

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.06.002

猫爪草多糖双氧水脱色工艺研究*

经 嘉 廖启元[△]

(安徽中医药高等专科学校药学系, 芜湖 241000)

摘要 目的 优化猫爪草多糖双氧水脱色工艺。方法 以多糖脱色率和保留率为考察指标,考察了单因素对脱色效果的影响并进行了正交优化。结果 猫爪草多糖双氧水脱色最优工艺为:脱色时间 60 min、pH 9.0、脱色温度 45℃、双氧水用量 20%,此条件下脱色率为 79.7%,多糖保留率为 74.3%。结论 采用双氧水对猫爪草多糖脱色操作简单、工艺稳定,是一种可行脱色方法。

关键词 猫爪草;多糖;脱色;双氧水

中图分类号:TQ028.8 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)12-384-04

Study on decolorization of polysaccharides from Radix ranunculi ternati with hydrogen peroxide

JING Jia, LIAO Qiyan[△]

(Department of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China)

Abstract: Objective To optimize decolorization process of polysaccharides from Radix ranunculi ternati with hydrogen peroxide. **Methods** By taking the decolorization rate and retention rate of polysaccharides as the index, the effects of single factor on the decolorization were investigated, which was optimized by orthogonal test. **Results** The optimal condition was as following: decolorization time of 60 min, pH 9.0, decolorization temperature of 45℃, and 20% hydrogen peroxide. The decolorization rate and retention rate were 79.7% and 74.3%, respectively. **Conclusion** It is feasible that hydrogen peroxide is used to discolor polysaccharides from Radix ranunculi ternati, due to its stability and easy to operate.

Keywords: Radix ranunculi ternati; Polysaccharide; Decolorization; Hydrogen peroxide

猫爪草为毛茛科植物小毛茛的块根,具有调免疫、抗肿瘤、抗氧化等作用^[1-2],免疫活性部位的筛选试验表明多糖是其重要活性成分之一。采用水提醇沉法所得的猫爪草粗多糖中含有大量色素,需进一步精制纯化。基于此,本文探讨了双氧水脱除猫爪草多糖色素的工艺条件,并利用正交试验进行优化,以期猫爪草多糖的脱色处理提供参考。报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

猫爪草购于安徽亳州中药材市场,经安徽中医

药高等专科学校汪荣斌教授鉴定为毛茛科植物小毛茛的块根;FA1204N 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);RE5298A 旋转蒸发仪(西安禾普生物科技有限公司);80-2B 离心机(湖南星科科学仪器有限公司);UV-1800 型紫外可见分光光度计(上海翱艺仪器有限公司);苯酚、无水乙醇、双氧水(质量浓度 30%)等试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 猫爪草多糖的制备 将猫爪草粉碎后用石油醚回流脱脂 3 次,每次 6h。而后加 20 倍量水,于 90℃提取 2 次,每次 2h。合并上清液并减压浓缩,加 4 倍体积无水乙醇,冷藏过夜。收集沉淀得猫爪草粗多糖。用蒸馏水溶解至 1.0mg/ml,作待脱色液备用。

1.2.2 多糖含量测定-苯酚硫酸法 具体方法参

*[基金项目] 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2016A420)

[△][通信作者] 廖启元; E-mail: liaoqiyan@126.com

见文献^[3]。

1.2.3 多糖保留率与色素脱除率的计算

多糖保留率 = $\frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\%$ (1)

脱色率 = $\frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$ ^[4] (2)

式 1 中, M_1 示脱色之前多糖质量, M_2 示脱色之后多糖质量。式 2 中, A_1 示脱色处理之前溶液 450 nm 处的吸光度, A_2 示脱色处理之后溶液 450 nm 处的吸光度。

1.2.4 单因素试验 取 50ml 待脱色液 5 份, 以脱色率及多糖保留率为指标, 考察脱色时间 (20、40、60、80、100min)、脱色 pH (6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)、脱色温度 (35℃、45℃、55℃、65℃、75℃)、双氧水用量 (5%、10%、15%、20%、25%) 4 个因素对猫爪草多糖脱色效果的影响。

1.2.5 正交试验 根据单因素试验结果, 固定 pH 9.0, 以多糖脱色率为考察指标, 选择脱色时间 (A)、脱色温度 (B)、双氧水用量 (C) 进行三因素三水平正交试验, 优化猫爪草多糖脱色工艺, 各因素水平安排如表 1 所示。

表 1 正交试验因素与水平			
水平	A	B	C
	脱色时间/min	脱色温度/℃	双氧水用量/%
1	60	45	15
2	80	55	20
3	100	65	25

2 结果与分析

2.1 脱色时间对猫爪草多糖脱色效果的影响

在 20~60min 的脱色时间范围内, 随着时间的延长, 猫爪草多糖脱色率迅速从 45.4% 提高至 78.9%。但 60 min 以后, 脱色率变化较小。而多糖保留率随脱色时间的延长不断降低, 且 60min 后降低速度加快。可能原因是双氧水氧化色素同时也在氧化多糖, 脱色时间越长多糖损失越多。因此, 应选择脱色时间为 60min 较为适宜。见图 1。

2.2 脱色 pH 对猫爪草多糖脱色效果的影响

猫爪草多糖的脱色率随 pH 值的升高而逐渐提高。pH 6.0 时, 脱色率 64.1%, pH 9.0 时, 脱色率 78.3%。此后继续增加 pH 至 10.0 时, 脱色率几乎保持不变。H₂O₂ 在水溶液中可电离出过氧氢

根离子攻击色素, 且在碱性介质中其电离度增大。因此, 提高 pH 可增强双氧水的脱色作用。多糖保留率则受 pH 影响较小, 稳定在 71.9%~75.1% 之间, 故应选择 pH 为 9.0 较为适宜。见图 2。

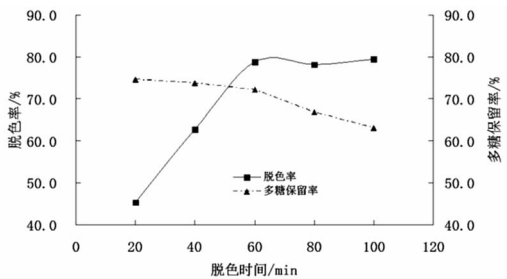


图 1 脱色时间对猫爪草多糖脱色效果的影响

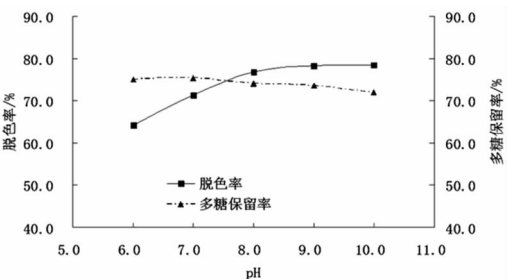


图 2 脱色 pH 对猫爪草多糖脱色效果的影响

2.3 脱色温度对猫爪草多糖脱色效果的影响

提高温度可增加脱色率, 因为高温可加快自由基的离解, 利于脱色。所以当温度从 35℃ 升高至 55℃ 时, 脱色率提高了 1.2 倍, 达到 78.2%。但过高的温度同时也会促进自由基自身的分解, 不利于脱色。所以, 当温度超过 55℃ 后, 脱色率开始降低。与此同时, 多糖保留率几乎不变, 所以, 综合考虑应选择脱色温度为 55℃。见图 3。

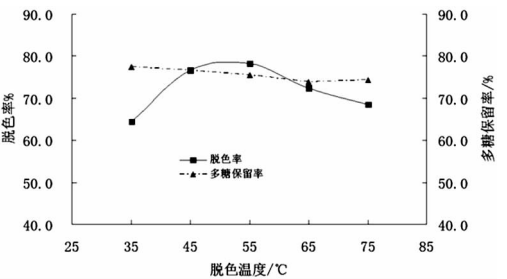


图 3 脱色温度对猫爪草多糖脱色效果的影响

2.4 双氧水用量对猫爪草多糖脱色效果的影响

当双氧水用量 5% 时, 脱色率 40.8%, 而双氧水用量 20% 时, 脱色率 78.2%, 提高了 1.9 倍。主要原因是当双氧水浓度较低时, 分解速度较慢, 因

而脱色效果相对较差。但继续增加双氧水的用量,脱色率变化不大,与此同时多糖保留率迅速降低,因过量的双氧水会导致多糖的氧化降解。因此,应选择双氧水的用量为 20% 较为适宜。

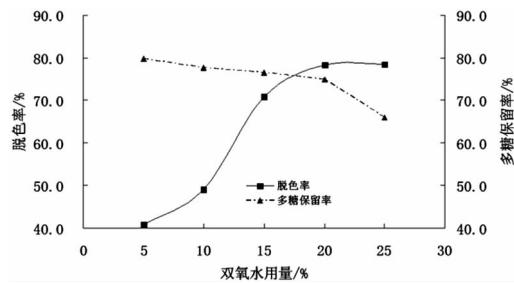


图 4 双氧水用量对猫爪草多糖脱色效果的影响

2.5 正交试验结果

正交试验结果及方差分析如表 2、3 所示,可知对猫爪草多糖双氧水脱色率影响大小的顺序为:双氧水用量>脱色时间>脱色温度,但三个因素中只有双氧水用量对猫爪草多糖脱色率影响显著($P<0.05$)。最优工艺组合为 $A_1B_1C_3$,即脱色时间 60 min、脱色温度 45℃、双氧水用量 25%。但由单因素考察可知,双氧水用量达 25% 时,多糖保留率降低,因此,综合考虑脱色率与多糖保留率,选择双氧水用量为 20%。

表 2 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	空列	脱色率/%
1	1	1	1	1	74.6
2	1	2	2	2	78.9
3	1	3	3	3	79.7
4	2	1	2	3	78.1
5	2	2	3	1	79.3
6	2	3	1	2	71.6
7	3	1	3	2	78.9
8	3	2	1	3	71.7
9	3	3	2	1	77.8
K_1	77.733	77.200	72.633	77.233	
K_2	76.333	76.633	78.267	76.467	
K_3	76.133	76.367	79.300	76.500	
R	1.600	0.833	6.667	0.766	

表 3 正交试验方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	P
A	4.560	2	4.046	19.000	
B	1.087	2	0.965	19.000	<0.05
C	77.242	2	68.542	19.000	
空列	1.127	2	1.000	19.000	
误差	1.13	2			

为验证双氧水脱色工艺的稳定性 and 可信度,在最优条件下进行 3 次平行试验。见表 4。

表 4 验证试验结果

试验次数	脱色率/%	多糖保留率/%
1	80.1	74.1
2	79.5	73.8
3	79.4	74.9
平均值	79.7	74.3

3 组平行试验结果稳定,重现性较好,且多糖保留率相对较高,表明该脱色工艺稳定可行。

3 讨论

目前,常用的多糖脱色方法包括吸附法、化学法、离子交换法等。龚敏等^[5]采用大孔树脂对药桑多糖脱色后发现其抗氧化活性有所增强;蒋俊等^[6]报道了猴头菌大孔树脂脱色多糖对胃黏膜的损伤修复作用显著提高;但肖平等^[7]用活性炭对板蓝根多糖脱色后发现其清除自由基的能力降低。因此,脱色方法的选择除考虑脱色率、多糖保留率以外,还应评估其对多糖结构与活性的影响。

本文采用双氧水对猫爪草多糖进行脱色,考察了脱色时间、pH、脱色温度、双氧水用量对脱色率及多糖保留率的影响,并通过正交试验对工艺进行了优化。结果表明,双氧水用量对脱色率有显著影响,在脱色时间 60 min、pH 9.0、脱色温度 45℃、双氧水用量 20% 的条件下,猫爪草多糖的双氧水脱色率为 79.7%,多糖保留率为 74.3%。但双氧水为强氧化剂,从单因素考察可知其可能导致多糖氧化降解,故下一步将结合多糖的结构分析与活性研究,更为深入地探讨双氧水的脱色影响。

参考文献:

[1] Zhang Z, Wang M, Yu T. Effects of polysaccharides of radix ranunculi ternati on type I skin hypersensitivity in rats[J]. Biomedical Research, 2015, 26(2): 315-319.

[2] 韩红霞,吕小华. 猫爪草多糖对 D-gal 衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(34): 6560-6561. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2017.34.015.

[3] 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): 107-109. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2011.06.031.

- [4] 赵肖通,解军波,潘炳成,等. 响应面分析法优化姬松茸多糖的脱色工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9):207-212. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2016. 09. 032.
- [5] 龚敏,赵德前,孙慧洁. 大孔吸附树脂对药桑多糖的脱色及抗氧化活性影响[J]. 中国农学通报, 2016, 32(33):147-150.
- [6] 蒋俊,杨焱,乔彦茹. 猴头菌多糖脱色前后理化性质

及生物活性的研究[J]. 菌物学报, 2014, 33(1):78-86. DOI:10. 13346/j. mycosystema. 120274.

- [7] 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. DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2014. 12. 028.

(收稿日期 2017-12-1)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 383 页)胶相对分子质量偏低、黏度不高的缺陷。

3 结论

外切型蛋白酶从胶原纤维肽链外端逐一切除氨基酸,在具备较强的水解胶原纤维之间交联键能力的同时,对胶原纤维内部纤维肽键的损伤亦较小,可弥补内切型蛋白酶酶解速度过快而导致所提骨明胶黏度低的难题。本文采用骨粉代替骨粒进行梯度滴滤浸酸,能有效地将浸酸终点 pH 提高至 2.0,所提骨明胶的黏度提高了 90.4%,避免了低 pH 对胶原的破坏。组合使用外切型风味蛋白酶与内切型 2709 蛋白酶酶解骨素,在可保持明胶高黏度的条件下,有效地将酶解时间缩短为 20 h。最佳工艺条件下,所提明胶的冻力 337 Bloom · g,黏度 6.52 mPa · S,提交率为 15.3%,透明度 >400 mm,相对分子质量 >10 万的组分占 52.57%,明胶质量达到高档医用骨明胶国家标准,为后续生物酶法制备高档骨明胶的工业化应用奠定基础。

参考文献:

- [1] Duan R, Zhang J, Liu L, et al. The functional properties and application of gelatin derived from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Food Chem, 2018, 239:464-469. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2017. 06. 145.
- [2] Sompie M, Surtijono SE, Pontoh JHW, et al. The effects of acetic acid concentration and extraction temperature on physical and chemical properties of pigskin gelatin [J]. Procedia Food Sci, 2015, 3(3):383-388. DOI: 10. 1016/j. profoo. 2015. 01. 042

- [3] Tu ZC, Huang T, Wang H, et al. Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(4):2166-2174. DOI: 10. 1007/s13197-013-1239-9.

- [4] Sinthusamran S, Benjakul S, Kishimura H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions [J]. Food Chem, 2014, 152:276-284. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2013. 11. 109.

- [5] 吕林刚. 骨制磷酸氢钙的生产[J]. 明胶科学与技术, 2008(1):9-11.

- [6] Zhang F, Xu S, Wang Z. Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales [J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(3):185-193. DOI: 10. 1016/j. fbp. 2010. 05. 003.

- [7] Fan H, Dumont MJ, Simpson BK. Extraction of gelatin from salmon (*Salmo salar*) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett-Burman and response surface methodological approaches [J]. J Food Sci Technol, 2017, 54(12):4000-4008. DOI: 10. 1007/s13197-017-2864-5.

- [8] 张锋,施辉阳,张鹏. 酶法制备明胶的新工艺研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2003, 30(1):9-12.

- [9] 张兵,史京京,王颖,等. 酸预处理对酶法骨明胶功能性质和分子质量分布的影响[J]. 影像科学与光化学, 2012, 30(2):102-109.

- [10] 杨远帆,倪辉,吴黎明. 茚三酮法测定蜂蜜及果葡糖浆中的氨基酸含量[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2):171-176.

(收稿日期 2018-06-05)

(本文编辑:石俊强)