

牡丹叶多糖的提取纯化、分级制备及抗氧化性能研究

陈程¹, 梁宇柱², 苗榕宸², 杜远东³, 廉婷¹, 张萌¹

(1. 西安医学院, 西安 710021; 2. 中粮工科(西安)国际工程有限公司, 西安 710082;

3. 汉中市食品药品检验检测中心, 陕西 汉中 723000)

摘要:以牡丹叶为实验对象,建立牡丹叶多糖的提取及分离纯化方法,再采用不同体积分数(25%、45%、65%、85%)乙醇分级沉淀,得牡丹叶多糖PW-25、PW-45、PW-65、PW-85,采用红外光谱分析各组分的光谱学特征,并通过DPPH自由基和羟自由基清除实验对各组分体外抗氧化活性进行研究。结果表明:采用ZTC1+1-II型天然澄清剂法脱蛋白和过氧化氢脱色法联用进行牡丹叶粗多糖的分离纯化,在此方法下牡丹叶粗多糖中蛋白脱除率为89.66%,色素脱除率为79.35%,多糖保留率为61.41%,得到PW-25多糖纯度达91.23%,得率为1.29%;4种牡丹叶多糖组分均具有一定体外抗氧化能力,其中PW-25对DPPH自由基和羟自由基具有明显清除能力,且半数抑制浓度(IC₅₀)分别为15.36、65.77 μg/mL,但均略差于V_c(IC₅₀分别为7.89、46.46 μg/mL)。研究结果为牡丹叶多糖开发和应用提供基础。

关键词:牡丹叶;多糖;提取纯化;体外抗氧化性

中图分类号:TQ281;TS229

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)02-0119-05

Extraction, purification, classic preparation and antioxidant activities of polysaccharides from peony leaves

CHEN Cheng¹, LIANG Yuzhu², MIAO Rongchen², DU Yuandong³, LIAN Ting¹, ZHANG Meng¹

(1. Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. COFCO ET (Xi'an) International Engineering Co., Ltd., Xi'an 710082, China; 3. Hanzhong Center for Food and Drug Control, Hanzhong 723000, Shaanxi, China)

Abstract: A method for extracting, isolating and purifying polysaccharides from peony leaves was established, and four polysaccharides from peony leaves (PW-25, PW-45, PW-65, PW-85) were obtained by ethanol graded precipitation method with 25%, 45%, 65% and 85% ethanol. The spectral characteristics of the four polysaccharides were determined by FTIR and the in vitro antioxidant activities were studied by DPPH free radical and hydroxyl free radical scavenging experiments. The results showed that the polysaccharides from peony leaves were isolated and purified by a combined method of ZTC1 + 1 - II natural clarifying agents for removing protein and decolorization with hydrogen peroxide, and under this method, the removal rates of protein and pigment and retention rate of polysaccharides in crude polysaccharides from peony leaves were 89.66%, 79.35% and 61.41% respectively; the purity of polysaccharides PW-25 was 91.23%, and its yield was 1.29%; four polysaccharides from peony leaves

收稿日期:2020-05-20;修回日期:2020-11-17

基金项目:西安医学院2018年配套基金项目(2018PT63);西安医学院2018年青年科研基金项目(2018QN12);陕西高校青年创新团队建设项目(陕教[2019]90号);陕西省科技厅一般项目(2017SF-270)

作者简介:陈程(1987),男,副教授,硕士,主要从事药物新剂型与新技术研究(E-mail)xayxychencheng@163.com。

showed certain in vitro antioxidant activities, and the IC₅₀ of PW-25 by scavenging DPPH free radical and hydroxyl free radical were 15.36, 65.77 μg/mL respectively, which were slightly worse than V_c (IC₅₀ 7.89, 46.46 μg/mL). The results could provide foundation for the development and application of polysaccharides

from peony leaves.

Key words: peony leaf; polysaccharides; extraction and purification; in vitro antioxidant activity

牡丹是毛茛科芍药属植物,其资源丰富,主要分布于河南、陕西、山东、湖北、甘肃、安徽等省份^[1]。牡丹籽油是油用牡丹籽经加工得到的植物油,其不饱和脂肪酸含量近 90%^[2],于 2011 年被国家批准为新资源食品。陕西省油用牡丹产业分布于 70 多个县市区,种植面积不断增加^[3-4],牡丹籽油产量持续增加,但围绕牡丹非药食用部位的综合利用开发已成为油用牡丹产业亟需解决的问题。笔者前期针对牡丹籽油、牡丹籽饼粕、牡丹叶、牡丹籽种壳化学成分和综合利用开发开展了系列研究^[5-9],奠定一定研究基础。牡丹叶作为牡丹的主要副产物,含有芍药苷、多酚、多糖等活性成分,且产量大,常作为废弃物被丢弃,造成资源浪费。基于此,本研究选择牡丹叶为研究对象,建立牡丹叶多糖的分离纯化方法,再通过乙醇分级沉淀法得到不同极性段的牡丹叶多糖,并对其光谱学特征和体外抗氧化活性进行分析,以期牡丹叶多糖综合利用开发提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

牡丹叶,产地陕西省咸阳市;食品级 V_C(纯度 > 99%),北京索莱宝科技有限公司;DPPH 标准品(纯度 > 97%),梯希爱化成工业发展有限公司;D-葡萄糖对照品(纯度 ≥ 98%),批号为 S10S9I69833,上海源叶生物科技有限公司;牛血清白蛋白 V(纯度 ≥ 96%),批号为 Y21N656172,上海源叶生物科技有限公司;考马斯亮蓝,天津市科密欧化学试剂有限公司;ZTC1 + 1 - II 型天然澄清剂,天津振天成科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Thermo Multiskan Go 酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;YZN50 型液体真空浓缩煎药机,北京东华原医疗设备有限责任公司;TD5M 型低速大容量离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;BT125 型电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;KH7200DB 型数控超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;Cary60 型紫外分光光度计,安捷伦科技有限公司;Labconco 型冷冻干燥机,美国 Labconco 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牡丹叶多糖的提取

称取牡丹叶适量,粉碎后置于液体真空浓缩煎

药机中,按料液比 1:10 加入水,浸泡 30 min 后,于 70 °C 条件下加热回流提取 2 次,每次 60 min,压力为 0.06 ~ 0.08 MPa,合并提取液,置于离心机于 3 500 r/min 离心 10 min,收集上清液并减压浓缩至 0.5 g/mL(以 100 g 牡丹叶为例,最后浓缩液为 200 mL)按照浓缩液 4 倍体积加入 95% 乙醇,边加边搅拌,于 4 °C 条件下静置 24 h 后,于 3 500 r/min 离心 15 min,收集沉淀,50 °C 干燥 24 h,得牡丹叶粗多糖粉末。

1.2.2 牡丹叶多糖的纯化

1.2.2.1 脱蛋白

取牡丹叶粗多糖粉末适量,加纯化水制成质量浓度为 0.5 g/mL 粗多糖溶液,备用。

(1) Sevag 法

取一定量的牡丹叶粗多糖溶液,向其中加入 1/4 体积的 Sevage 试剂(氯仿 - 正丁醇(体积比 4:1)),磁力搅拌 20 min 后,于 3 500 r/min 离心 15 min,重复 3 次,收集上清液,备用。

(2) ZTC1 + 1 - II 型天然澄清剂法

取一定量的牡丹叶粗多糖溶液,按照体积分数 4% B、2% A 加入 ZTC1 + 1 - II 型天然澄清剂 A、B 两个组分,60 °C 水浴保温处理 90 min 后,于 3 500 r/min 离心 15 min 得上清液,备用。

(3) 盐酸法

取一定量的牡丹叶粗多糖溶液,置于 25 mL 容量瓶中,用盐酸调节 pH 至 3.0,摇匀并置于冰箱中冷藏 24 h 后,于 3 500 r/min 离心 15 min 得上清液,重复 3 次,收集上清液,备用。

(4) 三氯乙酸法

取一定量的牡丹叶粗多糖溶液,加入适量的三氯乙酸,使三氯乙酸质量分数为 5%,振荡 15 min 后,于 3 500 r/min 离心 15 min 得上清液,重复 3 次,收集上清液,备用。

1.2.2.2 脱色素

(1) 活性炭脱色法

取脱蛋白的牡丹叶多糖溶液适量,每 100 mL 中加入 1.5 g 活性炭,加热煮沸,保温处理 10 min 后趁热过滤,反复操作 3 次,计算色素脱除率。

(2) 过氧化氢脱色法

用浓氨水调节脱蛋白的牡丹叶多糖溶液的 pH 为 8.0,滴加 30% 过氧化氢至溶液颜色为淡黄色,pH 约为 7.0,于 50 °C 水浴下保温 3 h,计算色素脱除率。

1.2.3 多糖含量、蛋白质含量及脱色率测定

1.2.3.1 多糖含量测定

根据文献[10]采用硫酸-苯酚法测定多糖含量,以D-葡萄糖质量浓度(c)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制的标准曲线回归方程为 $A = 19.598c - 0.0262$ ($r = 0.9993$)。

1.2.3.2 蛋白质含量测定

根据文献[11]采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,以牛血清白蛋白质量浓度(c)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制的标准曲线回归方程为 $A = 19.856c + 0.0031$ ($r = 0.9970$)。

1.2.3.3 色素脱除率的测定

取脱蛋白的牡丹叶多糖溶液适量,纯化水为对照,于200~800 nm波长范围内进行全波长扫描,确定最大吸收波长并作为多糖色素的检测波长。测定脱色前后牡丹叶多糖溶液在检测波长处的吸光度,以脱色前后吸光度减小率表示色素脱除率。

1.2.4 不同极性段牡丹叶多糖的制备

将脱蛋白、脱色素后的牡丹叶多糖溶液置于截留相对分子质量3500的透析袋中24 h以除去小分子物质,再分别加入不同体积分数(25%、45%、65%、85%)的乙醇溶液进行沉淀,离心,过滤,沉淀于-20℃预冻12 h,再升温至20℃继续干燥6 h,得牡丹叶多糖PW-25、PW-45、PW-65、PW-85。

1.2.5 牡丹叶多糖样品的红外光谱扫描

参考文献[12],取样品适量,采用KBr压片法记录400~4000 cm^{-1} 扫描光谱,对牡丹叶多糖样品进行红外光谱分析。

1.2.6 体外抗氧化活性的测定

1.2.6.1 DPPH自由基清除能力测定

参考文献[13]的方法并修改如下。精密称定DPPH适量于棕色容量瓶中,加入无水乙醇溶解得质量浓度为39.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPPH溶液,4℃下避光保存,备用;精密称定 V_c 适量于容量瓶中,加入无水乙醇溶解得质量浓度为1.0 mg/mL V_c 溶液,备用;分别精密称取PW-25、PW-45、PW-65、PW-85适量于容量瓶中,加无水乙醇制备成1 mg/mL 的系列供试品溶液,于96孔板避光点样,避光反应30 min,用酶标仪测定517 nm处的吸光度,计算多糖样品对DPPH自由基的清除率,经线性拟合计算 IC_{50} ,以 V_c 作为阳性对照。

1.2.6.2 羟自由基清除能力测定

参考文献[14],采用铁还原邻二氮菲法测定,加样顺序为邻二氮菲→PBS→待测样品→硫酸亚铁→过氧化氢,于536 nm处测定吸光度,并计算不

同质量浓度的样品对应的清除率。以样品质量浓度为横坐标,以羟自由基清除率为纵坐标,绘制标准曲线,经线性拟合计算 IC_{50} ,以 V_c 作为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 不同脱蛋白方法对实验结果的影响

以多糖保留率和蛋白脱除率为评价指标,考察了Sevag法、ZTC1+1-II型天然澄清剂法(简称澄清剂法)、盐酸法、三氯乙酸法对牡丹叶粗多糖中蛋白质脱除效果的影响,结果见图1。

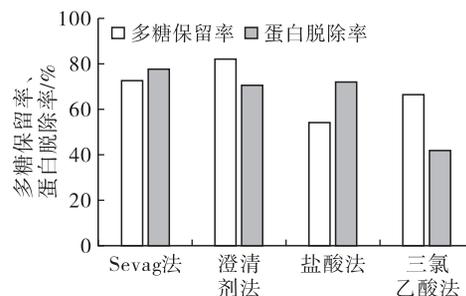


图1 不同脱蛋白方法对实验结果的影响

由图1可知,4种脱蛋白方法的蛋白脱除率大小顺序为Sevag法>盐酸法>ZTC1+1-II型天然澄清剂法>三氯乙酸法。Sevag法蛋白脱除率最高,但该方法多糖保留率较ZTC1+1-II型天然澄清剂法的低,且操作复杂,有机试剂使用量大;盐酸法蛋白脱除率达71.85%,但强酸的加入破坏了多糖的化学结构,操作中多糖大量损失;三氯乙酸法蛋白质脱除效果较差;ZTC1+1-II型天然澄清剂法在保证良好蛋白质脱除效果的基础上多糖保留率达81.88%,此方法絮状物便于除去,操作简便,易于工业化生产。因此,选择ZTC1+1-II型天然澄清剂法作为牡丹叶粗多糖脱蛋白的方法。为了达到更好的蛋白脱除效果,进行ZTC1+1-II型天然澄清剂法的操作次数优化,结果见图2。

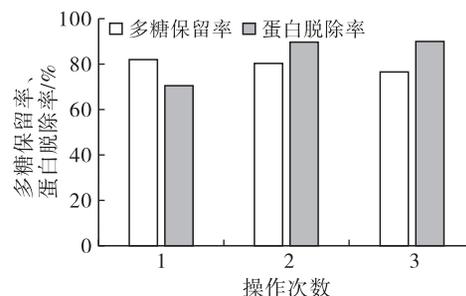


图2 ZTC1+1-II型天然澄清剂法操作次数对实验结果的影响

由图2可知,随着操作次数增加,多糖保留率呈减小趋势,蛋白脱除率呈较明显增大趋势,考虑操作时间和节约成本,确定操作次数为2次。

综上所述,牡丹叶粗多糖脱蛋白的方法和工艺

参数为:ZTC1+1-Ⅱ型天然澄清剂法,按照体积分数4% B、2% A加入ZTC1+1-Ⅱ型天然澄清剂A、B两个组分,60℃水浴保温处理90 min后,于3 500 r/min离心15 min得上清液,操作2次,在此条件下多糖保留率为80.29%,蛋白脱除率为89.66%。

2.2 不同脱色素方法对实验结果的影响

以多糖保留率、色素脱除率为评价指标,考察活性炭脱色法、过氧化氢脱色法对牡丹叶多糖色素脱除效果的影响,结果见图3。

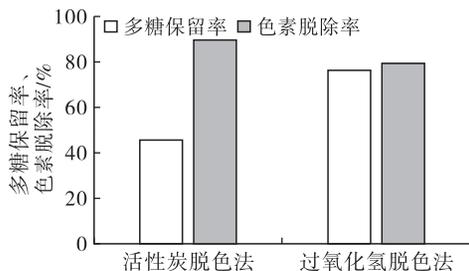


图3 不同脱色素方法对实验结果的影响

由图3可知:2种方法均具有较好的色素脱除效果,其中活性炭脱色法色素脱除率达89.73%,但多糖保留率只有45.73%,分析原因,可能是活性炭为强吸附剂,吸附色素的同时非选择性吸附多糖,造成多糖损失;过氧化氢脱色法通过氧化色素达到脱色目的,色素脱除率达79.35%,多糖保留率为76.49%,在保证脱色效果的基础上可最大限度降低多糖损失,且此方法耗材价格不高,实验操作简单,便于工艺放大。因此,综合考虑选择过氧化氢脱色法为牡丹叶多糖脱色素方法。

2.3 不同极性段牡丹叶多糖的制备

牡丹叶粗多糖采用ZTC1+1-Ⅱ型天然澄清剂法脱蛋白和过氧化氢脱色法联用进行分离纯化后,按1.2.4方法制备得到不同极性段牡丹叶多糖PW-25、PW-45、PW-65和PW-85。测得PW-25多糖纯度达91.23%,得率为1.29%。

2.4 牡丹叶多糖红外光谱分析

对不同极性段牡丹叶多糖PW-25、PW-45、PW-65、PW-85进行红外光谱分析,结果见图4。

由图4可知,4个样品在4 000~400 cm⁻¹均具有多糖典型的吸收峰,且峰形基本相似。其中3 431.42 cm⁻¹处出现较强且宽的糖类物质O—H伸缩振动吸收峰,说明牡丹叶多糖存在分子内氢键;2 924.84 cm⁻¹处出现烷基中C—H键伸缩振动吸收峰,1 384.11 cm⁻¹处出现了较强的C—H变角振动吸收峰,也证明多糖中C—H键存在;1 616.91 cm⁻¹处出现较强较尖的酯羰基中C=O键的伸缩振动峰;1 073.97 cm⁻¹处出现吡喃糖环的C—O—C伸缩

振动吸收峰,800 cm⁻¹附近出现若干小的吸收峰,证明β-D-吡喃糖环的存在。

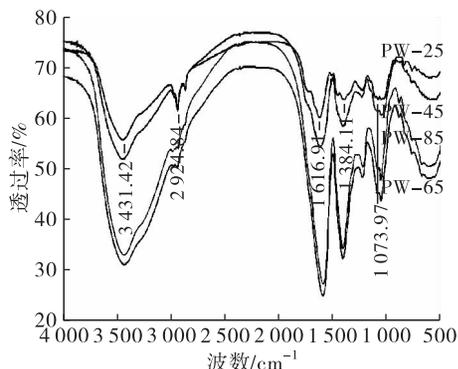


图4 牡丹叶多糖的红外光谱图

2.5 牡丹叶多糖的抗氧化活性

2.5.1 DPPH 自由基清除能力(见图5)

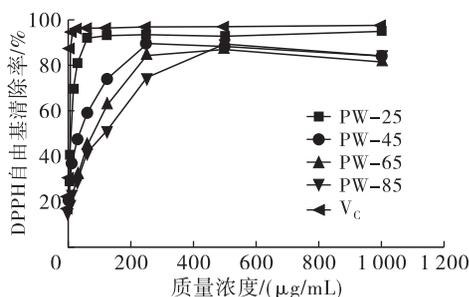


图5 不同牡丹叶多糖组对DPPH自由基清除能力

由图5可知,4种牡丹叶多糖对DPPH自由基均具有一定清除能力,整体均呈现先增强后平稳趋势,存在明显的剂量效应。其中PW-25清除能力最强,当其质量浓度为62.5 μg/mL时,DPPH自由基清除率达92.05%,随着其质量浓度继续增加,对DPPH自由基清除能力趋于平缓,最高清除率为94.90%,半数抑制浓度(IC₅₀)为15.36 μg/mL,其DPPH自由基清除能力略差于V_c(IC₅₀为7.89 μg/mL)。

2.5.2 羟自由基清除能力(见图6)

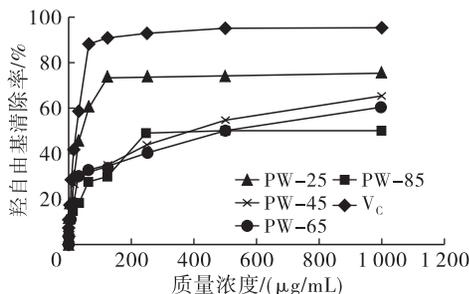


图6 不同牡丹叶多糖组对羟自由基清除能力

由图6可知,4种牡丹叶多糖对羟自由基的清除作用呈现先增强后平稳趋势,其中PW-25清除能力最强,当其质量浓度小于15.625 μg/mL时清除率较低,当质量浓度增加至125 μg/mL时清除能力明显增加,羟自由基清除率达73.57%,但低于同

质量浓度的 V_c (91.17%)。PW-25 和 V_c 对羟自由基清除作用的 IC_{50} 分别为 65.77、46.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 结论

牡丹叶多糖最佳纯化工艺为 ZTC1 + 1 - II 型天然澄清剂法脱蛋白和过氧化氢脱色法联用,在此联用方法下牡丹叶粗多糖蛋白脱除率为 89.66%、色素脱除率为 79.35%,多糖保留率为 61.41%。采用不同体积分数的乙醇从精制牡丹叶多糖中依次沉淀得到 4 个多糖组分,红外光谱实验结果表明 4 个多糖组分均具有多糖典型的吸收峰,且特殊吸收峰表明存在 β -D-吡喃糖环;DPPH 自由基和羟自由基清除能力实验表明 PW-25 段多糖组分对自由基的清除能力最强,但略差于 V_c 。综上所述,牡丹叶多糖 PW-25 可作为天然抗氧化剂的良好来源。

参考文献:

[1] 程安玮,孙金月,王维婷,等. 牡丹籽油的研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2016(3):79-84.
 [2] 毛善巧,李西俊. 牡丹籽油的研究进展及油用牡丹综合利用价值分析[J]. 中国油脂, 2017, 42(5):123-126.
 [3] 万培余,董国跃,候志铭,等. 陕西省油用牡丹产业发展机遇挑战及对策[J]. 陕西林业科技, 2015(5):54-57.
 [4] 杜扶阳,韩宇. 陕西省油用牡丹产业发展探析[J]. 现代农业科技, 2015(5):54-57.
 [5] 陈程,张存劳,罗国平,等. 超声波辅助纤维素酶提取牡丹籽饼中多糖及其清除自由基活性研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(4):119-124.

[6] 陈程,梁宇柱,张存劳,等. 基于 PB 设计和 BBD 响应面法优化牡丹籽饼中油脂的超声辅助提取工艺[J]. 中国油脂, 2018, 43(2):14-18.
 [7] 陈程,王海坤,张存劳,等. 响应面法优化超声辅助提取牡丹籽粕中多酚工艺[J]. 中国油脂, 2017, 42(3):127-130.
 [8] 陈程,罗国平,张存劳,等. HPLC 法测定牡丹籽油中 2 种有机酸类成分的含量[J]. 中国食品添加剂, 2018(2):177-181.
 [9] 陈程,曹斌,张存劳,等. HPLC 法测定牡丹籽饼、牡丹叶、牡丹籽外壳中芍药苷的含量[J]. 应用化工, 2018, 47(6):1312-1313.
 [10] 喻俊,张利,李亚波,等. 干燥方式对牛蒡多糖理化性质及抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(6):160-163.
 [11] 朱海霞,张小芳,高洋,等. 萝卜籽粕中黄酮的提取及纯化工艺研究[J]. 食品与机械, 2018, 32(1):159-162.
 [12] 商龙臣,吴少魏,张弛,等. 南瓜晒多糖的制备表征及活性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(19):48-53.
 [13] 陈程,罗国平,闫梦茹,等. 基于体外抗糖尿病活性优选葛根素-黄连素最佳配比[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(3):35-38.
 [14] 孔宇,张倚菲,韩鹏云,等. 沙棘籽粕多酚提取工艺优化、组分分析及抗氧化性能研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(4):109-114.

(上接第 118 页)

[17] 艾于杰. 抗氧化活性茶多糖构效关系研究[D]. 武汉:华中农业大学,2019.
 [18] IBUKUNOLUWA F O, SOO R K, DONGYUP H, et al. Influences of combined enzyme-ultrasonic extraction on the physicochemical characteristics and properties of okra polysaccharides [J/OL]. Food Hydrocoll, 2020, 100:105396[2020-07-20]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105396>.
 [19] 周思杰,张智红,段久芳,等. 雪松松针多糖超声波酶法提取及其抗氧化性[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(2):284-291.
 [20] 于侃超,杨晓杰,王瑶,等. 不同提取方法对桔梗多糖体外抗氧化性的影响[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(2):251-256.
 [21] 张涛,吴昌英,张永模,等. 蜗牛酶降解壳聚糖制备壳寡糖的研究[J]. 华西药学杂志,2010,25(3):313-315.
 [22] 陈文娟,陈建福,卢惠婷,等. 蜗牛酶辅助提取白芽奇兰

茶多糖及其抗氧化活性[J]. 安徽农业大学学报,2018, 45(6):996-1003.

[23] 陈桂冰,孙培冬,季晓彤,等. 茶籽多糖的提取及脱蛋白工艺研究[J]. 中国油脂,2016,41(8):74-77.
 [24] 常馨月,陈程莉,龚娣,等. 天然抗氧化剂抑制油脂氧化的研究进展[J]. 中国油脂,2020,45(4):46-50.
 [25] 周丽明,张勇,林国卫,等. 葛根多糖提取条件的优化及其抗氧化活性的研究[J]. 湖北农业科学,2012,51(19):4344-4347.
 [26] 程轩轩,张旭红,杨慧文,等. 白藜多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 中草药,2017,48(20):4219-4223.
 [27] SONG H F, ZHANG Q B, ZHANG Z S, et al. In vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Bryopsis plumosa* [J]. Carbohydr Polym, 2010, 80(4):1057-1061.
 [28] 杨春瑜,刘海玲,杨春莉,等. 响应曲面法优化蜗牛酶辅助提取黑木耳多糖工艺[J]. 食品工业科技,2015,36(22):198-202,208.