

# 墨旱莲多糖的酶法提取工艺优选

杨春静<sup>1</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 张华锋<sup>2</sup>, 刘炯<sup>2</sup>, 杨云<sup>2\*</sup>, 杨璐<sup>3</sup>

(1. 河南中医学院第三附属医院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院药学院, 郑州 450046;  
3. 中国医科大学药学院, 南京 211198)

**[摘要]** 目的: 优选酶法提取墨旱莲多糖的工艺条件。方法: 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 以多糖提取率和蛋白质含量的综合评分为指标, 采用单因素试验筛选酶的种类。以多糖总提取率为指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察酶用量、酶解温度、酶解时间、pH 对墨旱莲多糖提取工艺的影响。结果: 选用纤维素酶, 最佳提取工艺条件为 pH 5.0, 纤维素酶用量 3%, 酶解时间 3 h, 酶解温度 50 ℃。结论: 酶解水提法可显著提高墨旱莲多糖的提取率。

**[关键词]** 墨旱莲多糖; 酶法; 正交试验; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0063-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013120063

## Optimization of Enzymatic Extraction Technology of Polysaccharides from *Eclipta prostrata*

YANG Chun-jing<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>, ZHANG Hua-feng<sup>2</sup>, LIU Jiong<sup>2</sup>, YANG Yun<sup>2\*</sup>, YANG Lu<sup>3</sup>

(1. Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese  
Medicine (TCM), Zhengzhou 450008, China;

2. College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China;

3. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China )

**[Abstract]** **Objective:** To optimize enzymatic extraction technology conditions of polysaccharides from *Eclipta prostrata*. **Method:** Composite score of yield of polysaccharides and the content of protein as index, type of enzyme was screened by single factor test. With total yield of polysaccharides as index, based on single factor tests, effect of the amount of enzyme, pH, hydrolysis time and temperature on extraction technology of polysaccharides was investigated by orthogonal test. **Result:** Cellulose enzyme was adopted, optimum extraction technology was as following: pH 5.0, the amount of cellulose enzyme 3%, hydrolysis time 3 hours and

**[收稿日期]** 20121224(012)

**[基金项目]** 2010 河南省郑州市科技攻关项目(10PTGS486-1)

**[第一作者]** 杨春静, 副主任医师, 从事临床药学研究, Tel:13526505961, E-mail: Ycj5961@163.com

**[通讯作者]** \* 杨云, 硕士生导师, 教授, 从事中药活性成分研究, Tel:0371-5680605, E-mail: yyun@china.com.cn

[5] 陈菁, 陈建华, 周怡雯, 等. 高效液相色谱法检测发酵液中二羟基丙酮和甘油的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(3): 170.

[6] 陈均, 杨通汉, 王云华, 等. 冰冻红细胞解冻后残留甘油含量的测定方法初探[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(2): 97.

[7] 徐秀丽, 成立军, 刘伦, 等. 分光光度法测定甘油剂中甘油的含量[J]. 泰山医学院学报, 2002, 23(3): 247.

[8] 张永生, 高辉, 王艳萍. 克拉维酸发酵液中碳源——甘油含量的比色法测定[J]. 天津科技大学学报, 2006, 21(1): 15.

[9] 阎杰, 丘泰球. 甘油铜比色法测定甘油含量的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(1): 40.

[10] 王鲁石, 杜华, 唐辉. 折光法快速测定甘油护肤水中甘油的含量[J]. 农垦医学, 2003, 25(2): 93.

[责任编辑 全燕]

temperature at 50 °C. **Conclusion:** Yield of polysaccharides from *E. prostrata* could significantly increase by enzymolysis water extraction method.

[**Key words**] polysaccharides from *Eclipta prostrata*; enzymatic; orthogonal test; extraction technology

墨旱莲别名白花虻螂草、乌墨菜、旱莲草, 主要生长于江苏、江西、浙江、广东<sup>[1]</sup>, 临床用于治疗阴虚血热、崩漏下血、外伤出血等症<sup>[2]</sup>。目前对墨旱莲的水、醇及乙酸乙酯提取物的生物活性研究较多<sup>[3]</sup>, 但尚未完全明确其活性机制及具体的活性成分。多糖具有抗氧化、调节免疫、降血糖、抗衰老、抗肿瘤<sup>[4-9]</sup>等生物活性, 与维持生物机能密切相关, 已成为目前研究热点之一。本实验在单因素试验基础上, 采用正交试验优选墨旱莲多糖的酶提取工艺, 为墨旱莲的资源开发提供参考。

## 1 材料

UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), AE240 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 Mettler 公司), BS224S 型 1/万电子分析天平(北京赛多利斯公司), LDZ5-2 型离心机(北京京立离心机公司)。

无水葡萄糖对照品(天津市科密欧化学试剂开发中心, 批号 20050805), 墨旱莲(购于河南郑州张仲景大药房, 由河南中医学院生药教研室董诚明教授鉴定为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的地上部分), 纤维素酶、果胶酶、中性蛋白酶、复合酶 007-A 均购于夏盛实业集团有限公司, 试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 墨旱莲多糖含量测定** 精密量取葡萄糖储备液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀, 得葡萄糖质量浓度分别为 20.02, 30.03, 40.04, 50.05, 60.06, 70.07 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。分别量取各葡萄糖对照品溶液 2.0 mL 于 20 mL 试管中, 加 5% 苯酚溶液 1 mL, 加浓硫酸 5 mL, 摇匀, 室温放置 40 min, 于 490 nm 处测定吸光度(A), 以水为空白对照。以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程  $Y = 0.0156X + 0.0176$  ( $r = 0.9995$ ), 表明葡萄糖质量浓度在 20.02 ~ 70.07 mg·L<sup>-1</sup> 与 A 呈良好线性关系。称取样品多糖 25.0 mg, 加水溶解并定容于 100 mL 量瓶中, 摇匀, 精密吸取 2.0 mL 溶液于具塞试管中, 按上述方法测定 A, 计算多糖含量。

**2.2 墨旱莲多糖的提取** 称取墨旱莲药材粗粉 15 g 置于烧瓶中, 加 25 倍量水于 50 °C 浸泡 30 min, 冷却后加入已活化的生物酶(生物酶加 10 mL 水溶

解, 于 40 °C 水浴活化 10 min) 并调节溶液 pH 5.0, 于 50 °C 水浴中酶解 3 h, 酶解后调 pH 中性, 于 90 °C 恒温提取 2 次, 每次 2 h, 过滤, 滤液浓缩至液料比 1:2, 80% 乙醇沉淀, 于 4 °C 静置过夜, 醇沉液以 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取沉淀物, 依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 真空干燥, 即得。

多糖得率 = 所得粗多糖质量 / 药材质量 × 100%;

多糖质量分数 =  $C \times D / M \times 100\%$ ;

多糖总提取率 = 多糖得率 × 多糖质量分数 × 100%

式中 C 为多糖质量浓度, D 为稀释倍数, M 为干燥后所得粗多糖的质量。

**2.3 酶种类的筛选** 在 pH 5.5, 酶用量 3%, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 3 h 的条件下, 按 2.2 项下方法进行提取, 分别加入已活化的纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、复合酶, 测定多糖提取率和蛋白质含量。以多糖提取率和蛋白质含量的综合评分为指标, 筛选墨旱莲多糖的最佳酶种类。多糖提取率除以该列最大值再乘以 100 即为该项得分; 把蛋白质质量浓度(y)最小值定成 100, 其他按公式  $y = 156.8 - y_n \times 100$  计算。多糖提取率(x)和 y 同等重要, 两者权重系数均为 0.5, 综合评分(w) = 0.5x + 0.5y。蛋白酶、纤维素酶、果胶酶和复合酶的综合评分分别为 95.1, 98.4, 93.5, 93.6, 故确定选用纤维素酶。

多糖提取率 = 多糖质量 × 含糖量 / 药材质量 × 100;

蛋白质质量浓度 =  $1.45A_{280} - 0.74A_{260}$ <sup>[10]</sup>

式中  $A_{280}$ ,  $A_{260}$  分别为蛋白质溶液在 280, 260 nm 处的吸光度。

## 2.4 单因素试验考察

**2.4.1 酶解温度** 在料液比 1:25, pH 5, 酶解时间 3 h, 酶用量 3% 条件下, 分别考察酶解温度为 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C 对酶提取工艺的影响, 结果多糖总提取率分别为 0.98%, 0.98%, 1.07%, 1.06%, 0.88%, 故选择酶解温度 50 °C。

**2.4.2 酶用量** 在料液比 1:25, pH 5, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 3 h 条件下, 考察酶用量分别为 0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 对多糖提取工艺的影响, 结果多糖总提取率分别为 0.94%, 1.12%, 1.20%, 1.09%, 1.02%, 故选择酶用量 3%。

**2.4.3 酶解时间** 在料液比 1:25, pH 5, 酶解温度 50 °C, 酶用量 3% 条件下, 考察酶解时间分别为 2,

3,4,5,6,7 h 对多糖酶解工艺的影响,结果多糖总提取率分别为 1.14%, 1.21%, 1.09%, 1.05%, 0.94%, 0.86%, 故选择酶解时间 3 h。

**2.4.4 料液比** 在 pH 5.0, 酶用量 3%, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 3 h 条件下, 考察料液比分别为 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40 对多糖酶解工艺的影响, 结果多糖总提取率分别为 1.15%, 1.17%, 1.21%, 1.00%, 0.88%, 0.87%, 故选用料液比 1:25。

**2.4.5 pH** 在料液比 1:25, 酶用量 3%, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 3 h 条件下, 考察不同酶解 pH(3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0) 对墨旱莲多糖提取工艺的影响, 结果多糖总提取率分别为 0.82%, 1.02%, 1.06%, 1.27%, 1.20%, 1.07%, 故选择 pH 5。

**2.5 正交试验优选** 在单因素试验基础上, 确定料液比 1:25, 选择酶用量、酶解温度、酶解时间、pH 为考察因素, 以多糖总提取率为指标, 按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验, 确定最佳酶解工艺参数, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 墨旱莲多糖酶解工艺正交试验因素水平

水平	A 酶解时间/h	B 酶用量/%	C 酶解温度/℃	D pH
1	2	2	45	4.5
2	3	3	50	5.0
3	4	4	55	5.5

表 2 墨旱莲多糖酶解工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	多糖总提取率/%
1	1	1	1	1	1.75
2	1	2	2	2	2.12
3	1	3	3	3	2.37
4	2	1	2	3	2.28
5	2	2	3	1	2.58
6	2	3	1	2	2.11
7	3	1	3	2	2.34
8	3	2	1	3	2.17
$K_1$	6.24	6.37	6.03	6.71	
$K_2$	6.97	6.87	6.78	6.57	
$K_3$	6.89	6.86	7.29	6.82	
R	0.243	0.167	0.420	0.083	

由直观分析可知, 各因素对酶解工艺的影响顺序为  $C > A > B > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析, C 因素有显著性差异, A, B 因素无显著影响。确定最佳工艺为  $A_2B_2C_3D_3$ , 即纤维素酶用量 3%, 酶解温度 55 ℃, 酶解时间 3 h, 酶解 pH 5.5。

表 3 酶解工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.053	2	0.027	10.6	>0.05
B	0.027	2	0.014	5.4	>0.05
C	0.134	2	0.067	26.8	<0.05
D(误差)	0.005	2	0.003	1.00	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

### 3 讨论

细胞壁主要成分为纤维素, 本实验选择纤维素酶进行提取, 可使细胞壁软化、膨胀和崩溃等, 改变细胞壁的通透性, 提高细胞内含物(蛋白质、淀粉、糖等)的提取率。在水提前对原料进行酶预处理, 可有效提高多糖得率<sup>[11]</sup>。

酶法提取墨旱莲多糖具有条件温和、不引入杂质、无污染等优点, 而且不易破坏多糖的立体结构和生物活性, 能比较温和地将植物组织分解, 加速有效成分的释放, 从而提高其提取率, 更适合于工业化大生产, 产业化前景良好。

#### [参考文献]

- [1] 全国中草药汇编委员会. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 432.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 259.
- [3] 韩英, 夏超, 陈小媛, 等. 墨旱莲化学成分及药理活性的初步研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 680.
- [4] 辛晓林, 刘长海. 中药多糖抗氧化作用研究进展[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(5): 54.
- [5] 邓航, 贺敏, 李江, 等. 柿叶多糖对糖尿病小鼠降血糖作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 114.
- [6] 刘永斌. 中药多糖的免疫调节与抗肿瘤作用研究进展[J]. 现代医院, 2008, 8(2): 1.
- [7] 许小华, 郝鹏飞, 杨云, 等. 墨旱莲多糖对正常小鼠免疫功能的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 181.
- [8] 刘雪英, 赵越平, 蒋永培, 等. 墨旱莲乙酸乙酯总提取物对 T 淋巴细胞功能的调节[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(8): 754.
- [9] 张庭廷, 夏晓凯, 陈传平, 等. 黄精多糖的生物活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 42.
- [10] 郭颖娜, 孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 河北化工, 2008, 31(4): 36.
- [11] 陈石良, 孙震, 谷文英, 等. 灰树花深层发酵菌丝体多糖的酶法提取及其抗肿瘤作用[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(4): 336.

[责任编辑 全燕]