

猪牙皂多糖提取工艺及体外抗氧化活性的研究\*

赵声兰<sup>1</sup>，陈进伟<sup>1</sup>，刘芳<sup>2</sup>，罗立梅<sup>1</sup>，李时琪<sup>1</sup>，余仕继<sup>1</sup>

(1. 云南中医学院，云南昆明 650500；2. 昆明理工大学，云南昆明 650224)

【摘要】目的：研究猪牙皂多糖的提取工艺条件及其抗氧化活性。方法：在对时间、温度、料液比进行单因素试验的基础上，采用正交试验优化猪牙皂多糖的提取工艺条件。抗氧化活性的研究采用邻苯三酚自氧化法。结果：料液比（A）、提取温度（B）、提取时间（C）对猪牙皂多糖提取影响的顺序为 A>B>C。适宜的提取工艺条件为料液比 1:25、温度 90℃、时间 60min。0.9μg/mL 的猪牙皂多糖溶液可消除 50% 的超氧自由基（即 CC<sub>50</sub>=0.9μg/mL），对羟自由基（·OH）清除的 CC<sub>50</sub>=1.74mg/mL。结论：猪牙皂多糖具有较强的清除超氧自由基和羟自由基的作用。

【关键词】猪牙皂；粗多糖；提取工艺；抗氧化

中图分类号：R284.2 文献标志码：A 文章编号：1000—2723(2010)04—0015—04

猪牙皂（*Fructus Gleditsiae abnormalis*）系豆科苏木亚科皂荚属（*Gleditsia* Linn.）植物皂荚（*Gleditsia sinensis* Lam.）的干燥不育果实，2005 版《中国药典》收载为常用中药之一。性辛、咸、温，归肺、大肠经，具有祛痰开窍、消肿散结、抗炎、抗过敏、抗肿瘤、抗病毒和改善心肌缺血等作用，用于中风口噤、昏迷不醒、癫痫痰盛、关窍不通、喉痹痰阻、顽痰喘咳、咯痰不爽、大便燥结、外治痈肿<sup>[1]</sup>。本文对猪牙皂多糖的提取工艺及抗氧化活性进行研究，为猪牙皂的综合利用奠定基础。

1 材料及方法

1.1 原料

猪牙皂购于昆明中药材市场，经去籽、粉碎、95%乙醇抽提 3 次，干燥备用。

1.2 方法

粗多糖提取采用水提醇沉法<sup>[2]</sup>，脱蛋白采用 Sevage 法<sup>[3]</sup>，多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>，总蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法<sup>[5]</sup>，抗氧化活性的测定采用邻苯三酚自氧化法<sup>[6]</sup>测定猪牙皂多糖对超氧自由基的清除活性。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间对猪牙皂多糖提取量的影响

精确称取猪牙皂 5.00 g 于圆底烧瓶中，在料液比 1:15，温度 100℃ 条件下考察提取时间对粗多糖提取量的影响，结果见图 1。

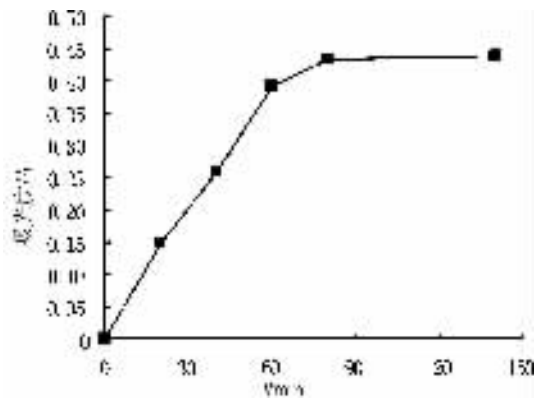


图 1 提取时间对猪牙皂多糖提取量的影响

由图 1 可知，在料液比为 1:15，温度 100℃ 条件下，粗多糖提取量随提取时间的增加而增加，但提取时间超过 80min 后，粗多糖提取量基本不变。

2.1.2 料液比对猪牙皂多糖提取量的影响

精确称取猪牙皂 5.00g 于圆底烧瓶中，在提取时间 80min，温度 100℃ 条件下考察不同的料液比对猪牙皂多糖提取量的影响，结果见图 2。

\* 基金项目：国家自然科学基金项目（30760304）和云南省科学基金项目（2006C0046M）

收稿日期：2010—06—27 修回日期：2010—07—14

作者简介：赵声兰（1962~），女，云南人，教授，主要研究方向：生物资源开发与利用。

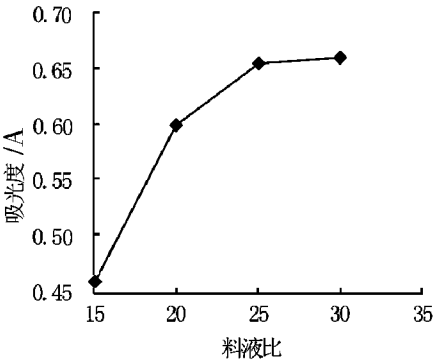


图 2 料液比对猪牙皂多糖提取量的影响

由图 2 可知：在温度 100℃ 加热提取 80min 的条件下，多糖提取量随料液比的增加而增加，但料液比大于 1:25 后，多糖提取量的增加很小。

2.1.3 提取温度对猪牙皂多糖提取量的影响

精确称取猪牙皂粗粉 5.00 g 于圆底烧瓶中，在料液比 1:30，加热提取 80min 的条件下，考察不同的提取温度对猪牙皂多糖提取量的影响。结果见图 3。

由图 3 可知：温度小于 90℃ 时，多糖提取量随温度的增加而增加，但温度大于 90℃ 后，温度增加，多糖提取量下降，90℃ 时多糖提取量最高。

2.2 正交试验

在上述单因素试验的基础上，采用  $L_9(3^4)$  三因素三水平正交试验<sup>[7]</sup>和平行重复试验的方法，优化猪牙皂多糖的提取工艺条件，试验的因素水平见表 1，正交试验结果见表 2，方差分析见表 3。

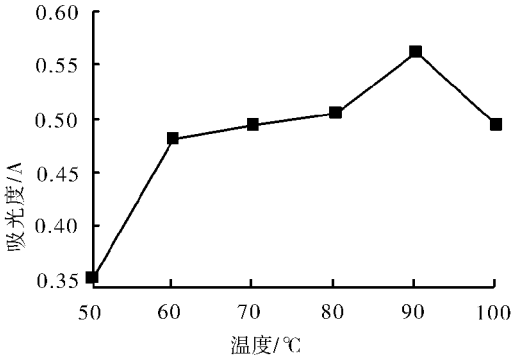


图 3 提取温度对猪牙皂多糖提取量的影响

表 1 因素水平表

| 水平 | 料液比<br>/mL             | 加热提取温度<br>/℃        | 加热提取时间<br>/min      |
|----|------------------------|---------------------|---------------------|
| 1  | A <sub>1</sub> = 1: 15 | B <sub>1</sub> = 50 | C <sub>1</sub> = 40 |
| 2  | A <sub>2</sub> = 1: 20 | B <sub>2</sub> = 70 | C <sub>2</sub> = 60 |
| 3  | A <sub>3</sub> = 1: 25 | B <sub>3</sub> = 90 | C <sub>1</sub> = 80 |

表 2 实验数据分析表

| 实验号 | A     | B     | C     | D     | y <sub>ij</sub> |       |       | Σy <sub>ij</sub> |
|-----|-------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|------------------|
|     |       |       |       |       | 1               | 2     | 3     |                  |
| 1   | 1     | 1     | 1     | 1     | 0.315           | 0.312 | 0.312 | 0.939            |
| 2   | 1     | 2     | 2     | 2     | 0.445           | 0.437 | 0.433 | 1.315            |
| 3   | 1     | 3     | 3     | 3     | 0.372           | 0.367 | 0.365 | 1.104            |
| 4   | 2     | 1     | 2     | 3     | 0.459           | 0.451 | 0.451 | 1.361            |
| 5   | 2     | 2     | 3     | 1     | 0.509           | 0.505 | 0.503 | 1.517            |
| 6   | 2     | 3     | 1     | 2     | 0.500           | 0.497 | 0.497 | 1.494            |
| 7   | 3     | 1     | 3     | 2     | 0.363           | 0.360 | 0.360 | 1.083            |
| 8   | 3     | 2     | 1     | 3     | 0.602           | 0.589 | 0.589 | 1.786            |
| 9   | 3     | 3     | 2     | 1     | 0.692           | 0.690 | 0.688 | 2.070            |
| I   | 3.358 | 3.383 | 4.219 | 4.526 | T = 12.669      |       |       |                  |
| II  | 4.372 | 4.618 | 4.746 | 3.892 |                 |       |       |                  |
| III | 4.939 | 4.668 | 3.704 | 4.251 |                 |       |       |                  |
| R   | 1.581 | 1.285 | 1.042 | 0.275 |                 |       |       |                  |

表 3 方差分析

| 方差来源 | 平方和      | 自由度 | 均方和      | F 值      | $F_{0.05}(2, 20)$ | $F_{0.01}(2, 20) = 5.85$ | 显著性 |
|------|----------|-----|----------|----------|-------------------|--------------------------|-----|
| A    | 0.142 6  | 2   | 0.071 3  | 54.846 1 | 3.49              | 5.85                     | **  |
| B    | 0.117 7  | 2   | 0.058 9  | 45.307 7 | 3.49              | 5.85                     | **  |
| C    | 0.060 33 | 2   | 0.030 16 | 23.200 0 | 3.49              | 5.85                     | **  |
| e    | 0.025 8  | 20  | 0.001 3  |          |                   |                          |     |

极差 R 值反映了各因素对指标影响的大小，表 2 试验结果表明，极差  $R_A > R_B > R_C$ ，说明料液比对猪牙皂多糖提取量的影响最大，其次是提取温度和提取时间，适宜的提取工艺条件为  $A_3B_3C_2$ ，即料液比为 1:25、温度为 90℃、时间为 60min。方差分析表明料液比、提取温度、提取时间对猪牙皂多糖提取量均具有显著性影响。

2.3 猪牙皂多糖清除超氧自由基的测定

称取猪牙皂原料 200 g，按上述适宜的提取工艺条件进行加热回流提取，过滤，提取液用旋转蒸发器浓缩至一定体积，加入 3 倍体积的 95% 乙醇，密封，静置过夜，离心后得多糖沉淀。多糖沉淀复溶，经 Sevage 法<sup>[3]</sup>脱蛋白 3 次，冷冻干燥得猪牙皂多糖。采用凯氏定氮法<sup>[5]</sup>测得该猪牙皂多糖含蛋白质 0.987 2%。

以维生素 C 为阳性对照，采用邻苯三酚自氧化法<sup>[6]</sup>，测定猪牙皂多糖对超氧自由基的清除率。邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化，释放出超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 与中间物，中间物与超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 反应形成在 325nm 波长下有特征吸收的中间产物，引起 325nm 波长处吸光值的积累。邻苯三酚的氧化速率依赖于自氧化产生的  $O_2^{\cdot -}$  浓度，当有抑制剂存在时，可清除超氧阴离子，阻止中间产物的积累，325nm 波长处吸光值的增量减少，根据吸光度数值的变化可求出待测样品的抗氧化活性。

在 10mL 具塞试管中依次加入 1.5mL 15mmol/L pH 值 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液，1.5mL 蒸馏水，25℃ 恒温 20min 后，立即加入 25℃ 预热的 3mmol/L 邻苯三酚溶液 0.5mL，迅速混匀，在 325nm 处每隔 30s 测定 1 次溶液的吸光度，计算线性范围内每分钟吸光度的增值，即邻苯三酚的自氧化速率  $\Delta A_{\text{对照}}$ 。

测定待测样品的抗氧化活性时，加入邻苯三酚前，先加入一定量的待测样品溶液，同时减少同体积的蒸馏水，其余操作同上，得  $\Delta A_{\text{样品}}$ 。结果见图

4 和图 5。

清除率 =  $\frac{\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{对照}}} \times 100\%$

式中： $\Delta A_{\text{对照}}$ ：一分钟内对照管吸光度的变化值。  
 $\Delta A_{\text{样品}}$ ：一分钟内样品管吸光度的变化值。

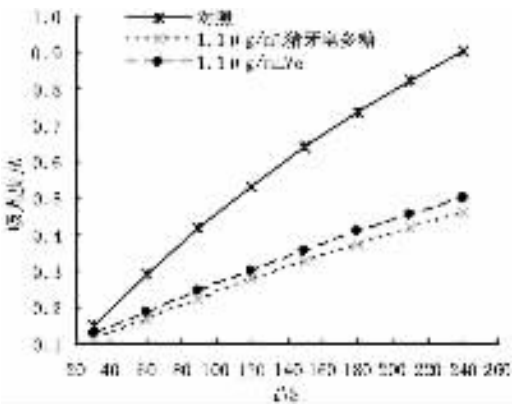


图 4 猪牙皂多糖抗超氧自由基的活性

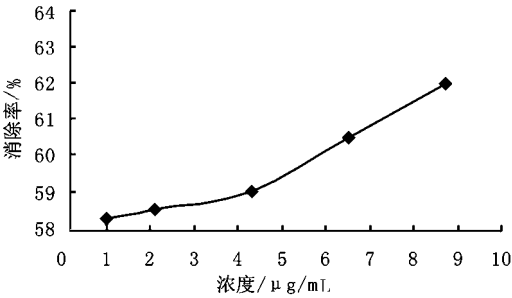


图 5 猪牙皂多糖对超氧自由基的清除率

由图 4 和图 5 可知，猪牙皂多糖对超氧自由基具有较强的抗超氧自由基活性，清除 50% 超氧自由基时的多糖浓度 CC50 为 0.9μg/mL。

2.4 猪牙皂多糖体外清除羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 的测定<sup>[8-10]</sup>

采用  $H_2O_2/Fe$  体系法。Fenton 反应产生羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 体系中，邻二氮菲与  $Fe^{2+}$  反应生成  $Fe^{2+}$ -邻二氮菲配合物，该配合物在 536nm 有最大吸收。当  $\cdot OH$  氧化  $Fe^{2+}$ -邻二氮菲成  $Fe^{3+}$ -邻二氮菲时，使  $A_{536nm}$  减小。若反应体系中存在  $\cdot OH$  清除剂，氧化过程受到抑制， $A_{536nm}$  减小不明显，通过  $A_{536nm}$  值比较，可测定待测样品清除  $\cdot OH$  的

活性。

取 7 支试管，分别加入浓度为 7.5mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 1mL，取其中 2 支试管分别作为损伤管和未损伤管，另外 5 支试管中分别加入 3mg/mL 的多糖溶液 1.0，1.2，1.4，1.6，1.8 mL 和 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mL，损伤管和未损伤管不加糖液，未损伤管不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，用蒸馏水补足体积，37℃ 保温 1h，测定 536nm 处的吸光值，平行测定 3 次。配置相同浓度的 Vc 作为对照。

$$\cdot\text{OH} \text{ 的清除率} = 1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

式中：A<sub>0</sub>—损伤管的吸光度；A<sub>1</sub>—未损伤管的吸光度；A<sub>2</sub>—加入多糖的吸光度。结果见表 4。

表 4 猪牙皂多糖对羟自由基 ( · OH ) 的清除

| 多糖<br>/mg · mL <sup>-1</sup> | 1     | 2     | 3     | 平均    | · OH 的清除率 =<br>$1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100\%$ |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------------------------------------------------------|
| 未损伤管                         | 0.253 | 0.248 | 0.301 | 0.267 |                                                               |
| α 损伤管)                       | 0.104 | 0.105 | 0.109 | 0.106 | 0                                                             |
| 0.5                          | 0.13  | 0.119 | 0.121 | 0.123 | 10.56                                                         |
| 1.0                          | 0.157 | 0.158 | 0.162 | 0.159 | 32.92                                                         |
| 1.5                          | 0.179 | 0.181 | 0.176 | 0.179 | 45.34                                                         |
| 2.0                          | 0.196 | 0.208 | 0.204 | 0.203 | 60.25                                                         |
| 2.5                          | 0.219 | 0.21  | 0.218 | 0.216 | 68.32                                                         |
| 3.0                          | 0.219 | 0.23  | 0.221 | 0.223 | 72.67                                                         |

由表 4 可知，猪牙皂多糖对羟自由基 ( · OH ) 具有明显的清除作用，CC<sub>50</sub> = 1.7408mg/mL。

[ 参考文献 ]

[ 1 ] 高峥贞,夏玉凤,王强,等. 猪牙皂的化成分和药理活性研究进展 [ J ]. 中国野生植物资源,2008,27 ( 1 ): 1 - 4.

[ 2 ] 丁诸俊,许娜,风先哲,等. 药百合多糖的提取工艺研究 [ J ]. 中国林副特产,2009,( 1 ): 15 - 17.

[ 3 ] 高英春,陈钧. 山药粗多糖脱蛋白的方法对比研究 [ J ]. 2009,34 ( 6 ): 71 - 74.

[ 4 ] 蔡凌云,黎云祥,陈蕉,等. 白藜多糖的提取工艺和含量比较 [ J ]. 光谱实验室,2009,( 2 ): 251 - 257.

[ 5 ] GB/T5009. 5 食品中蛋白质的测定 [ S ].

[ 6 ] 张泽庆,田应娟,张静. 防风多糖的抗氧化活性研究 [ J ]. 中药材,2008,31 ( 2 ): 268 - 272.

[ 7 ] 赵选民. 实验设计方法 [ M ]. 北京:科学出版社,2006.

[ 8 ] 包怡红,秦蕾,王戈. 沙棘叶多糖的提取工艺及氧化作用的研究 [ J ]. 食品工业科技,2010,1 ( 31 ): 286 - 290.

[ 9 ] 赵丰丽,张云鸽,宁良丹. 红菇多糖的提取分离及其抗氧化活性的研究 [ J ]. 中国酿造,2009,11: 98 - 101.

[ 10 ] 白伟芳,崔波. 玫瑰花多糖提取及抗氧化活性研究 [ J ]. 提取与活性,2009,6 ( 25 ): 83 - 86.

( 编辑:迟越 )

Study on the Extraction and Anti - oxidant Activity of Polysaccharide  
from *Fructus Gleditsiae abnormalis Pericarp*

ZHAO Sheng - lan , CHEN Jin - wei , LIU Fang , LUO Li - mei , LI Shi - qi , YU Shi - ji  
( Yunnan University of TCM , Kunming Yunnan 650500 )

[ ABSTRACT ] Objective : Study on the extraction technology and anti - oxidant activity of *Pericarp* Polysaccharide from *Fructus Gleditsiae abnormalis*. Method : Single factor and orthogonal tests were applied to optimize the extraction conditions of polysaccharide from *Fructus Gleditsiae abnormalis pericarp* , including the ratio of raw materials to solvent , temperature , time. Anti - oxidation was detected with *pyrogallol autoxidation* and Fenton reaction. Result : The optimum extraction conditions were the ratio of raw materials to *solvant* 1: 25 ( w/v ) , 90℃ for 60 minutes. Anti - oxidation tests show that the polysaccharides concentration required to clear 50% O<sup>2</sup> - · is 0.9μg/ml and the concentration required to clear 50% · OH is 1.74mg/ml. Conclusion : *Pericarp* polysaccharides from *Gleditsiae abnormalis* appear strong *antioxidation*.

[ KEY WORDS ] *Fructus Gleditsiae abnormalis* ; polysaccharide ; single factor experiment ; *orthogonal* experiment ; anti - oxidation