

白屈菜多糖果胶酶提取及脱色工艺的优化

刘富岗¹, 冯素香^{1,2,3*}, 张 杰¹, 杨 云¹

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省高校协同创新中心, 河南 郑州 450046; 3. 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 优化白屈菜多糖的果胶酶提取及脱色工艺。**方法** 以多糖得率和多糖含量为指标, 采用加权评分法(权重各占 50%), 以正交法优化果胶酶对白屈菜多糖的酶解提取效果; 以脱色率和多糖保留率为指标, 采用加权评分法(权重各占 50%), 利用正交试验分别确定活性炭和双氧水的最佳脱色工艺。**结果** 白屈菜多糖最佳酶提条件为酶解温度 40 ℃, 酶用量 5%, 酶解 pH 3.0, 酶解时间 2 h; 活性炭最佳脱色工艺为白屈菜多糖溶液加入 0.5% 的活性炭, 调 pH 至 3.0, 50 ℃ 条件下水浴搅拌 40 min, 多糖保留率为 88.56%, 多糖含量为 68.03%; 双氧水最佳脱色工艺为白屈菜多糖溶液加入 10% 双氧水, 调 pH 至 10.0, 50 ℃ 条件下水浴反应 1 h, 多糖保留率为 79.17%, 多糖含量为 71.34%。**结论** 该方法稳定, 重复性好, 可用于提取白屈菜多糖果胶酶。

关键词: 白屈菜; 多糖; 果胶酶提取; 脱色

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2018)07-1622-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.039

白屈菜为罂粟科白屈菜属植物白屈菜 *Chelidonium majus* L 的干燥全草, 别名地黄连、牛金花、土黄连、八步紧、断肠草、雄黄草等, 为 2010 版《中国药典》新增品种, 亦收载于 2015 版《中国药典》^[1]。其味苦、性凉、有小毒, 全草入药有解痉镇痛、止咳平喘之功效; 主治胃痛、胃溃疡、腹痛、肠炎、痢疾、黄疸、慢性气管炎、百日咳、肿瘤^[2-4], 外用治疗水田皮炎、毒虫咬伤。本研究首次对中药白屈菜中的多糖类成分进行研究, 通过酶提工艺得到的白屈菜粗多糖中尚含有色素、蛋白质等杂质, 需要脱色、脱蛋白等进一步处理, 以期得到外观更好、含量更高的精制白屈菜多糖。针对本实验所提取的白屈菜粗多糖, 通过预实验结果得知, 蛋白含量很低, 故主要考察白屈菜多糖脱色工艺, 利用正交试验法, 考察了活性炭及双氧水的最佳脱色工艺^[5-6], 为白屈菜药材及白屈菜多糖的开发应用奠定了理论基础。

1 仪器与材料

岛津 UV-2600 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); METTLER AE240 十万分之一精密天平(瑞士梅特勒-托利多集团); Sartorius BS224S 万分之一精密天平(北京赛多利斯公司); EYELA N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); SHZ-D (Ⅲ) 型循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司); XJA100A 型高速粉碎机(姜堰市银河仪器厂); 京立 LDZ5-2 离心机(北京京

立离心机有限公司)。

白屈菜药材购于河南省郑州市东升医药超市, 经河南中医学院生药教研室陈随清教授鉴定为正品, 经粉碎后过 2 号药典筛, 密封备用; 果胶酶购于南宁庞博生物有限公司; 活性炭、双氧水、苯酚、硫酸等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白屈菜多糖酶提工艺 考察果胶酶对白屈菜多糖的酶解提取效果, 采用四因素三水平设计, 以加酶量(A)、酶解 pH(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D)为考察因素, 按照 $L_9(3^4)$ 正交表安排白屈菜多糖果胶酶提工艺正交试验, 以多糖得率(% , a) 和多糖含量(% , b) 为指标, 采用加权评分法(权重各占 50%) 来综合评估白屈菜多糖的提取条件。评分标准为用各项数值除以该列最大值再乘以 100, 使其转化为 0~100 之间的数值, 即为该项评分, 运用公式 $M=0.5a+0.5b$ 即可求得综合评分(M)。正交试验设计的因素水平见表 1, 正交试验分析见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 酶提工艺因素水平

水平	A 加酶量/%	B 酶解 pH	C 酶解温度/℃	D 酶解时间/h
1	3	3.0	40	1
2	4	3.5	50	2
3	5	4.0	60	3

由表 2 可得, 影响多糖提取效果的各因素主次关系为 D(酶解时间)>C(酶解温度)>A(加酶量)>B(酶解 pH);

收稿日期: 2017-07-13

作者简介: 刘富岗(1983—), 男, 硕士, 实验师, 从事中药质量分析及新药研究工作。Tel: (0371) 65962746, E-mail: liufg_417@163.com

* **通信作者:** 冯素香(1971—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药质量分析及新药研究工作。Tel: (0371) 65962746, E-mail: fengsx221@163.com

表 2 酶提工艺试验设计及结果

序号	A	B	C	D	综合评分		合计
					Y ₁	Y ₂	
1	1	1	1	1	87.59	85.23	172.82
2	1	2	2	2	88.55	89.94	178.49
3	1	3	3	3	74.78	77.60	152.38
4	2	1	2	3	82.87	79.99	162.86
5	2	2	3	1	85.57	84.16	169.73
6	2	3	1	2	100.00	100.00	200.00
7	3	1	3	2	95.91	96.74	192.65
8	3	2	1	3	88.64	87.21	175.85
9	3	3	2	1	83.81	84.74	168.55
I	503.69	528.33	548.67	511.10			
II	532.59	524.07	509.90	571.14		G = 1 573.33	
III	537.05	520.93	514.76	491.09		CT = 137 520.40	
I ²	253 703.616 1	279 132.59	301 038.8	261 223.21		SS _总 = 855.811	
II ²	283 652.108 1	274 649.36	259 998	326 200.9		SS _{总1} = 841.144	
III ²	288 422.702 5	271 368.06	264 977.9	241 169.39		SS _{e2} = 14.688	
R _j	825 778.426 7	825 150.02	826 014.6	828 593.5			
S _j	109.333	4.598	148.701	578.511			

表 3 酶提工艺方差分析

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	109.333	2	54.666	33.543	<0.01
B	4.598	2	2.299	1.411	>0.05
C	148.701	2	74.351	45.621	<0.01
D	578.511	2	289.256	177.486	<0.01
误差	14.668	9	1.630	—	—

注： $F_{0.01(2,9)} = 8.02$, $F_{0.05(2,9)} = 4.26$

由表 3 可得，因素 A、C、D 对试验结果的影响均极显著 ($P < 0.01$)，因素 B 对试验结果无显著性影响，因此得出白屈菜多糖最佳酶提工艺为 A₃B₁C₁D₂，即白屈菜药材粉末 10.0 g 加入 30 倍量水，40 ℃ 浸泡 30 min，加入 5% 的果胶酶，调 pH 至 3.0，40 ℃ 条件下酶解 2 h，调 pH 至中性，100 ℃ 提取 2 次，每次 2 h，合并滤液，浓缩醇沉，沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤，干燥后即得白屈菜多糖。

2.2 酶提工艺验证试验 为考察白屈菜多糖的果胶酶提取工艺的稳定性，按照该工艺提取 3 批产品，分别测定多糖得率及多糖含有量，结果见表 4。

表 4 酶提工艺验证试验结果 (n=3)

序号	固形物/g	得率/%	平均含有量/%	多糖含有量/%	平均含有量/%
1	1.553 3	15.53		27.09	
2	1.497 8	14.98	15.63	26.91	26.34
3	1.638 2	16.38		25.02	

由表 4 可得，平均多糖得率为 15.63%，平均多糖含有量为 26.34%。

2.3 色素测定波长选择 分别取 1、5、10 mg/mL 白屈菜多糖溶液，在 200 ~ 900 nm 范围进行全波长内扫描，见图 1 ~ 3。

从图 1 ~ 3 可得，1、5、10 mg/mL 白屈菜多糖溶液在

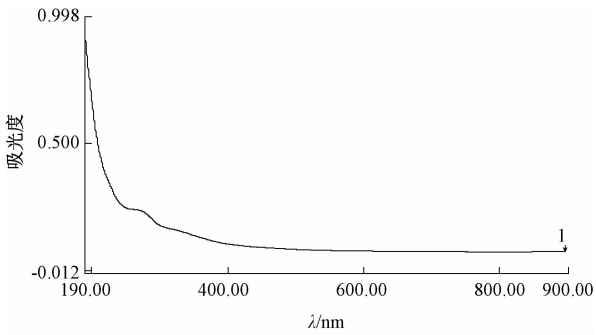


图 1 1 mg/mL 白屈菜多糖溶液扫描图

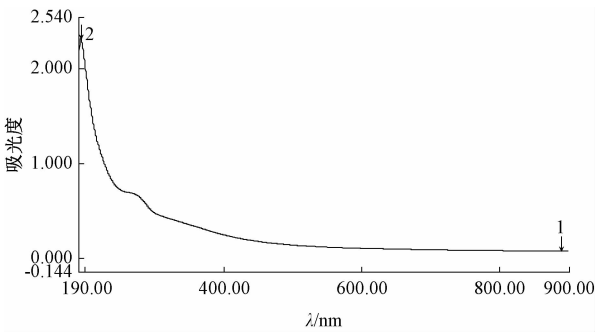


图 2 5 mg/mL 白屈菜多糖溶液扫描图

可见光范围内均无最大吸收峰。根据颜色互补原理，选定 450 nm 为测定吸收波长。

2.4 葡萄糖标准曲线^[7-8] 精密称取 105 ℃ 烘干至恒重的无水葡萄糖标准品 100.1 mg，溶解到 100 mL 量瓶中定容，反复上下摇匀，即得浓度为 1 001 μg/mL 的葡萄糖储备液，置于 4 ℃ 冰箱中备用。

分别精密吸取葡萄糖储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 100 mL 量瓶中，用蒸馏水定容，反复上下摇匀，得葡萄糖浓度分别为 10.01、20.02、30.03、40.04、

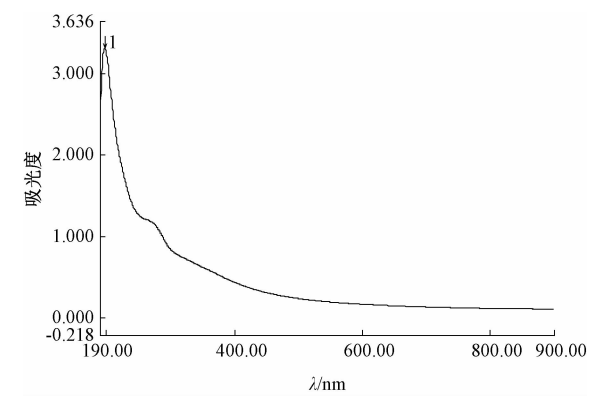


图 3 10 mg/mL 白屈菜多糖溶液扫描图

50.05、60.06 μg/mL 的标准溶液。分别量取上述葡萄糖标准液和蒸馏水空白溶液各 1.0 mL 于 25 mL 试管中，作为空白对照，分别加入 1 mL 5% 苯酚饱和溶液和 5 mL 浓硫酸溶液显色，振荡摇晃均匀，室温放置 40 min，490 nm 处测定吸光度，以质量浓度为横坐标（*X*），吸光度为纵坐标（*A*），绘制标准曲线，得到曲线方程为 $A = 0.010\ 6X + 0.007$ ， $R^2 = 0.999\ 5$ （ $n = 6$ ），在 10.01 ~ 60.06 μg/mL 范围内，质量浓度与吸光度线性关系良好。

2.5 活性炭法脱色最佳工艺^[9-10] 称取 0.1 g 白屈菜多糖，

表 6 活性炭脱色工艺试验设计及结果

序号	A	B	C	D	综合评分		合计
					Y ₁	Y ₂	
1	1	1	1	1	86.00	85.28	171.28
2	1	2	2	2	89.90	87.97	177.87
3	1	3	3	3	90.10	91.13	181.23
4	2	1	2	3	95.32	96.87	192.19
5	2	2	3	1	87.60	88.02	175.62
6	2	3	1	2	86.74	83.61	170.35
7	3	1	3	2	98.95	96.74	195.69
8	3	2	1	3	90.20	88.76	178.96
9	3	3	2	1	77.60	79.02	156.62
I	530.38	559.16	520.59	503.52			
II	538.16	532.45	526.68	543.91		G = 1 599.81	
III	531.27	508.20	552.54	552.38		CT = 142 188.45	
I ²	281 302.944 4	312 659.91	271 013.9	253 532.39		SS _总 = 559.117	
II ²	289 616.185 6	283 503	277 391.8	295 838.09		SS _{总1} = 545.790	
III ²	282 247.812 9	258 267.24	305 300.5	305 123.66		SS _{总2} = 13.327	
R _j	853 166.942 9	854 430.15	853 706.2	854 494.14			
S _j	6.044	216.578	95.924	227.244			

表 7 活性炭脱色工艺方差分析

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	6.044	2	3.022	2.041	>0.05
B	216.578	2	108.289	73.130	<0.01
C	95.924	2	47.962	32.390	<0.01
D	227.244	2	113.622	76.731	<0.01
误差	13.327	9	1.481	—	—

注： $F_{0.01(2,9)} = 8.02$ ， $F_{0.05(2,9)} = 4.26$

由表 5 可得，各因素对活性炭脱色效果的影响为 D（活性炭用量）> B（pH）> C（时间）> A（温度）；由

1624

用蒸馏水定容于 100 mL 量瓶中，混匀，作为样品溶液。取样品溶液，每份 10 mL，按正交设计表的条件进行脱色，离心，取上清液，于 450 nm 和 490 nm 处分别测其脱色前后的吸光度，每个实验平行 2 份，计算多糖保留率及脱色率。以多糖保留率（*a*）及脱色率（*b*）为指标，采用加权评分法来综合评估白屈菜多糖的脱色条件。评分标准为用各项数值除以该列最大值再乘以 100，使其转化为 0 ~ 100 之间的数值，即为该项评分，再运用公式 $M = 0.5a + 0.5b$ 即可求得综合评分（*M*）。

根据查阅文献资料，选择温度（A）、pH（B）、时间（C）、活性炭用量（D）作为考察因素，正交试验设计的因素水平表见表 5（活性炭用量体积分数），正交实验分析见表 6，方差分析见表 7。

多糖保留率 = $M_{\text{脱色后}} / M_{\text{脱色前}} \times 100\%$ （*M* 为白屈菜多糖脱色前、后的质量）

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

表 5 活性炭脱色工艺因素水平

水平	A 温度/℃	B pH	C 时间/min	D 活性炭/%
1	40	3.0	20	0.1
2	50	4.0	30	0.3
3	60	5.0	40	0.5

表 7 可得因素 B、C、D 对实验结果的影响均极显著（ $P < 0.01$ ），因素 A 对实验结果无显著性影响，因此得出白屈菜多糖的活性炭脱色最佳工艺为 A₂B₁C₃D₃，即白屈菜多糖溶液加入 0.5% 的活性炭，调 pH 至 3.0，50 ℃ 条件下水浴搅拌 40 min。

2.6 双氧水法脱色最佳工艺^[11-12] 称取 0.1 g 白屈菜多糖，用蒸馏水定容于 100 mL 量瓶中，混匀，作为样品溶液。取样品溶液，每份 10 mL，按正交设计表的条件进行脱色，搅拌中加入 30% H₂O₂ 溶液，保鲜膜封口后水浴，

冷却，调 pH 至中性，加热除去多余的 H₂O₂，用 KMnO₄ 作为检测试剂，挥干，用蒸馏水定溶至 10 mL，于 450 nm 和 490 nm 处分别测其脱色前后的吸光度，每个实验平行 2 份，计算多糖保留率及脱色率。以多糖保留率（*a*）及脱色率（*b*）为指标，采用加权评分法综合评估白屈菜多糖的脱色条件，评分标准与“2.5”项相同。

根据查阅文献资料，选择温度（A）、pH（B）、时间（C）、双氧水用量（D）作为考察因素，正交试验设计的

表 9 双氧水脱色工艺试验设计及结果

序号	A	B	C	D	多糖保留率/%	脱色率/%	综合评分		合计
							Y ₁	Y ₂	
1	1	1	1	1	79.34	68.16	97.65	92.15	189.80
2	1	2	2	2	77.14	69.84	97.04	96.57	193.61
3	1	3	3	3	73.40	71.47	96.61	93.26	189.87
4	2	1	2	3	74.24	72.22	95.4	97.84	193.24
5	2	2	3	1	77.82	67.52	96.15	93.62	189.77
6	2	3	1	2	79.76	71.35	97.91	99.04	196.95
7	3	1	3	2	77.76	68.92	95.84	95.27	191.11
8	3	2	1	3	76.96	71.84	96.27	98.38	194.65
9	3	3	2	1	77.94	69.12	96.98	95.03	192.01
I	573.28	574.15	581.40	571.58					
II	579.96	578.03	578.86	581.67				G = 1 731.01	
III	577.77	578.83	570.75	577.76				CT = 166 466.42	
I ²	328 649.958 4	329 648.22	338 026	326 703.7				SS _总 = 56.874	
II ²	336 353.601 6	334 118.68	335 078.9	338 339.99				SS _{总1} = 24.895	
III ²	333 818.172 9	335 044.17	325 755.6	333 806.62				SS _{总2} = 31.952	
R _j	998 821.732 9	998 811.07	998 860.4	998 850.3					
S _j	3.865	2.089	10.314	8.627					

表 10 双氧水脱色工艺方差分析

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	3.865	2	1.933	0.544	>0.05
B	2.089	2	1.044	0.294	>0.05
C	10.314	2	5.157	1.453	>0.05
D	8.627	2	4.314	1.215	>0.05
误差	31.952	9	3.550	—	—

注： $F_{0.01(2,9)}=8.02$ ， $F_{0.05(2,9)}=4.26$

由表 9 可得，各因素对双氧水脱色效果的影响为 C（时间）>D（双氧水用量）>A（温度）>B（pH）；由表 10 可得，各因素均对试验结果无显著性影响，可能是由于双氧水的强氧化性在破坏色素结构时也破坏了一部分多糖的结构，造成了多糖保留率均较低，因此不同因素显示出了较低的差异性。由试验结果得出白屈菜多糖的双氧水脱色最佳工艺为 A₂B₃C₁D₂，即白屈菜多糖溶液 10 mL 加入 1 mL 双氧水，调 pH 至 10.0，50 ℃ 条件下水浴反应 1 h。

2.7 脱色工艺验证 为考察上述白屈菜多糖的活性炭及双氧水脱色工艺的稳定性，分别按照正交法所得最佳脱色工艺制备 3 批产品，分别测定多糖保留率及脱色率，结果见表 11。

由表 11 可得，白屈菜多糖的活性炭法脱色工艺平均多

因素水平表见表 8，正交试验分析见表 9，方差分析见表 10。

表 8 双氧水脱色工艺因素水平

水平	A 温度/℃	B pH	C 时间/h	D 双氧水/mL
1	40	8.0	1	0.5
2	50	9.0	2	1
3	60	10.0	4	2

糖脱色率为 70.51%，平均多糖保留率为 95.79%；双氧水法脱色工艺平均多糖脱色率为 74.82%，平均多糖保留率为 80.57%。

表 11 脱色工艺验证试验结果（n=3）

脱色工艺	多糖脱色率/	平均值/	多糖保留率/	平均值/
	%	%	%	%
活性炭法	70.38	70.51	95.62	95.79
	69.89		96.34	
	71.26		95.43	
双氧水法	74.51	74.82	79.84	80.57
	74.27		80.63	
	75.69		81.25	

3 讨论

植物多糖提取的同时常有水溶性的色素、蛋白质等杂质共存，需要进一步的纯化处理，以提高含量。果胶酶可以除去细胞壁中的果胶质，使细胞中的物质快速充分的溶解出来，可以在提高有效成分提取率的同时减少溶剂的用量，增强药物生物活性，因此本实验采用果胶酶提取白屈菜多糖^[13-14]。所得多糖经过对不同浓度的溶液反复测定测得的蛋白质含量极低，所以在纯化处理中未对蛋白质

进行处理，只研究了活性炭和双氧水对白屈菜多糖的脱色效果。活性炭脱色的最佳工艺为白屈菜多糖溶液加入 0.5% 的活性炭，调 pH 至 3.0，50 ℃ 条件下水浴搅拌 40 min，多糖保留率为 88.56%，多糖含有量为 68.03%。双氧水脱色的最佳工艺为白屈菜多糖溶液加入 1 mL 双氧水，调 pH 至 10.0，50 ℃ 条件下水浴反应 1 h，多糖保留率为 79.17%，多糖含有量为 71.34%。

活性炭对脂溶性色素的吸附效果较好，在本研究中对多糖水提取物的脱色效果一般，综合评分评价可以看出，其脱色效果弱于双氧水；双氧水的脱色原理是过氧化氢带有过氧键，容易因过氧键断裂生成过氧自由基，该自由基夺电子能力强，有强氧化性。优良的脱色剂应具有较理想的脱色效果、较高的多糖保留率，同时又易于从多糖中清除，但前提是要保证脱色前后多糖的结构不发生改变，当过氧化氢等强氧化剂与色素作用时，有色物质的分子被氧化从而失去原有的颜色，由于其强氧化性，其脱去色素的同时有可能对多糖的结构产生影响^[15]，本研究双氧水对白屈菜多糖的脱色效果优于活性炭脱色法而多糖保留率低于活性炭脱色，其原因可能与双氧水破坏了一部分白屈菜多糖的结构有关，有待于做进一步的深入研究进行确证。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：109.

[2] 黄涛阳，王 晖，翁燕君，等. 一测多评法测定白屈菜中 5 种生物碱的含量 [J]. 中药材，2016，39（10）：2268-2271.

[3] 韩 聪，朱国福. 白屈菜红碱诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡及机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（11）：127-130.

[4] 陆世惠，林 瑶，陈 冉，等. 超声-酶法提取两面针中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（13）：23-26.

[5] 肖 平，陈建伟，陈亚运，等. 板蓝根多糖活性炭脱色工艺及抗氧化活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，2014，26（12）：2041-2045，2021.

[6] 汪荣斌，秦亚东，周娟娟. 青钱柳叶多糖双氧水脱色工艺研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2016，18（9）：60-62.

[7] 廖红丹. 响应面法优化茯苓苦瓜胶囊粗多糖和总皂苷的综合提取工艺 [J]. 中国药房，2016，27（1）：92-95.

[8] 张楠楠，朱志军，蒋亚超，等. 星点设计-响应面法优化五味子多糖的酶提工艺 [J]. 中国药房，2016，27（22）：3142-3144.

[9] 马 稳，谢银军，张婉思. 甘草多糖活性炭脱色工艺 [J]. 光谱实验室，2013，30（6）：2965-2968.

[10] 吴光杰，李玉萍，李资玲，等. 马齿苋多糖的活性炭脱色工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（12）：43-45.

[11] 孟 迪，乔长晟，宋玉民，等. 双氧水对聚苹果酸脱色效果探究 [J]. 食品研究与开发，2015，36（16）：34-39.

[12] 王文彤，张 岩，陶遵威. 正交试验优化苦豆子多糖的双氧水脱色工艺研究 [J]. 现代药物与临床，2014，29（11）：1234-1237.

[13] 高建德，朱晓玉，宋开蓉，等. 星点设计-效应面法优化果胶酶酶解提取枸杞总黄酮的工艺 [J]. 中药材，2017，40（2）：421-424.

[14] 刘汉珍，史亚东，俞 浩，等. 超声-果胶酶协同提取滁菊总黄酮的工艺研究 [J]. 中药材，2016，39（12）：2820-2822.

[15] 秦亚东，汪荣斌，周娟娟. 白芍多糖脱色工艺研究 [J]. 中成药，2015，37（12）：2783-2787.