# 败酱草多糖的超声波协同复合酶提取、结构分析及抗菌活性研究

惠和平<sup>1</sup>,金辉<sup>2</sup>,赵锐明<sup>3</sup>,牛攀龙<sup>1</sup>,王兴宇<sup>1</sup>,刘谢治<sup>1</sup>,罗玉卿<sup>1</sup>,邓薇<sup>1</sup>(1.甘肃农业职业技术学院,兰州 730020; 2.中科院兰州化学物理研究所,西北特色植物资源化学重点实验室,甘肃省天然药物重点实验室,兰州 730000;3.甘肃农业大学农学院,兰州 730070)

摘要:目的 在单因素实验基础上,运用正交试验优选超声波协同复合酶法提取败酱草多糖的工艺,并通过仪器分析和 体外抑菌试验初步分析败酱草多糖的结构及其抗菌活性。方法 分别考察酶添加量、料液比、超声功率及时间对多糖提 取率的影响,采用四因素三水平正交试验进行多糖提取工艺的优化,利用高效凝胶色谱法、气相色谱法及紫外和红外光 谱法分析其结构。结果 败酱草多糖的最佳提取工艺:提取温度 55 ℃,pH 值为 6.5,酶添加量 2.0%,料液比 1:20,超 声功率 90 W,超声时间 20 min。在此条件下,败酱草多糖的提取率为(25.01±0.15)%,多糖质量分数达(44.12±0.14)%。经 凝胶柱层析纯化后紫外光谱分析显示败酱草多糖的纯度较高,红外光谱和气相色谱分析表明败酱草多糖为 α-和β-糖苷键 的呋喃型糖苷环骨架,主要由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖和木糖按照摩尔比 1:0.5:0.9:1.1:0.3: 0.3 组成,重均分子量为 1.26×10<sup>5</sup>。抑菌试验显示败酱草多糖对肺炎克雷伯菌和恶臭假单胞菌具有一定的抗菌活性,而对 蜡状芽孢杆菌和藤黄微球菌基本没有抗菌作用。结论 超声波协同复合酶法提取效率高,多糖含量高,提取的败酱草多 糖具有一定的抗菌活性。

关键词:败酱草多糖;超声波协同复合酶;提取工艺;结构分析;抗菌活性

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)11-1412-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.004

引用本文: 惠和平, 金辉, 赵锐明, 等. 败酱草多糖的超声波协同复合酶提取、结构分析及抗菌活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1412-1418.

# Studies on the Ultrasonic Composite-enzyme Extraction, Structure and Antibacterial Activity of Herba *Patriniae* Polysaccharide

HUI Heping<sup>1</sup>, JIN Hui<sup>2</sup>, ZHAO Ruiming<sup>3</sup>, NIU Panlong<sup>1</sup>, WANG Xingyu<sup>1</sup>, LIU Xiezhi<sup>1</sup>, LUOYuqing<sup>1</sup>, DENG Wei<sup>1</sup>(1.Gansu Agriculture Technology College, Lanzhou 730020, China; 2.CAS Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3.College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE On the basis of single factor experiment, to optimize the extraction process of polysaccharide from Herba Patriniae by ultrasonic composite-enzyme method by orthogonal experiment. To analyze and evaluate the preliminary structure and the antibacterial activity of Patriniae polysaccharide through instrumental analysis and antibacterial test in vitro, respectively. METHODS The effects of enzyme dosage, solid-liquid ratio, ultrasonic power and time on the extraction rate of polysaccharides were investigated by the four-factor, three-level orthogonal test, while the structure of polysaccharide was analyzed using high-performance gel permeation chromatography, gas chromatography, ultraviolet and infrared spectroscopy. **RESULTS** The optimum extraction conditions of *Patriniae* polysaccharides were as follows: extraction temperature 50 °C, pH=6.5, enzyme dosage 2.0%, solid-liquid ratio 1 : 20, ultrasonic power 90 W, ultrasonic time 20 min. Under the optimum conditions, the extraction yield of Patriniae polysaccharides was (25.01±0.15)%, while the concentration of total carbohydrate was (44.12±0.14)%. Ultraviolet spectroscopy analysis showed that the purity of Patriniae polysaccharide was higher after purification by gel column chromatography. Infrared spectroscopy and gas chromatography analysis showed that *Patriniae* polysaccharide was a furan-type glycoside ring skeleton with  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycosidic bond, and was mainly composed of glucose, mannose, galactose, arabinose, rhamnose and xylose at the molar ratio of 1:0.5:0.9:1.1:0.3:0.3, with the average molecular weight 1.26×10<sup>5</sup>. Antibacterial test in vitro showed that the Patriniae polysaccharide had certain antibacterial activity against Klebsiella pneumonia (K. pneumonia) and Pseudomonas putida (P. putida), but no antibacterial effect on Bacillus cereus (B. cereus) and Micrococcus luteus (M. luteus). CONCLUSION Ultrasonic-composite enzyme is an efficient extraction method, and the extracts rich in polysaccharide, with certain antibacterial activity.

**KEYWORDS:** Herba *Patriniae* polysaccharide; ultrasonic composite-enzyme; extraction process; structural analysis; antibiotic activity

**基金项目**:国家自然科学基金项目(31772668);甘肃农业职业技术学院科研流动站(2021-GNZY-02) 作者简介: 惠和平,男,博士,副教授 E-mail: lzdxhui@163.com

· 1412 · Chin J Mod Appl Pharm, 2022 June, Vol.39 No.11

败酱草(Herba Patriniae),又称鹿肠、泽败、 苦菜、败酱等,隶属于败酱科多年生草本植物。 药用植物为白花败酱(Patrinia villosa Juss)、黄花败 酱(Patrinia scabiosaefolia Fisch. Ex Trev)或其近缘 植物的带根全草<sup>[1]</sup>,我国大部分地区有分布,具有 祛瘀止痛、消痈排脓、清热解毒、宁心安神、保 肝利胆等功效<sup>[1-5]</sup>。败酱草因其含有丰富的营养素 (如蛋白质、糖、氨基酸、维生素和微量元素等), 在许多地方被广泛作为野生蔬菜食用,应用历史 悠久<sup>[2-4]</sup>。研究表明败酱草中含有丰富的多糖,具 有明显的抗疲劳、防腹泻、抗便秘、抗病毒、抗 氧化、调节免疫、抑制肿瘤生长等多种药理活性<sup>[6-12]</sup>。 由于其资源丰富,安全无毒,作为抗氧化剂广泛 用于食品、医药保健品和化妆品等领域,极具医 疗价值和应用前景。

然而,目前市面上败酱草多糖的提取主要使 用传统的热水煎煮法,该方法耗时、需高温、提 取效率低,多糖颜色深,大多为深褐色,总糖含 量低且杂质偏多[1-2,4,11-16],增加了后期多糖纯化的 步骤和难度。所以,亟需一种高效的提取方法来 解决这些问题。超声波在液体中产生的空化、剪 切、剧烈搅拌等作用带来的强分散效应使细胞组 织破坏,具有快速、节能等特点。而酶具有高效 破坏细胞壁、作用条件温和及有效保持多糖活性 等特点[17-20],超声波结合酶是当前天然有效成分 高效提取的方法之一。截至目前,尚未见关于超 声波协同复合酶提取败酱草多糖的工艺及结构、生 物活性等的研究报道。本研究选择 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验 优选超声波协同复合酶法提取败酱草多糖的工艺, 提取的多糖经凝胶色谱纯化后采用紫外光谱、气相 色谱、高效凝胶色谱、红外光谱和抑菌圈法分别进 行结构和抗菌活性的初步分析, 以期为败酱草多糖 的高效提取及其进一步深入研究提供参考。

# 1 材料与方法

## 1.1 仪器与试剂

IFS 66v/s 傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司); LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津公 司); Shodex OHpak SB-804 和 803(日本昭和公司, 8.0 mm×300 mm); 6890N 气相色谱仪(美国安捷伦 公司); DB-1色谱柱(美国 Agilent 公司, 30 m× 0.32 mm,0.25 μm); 8453E 紫外可见分光光度计(安 捷伦科技有限公司); SCIENTZ-10N 冻干燥机(宁 波新芝生物科技股份有限公司); CYS-Y21S 超声 萃取仪(杭州超音速机电科技有限公司)。

败酱草为新鲜采集的白花败酱草,由兰州大学 药学院马志刚教授鉴定为白花败酱草 Patrinia villosa Juss; 木瓜蛋白酶(800 U·mg<sup>-1</sup>)、纤维素酶 (100 U·mg-1)均由北京索莱宝有限公司提供;葡萄 糖对照品(批号: 101852372, 供含量测定用)、恶臭 假单胞菌(ATCC 49128)、对腾黄微球菌(ATCC 49732)、肺炎克雷伯菌(ATCC 35657)和蜡状芽孢杆 菌(ATCC 14579)均由美国 Sigma 公司提供;甘露糖 (批号: SRXC-A7M6; 供含量测定用)、木糖(批号: KT64-A54F; 供含量测定用)、半乳糖(批号: 4BP5-DGYC;供含量测定用)、鼠李糖(批号: 887N-NE6W;供含量测定用)、阿拉伯糖(批号: 506-200202;供含量测定用)对照品均由中国食品药 品检定研究院提供; 葡聚糖系列标准品, 重均分子 量为1152,11600,23800,48600,80900,148000, 273 000, 409 800, 批号分别为 140638-201203, 140639-201203, 140640-201203, 140641-201203, 140642-201203, 140643-201203, 140644-201203, 140645-201203, 均由 Sigma-Aldrich 公司提供; Sephadex G100(上海源叶有限公司, 批号: S14034); 硫酸链霉素(Amresco 公司, 批号: 650-850)苯酚、 浓硫酸、乙醇、无水碳酸钠、碳酸氢钠等试剂(分析 纯)均由天津市大茂化学试剂厂提供。

1.2 方法

1.2.1 多糖含量的测定 标准曲线的绘制<sup>[21]</sup>:准确称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 25.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水定容。分别吸取 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 于 10 mL 量瓶中,加蒸馏水定容。移取上述溶液各 2.0 mL,分别加入 5%苯酚溶液 1.0 mL,摇匀后,再加入浓硫酸 5.0 mL,充分混匀后在室温放置 5 min, 60 ℃水浴 中反应 15 min,冷却至室温,于 490 nm 处测定吸 光度。以糖浓度和吸光度为坐标绘制标准曲线。

样品测定:吸取被测样品溶液0.2 mL,加水稀释至 1.0 mL,按上述步骤操作,于 490 nm 处测定吸光度,代入标准曲线计算多糖含量。

多糖提取率按照如下公式计算:多糖提取率 (%)=(M<sub>1</sub>/M<sub>0</sub>)×C×100。

式中: $M_0$ 为败酱草原药材的质量,g; $M_1$ 为 提取多糖冻干后的质量,g;C为多糖的含量, mg·mL<sup>-1</sup>。

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2022 June, Vol.39 No.11 · 1413 ·

**1.2.2** 超声波协同复合酶提取败酱草多糖的工艺 优选

1.2.2.1 超声波协同复合酶提取败酱草多糖的工 艺流程 败酱草→粉碎过 60 目筛→80%乙醇回流 脱脂→滤渣抽干→超声协同复合酶提取败酱草多 糖→离心取上清液→Sevag 试剂除蛋白→6%的过 氧化氢脱色→4 倍体积乙醇醇沉→离心取沉淀→ 无水乙醇、丙酮依次洗剂→抽滤冻干→苯酚硫酸 法测多糖含量。

1.2.2.2 单因素试验 以 1.6 g 败酱草粉末为基准, 选择 2 种酶(木瓜蛋白酶-纤维素酶为 1:1)的最适 温度(55 ℃)和最适 pH 值(6.5),考察复合酶的添加 量、料液比、超声功率和超声时间 4 个因素对败酱 草多糖提取率的影响。单因素试验除考察因素外的 默认条件:复合酶添加量 1.0%,料液比为 1:10, 超声功率 30 W,超声时间 20 min。平行操作 3 次, 通过统计软件分析确定复合酶的添加量、料液比、 超声功率和超声时间 4 个因素的实验水平。

1.2.2.3 正交试验 在单因素试验基础上,准确称 取 3 份约 1.6 g 败酱草,依据因素与水平表(表 1) 和 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验表(表 2)进行复合酶添加量、料 液比、超声功率和超声时间 4 因素正交试验,重 复 3 次,计算多糖的提取率,通过统计软件 SPSS 18.0 分析确定超声波协同复合酶提取败酱草多糖 的最佳工艺。

**表 1** 超声波协同复合酶提取败酱草多糖的正交试验因素 水平表

Tab. 1Factor levels of orthogonal test for ultrasoniccomposite-enzyme extraction of polysaccharide from HerbaPatriniae

	因素				
水平	A 复合酶 添加量/%	B 料液比/ g:mL	C 超声功率/ W	D 超声时间/ min	
1	1.0	1:15	60	20	
2	1.5	1:20	90	30	
3	2.0	1:25	120	40	

1.2.3 败酱草多糖的纯化及其结构分析

**1.2.3.1** 凝胶柱层析纯化 取 80.0 mg 败酱草多糖 提取物溶解于 1.5 mL 蒸馏水中,采用 Sephadex G100 柱层析纯化,蒸馏水洗脱,苯酚硫酸法跟踪 检测,收集主峰部分,浓缩后冻干即得。

**1.2.3.2** 紫外光谱分析 取适量败酱草多糖用蒸 馏水配置成 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,以蒸馏水为空白, 用紫外分光光度计在 190~800 nm 内进行扫描。

1.2.3.3 分子量测定 采用高效凝胶色谱法。精密称取样品和对照品配制成 5.0 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液, 15 984×g 离心 10 min,上清液用 0.22 µm 的微孔滤 膜过滤,转置于 1.8 mL 进样小瓶中,进样 20 µL。 以不同相对分子质量的葡聚糖进样并绘制标准曲 线,根据标准曲线求得多糖样品的分子量。色谱条 件: Shodex OHpak SB-804 和 803(8.0 mm×300 mm) 串联凝胶色谱柱;示差折光检测器;流动相为 0.05 moL·L<sup>-1</sup>的氯化钠溶液,流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温箱温度为 40 ℃。

1.2.3.4 气相色谱分析 参照文献<sup>[21]</sup>,取 5.0 mg 败酱草多糖,用 2 moL·L<sup>-1</sup>三氟醋酸在 110 ℃水解 6 h,经糖腈乙酸酯衍生化后进气相色谱仪分析。
色谱条件: DB-1 毛细管柱(30 m×0.32 mm,

0.25 μm), FID 检测器, 载气 N<sub>2</sub>, 分流比为 50:1; 柱温: 程序升温, 以 3 ℃·min<sup>-1</sup>的速率从 100 ℃(保 持 2 min)升温至 220 ℃(保持 5 min); 气化室和检 测器温度分别为 250, 260 ℃。

**1.2.3.5** 红外光谱分析 称取 1~2 mg 经干燥至恒 重的败酱草多糖与适量 KBr 研磨均匀,压片。在 400~4 000 cm<sup>-1</sup>内进行红外光谱扫描。

1.2.4 体外抗菌活性试验

**1.2.4.1** 多糖溶液的准备 取一定量纯化后多糖 粉末溶解于蒸馏水中,用 0.22 μm 的微孔滤膜过 滤,配成一定浓度的原液,用灭菌蒸馏水稀释成 系列浓度(4.0, 2.0, 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>),置于 4 ℃冰箱 中备用。

1.2.4.2 菌悬液的配置 用接种环挑取实验测试 用菌种接种于 TSA 固体培养基,于 37 ℃培养箱培 养24h后,用灭菌牙签取少许菌溶于TSA液体培 养基中,在37℃摇床上培养24h后,置离心管中 444×g 离心 4 min 弃上清,将各细菌浓度调整至 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 左右的菌种液,置4℃冰箱备用<sup>[22]</sup>。 1.2.4.3 抑菌试验操作 吸取 0.1 mL 试验菌悬液 加于 TSA 培养基并涂布均匀后培养过夜。使用打 孔机将滤纸片打成直径 0.6 cm 的圆形纸片若干, 高压灭菌。将灭菌过的滤纸片浸泡在"1.2.4.1"项 下配置好的系列多糖溶液或阳性对照品溶液中 30 min 后,取出晾干,贴在涂有不同菌种的 TSA 培养基表面, 以蒸馏水为阴性对照, 硫酸链霉素 (1.0 mg·mL<sup>-1</sup>)为阳性对照, 37 ℃生化培养箱内培 养 24 h, 观察并测量滤纸片的抑菌圈直径大小来 评价多糖的抑菌活性。

**1.2.5** 数据处理 本实验采用 SPSS 18.0 进行正 交试验分析和方差分析, *P*<0.05 表示有显著性差 异;采用 Origin 8 对实验数据进行作图。

#### 2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

葡萄糖浓度为 0~0.03 mg·mL<sup>-1</sup>时,与吸光度呈 良好的线性关系,回归方程为 A=15.046C-0.0066, 其中 A 为吸光度, C 为葡萄糖浓度(mg·mL<sup>-1</sup>),相 关系数  $R^2=0.992$ 。

# 2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 酶添加量对败酱草多糖提取率的影响 务 糖提取率随着复合酶添加量的增加先提高后降 低,在酶添加量为 1.5%时达到最大,之后多糖提 取率缓慢降低。在一定条件下,随着酶量的增加, 酶与底物的接触机会增大,加速了细胞壁的溶解, 有利于多糖的溶出。但过高的酶添加量会使底物 完全被酶分子饱和而造成蛋白酶自溶和其他酶的 水解,从而使底物的水解速度下降<sup>[19,23-24]</sup>。因此, 复合酶添加量选 1.5%为宜,最后复合酶添加量选 择 1.0%, 1.5%, 2.0%进行正交试验。结果见图 1。 2.2.2 料液比对败酱草多糖提取率的影响 多糖 提取率随着料液比的逐渐增大先升高后保持不 变,在料液比1:25达到最大,说明料液比1:25 时可以充分提取多糖,再提高料液比会增加提取 液浓缩的难度,也造成能源浪费。所以,料液比 最佳选 1:25, 最后选择料液比 1:15、1:20 和 1:25进行正交试验。结果见图 1。

2.2.3 超声功率对败酱草多糖提取率的影响 多糖提取率随着超声波功率的增大先缓慢上升然后下降,在90W时达到最大值。可能是超声波产生的空洞效应和振动可以促进细胞破碎,有利于多糖的溶解和扩散,但是过高的功率又会导致多糖降解<sup>[24-25]</sup>。因此,超声波功率选90W为宜,最后选择超声功率 60,90,120W 进行正交试验。结果见图 1。

2.2.4 超声时间对败酱草多糖提取率的影响 多糖提取率随着超声时间的逐渐延长先升高后降低。当超声处理为 20~30 min 时,多糖提取率明显升高;在超声处理 30 min 后,多糖提取率逐渐降低。因为超声波高的加速度、剧烈的空化效应和搅拌等加速有效成分流入溶液,多糖的提取率升高;但超声时间太长会加速多糖的局部降解,使多糖提取率降低<sup>[25-26]</sup>。故超声时间 30 min 为宜,

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期

最后选择超声波时间 20, 30, 40 min 进行正交试 验。结果见图 1。



**图1** 不同复合酶添加量、料液比、超声功率和超声时间 对败酱草多糖提取的单因素试验

Fig. 1 Signal factor experiment on the extraction of polysaccharides from Herb *Patrinia* with different compound enzyme addition, solid-liquid ratio, ultrasonic power and ultrasonic time

#### 2.3 正交试验结果分析

超声波协同复合酶提取败酱草多糖的正交试验结果和方差分析分别见表 2~3。由正交试验与方差分析结果可知因素 A 和 B 均具有显著性差异,因素 C 和 D 均无显著性差异,即复合酶添加量和料液比对败酱草多糖提取率的影响显著,而超声时间和超声功率对败酱草多糖提取率的影响不显著。所以,因素 A 和 B 分别选择 A<sub>3</sub>和 B<sub>2</sub>水平;因素 C 选择 C<sub>2</sub>;为节约时间,降低成本,因素 D 选择 D<sub>1</sub>。超声波协同复合酶提取败酱草多糖的最佳工艺确定为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即酶添加量为 2.0%,

**表 2** 超声协同复合酶提取败酱草多糖的正交试验结果 **Tab. 2** Results of orthogonal test for ultrasonic compositeenzyme extraction of polysaccharide from Herba *Patriniae* 

2		1 2			
实验号	А	В	С	D	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	14.66±1.68
2	1	2	2	2	21.63±2.83
3	1	3	3	3	15.51±0.46
4	2	1	2	3	18.61±0.63
5	2	2	3	1	22.61±0.07
6	2	3	1	2	17.53±0.34
7	3	1	3	2	$20.28 \pm 0.28$
8	3	2	1	3	24.59±0.62
9	3	3	2	1	20.55±0.35
$k_1$	51.80	53.55	56.78	57.82	
$k_2$	58.75	68.83	60.79	59.44	
<i>k</i> <sub>3</sub>	65.42	53.59	58.40	58.71	
R	4.54	5.09	1.34	0.54	

Chin J Mod Appl Pharm, 2022 June, Vol.39 No.11

 $\cdot$  1415  $\cdot$ 

料液比为 1:20,超声功率为 90 W,超声时间为 20 min。对优化后的条件进行工艺验证,平行操作 3 次,多糖的提取率分别为 24.86%,25.16%, 25.01%,平均值为(25.01±0.15)%;多糖质量分数 分别为 44.16%,43.96%,44.23%,平均值为 (44.12±0.14)%。

表 3 方差分析结果 Tab. 3 Results of variance analysis

		-			
方差来源	А	В	С	D	误差 E
离差平方和(SS)	92.63	155.31	8.09	1.32	24.27
自由度( <i>df</i> )	2.00	2.00	2.00	2.00	18
均方(MS)	46.31	77.66	4.04	0.66	1.35
F 值	34.351)	57.59 <sup>1)</sup>	3.00	0.49	
F临界值	$F_{0.05}(2,18)=3.55$				

注: <sup>1)</sup>具有显著性差异(P<0.05)。

Note: <sup>1)</sup>represented significant difference(P<0.05).

2.4 败酱草多糖的纯化及其结构初步分析

2.4.1 败酱草多糖的纯化 败酱草多糖经 Sephadex G100 纯化后获得目标多糖(图 2a),浓缩后冻干得 败酱草多糖样品,经苯酚硫酸法测得其多糖含量 达 89.88%。

2.4.2 败酱草多糖结构的初步分析 败酱草多糖 的紫外光谱如图 3a,在 260,280 nm 处没有明显 的吸收峰<sup>[19,27]</sup>,亦无其他杂峰,表明纯化后败酱 草多糖不含核酸和蛋白质等。

经 HPGPC 测定后,依据系列葡聚糖标准品在 凝胶柱上测得的保留时间和分子量的对数作图获 得标准曲线为  $\log M_W$ =-0.197 3RT+12.456,  $R^2$ =0.995 7(其中  $M_W$  为重均分子量, RT 为保留时 间)。将样品测得的保留时间 RT 值(37.27 min,见 图 2b)代入标准曲线求得败酱草多糖的重均分子量 为 1.26×10<sup>5</sup>。

红外光谱如图 3b,可见败酱草多糖在 3 407.6 cm<sup>-1</sup>(-OH)、2 925.5 cm<sup>-1</sup>(-CH<sub>2</sub>)、1 622.3 cm<sup>-1</sup> (-CO)处有较明显的糖环特征吸收,为典型的多糖 类化合物<sup>[19,21-22,27]</sup>;此外,1110.8 cm<sup>-1</sup>和 1 068.1 cm<sup>-1</sup>处的吸收峰表明糖残基主要以呋喃环 存在<sup>[28-29]</sup>;871.7 cm<sup>-1</sup>处的吸收峰可能为甘露糖残 基,且其糖苷键为β型<sup>[22,27-28]</sup>;615.5 cm<sup>-1</sup>处的吸收 峰可能为α-D-葡萄糖残基<sup>[21,28-29]</sup>。结合紫外和红外 光谱图推测败酱草多糖为含有α-和β-糖苷键的呋喃 型糖苷环骨架。

败酱草多糖的气相色谱结果如图 4, 根据出峰



**图 2** 败酱草多糖的 Sephadex G100 纯化图(a)和高效凝胶 色谱图(b)

Fig. 2 Profile of Herba *Patriniae* polysaccharide purified by Sephadex G100(a) and its high performance gel chromatogram(b)



图 3 败酱草多糖的紫外光谱图(a)和红外光谱图(b) Fig. 3 Ultraviolet spectrum(a) and infrared spectrum(b) of polysaccharide from Herba *Patriniae* 

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期



图 4 混合标准单糖(a)和败酱草多糖(b)的气相色谱图 1-鼠李糖; 2-阿拉伯糖; 3-木糖; 4-甘露糖; 5-葡萄糖; 6-半乳糖。 Fig. 4 Gas chromatogram of mixed standard monosaccharide(a) and the Herba *Patriniae* polysaccharide(b) 1-rhamnose; 2-arabinose; 3-xylose; 4-mannose; 5-glucose; 6-galactose.

时间和峰面积推断败酱草多糖主要由葡萄糖、甘 露糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖和木糖按照摩 尔比 1.0:0.5:0.9:1.1:0.3:0.3 组成。

2.5 败酱草多糖的抗菌活性分析

根据抑制圈直径大小评估败酱草多糖的抗菌 活性。如表 4 所示,败酱草多糖对测试菌表现出 不同抑制作用,对肺炎克雷伯菌(K. pneumonia)显 示出较强的抗菌活性,其次是恶臭假单胞菌(P. putida),对腾黄微球菌(M. luteus)的抗菌活性较 弱,而对蜡状芽孢杆菌(B. cereus)没有抗菌活性。 可见败酱草多糖对测试菌株表现出选择性的抑菌 作用,实验浓度范围内的败酱草多糖对革兰氏阴 性菌的抗菌活性强于革兰氏阳性菌。但是,相比 同浓度的阳性对照硫酸链霉素(其抑菌圈直径在 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 时对 4 种测试菌的平均值为 27.16 mm),败酱草多糖对测试菌的抑菌作用较 弱。这可能与多糖的提取和处理方法以及多糖发 挥抗菌作用的机制等有关<sup>[30]</sup>,具体原因有待进一 步研究。

#### 表4 败酱草多糖的抑菌圈直径

**Tab. 4** Inhibition zone diameter of the polysaccharide from

 Herba *Patriniae* 1

	浓度 mg·mL <sup>−1</sup>	革兰氏阴性菌		革兰氏阳性菌	
组别		肺炎克雷 伯菌/mm	恶臭假单 胞菌/mm	腾黄微 球菌/mm	蜡状芽孢 杆菌/mm
败酱草多糖	1.0	10.5±0.3	6.8±0.2	$6.0{\pm}0.0$	$6.0{\pm}0.0$
	2.0	13.2±0.3	7.8±0.1	6.6±0.2	$6.0{\pm}0.0$
	4.0	18.3±0.2	$10.8 {\pm} 0.1$	7.0±0.3	$6.0{\pm}0.0$
阳性对照	1.0	33.2±0.2	23.2±0.2	32.0±0.1	20.1±0.2
阴性对照	0	$6.0{\pm}0.0$			

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期

#### 3 结论

在单因素实验基础上,通过正交试验优化得 到了超声波协同复合酶提取败酱草多糖的最佳工 艺,即提取温度 55 ℃,pH 值 6.5,复合酶添加量 2.0%,料液比 1:20,超声功率 90 W,超声时间 20 min。在此条件下,败酱草多糖的提取率为 (25.01±0.15)%,多糖质量分数为(44.12±0.14)%, 提取的多糖颜色淡(浅灰色)。该工艺参数稳定、可 靠,很好地解决了传统热水煎煮法所存在的提取 效率较低(平均提取率约为 4.0%)、多糖颜色深(褐 色)、多糖含量偏低(约为 24.3%)等问题;同时本工 艺提取操作技术相对简单,获得的产品纯度高, 是一种高效提取败酱草多糖的方法,适合于工业 化生产,具有良好的应用前景。

败酱草多糖经凝胶渗透柱色谱分离纯化后紫 外光谱显示其纯度较高,基本不含核酸和蛋白质 等。高效凝胶渗透色谱分析显示败酱草多糖的重 均分子量为 1.26×10<sup>5</sup>,气相色谱结果表明败酱草多 糖主要由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、 鼠李糖和木糖组成。与文献报道相比<sup>[2,9-10]</sup>,本法 提取的败酱草多糖经纯化后其组成相似,但分子 量较小。红外光谱显示其结构的基本骨架由 α-和 β-呋喃型糖苷环构成。体外抑菌试验表明败酱草多 糖对腾黄微球菌、恶臭假单胞菌、蜡状芽孢杆菌 和肺炎克雷伯菌等测试菌具有选择性抑菌作用, 其中对革兰氏阳性菌几乎没有抗菌活性, 而对革 兰氏阴性菌则表现出一定的抗菌活性,这表明多 糖可能是败酱草发挥其"消痈排脓、清热解毒"效 应的主要物质基础之一,也提示败酱草中多糖作为 天然抑菌剂具有潜在的开发和利用价值。该研究为 败酱草多糖的深入探究以及开发功能性食品等提 供了参考依据。

# REFERENCES

- [1] 李利娜. 败酱草多糖的提取工艺研究[J]. 北方药学, 2012, 9(1): 28, 38.
- [2] CHENG J W. Studies on polysaccharides from *Patrinia villosa* Juss[J]. Chongqing: Southwest University, 2007.
- [3] HU S, CAI W, YE J, et al. Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils[J]. Zentralbl Veterinarmed A, 1992, 39(8): 593-599.
- [4] XIE S D, XIE L P, GONG Z P. Preparation and antioxidant activity of crud polysaccharide from *Bitter* herbs[J]. Farm Products Processing(农产品加工), 2015(11): 15-18, 22.
- [5] ZHANG F M, LI H Y, LI X, et al. *In vitro* anti-respiratory syncytial virus effect of an active compound(AP4) from *Herba*

Chin J Mod Appl Pharm, 2022 June, Vol.39 No.11 . 1417 .

patriniae[J]. Heilongjiang Med Pharm(黑龙江医药科学), 2006, 29(1): 48-50.

- [6] LI A C, FANG L. The protective effect of herba patriniae polysaccharide on fatigue rats liver tissue[J]. Food Res Dev(食 品研究与开发), 2016, 37(12): 174-177.
- [7] CHI A P, KANG C Z, GUO H H, et al. Composition of polysaccharides from herba patriniae and their anti-fatigue and anti-hypoxia activities[J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(21): 212-215.
- [8] 吕品田,孙颖光,刘斌.败酱草多糖的免疫调节作用及对 S<sub>180</sub>荷瘤小鼠的影响研究[J].中药材,2017,40(1):212-215.
- [9] 张凤梅,刘璐,李鑫,等.败酱草多糖提取、纯化、鉴定及 其体外抗 RSV 作用研究[J].中药材, 2008, 31(12): 1879-1881.
- [10] 王雅丽,徐长隆,张春宇,等.败酱草中多糖提取和鉴定的 研究[J]. 食品安全导刊,2019(6):130.
- [11] WEI J, WANG D, WANG Y L. Extraction optimization and antioxidant activity estimation for polysaccharides from *Patrinia*[J]. World Chin Med(世界中医药), 2020, 15(14): 2026-2030.
- [12] LU W Z. Study on anti-cervical cancer mechanism of polysaccharides of *Pateinia Heterophylla* Bugge[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2009.
- [13] MENG L Y, LAN T F, LI X F, et al. Extraction of polysaccharides from *Patrinia villosa* juss and polysaccharide extraction yields from the young and old leaves and roots of the plant[J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31(18): 63-66.
- [14] YANG H. Extraction and inhibition of nitrosation of polysaccharide from *Sonchus arvensis* L.[J]. Hubei Agricult Sci(湖北农业科学), 2014, 53(3): 654-656.
- [15] ZHU J J. Extraction technology of soluble polysaccharides from wild *Patrinia villosa*[J]. Trans Chin Soc Agric Eng(农业 工程学报), 2002, 18(1): 138-141, 4.
- [16] YUAN W, ZHANG Z L, ZHANG L, et al. Study on extraction conditions of polysaccharides from wild *Thlaspi arvense* in Lu'an City[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2013, 41(36): 14012-14013, 14026.
- [17] CHEN R Z, REN X, YIN W, et al. Ultrasonic disruption extraction, characterization and bioactivities of polysaccharides from wild *Armillaria mellea*[J]. Int J Biol Macromol, 2020(156): 1491-1502.
- [18] 郭孝武. 超声提取分离[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [19] LI Y, CHEN X M, YAN Y P, et al. Optimal extraction technology of polysaccharides from red kindey bean using ultrasonic assistant with enzyme[J]. Trans Chin Soc Agric Eng(农业工程学报), 2015, 31(15): 293-301.
- [20] YANG X Y, XUE Z Y, YANG Y F, et al. Complex enzyme

combined with ultrasound extraction technology, physicochemical properties and antioxidant activity of Hedysarum polysaccharides[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(11): 2261-2268.

- [21] HUI H P, JIN H, LI X Z, et al. Purification, characterization and antioxidant activities of a polysaccharide from the roots of *Lilium davidii* var. *unicolor* Cotton[J]. Int J Biol Macromol, 2019(135): 1208-1216.
- [22] HUI H P, LI X Z, JIN H, et al. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of two heteropolysaccharides purified from the bulbs of *Lilium davidii* var. unicolor Cotton[J]. Int J Biol Macromol, 2019(133): 306-315.
- [23] LI J W, YANG X Q, XU J C, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and physicochemical properties of polysaccharide from *Eucheuma gelatinae*[J]. J South Agricult (南方农业学报), 2020, 51(12): 3030- 3039.
- [24] CHENG X H, YANG W G. Optimization of ultrasonic and enzymatic-assisted extraction of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* oliver leaves by response durface method[J]. Sci Tech Food Indust(食品工业科技), 2020, 41(22): 193-198.
- [25] HU H G, ZHAO Q L, XIE J H, et al. Polysaccharides from pineapple pomace: New insight into ultrasonic-cellulase synergistic extraction and hypoglycemic activities[J]. Int J Biol Macromol, 2019(121): 1213-1226.
- [26] FU Q, XIAO Y J, MAO Y T, et al. Study on ultrasonic synergistic multi-enzyme extraction of *Hericium erinaceus* poysaccharide[J]. Farm Products Processing(农产品加工), 2020(10): 34-38, 43.
- [27] 惠和平,封士兰,赵良功,等. 红芪多糖的纯化及初步结构 鉴定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2302-2303.
- [28] ZHU M Q, HUANG R M, WEN P, et al. Structural characterization and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (*Cucumis metuliferus*) peels[J]. Carbohydr Polym, 2021(254): 117371.
- [29] ZHANG H, ZOU P, ZHAO H T, et al. Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharide from pinecones of *Pinus koraiensis*[J]. Carbohydr Polym, 2021(251): 117078.
- [30] BELGHITH-FENDRI L, CHAARI F, JEDDOU K B, et al. Identification of polysaccharides extracted from pea pod by-products and evaluation of their biological and functional properties[J]. Int J Biol Macromol, 2018(116): 947-954.

收稿日期: 2021-06-30 (本文责编: 蔡珊珊)