL-16B 微量离心机(上海安亭科学仪器厂)。全波长酶标仪(powerwave X340,美国 Bio-Tek 公司);雷磁 PHSJ-3F 型实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),Spectrum752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);costar 96 孔细胞培养板;XS205 DualRange 电子天平(1/10 万,瑞士梅特勒公司)。

1.2 实验原料

板蓝根药材购于安徽丰厚铜陵中药饮片有限公司经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥根;1,2-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(美国 Sigma 公司);邻苯三酚(国药集团化学试剂有限公司);活性炭;苯酚,葡萄糖,硫酸等试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 板蓝根多糖提取液的制备

将板蓝根药材放于 80 °C 烘箱烘干至恒重,粉碎,过 20 目筛,备用。经石油醚脱脂后,加入 10、8 倍量水均连续回流提取 2 h,趁热过滤,合并滤液,真空浓缩,加入 95% 的乙醇至乙醇含量为 75%,4 °C 冰箱静置过夜,3000 rpm 离心 15 min,沉淀经无水乙醇,丙酮洗涤后真空冷冻干燥得板蓝根粗多糖。称取干燥后的板蓝根多糖适量,按料液比 1:20 加入蒸馏水,超声溶解,抽滤,得板蓝根多糖溶液。

2.2 多糖的含量测定

多糖含量测定采用苯酚-硫酸法,参考文献^[8]略做改动,以葡萄糖制作标准曲线:准确称取 105 °C 干燥至恒质量的葡萄糖标准品 10 mg 于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,配成 0.1 mg/mL 的标准溶液。然后精确移取标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于带塞试管中,各管以蒸馏水补充至 1 mL,然后加入质量分数为 5% 的重蒸苯酚 1.0 mL 充分振摇。沿管壁加入浓硫酸 5.0 mL,静置 5 min 后置于沸水浴中反应 15 min,取出迅速插入冰水浴中 5 min 后于 490 nm 处测定吸光度值,取 1.0 mL 蒸馏水同法平行操作作为空白对照,以葡萄糖浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y),进行线性回归,绘制葡萄糖浓度标准曲线。 y

$= 8.1667x + 0.0096, r = 0.9991$ 。

2.3 多糖保留率的测定

采用苯酚-硫酸法测定多糖的含量,多糖保留率按下式计算。

多糖保留率% = (脱色后多糖含量/脱色前多糖含量) × 100

2.4 脱色率的测定

对板蓝根多糖溶液在 200 ~ 700 nm 进行可见-紫外光谱全波长扫描,确定板蓝根多糖提取液的最大吸收波长,作为提取液中色素的最佳吸收波长。经紫外扫描,板蓝根多糖提取液的最大吸收波长为 301 nm。在 301 nm 处测定吸光度,按下式计算脱色率。

脱色率(%) = (脱色前吸光度 - 脱色后吸光度)/脱色前吸光度 × 100

2.5 活性炭脱色工艺

2.5.1 温度对板蓝根多糖脱色的影响

分别取板蓝根多糖溶液 5.0 mL 置于具塞试管中,每支试管各添加活性炭 1.5% (m/v),分别在 30、40、50、60、70、80 °C 条件下,恒温振荡脱色 40 min,离心取上清液,测定脱色率和多糖保留率。

2.5.2 活性炭用量对板蓝根多糖脱色效果的影响

分别取板蓝根多糖溶液 5.0 mL 置于具塞试管中,分别按照 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的比例添加活性炭,在温度 40 °C 下恒温振荡脱色 40 min 后,离心取上清液,测定脱色率和多糖保留率。

2.5.3 脱色时间对板蓝根多糖脱色效果的影响

分别取板蓝根多糖溶液 5.0 mL 置于具塞试管中,每支试管中按 1.5% 比例加入活性炭,在 40 °C 恒温条件,分别恒温振荡脱色 20、40、60、80、100 min 后,离心取上清液,测定脱色率和多糖保留率。

2.5.4 溶液 pH 对板蓝根多糖脱色效果的影响

分别取板蓝根多糖溶液 10.0 mL 置于具塞试管中,每支试管中按 1.5% 比例添加活性炭,调节溶液 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,在 30 °C 恒温振荡脱色 40 min 后,离心取上清液,测定脱色率和多糖保留率。

2.5.5 活性炭脱色工艺的正交试验

在单因素试验的基础上,选取脱色温度、脱色时间、pH、活性炭用量 4 个单因素按 $L_9(3^4)$ 进行正交试验。因素水平表见表 1。

表1 因素水平设计

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平 Level	因素 Factor			
	A 脱色温度 Bleaching temperature(°C)	B 时间 Bleaching time(min)	C pH pH	D 活性炭用量 Added quantity of active carbon(%)
1	60	40	6	0.5
2	70	60	7	1
3	80	80	8	1.5

2.6 多糖抗氧化活性

2.6.1 清除 DPPH 自由基活性试验

参照文献^[9],并作适当改进:精密移取不同浓度的提取物溶液 20 μL 加入 96 孔板中,再加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 对照品液 80 μL ,振荡后反应 30 min,每个样品平行测定 4 个复孔,517 nm 处测定吸光度(A_1);以蒸馏水代替样品溶液、无水乙醇代替 DPPH 溶液,做空白实验调零。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

式中: A_0 为对照实验(水代替样品溶液)的吸光度值; A_1 为样品溶液实验的吸光度值; A_2 为样品干扰实验(无水乙醇代替 DPPH 溶液)的吸光度值。

2.6.2 清除超氧阴离子(O_2^-)活性试验

参照文献^[10],并稍作改进,精密吸取不同浓度的各部位样品 0.1 mL,加入 2.8 mL 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.2),空白对照管以蒸馏水代替样品,震荡混匀,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 10 min 后加入 0.1 mL 3 mmol/L 的邻苯三酚(25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热),迅速混匀并开始计时,在 320 nm 处测定吸光值 A,每隔 30 s 读取 A_{320} ,5 min 后结束。以 0.1 mL 蒸馏水加入 2.8 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液调零。作吸光值随时间变化的回归方程,其斜率为邻苯三酚自氧化速率 V,按下式计算样品对超氧阴离子的抑制率:

$$\text{清除率}(\%) = (V_{\text{对照}} - V_{\text{样品}}) / V_{\text{对照}} \times 100$$

2.7 综合评分^[11]

数据处理采用加权评分法,评分标准为:将各项指标除以该列的最大值再乘以 100 为该项得分。设定多糖脱色率(x)和多糖保留率(y)两者的权重系数均为 0.5,对两项指标进行加权求和。通过公式 $z = (0.5x + 0.5y) \times 100$,得到综合评分(z)。

3 结果与分析

3.1 脱色温度对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响

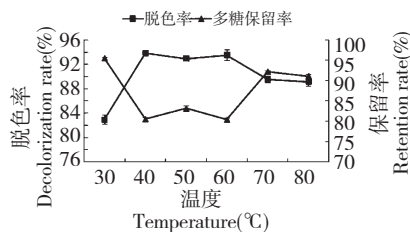


图1 脱色温度对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响
Fig. 1 Effect of decolorization temperature on decoloring rate and retention rate of *I. indigotica* polysaccharide

如图1所示,40~60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,脱色效率较好,但在该温度范围内多糖保留率较低。70~80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内脱色率、多糖保留率都较高,综合考虑选择 70 $^{\circ}\text{C}$ 左右较好。

3.2 活性炭用量对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响

如图2所示,活性炭用量在 0.5%~2.0% 之间

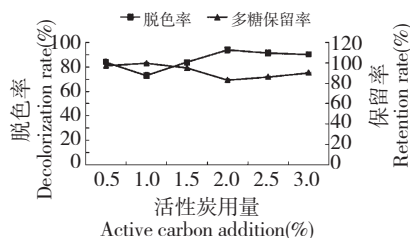


图2 活性炭用量对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响
Fig. 2 Effect of amount of active carbon on decoloring rate and retention rate of *I. indigotica* polysaccharide

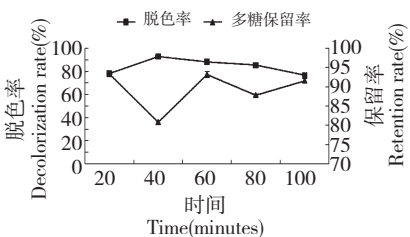


图3 脱色时间对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响
Fig. 3 Effect of decolorization time on decoloring rate and retention rate of *I. indigotica* polysaccharide

随着活性炭用量的增加,脱色率也随之显著增加;在2.0%~3.0%之间脱色率基本保持不变;活性炭用量在1.5%~2.0%时多糖保留率显著下降。综合考虑脱色率和多糖保留率选择活性炭用量在0.5%~1.5%范围内较好。

3.3 脱色时间对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响

如图3所示,随着脱色时间增加,脱色率在78.2%~93.3%范围内波动,变化不明显;而多糖保留率在40 min时保留率达到最低为80.8%,60~80 min时多糖保留率在87.8%~93.3%范围内波动,变化不明显,且该段时间的脱色率较高,故选择60 min左右效果较好。

3.4 多糖溶液 pH 对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响

如图4所示,在pH为3.0~7.0时随着pH值的增加,脱色率变化不大,但pH大于7.0之后,脱色率急剧下降。在pH为6.0时多糖保留率最高,当pH为5.0时多糖保留率达到最低。多糖保留率在pH为6.0左右均有下降,PH为7.0~8.0时下降平缓,且pH为7.0为中性,不需要调pH,综合考虑选择pH为7.0左右较好。

3.5 正交试验

在单因素试验的基础上,采用正交试验法确定

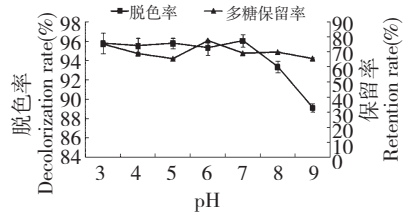


图4 溶液 pH 对板蓝根多糖脱色率和多糖保留率的影响
Fig. 4 Effect of pH value of polysaccharide solution on decolorizing rate and retention rate of *I. indigotica* polysaccharide

多糖提取液的最佳脱色工艺条件,正交实验结果见表2。由表2和表3分析可知,活性炭脱色的最佳工艺条件组合为:A₂B₃C₂D₂,即在70℃下调节pH为7.0,添加1.0%的活性炭,振荡80 min。按照R值的大小顺序,上述四个因素对活性炭脱色影响程度大小顺序为:pH>时间>温度>活性炭用量。由正交试验方差分析结果(表3)可知,pH对脱色率有显著影响($P < 0.05$),其他3个考察因素对多糖保留率和脱色率无显著影响($P > 0.05$)。在最佳条件下进行3次验证实验,脱色率的平均值为92.97%,相对标准偏差为1.32%;多糖保留率平均值为92.45%,相对标准偏差为0.88%。由此可知,该方法重复性较好,具有较高的可行性,符合正交试验结果分析。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiments

试验号 No.	因素 Factor				试验结果 Result		综合评分 Composite score
	A	B	C	D	脱色率 Decolorization rate (%)	多糖保留率 Retention rate of polysaccharide (%)	
1	1	1	1	1	75.52	99.36	87.44
2	1	2	2	2	86.93	96.74	91.84
3	1	3	3	3	85.94	73.99	79.96
4	2	1	2	3	88.25	92.20	90.23
5	2	2	3	1	76.18	88.30	82.24
6	2	3	1	2	92.80	91.67	92.24
7	3	1	3	3	92.97	64.37	78.67
8	3	2	1	1	78.83	99.09	88.96
9	3	3	2	2	84.86	95.83	90.35
k ₁	89.833	88.953	92.970	89.963			
k ₂	91.770	91.037	94.390	91.290			
k ₃	89.507	91.120	83.750	89.857			
R	2.263	2.167	10.640	1.433			

表3 方差分析和显著性检验结果

Table 3 Analysis of variance on results of orthogonal experiments

因素 Factor	偏差平方和 Sum of squared deviations	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	显著性 Significance
C	200.23	2	27.5	*
B	9.04	2	1.24	
A	8.98	2	1.23	
D	3.826	2	0.52	

注:与空白组相比较有显著影响, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$.

3.6 多糖的抗氧化活性分析

3.6.1 多糖对 DPPH 自由基的清除能力

如图5所示板蓝根多糖具有一定的清除 DPPH 自由基的活性,且表现出较好的量效关系,但脱色后多糖的清除 DPPH 自由基的活性较粗多糖显著降低,当浓度为 2.0 mg/mL 时板蓝根多糖和脱色后多糖的清除率分别为 63.73%、47.21% 较阳性药 VC 低。

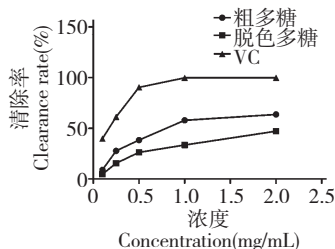


图5 多糖对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 5 Scavenging rate of *I. indigotica* polysaccharide on DPPH free radical

3.6.2 多糖对超氧阴离子的清除能力

以 VC 为阳性对照,测定板蓝根多糖脱色前后对超氧阴离子的清除率,如图6所示板蓝根多糖具有一定的清除超氧阴离子的活性,但较阳性药活性低,脱色后的板蓝根多糖清除能力降低。

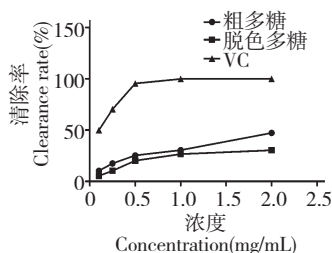


图6 多糖对超氧阴离子的清除率

Fig. 6 Scavenging rate of *I. indigotica* polysaccharide on superoxide anion

4 讨论

本研究首先对板蓝根多糖脱色材料进行了筛选,在相同条件下比较活性炭、氧化铝、AB-8 树脂的脱色率和多糖保留率,活性炭脱色率为 82.21%,多糖保留率为 90.64%;氧化铝脱色率为 37.62%,多糖保留率为 80.28%;AB-8 脱色率为 44.21%,多糖保留率为 75.21%。活性炭的脱色率、多糖保留率均较高,且脱色成本较低,也避免了脱色材料繁琐的前处理过程,故优选出活性炭作为板蓝根多糖的脱色剂。实验进一步研究活性炭对板蓝根多糖中色素脱除率和多糖保留率的影响,确定活性炭最佳脱色工艺为在 70 °C 下调节 pH 为 7.0,添加 1.0% 的活性炭,搅拌 80 min,脱色率为 92.97%、多糖保留率为 92.45%,活性炭脱色影响程度大小顺序为: pH > 时间 > 温度 > 活性炭用量。比较了脱色前后多糖清除 DPPH 自由基、超氧阴离子的能力,结果显示脱色后的多糖清除自由基的能力显著降低,板蓝根多糖中可能含有一些蛋白质多肽类成分以及鞣质类成分,这些成分具有较好的抗氧化作用,被活性炭吸附后而去除。脱色后多糖清除自由基能力降低,多糖本身抗氧化基团较少,结合课题组前期分离纯化药理活性筛选结果,推测板蓝根多糖本身清除能力较弱而其他类别的杂质成分影响其抗氧化能力的测定。中药作为一个多成分的复杂体系,部位分离后的成分之间会相互掺杂而影响药效实验的结果,故分离得到高纯度的单一类别的物质对于活性的合理评价有重要的意义。本次实验结果与文献报道^[4,5]稍有出入,板蓝根多糖是否具有较好的体外清除自由基的能力还有待商榷。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 191. (下转第 2021 页)