

纤维素酶辅助提取陕产珠子参多糖工艺 及抗氧化活性研究^{*}

贺维涛¹ 赵重博² 年婧^{3**}

(1. 泾阳县医院, 陕西 咸阳 713700; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046;
3. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 应用正交设计实验优化珠子参多糖提取工艺, 并研究其抗氧化活性。方法 在单因素实验基础上, 以多糖提取率(Y)为评价指标, 纤维素酶的用量(A)、超声功率(B)、超声温度(C)、超声时间(D)为考察对象, 利用正交设计优化珠子参多糖提取工艺, 并考察其抗氧化活性。结果 优化后的最佳提取工艺为脱脂后珠子参药材加 20 倍量水, 加 5% 纤维素酶, 在 50 ℃ 下超声(150 W)50 min, 所制备的珠子参多糖在 8 mg · mL⁻¹ 时对 DPPH 自由基的清除率达到 80% 以上。结论 采用正交试验法优化珠子参多糖的纤维素酶辅助提取工艺方法可行, 珠子参多糖具有一定的抗氧化能力。

关键词: 多糖; 珠子参; 正交设计; 抗氧化; 纤维素酶

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2022)06-0040-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.06.007

珠子参为五加科植物珠子参 *Panax japonicas* C. A. Mey. var. *major* (Buck.) C. Y. Wu et K. M. Feng 或羽叶三七 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *bi-pinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎, 主产云南、陕西、四川等地, 陕产珠子参也是陕西太白七药里的八大金刚之一——组子七, 具有补肺养阴, 祛瘀止痛, 止血, 抗肺纤维化的功效^[1-2]。研究报道珠子参多糖 PJPS1-A 对血虚模型小鼠的造血功能有很好的保护作用^[3], 同时体外研究表明珠子参多糖对肝癌^[4-5]、胃癌^[6]、抗补体活性^[7]和衰老^[8]也有一定的功效, 而抗氧化活性与癌症和衰老密切相关, 因而研究其提取工艺和抗氧化活性更加重要。

植物根茎类组织一般富含较多的纤维素, 因此使用纤维素酶提高该类中药多糖的得率是常用的方式^[9]。之前已有应用正交设计研究超声提取和水提醇沉法制备珠子参多糖的工艺研究, 因此选用水作为提取溶剂^[10-11], 在单因素实验基础上, 采用正交试验设计优化珠子参多糖提取工艺并对

其抗氧化活性进行研究, 以期为珠子参的开发应用提供依据和参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Autoscience AS 5150A 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 电热式恒温水浴锅(江苏金坛宏凯仪器厂); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); LXJ-II 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂); UPT-11-10T 优普系列超纯水器(成都超纯科技有限公司); DB-206SC 电热鼓风恒温干燥箱(成都天宇试验设备有限责任公司); Scientz-10N 型真空冷冻干燥机(宁波新艺生物科技股份有限公司); FA2004N 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); METTLER TOLEDO 十万分之一天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药 珠子参药材, 购于陕西眉县, 经陕西中医药大学王昌利教授鉴定为珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. v ar. *major* (Burk.) C. Y. Wu et

* 基金项目: 陕西省科技厅重点研发计划项目(2021SF-385)

** 通讯作者: 年婧, 主管中药师。E-mail: 452414656@qq.com

K. M. Feng 的干燥根茎;D-无水葡萄糖对照品(纯度 $\geq 99.5\%$,批号:140974-110833,中国食品药品检定研究所);浓硫酸、苯酚、乙醇等均为分析纯;纤维素酶($10\,000\,\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);Vc 标准对照品(纯度 $\geq 99\%$,批号:S05J6G1,上海源叶生物科技有限公司);DPPH 标准对照品(Diybio 生物科技有限公司);实验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 珠子参多糖的含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 称取珠子参药材粗粉(过2号筛)约1000 g,置于圆底烧瓶中,加入5倍量乙酸乙酯12 h 脱脂,过滤,残渣挥干乙酸乙酯后充分干燥,即得脱脂的珠子参药材。精密称取脱脂的珠子参药材50 g,加水500 mL,加纤维素酶4%,在50℃下超声(200 W)20 min,过滤,滤液浓缩至100 mL后加95%乙醇至含醇量80%,4℃静置过夜后抽滤,残渣用乙醚和无水乙醇抽滤脱色后冷冻干燥,即得珠子参多糖,称定重量,记做M(g)。

精密称取珠子参多糖10 mg至100 mL容量瓶中,加水充分溶解并稀释至刻度即得供试品溶液。

2.1.2 线性关系考察 将无水葡萄糖在105℃干燥至恒重后,精密称取10 mg加水充分溶解,并定容于100 mL棕色量瓶中,得浓度为 $0.11\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液。

分别精密吸取葡萄糖对照品溶液0.0,0.2,0.4,0.6,0.8和1.0 mL置于10 mL具塞试管中,分别加水至2.0 mL,各加入5.0%苯酚溶液1 mL和浓硫酸5 mL,摇匀,置于沸水中水浴15 min,取出置于冷水中冷却至室温,于488 nm处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标,得回归方程 $Y=0.0576X+0.0293(r=0.9990)$,表明葡萄糖质量浓度在 $0.0\sim 13.75\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与吸光度呈良好线性关系。

2.2 多糖提取率的测定 采用硫酸-苯酚法测定。精密移取供试品溶液1.0 mL置于10 mL具塞试管中,加1.0 mL水,用5.0%的苯酚和浓硫酸依次处理显色,测定吸光度值,计算多糖浓度,并按照下列公式计算珠子参多糖提取率。

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{\text{多糖浓度} \times \text{体积}}{\text{珠子参药材质量}} \times 100\%$$

2.3 单因素试验考察

2.3.1 加水量 称取5份脱脂珠子参药材,每份约10 g,分别加入5、10、15、20、25倍量水,加纤维素酶4%,在50℃下超声(200 W)20 min,过滤,滤液醇沉脱色后取10 mg珠子参多糖,测定吸光度,计算多糖提取率分别为4.42%、6.23%、6.75%、6.94%、7.12%,加水量15倍后珠子参多糖提取率基本稳定,故选取15倍加水量进一步考察其他因素,结果如图1。

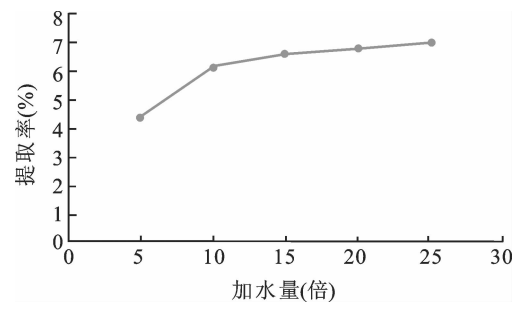


图1 加水量与珠子参多糖提取率的关系

2.3.2 纤维素酶用量 称取5份脱脂珠子参药材,每份约10 g,加150 mL水,分别加入1%、2%、3%、4%、5%的纤维素酶,在50℃下超声(200 W)20 min,过滤,滤液醇沉脱色后取10 mg珠子参多糖,测定吸光度,计算多糖提取率分别为2.17%、3.42%、5.45%、6.74%、6.38%,选取4%纤维素酶进一步考察其他因素。结果如图2。

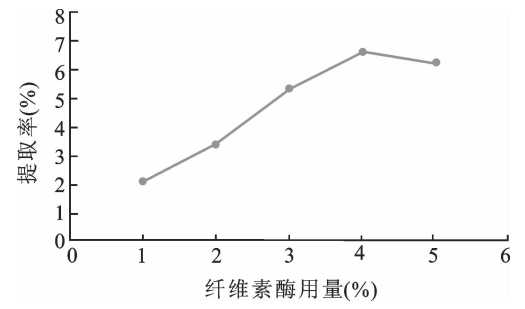


图2 纤维素酶与珠子参多糖提取率的关系

2.3.3 超声温度 根据纤维素酶的说明,最佳使用温度为45~55℃,故称取3份脱脂珠子参药材,每份约10 g,加150 mL水,加入4%的纤维素酶,在40℃、50℃和55℃条件下超声(200 W)20 min,过滤,滤液醇沉脱色后取10 mg珠子参多糖,测定吸光度,计算多糖提取率分别为6.47%、6.76%、6.71%,在规定温度内纤维素酶的活力和

珠子参多糖提取率基本稳定,因此固定超声温度 50 ℃,考察其他因素对珠子参多糖提取率的影响。结果如图 3。

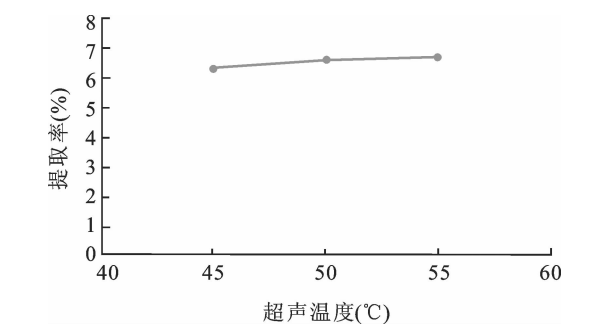


图 3 超声温度与珠子参多糖提取率的关系

2.3.4 超声功率 称取 5 份脱脂珠子参药材,每份约 10 g,加 150 mL 水,加入 4% 的纤维素酶,在 50 ℃下超声(100 W、150 W、200 W、250 W、300 W)20 min,过滤,滤液醇沉脱色后取 10 mg 珠子参多糖,测定吸光度,计算多糖提取率分别为 5.84%、8.61%、6.58%、5.47%、4.92%,超声功率的增加在一定范围内促进珠子参多糖的溶出,但功率太大可能会破坏酶的结构导致提取率下降,故选取超声功率 150 W 进一步考察其他因素。结果如图 4。

2.3.5 超声时间 称取 5 份脱脂珠子参药材,每份约 10 g,加 150 mL 水,加入 4% 的纤维素酶,在 50 ℃下超声(150 W)分别 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 过滤,滤液醇沉脱色后取 10 mg 珠子参多糖,测定吸光度,计算多糖提取率分别为 4.23%、8.56%、9.84%、10.68%、10.74%,故选取

超声时间 40 min 进一步考察。结果如图 5。

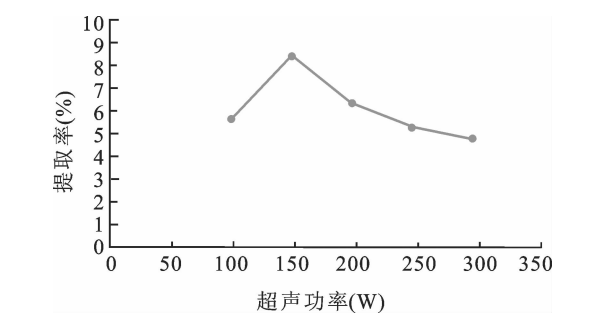


图 4 超声功率与珠子参多糖提取率的关系

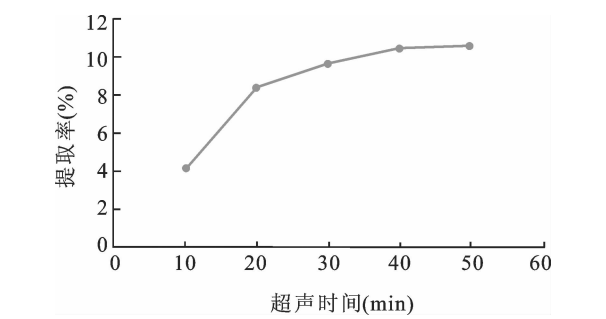


图 5 超声时间与珠子参多糖提取率的关系

2.4 正交试验优选最佳提取工艺 在单因素试验基础上,固定超声温度为 50 ℃,选择加水倍数、纤维素酶用量、超声功率和超声时间作为影响因素表见表 1,正交设计方案及实验结果见表 2。

表 1 因素水平表

因素	A 加水量 (倍)	B 纤维素酶 用量(%)	C 超声功率 (W)	D 超声时间 (min)
1	10	3	100	30
2	15	4	150	40
3	20	5	200	50

表 2 正交实验设计表与结果

No	A 加水量(倍)	B 纤维素酶用量(%)	C 超声功率(W)	D 超声时间(min)	多糖提取率(%)
1	10	3	100	30	5.74
2	10	4	150	40	6.94
3	10	5	200	50	9.78
4	15	3	150	50	10.33
5	15	4	200	30	6.17
6	15	5	100	40	5.73
7	20	3	200	40	6.26
8	20	4	100	50	8.38
9	20	5	150	30	9.49
K1	22.46	22.33	19.85	21.4	
K2	22.23	21.49	26.76	18.93	
K3	24.13	25	22.21	28.49	
R	1.9	3.51	6.91	9.56	

表 3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	方差 MS	F 值	显著性
A	0.717	2	0.359		
B	2.239	2	1.12	3.12	
C	8.224	2	4.112	11.454	
D	16.418	2	8.209	22.866	*

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$, * 显著性

由表 3 可知,超声时间对珠子参多糖得率影响最大,其次是超声功率,所选水平范围内加水倍量和纤维素酶的用量对珠子参多糖提取率影响不大。根据各因素的极差值 R 的影响大小,优选的最佳工艺为 $A_3B_3C_2D_3$,即脱脂后珠子参药材加 20 倍量水,加 5% 纤维素酶,在 50 ℃ 下超声(150 W) 50 min。

2.5 提取工艺参数验证 按照正交试验优化后的工艺参数提取 3 批珠子参多糖,多糖提取率第一次为 11.13%,第二次为 10.47%,第三次为 10.85%,平均提取率为 10.81%,多糖提取率较稳定,优化的提取工艺实用可靠。

2.6 珠子参多糖抗氧化活性研究 参考文献的方法^[12]精密称取 DPPH 适量,加无水乙醇制成每 1 mL 含 40 μg 的溶液,避光保存。分别配制珠子参多糖 0.5,1,2,4,8 和 10 mg · mL⁻¹ 系列不同浓度水溶液和 Vc 0.5,1,2,4,8 和 10 mg · mL⁻¹ 不同浓度乙醇溶液,各取 2 mL,加入 DPPH 乙醇溶液 2 mL,在试管中混合均匀,室温避光反应 30 min,在 517 nm 处平行测定 3 次吸光度,记做 A_i 。以无水乙醇或超纯水代替样品溶液,用同样的方法混匀、反应,平行测定 3 次吸光度,记做 A_0 。根据公式计算不同样品的提取液对 DPPH 自由基清除率。DPPH 自由基清除率 = $[1 - A_i/A_0] \times 100\%$ 。结果见图 6。

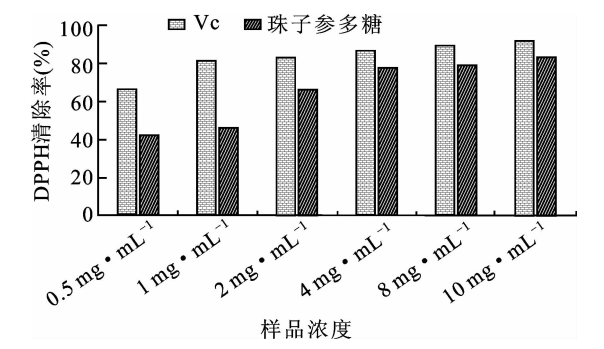


图 6 DPPH 自由基清除率结果

珠子参多糖浓度在 2 mg · mL⁻¹ 时对 DPPH 自由基的清除率达到 50% 以上,且随着珠子参多糖浓度的增强清除能力不断增强,在 8 mg · mL⁻¹ 时对 DPPH 自由基的清除率可达 80% 以上,DPPH 自由基的清除率最大达 84.25%,但其清除自由基能力较等浓度的 Vc 较弱。

3 讨论

多糖作为一种天然的高分子物质,由于药物体内过程的认识不断更新,也越来越为人们认识到其潜在的活性和研究价值^[13-15]。多糖的提取工艺除了传统的热水提取法之外,随着提取设备的不断研发和对多糖性质的不断深入研究,超声波辅助、微波辅助、酶辅助等手段都大大提升了多糖的提取效率^[16-18]。多糖含量方面陕产珠子参优于四川和云南等地的珠子参药材^[19]。珠子参多糖的分子量分布在 10³ ~ 10⁵ 之间,单糖组成主要由葡萄糖和半乳糖组成^[20-21]。

本研究通过正交试验优化纤维素酶辅助提取珠子参多糖工艺,得到最优工艺参数为脱脂后珠子参药材加 20 倍量水,加 5% 纤维素酶,在 50 ℃ 下超声(150 W) 50 min,验证试验表明在此条件下,所得珠子参多糖得率为 10.81%,结果表明,通过正交试验优化得到的珠子参多糖提取方法稳定可行。通过对 DPPH 自由基清除率的测定评价了珠子参多糖的体外抗氧化活性,结果珠子参多糖在 8 mg · mL⁻¹ 时对 DPPH 自由基的清除率就已达 80% 以上,具有良好的抗氧化活性,为其合理开发利用提供参考依据。

参考文献

[1] 刘琪琪,李晔,宗时宇,等. 太白七药珠子参的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2021,40(6):53-58.
[2] 张丽,梁卓菲,张化为,等. 珠子参总皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的影响[J]. 陕西中医药大学学报,2021,

- 44(3):75-79.
- [3] Zhang H, Wang HF, Liu Y, et al. The haematopoietic effect of *Panax japonicus* on blood deficiency model mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 154(3):818-824.
- [4] 陈涛, 陈茂华, 胡月琴, 等. 珠子参多糖提取及抗癌活性研究[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(7):912-914.
- [5] 陈涛, 陈茂华, 胡月琴, 等. 珠子参多糖抗肝癌作用的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(6):1329-1331.
- [6] 王炳淑, 梁荣珍, 戴楠楠. 珠子参多糖通过靶向 let-7a/CDK6 分子轴调控胃癌 MKN45 细胞的增殖与凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(2):135-141.
- [7] 杨涛, 陈平. 珠子参多糖结构的初步表征和抗补体活性研究[J]. *武汉轻工大学学报*, 2016, 35(1):26-29.
- [8] 胡卫, 陈涛, 王泉, 等. 珠子参多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆障碍的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(13):3522-3524.
- [9] 周晓红, 陈洁冰, 罗智, 等. 纤维素酶辅助提取茶多糖的工艺研究[J]. *湖南城市学院学报(自然科学版)*, 2022, 31(1):67-71.
- [10] 郭春喜, 高宇琼. 超声波提取珠子参根茎多糖的工艺优化[J]. *南方农业学报*, 2014, 45(12):2242-2247.
- [11] 袁菊丽, 房方, 张旋, 等. 珠子参多糖提取纯化工艺研究[J]. *河南中医*, 2007, 27(12):73-74.
- [12] 王相, 杨梦婷, 高乐, 等. 酸枣不同部位提取物指标成分测定及体外抗氧化活性研究[J]. *现代中医药*, 2020, 40(4):13-19.
- [13] 赵重博, 王晶, 吴博, 等. 星点设计优化天南星多糖提取工艺及提取动力学研究[J]. *陕西中医药大学学报*, 2018, 41(5):107-113.
- [14] 曹瑞, 邓翀, 李柳柳. 女贞子炮制前后多酚和多糖的含量变化[J]. *陕西中医药大学学报*, 2019, 42(4):39-44, 49.
- [15] 刘珺, 胡雨彤, 刘江涛, 等. 马齿苋多糖对高糖诱导的人晶状体上皮细胞发生上皮间质转化的影响[J]. *现代中医药*, 2021, 41(1):15-19, 41.
- [16] 赖帅众, 宋志远, 李双双, 等. 不同加工方式和提取方法对海参多糖的影响研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(5):205-212.
- [17] 宝力道, 朱景涛, 赵玉英. 4 种提取方法对广枣多糖含量及性质的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(5):1596-1599.
- [18] 吴金松, 耿广威, 任聪, 等. 超声辅助酶法提取山药皮水溶性多糖的工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(8):90-97.
- [19] 许苗苗, 刘银环, 杨新杰, 等. 不同产地珠子参中多糖的含量测定[J]. *现代中医药*, 2014, 34(5):73-75.
- [20] Yang T, Zhang SP, Wang RF, et al. Polysaccharides from rhizoma *panacis majoris* and its anti-oxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 86:756-763.
- [21] 张红. 珠子参促进造血活性及其多糖分析研究[D]. 西安:西北大学, 2015.

(修回日期:2022-06-08 编辑:崔春利)