

# 山茱萸多糖大孔树脂脱色技术的优化

雷 呈<sup>1\*</sup>,王桂桢<sup>2</sup><sup>1</sup>南阳医学高等专科学校;<sup>2</sup>南阳农业职业学院,南阳 473000

**摘 要:**以脱色率、多糖保留率和细胞抑制率3个指标,从D301、D303、D315、D900树脂筛选出脱色效果较好的树脂;采用MTT法检测,脱色后的山茱萸粗多糖抗HL-60细胞活性提高;对D303树脂,通过单因素和正交试验对其进行优化,确定最优工艺条件是时间7 h、温度50℃、样品浓度15 mg/mL,脱色率和多糖保留率分别为79.71%、81.12%。大孔树脂脱色工艺的研究,为山茱萸药物的研发提供了一定实验基础。

**关键词:**山茱萸多糖;大孔树脂;脱色;优化

中图分类号:R34

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.022

## Optimization of Decolorization Technology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc Polysaccharide by Macroporous Resin

LEI Cheng<sup>1\*</sup>, WANG Gui-zhen<sup>2</sup><sup>1</sup>Nanyang Medical College; <sup>2</sup>Nanyang Vocational College of Agriculture, Nanyang 473000, China

**Abstract:** The resin with better decolorization effect was screened out from D301, D303, D315 and D900 resin using decolorization rate, polysaccharide retention rate and cell inhibition rate as evaluation indexes. The inhibition effects of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc polysaccharide before and after decolorization on HL-60 cells were investigated by MTT assay. D303 resin showed the best decolorization effect. Its processing conditions were further optimized by single factor and orthogonal experiments. The results showed that the optimal process condition were as follows: processing time of 7 h, temperature of 50℃, sample concentration of 15 mg/mL. Under the optimized conditions, the decolorization rate and polysaccharide retention rate were 79.71% and 81.12%, respectively. The developed decolorization technology using macroporous resin for *C. officinalis* polysaccharide provided experimental basis for its further research and development.

**Key words:** *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc polysaccharide; macroporous resin; decolorization; optimization

山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc)为山茱萸科植物山茱萸的干燥成熟果肉,具有补益肝肾、涩精固脱的作用,在免疫调节、抗肿瘤、抗感染、抗氧化、降血糖、代谢调节等方面具有重要的生物学活性<sup>[1]</sup>。

传统工艺提取的山茱萸多糖颜色深、杂质多,降低了山茱萸多糖的生物学活性,不利于作为功能性食品或药品进一步研究与开发。为去除产品中的色素,传统脱色方法一般有活性炭吸附、过氧化氢法<sup>[2-5]</sup>等,但活性炭对多糖的吸附力很大,其吸附力随多糖的相对分子质量增大而增大,而且是不可逆吸附,造成大量多糖的损失,多糖保留率低。过氧化氢是强氧化剂,容易破坏多糖结构,影响其活性<sup>[5]</sup>。

利用大孔树脂脱色是新发展的一种脱色方法。由于大孔树脂价格便宜,使用方便,易再生,近年来越来越多的被用于植物多糖的脱色研究<sup>[6-8]</sup>,但大孔树脂用于山茱萸多糖的脱色研究仍未见报道。本实验用大孔树脂对山茱萸多糖进行脱色,并采用单因素和正交试验对脱色条件进行优化,以期如山茱萸药物的研发提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

山茱萸干燥果实,购自河南省西峡县天然药物研究所;人早幼粒白血病 HL-60 细胞,南阳医专科研中心保存;D301、D303、D315、D900 树脂,沧州宝恩吸附材料科技有限公司;D(+)-葡萄糖,美国 Sigma 公司;青霉素和链霉素等试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

电子天平,美国奥豪斯;透析袋,上海涑昂生物

收稿日期:2016-03-15 接受日期:2016-05-18

基金项目:南阳市科技攻关计划(2011GG039)

\*通讯作者 Tel:86-377-63526173; E-mail:leich0504@sina.com

科技有限公司;多功能酶标仪、高速中药粉碎机、台式高速冷冻离心机、增力电动搅拌器、旋转蒸发器、真空干燥器、紫外-可见分光光度计、CO<sub>2</sub> 培养箱等仪器均为国产。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 大孔树脂的预处理

大孔树脂 D301、D303、D315、D900 用 0.5 mol/L NaOH 溶液搅拌浸泡 0.5 h,蒸馏水洗至中性,再用 0.5 mol/L HCl 溶液搅拌浸泡 0.5 h,蒸馏水洗至中性,抽气 0.5 h,备用。

#### 1.3.2 山茱萸粗多糖的制备

将山茱萸果实烘干(60 ℃),粉碎(转速 25000 rpm,时间 1.5 min),过 80 目筛。将筛分后的山茱萸用 8~10 倍体积的 95% 乙醇回流 8 h 脱脂,脱脂后降至室温,过滤,滤渣晾干即为山茱萸原料。精密称取经过预处理的 10.000 g 山茱萸于锥形瓶中,加入一定比例的蒸馏水,选择一定频率的超声波,超声一段时间后,再按照常规热水浸提方法进行提取,抽滤,滤液减压浓缩,400 rpm,离心 15 min,取上清液,加入 4 倍体积的无水乙醇并不断搅拌,过夜,离心,得沉淀,将沉淀溶于水,透析袋透析 2 d,浓缩冻干后得到山茱萸粗多糖干品。

#### 1.3.3 对不同型号树脂粗筛试验

准确量取 50 mL 经预处理的 4 种树脂于 250 mL 三角瓶中,加入 40 mL 50 mg/mL 山茱萸多糖粗提物溶液,置于摇床中,150 rpm、25 ℃ 振荡 12 h,取上清液在波长 490 nm 处测定吸光度,计算脱色率,测定多糖含量,计算多糖保留率。初步筛选较适宜的脱色树脂。

#### 1.3.4 细胞培养

人早幼粒白血病 HL-60 细胞(南阳医专科研中心保存),置于含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵化箱传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

#### 1.3.5 MTT 法检测山茱萸多糖粗提物对 HL-60 细胞生长抑制作用

取对数生长期的 HL-60 细胞,以  $5 \times 10^5$  /L 细胞悬液,同脱色前后的山茱萸多糖粗提物共培养,以未处理的 HL-60 细胞为对照,每孔 0.1 mL 接种于 96 孔培养板,每组均设 6 个平行孔,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下进行细胞培养 48 h,每孔加入

10 μL MTT(5 mg/mL)液,放置培养箱中继续孵育 4 h 后,弃上清,每孔加终止液 DMSO 溶液 150 μL/孔,微量振荡器上震荡 10 min,于酶标仪 570 nm 处检测吸光度值。并计算细胞的抑制率。实验重复 3 次取均值。

细胞抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照组平均吸光度值}-\text{给药组平均吸光度值}}{\text{对照组平均吸光度值}} \times 100\%$$

#### 1.3.6 单因素试验和正交试验

粗筛试验结合细胞试验筛选出的树脂,以山茱萸多糖粗提物溶液的脱色时间、温度和样品浓度为单因素,测定并计算不同条件下的脱色率及多糖保留率,在单因素试验基础上设计正交试验,确定最佳脱色条件。

##### 1.3.6.1 时间对树脂脱色的影响

准确量取处理好的大孔树脂 5 mL,加入 10 mg/mL 40 mL 山茱萸多糖粗提物,置于摇床中,150 rpm、25 ℃ 脱色。取上清液在 490 nm 测定吸光度,计算脱色率,测定多糖含量,计算多糖保留率。

选择 490 nm 波长为检测波长,测定溶液的吸光度,并计算脱色率。

$$\text{脱色率}(\%) = \frac{\text{脱色前吸光度}-\text{脱色后吸光度}}{\text{脱色前吸光度}} \times 100\%$$

采用苯酚-硫酸法<sup>[9]</sup>测定山茱萸的多糖含量。

$$\text{多糖保留率}(\%) = \frac{\text{脱色后多糖含量}}{\text{脱色前多糖含量}} \times 100\%$$

##### 1.3.6.2 温度对树脂脱色的影响

准确量取大孔树脂 5 mL,加入 10 mg/mL 40 mL 山茱萸多糖粗提物,分别在 20、30、40、50、60、70 ℃,置于摇床中,150 rpm、pH 7 脱色 6 h,取上清液在波长 490 nm 处测定吸光度,计算脱色率,测定多糖含量,计算多糖保留率。

##### 1.3.6.3 样品浓度对树脂脱色的影响

准确量取大孔树脂 5 mL,分别加入 5、10、15、20、25、30、35 mg/mL 等不同浓度的山茱萸多糖粗提物 40 mL,置于摇床中,150 rpm、25 ℃、pH 7 脱色 6 h,取上清液在波长 490 nm 处测定吸光度,计算脱色率,测定多糖含量,计算多糖保留率。

##### 1.3.6.4 正交试验

在单因素试验的基础上,采用正交试验确定山茱萸多糖粗提物的最佳脱色条件,按照 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表设计试验(表 1)。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal array

水平 Level	因素 Factor		
	A (Time, h)	B (temperature, ℃)	C (Sample concentration, mg/mL)
1	6	40	10
2	7	50	15
3	8	60	25

1.3.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件对所有数据进行统计学分析,多组间均数比较采用方差分析,两组间比较用  $t$  检验,实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$ ,有显著性差异,即差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 树脂粗筛

通过 4 种树脂 D301、D303、D315、D900 对山茱萸多糖的脱色率和多糖保留率的比较发现(表 2), D301、D303 脱色效果好,多糖保留率较高,适合山茱萸多糖溶液的脱色。其他树脂对山茱萸多糖的吸附比较大,多糖损失多,多糖保留率均极低,不适合山茱萸多糖溶液的脱色。

表 2 4 种大孔树脂的脱色比较

Table 2 Comparison of decolorization of 4 macroporous resins

树脂名称 Resin	性质 Character	脱色率 Decolorization rate( % )	多糖保留率 Polysaccharide retention rate( % )
D301	弱阴离子	82.45	76.87
D303	弱阴离子	89.12	60.63
D315	弱阴离子	83.13	45.65
D900	弱阴离子	81.36	36.38

2.2 山茱萸多糖脱色前后对 HL-60 细胞增殖抑制作用

未脱色的山茱萸粗多糖和经过 4 种树脂脱色后的样品,以 1.0 g/L 山茱萸多糖作用 HL-60 细胞 48 h 后,各实验组的山茱萸多糖对 HL-60 细胞均有抑制作用,实验组与对照组(未处理的 HL-60 细胞)的  $A_{570}$  相比均有显著性差异(  $P < 0.05$  ),脱色前后山茱

萸多糖对 HL-60 细胞均具有抑制作用,但是山茱萸多糖脱色后对 HL-60 细胞的抑制作用明显增强;同时四种树脂的抑制作用效果不同,经过 D301、D303 树脂处理后的样品,HL-60 细胞活性明显降低,抑制率高,而 D315、D900 树脂处理后的样品,HL-60 细胞活性明显升高,抑制率低(见表 3)。

表 3 不同树脂处理的山茱萸多糖对 HL-60 细胞生长的影响(  $n = 6$  )

Table 3 Effect of *C. officinalis* polysaccharide with different resin treatment on the growth of HL-60 cells(  $n = 6$  )

实验分组 Group	$A_{570}$	抑制率 Inhibition rate
对照 Control	0.487 ± 0.01	—
脱色前的山茱萸粗多糖 Crude <i>C. officinalis</i> polysaccharide	0.397 ± 0.02	18.48
D301	0.196 ± 0.03	59.75
D303	0.133 ± 0.02	72.69
D315	0.297 ± 0.02	39.01
D900	0.321 ± 0.01	34.09

注:与对照组比较,  $P = 0.0000 < 0.05$  ( $t$  实验)。  
Note: Compared with control,  $P = 0.0000 < 0.05$  ( $t$  test).

综合考虑脱色率、多糖保留率以及抗肿瘤细胞活性 3 个指标,确定 D303 作进一步脱色工艺优化试验对象。

2.3 单因素和正交试验

2.3.1 时间对脱色效果的影响

由图 1 可知,随着时间的延长,D303 树脂脱色效果明显增强,多糖保留率在缓慢下降,到 7 h 后,脱色率增加缓慢,几乎不再变化,色素的吸附和解吸达到了平衡,因此 D303 树脂脱色时间选择 7 h。

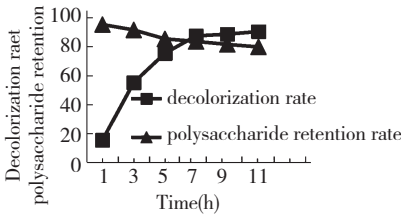


图 1 时间对树脂脱色效果的影响

Fig. 1 Effect of time on the decolorization of resin

2.3.2 温度对脱色效果的影响

由图 2 可知,随着温度的增加,树脂扩散速度加快,多糖黏度下降,溶解度增加,有利于色素的吸附,脱色率增加,而多糖保留率在下降。随着温度升高,多糖结构将受到破坏,同时增加成本。在重点考虑多糖保留率、兼顾脱色率指标情况下,将脱色温度设为 50 ℃。

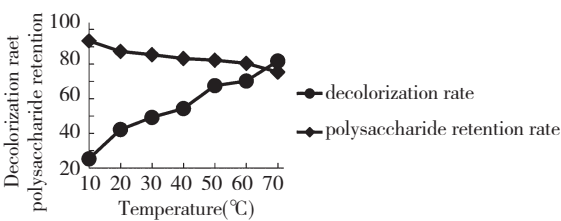


图 2 温度对树脂脱色效果的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the decolorization of resin

2.3.3 样品浓度对脱色效果的影响

由图 3 看出,随着上样质量浓度的增加,脱色率下降,多糖保留率提高,在上样质量浓度为 10 ~ 25 mg/mL 范围内,脱色率变化不明显,超出 10 ~ 25 mg/mL 范围,脱色率开始明显下降,故 D303 树脂上样质量浓度设为 10 ~ 25 mg/mL。

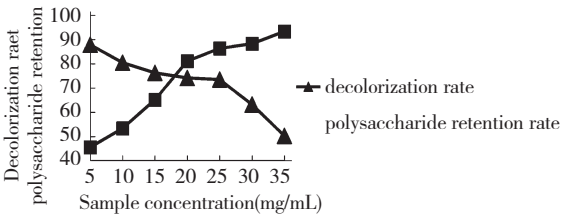


图 3 样品浓度对脱色效果的影响

Fig. 3 Effect of sample concentration on the decolorization of resin

2.3.4 山茱萸多糖粗提物脱色正交试验

正交试验结果与方差分析如表 4、表 5 所示。

表 4 正交试验及结果  
Table 4 Results of orthogonal test

试验号 No.	A	B	C	误差列 Error	脱色率 Decolorization rate( % )
1	1	1	1	1	61.89
2	1	2	2	2	91.21
3	1	3	3	3	72.56
4	2	1	2	3	75.01
5	2	2	3	1	87.98
6	2	3	1	2	89.16
7	3	1	3	2	62.32
8	3	2	1	3	92.05
9	3	3	2	1	87.36
K <sub>1</sub>	225.66	199.22	243.1	237.23	
K <sub>2</sub>	252.15	271.24	253.58	242.69	
K <sub>3</sub>	241.73	249.08	222.86	239.62	
S	118.73	907.11	162.58	4.99	
R	26.49	72.02	30.72	5.46	

从表 4 的 S 和 R 值(极差)数据可知各因素的重要性: B>C>A,且因素各水平最好的是 A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>;由方差分析表 5,各因素的显著性: B 因素达到极显著水平;C 和 A 因素达到显著水平。因此,最优工艺条件是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即时间 7 h、温度 50 ℃、样品浓度 15 mg/mL。

表 5 方差分析  
Table 5 Analysis of variance

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	$F_{\alpha}$	显著性 significance
A	118.73	2	59.36	23.77	$F_{0.05}(2,2)=19$	*
B	907.11	2	453.55	181.63	$F_{0.01}(2,2)=99$	**
C	162.58	2	81.29	32.55		*
Error	4.99	2	2.50			

注: \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ 。

3 讨论与结论

大孔树脂技术通过物理吸附和树脂网状孔穴的筛分作用进行分离和提纯。目前,大孔树脂脱色工艺已经在生产和研究中得到大量的应用,在中药新药的开发和中成药的生产上,一些企业大量应用大孔树脂的脱色技术,用于改善产品的外观,提高有效成分的含量。本实验采用大孔树脂对山茱萸粗多糖进行脱色处理,以脱色率、多糖保留率和细胞抑制率 3 个指标,从 D301、D303、D315、D900 树脂筛选出 D303 树脂脱色效果最好。

采用 MTT 法检测山茱萸多糖粗提物对 HL-60 细胞生长抑制作用。MTT 法通过颜色反应观察细胞代谢活化的程度,可以间接反映细胞的增值与存活情况,即反映出细胞的活性和数量。其基本原理是活细胞内线粒体富含琥珀酸脱氢酶,在琥珀酸脱氢酶和细胞色素 C 的作用下将黄色的 MTT 还原为蓝色,生成不溶于水的蓝色结晶,该结晶的生成量仅与活细胞数目成正比(死细胞中琥珀酸脱氢酶消失,不能将 MTT 还原)。实验结果表明,经脱色后的山茱萸粗多糖抗 HL-60 细胞活性提高,显示出山茱萸粗多糖具有抗肿瘤活性。对于这种多糖还需进一步分离纯化、对其化学结构进行分析,确定构效关系。

对 D303 树脂,通过单因素和正交试验对其进行优化,获得 D303 树脂最佳脱色工艺,达到了较满意的脱色效果和较高多糖保留率。在后续研究中,将对这一脱色工艺进行抗 HL-60 细胞活性实验,以进一步验证大孔树脂对山茱萸多糖的脱色效果和生物学活性的影响。山茱萸多糖脱色工艺的研究,改

准确量取 15 mg/mL 山茱萸粗多糖溶液 40 mL 于 250 mL 三角瓶中,用 D303 树脂 50 mL 在温度 50 ℃下脱色,脱色时间 7 h,计算脱色率和多糖保留率,并进行 3 次平行试验。实验结果:脱色率和多糖保留率分别为 79.71%、81.12%。

善了山茱萸多糖产品的外观,为山茱萸药物的研发提供了一定参考。

参考文献

1 Li YM(李雅梅),Li H(李华),Li CR(李春荣). Progress on cornel chemical constituents and pharmacological effects. *Acta Acade Med CPAPF*(武警医学院学报),2010,19:500-503.

2 Fang JL(方积年),Ding K(丁侃). Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharide. *Chin J Nat Med* (中国天然药物),2007,9:338-347.

3 Peng YS(彭友舜),Han ZX(韩占霞),Li JM(李嘉明). Asparagus polysaccharide process with activated carbon decolorization. *J Hebei Normal Univ Sci Technol* (河北科技师范学院学报),2014,28(2):15-20.

4 Qin YD(秦亚东),Wang RB(汪荣斌),Zhou JJ(周娟娟). Study on Radix *Paeoniae alba* polysaccharide decoloring technology. *Proprietary Chin Med*(中成药),2015,37:2783-2787.

5 Wang WT(王文彤),Zhang Y(张岩),Yao ZW(陶遵威). Technology of hydrogen peroxide decolorization with orthogonal experiment in bitter beans polysaccharide. *Mod Pharm Clin* (现代药物与临床),2014,29:1234-1237.

6 Yuan HB(袁红波),Zhang JS(张劲松),Jia W(贾薇),et al. Decoloring research by utilization of macroporous resin with low molecular weight on *Ganoderma lucidum* polysaccharide. *Food Ind Sci Technol* (食品工业科技),2009,30:204-206.

7 Yu HN(于海宁),Zhu J(朱惊),Liu Y(刘研),et al. Optimization technology on decolorization of Gracilaria polysaccharide by macroporous resin method. *J Zhejiang Univ Technol* (浙江工业大学学报),2014,42:418-421.