

藏药蔓菁抗氧化活性多糖的提取及纯化工艺优选

杨永东, 李聪颖, 唐策, 王张, 范刚, 张艺*
(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优化藏药蔓菁中抗氧化活性多糖的提取、纯化工艺。方法: 以粗多糖得率、总多糖质量分数和抗氧化活性的综合评分为指标, 采用正交试验考察浸提次数、料液比及浸提时间对蔓菁多糖提取工艺的影响; 以色素去除率和多糖损失率为综合评价指标, 通过正交试验考察脱色温度、吸附时间、活性炭用量对脱色工艺的影响。结果: 蔓菁多糖最佳提取工艺为料液比 1:30, 于 90 °C 水浴浸提 3 次, 每次 2 h; 最佳脱色工艺为加 3% 活性炭于 60 °C 吸附 40 min。蔓菁多糖纯度达 4.66%, 其清除 DPPH 自由基的 $IC_{50} = 6.71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: 优选的提取、纯化工艺稳定可靠, 所得多糖的含量高、杂质少, 适合于蔓菁多糖的工业化生产。

[关键词] 藏药; 蔓菁; 多糖; 提取工艺; 抗氧化

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0007-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070007

Optimization of Extraction and Purification Technology of Antioxidant Activity Polysaccharides from *Brassica rapa* by Orthogonal Design

YANG Yong-dong, LI Cong-ying, TANG Ce, WANG Zhang, FAN Gang, ZHANG Yi*
(College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification procedures of antioxidant activity polysaccharides from *Brassica rapa*. **Method:** With the crude polysaccharides yield, the content and antioxidant activity of total polysaccharides as indicators, orthogonal design was used to optimize extraction technology by taking extraction times, solid-liquid ratio and extraction time as factors; With the removal rate of pigment and the loss rate of polysaccharides as comprehensive evaluation index, effects of bleaching temperature, adsorption time and activated carbon dosage on decoloration technology were investigated by orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology was as following: solid-liquid ratio 1:30, extracted 3 times at 90 °C with 2 h each time; The best decoloration technology was: absorbed 40 min with 3% activated carbon at 60 °C. Under these conditions, purity of polysaccharides from *B. rapa* was up to 4.66%, the IC_{50} value of DPPH free radical scavenging was $6.71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** These optimized extraction and purification processes were stable and reliable, a high level of polysaccharides with fewer impurities was obtained, which indicated that optimized processes were suitable for industrial production of polysaccharides from *B. rapa*. Meanwhile, these results indicated that polysaccharides from *B. rapa* had strong antioxidant activity, and worthy of further study.

[Key words] Tibetan medicine; *Brassica rapa*; polysaccharide; extraction technology; antioxidant

[收稿日期] 20121109(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960507);四川省中医药管理局科研项目(2012-G-029);四川省教育厅四川省省属高校科研创新团队建设计划项目(11TD004);成都中医药大学科技发展基金项目(CGZH201201)

[第一作者] 杨永东, 硕士, 从事中药、藏药质量标准研究, Tel:15902830859, E-mail: yangyongdong87@163.com

[通讯作者] * 张艺, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事藏药药效物质基础及质量控制研究, Tel:028-61800274, E-mail: 9006zmy@sina.com

蔓菁的藏药名为“妞玛”，别名芜根，具有解毒、滋补的功效，主治各种中毒症、“龙”病、身体虚弱^[1]。藏医使用时常将其块根洗净，切片，煎煮浓缩成膏状入药。现代研究表明，蔓菁提取物具有抗缺氧^[2]、提高免疫力^[3]、抗辐射^[4]等活性。缺氧与多种疾病的发生、发展密切相关，机体缺氧时，体内自由基含量增加、自由基清除率降低^[5]。因此，筛选具有自由基清除活性的药物，降低缺氧对机体造成的损伤，是抗缺氧创新药物开发的重要依据。

蔓菁富含多糖^[6]，具有抗氧化作用^[7]，提示抗氧化活性可作为蔓菁多糖提取工艺的评价指标。本实验采用正交试验，系统研究提取、除蛋白和脱色等重要工艺环节，并引入抗氧化活性指标优化提取工艺，为蔓菁在治疗缺氧疾病方面的应用及新药开发提供实验依据。

1 材料

UV-1600 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)，UPUL-1-10T 型超纯水机(成都超纯科技有限公司)，TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(湘南湘仪实验室仪器开发有限公司)，FreeZone 2.5 型冷冻干燥仪(美国 LABCONCO 公司)。

D-无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所，批号 110833-200503)，牛血清白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司，批号 120118)，考马斯亮蓝 G-250(成都市科龙化工试剂厂，批号 20101101)，DPPH(日本 Wako 公司，批号 047-04051)。5% 苯酚试剂参照文献[8]配制，其他试剂均为分析纯。蔓菁药材于 2012 年 7 月购于四川省白玉县章都乡马拉村，经成都中医药大学民族医药学院张艺研究员鉴定为十字花科植物芜菁 *Brassica rapa* L. 的块根。

2 方法与结果

2.1 蔓菁多糖的提取 称取用 80% 乙醇提取后的干燥蔓菁药材粉末 100 g，加水 3 L 于 90 °C 浸提 3 次，每次 2 h，滤过，合并滤液，浓缩至料液比 1:1，加 95% 乙醇使其乙醇体积分数至 80%，静置 24 h，沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤至无色，真空冷冻干燥，即得。

2.2 考察指标的测定

2.2.1 粗多糖得率 将 2.1 项中真空干燥后的粗多糖准确称定，计算得率。

$$\text{粗多糖得率} = (\text{粗多糖样品质量} / \text{蔓菁原料质量}) \times 100\%$$

2.2.2 总多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[9]测定，以葡萄糖为对照品绘制标准曲线，回归方程 $A = 11.966X + 0.047$ ($r = 0.9995$)，其中 A 为吸光度， X 为多糖质量分数。精密称取粗多糖样品 25 mg，在相同条件下测定总多糖含量。

2.2.3 DPPH 自由基清除率测定 (IC_{50}) 参照 Kim 等^[10]的方法，略有改进。取多糖液 0.4 mL 和 50% 乙醇 0.4 mL，混合放入 5 mL 试管中，加 DPPH 溶液 3.2 mL，剧烈震荡后，室温避光静置 30 min，以 50% 乙醇为参比，于 525 nm 处测定反应液的 A ，按下式计算清除率。

$$\text{DPPH 清除率} = [1 - (A_s - A_b) / A_c] \times 100\%$$

A_c 表示不加样品的 DPPH 溶液吸光度值(稀乙醇 0.8 mL + DPPH 溶液 3.2 mL)， A_s 表示加入样品的吸光度值(样品液 0.4 mL + 稀乙醇 0.4 mL + DPPH 溶液 3.2 mL)， A_b 表示不加 DPPH 溶液的吸光度值(样品液 0.4 mL + 50% 乙醇 3.6 mL)。

测定 5 个不同质量浓度下样品对 DPPH 的清除率，经线性回归处理得回归方程，通过回归方程计算半数清除率质量浓度 (IC_{50})。

2.2.4 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝法^[11]测定。

2.2.5 脱色率的计算 对蔓菁粗多糖溶液进行紫外-可见光谱分析，于 200 ~ 700 nm 扫描，结果发现蔓菁粗多糖溶液无最大吸收波长，根据多糖溶液脱色前后均为橙黄色，故从溶液的互补色考虑，选择 450 nm 为检测波长^[12]，按下式计算脱色率。

$$\text{脱色率} = [(A_{\text{脱色前}} - A_{\text{脱色后}}) / A_{\text{脱色前}}] \times 100\%$$

2.3 提取工艺优选 以粗多糖得率、总多糖含量及 IC_{50} 为综合考察指标^[13]，选取浸提次数、料液比、浸提时间为考察因素，每个因素各取 3 个水平，按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，因素水平见表 1。分别在提取液中加入 95% 乙醇至乙醇体积分数达 80%，不断搅拌，放置 24 h，有大量沉淀生成，离心，收集沉淀，依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤至无色，真空冷冻干燥，得到蔓菁粗多糖。试验安排及结果见表 2，方差分析见表 3。综合评分 (Z) 按以下公式计算，为避免结果出现负值，将计算结果均加上 5。

$$Z_i = (X_i - (X_i) / S_i) \quad (1)$$

$$\sum Z_i = \sum Z_{i, \text{高优}} + \sum Z_{i, \text{低优}} \quad (2)$$

公式(1)中 X_i 为某指标值， (X_i) 为该指标平均值， S_i 为该指标标准差。用公式(2)计算时，对于高优的值予以加上，对低优的指标的 Z 值予以减去，即可得到 $\sum Z_i$ 值越大越优的结果。

表1 蔓菁多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A 浸提数/次	B 料液比	C 浸提时间/h
1	1	1:10	1
2	2	1:20	2
3	3	1:30	3

表2 蔓菁多糖水提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	粗多糖 得率 /%	总多糖 质量 分数/%	IC ₅₀ /g·L ⁻¹	综合 评分
1	1	1	1	1	6.21	3.26	21.46	0.28
2	1	2	2	2	8.35	5.32	20.74	2.46
3	1	3	3	3	9.21	6.00	27.63	2.13
4	2	1	2	3	11.45	7.64	6.52	7.31
5	2	2	3	1	12.64	7.77	15.63	6.47
6	2	3	1	2	11.55	7.28	13.75	6.02
7	3	1	3	2	11.62	7.96	9.44	7.10
8	3	2	1	3	11.49	7.62	17.63	5.58
9	3	3	2	1	13.53	9.52	16.69	7.66
K ₁	1.62	4.90	4.65	4.80				
K ₂	6.60	4.83	5.81	5.19				
K ₃	6.78	5.27	5.23	5.42				
R	5.16	0.44	1.16	0.62				

表3 蔓菁多糖水提取工艺综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	51.366	2	25.683	223.741	<0.01
B	0.328	2	0.164	1.430	>0.05
C	5.376	2	2.688	23.415	<0.05
D(误差)	0.230	2	0.115		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ (表6同)。

由直观分析可知,各因素对蔓菁多糖提取工艺的影响顺序依次为 $A > C > B$; 方差分析表明, A 因素对提取工艺影响极显著, C 因素影响显著, B 因素则无显著影响; 确定最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2$, 即加 30 倍量水浸提 3 次, 每次 2 h。

2.4 Sevag 法脱蛋白 采用 Sevag 法除去蔓菁多糖液中蛋白质。取 2.1 项下粗多糖浸膏, 用 200 mL 水复溶, 置锥形瓶中, 加入 1/4 体积的 Sevag 试剂(三氯甲烷-正丁醇 4:1 的混合溶液) 剧烈振摇 15 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液再加入相当于其体积 1/4 的 Sevag 试剂, 重复以上操作直到无白色絮状物产生为止。除蛋白前后, 蛋白质清除率 51.6%, 多糖保留率 79.4%, 表明 Sevag 法除蛋白既能保证较高的多糖保留率, 又能有效的除去多糖液

中蛋白质。

2.5 脱色工艺优选 以脱色温度、吸附时间、活性炭用量为考察因素, 采用 L₉(3⁴) 正交设计表进行脱色工艺的条件优化, 因素水平见表 4。以多糖损失率和色素去除率为综合指标, 试验安排及结果见表 5, 方差分析见表 6。

表4 蔓菁多糖活性炭脱色工艺正交试验因素水平

水平	A 脱色温度/℃	B 吸附时间/min	C 活性炭用量/%
1	40	30	1
2	50	40	2
3	60	50	3

表5 蔓菁多糖活性炭脱色工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	多糖损 失率/%	色素去 除率/%	综合 评分
1	1	1	1	1	46.0	56.1	0.18
2	1	2	2	2	53.2	83.7	1.45
3	1	3	3	3	51.8	86.3	1.84
4	2	1	2	3	45.8	78.3	1.98
5	2	2	3	1	43.5	85.3	2.84
6	2	3	1	2	33.1	60.7	2.23
7	3	1	3	2	49.9	86.0	2.06
8	3	2	1	3	31.1	63.0	2.67
9	3	3	2	1	44.4	85.7	2.75
K ₁	1.16	1.41	1.69	1.92			
K ₂	2.35	2.32	2.06	1.91			
K ₃	2.49	2.27	2.25	2.16			
R	1.33	0.91	0.56	0.25			

表6 活性炭脱色方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	3.242	2	1.621	26.975	<0.05
B	1.585	2	0.793	13.189	>0.05
C	0.480	2	0.240	3.992	>0.05
D(误差)	0.120	2	0.060		

由表 5 结果可知, 3 个因素对蔓菁多糖脱色效率的影响程度依次为 $A > B > C$; 方差分析表明, A 因素影响差异具有显著性, 其他因素均无显著性影响; 确定优化的脱色工艺为 $A_3B_2C_3$, 即 60 ℃ 加 3% 活性炭吸附 40 min。由于正交表中无此条件, 因此对其进行验证, 结果脱色率达 80.14%, 同时多糖损失率 38.23%, 说明此工艺可行。

2.6 验证实验 按最佳工艺条件平行试验 3 次, 结果蔓菁多糖质量分数 4.66%, 其清除 DPPH 自由基

的 $IC_{50} = 6.71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明该提取、纯化工艺稳定可靠, 所得多糖含量高、杂质少, 适合蔓菁多糖的大量制备。

3 讨论

植物多糖的提取常采用热浸法和超声法。本实验比较了 2 种提取方法, 结果热浸法提取的多糖得率高于超声法, 因此采用热浸法。同时本实验还比较了双氧水和活性炭对蔓菁多糖的脱色效果, 结果发现双氧水脱色效果虽然较好, 但会直接氧化提取液中色素, 并未脱去, 且有破坏多糖结构的可能; 活性炭对蔓菁多糖的脱色率 $> 70\%$, 且原料易得、操作简单、价格低廉, 故确定用活性炭脱色。

DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 是一种具有单电子、以氮为中心、稳定的化合物^[14], 被广泛应用于评价药物的抗氧化活性。多糖普遍存在于自然界植物体内, 具有广泛的生物活性。现代研究表明, 多糖具有免疫调节^[15]、抗氧化^[16]、抗肿瘤^[17]、降血糖^[18]、降血脂^[19]等作用。本实验采用生物活性和成分含量测定相结合的评价模式, 以 DPPH 清除率、粗多糖得率和总多糖含量为指标优化蔓菁多糖的提取工艺, 以多糖损失率和色素去除率为指标优化蔓菁多糖的脱色工艺, 最终建立的提取、纯化工艺稳定可靠, 获得的多糖含量高、杂质少。

蔓菁为常用藏药, 藏医常用于治疗各种中毒症、身体虚弱等症, 在民间, 藏族人民经常食用蔓菁, 用于缓解头昏、眼花、心慌等一系列高原缺氧症状。本试验研究发现, 蔓菁多糖具有较强的抗氧化活性, 其清除 DPPH 自由基的 $IC_{50} = 6.71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。说明蔓菁具有较好的开发利用价值, 可用于治疗高原缺氧相关疾病, 这对于综合合理利用资源、提高蔓菁的经济价值、促进藏区地方经济发展等具有重要的现实意义。

[参考文献]

[1] 西藏自治区藏医院药物研究所. 中华本草. 藏药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 349.
[2] 谢玥, 马超, 蒋思萍, 等. 西藏羌根提取物对小鼠抗缺氧作用的初步研究 [J]. 四川动物, 2009, 28(6): 853.
[3] 孙艳, 安熙强, 马媛, 等. 恰玛古蜜膏对小鼠免疫功能

的影响 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(6): 20.

[4] 安熙强, 马媛, 张涛, 等. 维药恰玛古粉和蜜膏对辐射损伤防护的对比 [J]. 科技导报, 2010, 28(10): 28.
[5] 姚谦. 脑缺氧与自由基 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1991: 10.
[6] 赵运林, 喻勋林, 傅晓华, 等. 湖南药用植物资源 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2009: 31.
[7] 兰美华, 吴红彦. 中药植物多糖抗氧化作用研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(4): 326.
[8] 余世春, 徐金龙, 汪海孙, 等. 苯酚-硫酸法测定小柴胡汤口服液多糖的含量 [J]. 中成药, 1993, 15(3): 12.
[9] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 苯酚-硫酸法测定乌梅多糖的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 107.
[10] Kim D O, Lee K W, Lee H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(13): 3713.
[11] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 115.
[12] 綦菲, 王昶, 李轶, 等. 单因素考察活性炭脱除麦冬多糖色素 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 38.
[13] 赵应征, 鲁翠涛, 梅兴国. 常用多指标综合评价法在优选实验中的应用 [J]. 医学研究生学报, 2004, 17(7): 624.
[14] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. LWT-Food Sci Technol, 1995, 28(1): 25.
[15] 薛明, 田丽娟. 青蒿多糖的免疫活性研究 [J]. 中成药, 2008, 30(8): 1211.
[16] 吕小华, 王会敏, 韩红霞, 等. 猫爪草多糖免疫调节及抗氧化活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1862.
[17] 石学魁, 阮殿清, 王亚贤, 等. 红花多糖抗肿瘤活性及对 T739 肺癌鼠 CTL, NK 细胞杀伤活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 215.
[18] 公惠玲, 李卫平, 尹艳艳, 等. 黄精多糖对链脲菌素糖尿病大鼠降血糖作用及其机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1149.
[19] 杨小红, 周远明, 张瑜, 等. 白首乌多糖降血脂作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1381.

[责任编辑 仝燕]