

# 超声波协同复合酶法提取半边莲多糖工艺优选

黄秀香, 赖红芳\*, 罗丽程

(河池学院化学与生命科学系, 广西 宜州 546300)

**[摘要]** **目的:**探讨超声波协同复合酶法对半边莲多糖提取率的影响。**方法:**以半边莲为原料,用超声波协同复合酶法提取多糖,通过单因素和正交试验对半边莲多糖的提取工艺进行优化。**结果:**超声波协同复合酶法提取半边莲多糖的最佳工艺条件为 pH 4.0,料液比 1:40,超声波时间 25 min,复合酶用量 1.0%。**结论:**超声波协同复合酶法具有提取率高、工艺简单、节能的特点。

**[关键词]** 半边莲; 多糖; 超声波; 复合酶

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0044-03

## Optimization of Extraction Technology for Polysaccharide from *Lobelia chinensis* by Ultrasonic-Composite Enzyme Synergistic Method

HUANG Xiu-xiang, LAI Hong-fang\*, LUO Li-cheng

(Department of Chemistry and Life Sciences, Hechi University, Yizhou 546300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effect of ultrasonic-composite enzyme synergistic method on extraction rate of polysaccharide from *Lobelia chinensis*. **Method:** With *L. chinensis* as raw material, polysaccharide was extracted by ultrasonic-composite enzyme synergistic method, extraction technology of polysaccharide from *L. chinensis* was optimized by single factor test and orthogonal test. **Result:** Optimum technology conditions were as follows: pH 4.0, ratio of solid-liquid 1:40, ultrasonic time 25 min, the amount of enzyme 1.0%. **Conclusion:** Ultrasonic-composite enzyme synergistic method had features of high extraction ratio, simple process, energy-saving.

**[Key words]** *Lobelia chinensis*; polysaccharide; ultrasonic wave; enzyme

**[收稿日期]** 20111003(002)

**[基金项目]** 广西教育厅项目(201010LX457)

**[第一作者]** 黄秀香, 硕士, 副教授, 从事天然有机化学研究, Tel:0778-3141892, E-mail:hxx1372@163.com

**[通讯作者]** \* 赖红芳, 硕士, 副教授, 从事天然有机化学及分析化学研究, Tel:0778-3141892, E-mail:laihongfang263@tom.com

药效试验和临床观察进一步研究。

### [参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中医方剂大辞典精选本[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:146.  
[2] 简永耀,靳龙文. 连翘的化学成分及药理学研究[J]. 淮海医药,2009,27(4):349.  
[3] 郭强,王智民,林丽美,等. 连翘属药用植物化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(5):76.  
[4] 李仲兴,王秀华,赵建宏,等. 连翘对金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的体外抗菌活性研究[J]. 天津中医药,2007,24(4):3281.

[5] 杨淑文. 32种中成药抑菌活性的比较研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(3):1361.  
[6] 张立伟,刘金,杨频. 中草药连翘提取物抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2003,24(2):122.  
[7] 中国药典. 一部[S]. 2010:159.  
[8] 张国彪. HPLC测定清灵感冒颗粒中连翘苷的含量[J]. 海峡药学,2008,20(8):49.  
[9] 韩家忠,贾善学. 高效液相色谱法测定牛黄清感胶囊中连翘苷的含量[J]. 医药导报,2009,28(10):1358.  
[10] 刘永,田军,李刘辉. 高效液相色谱法测定中耳炎颗粒中连翘苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):16.

[责任编辑 全燕]

半边莲全草含生物碱、黄酮苷、皂苷、氨基酸、多糖等成分,文献报道主要是半边莲生物碱、黄酮苷等<sup>[1]</sup>,对半边莲中多糖的研究很少。

中药多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、降血脂、保肝等多种药理作用<sup>[2]</sup>。多糖提取方法主要有水浸提法、碱提取法、酶解提取法、超声波提取法、微波提取法等。本实验采用超声波协同复合酶法提取半边莲多糖,通过正交试验确定出最佳工艺。采用超声波协同复合酶提取多糖,过程条件温和,酶活性高,可以促进多糖的溶出,提高多糖的提取得率<sup>[3]</sup>,为进一步开发和利用半边莲资源提供理论依据。

## 1 材料

半边莲(购于宜州市药材市场,经河池学院覃玥副教授鉴定为桔梗科植物半边莲 *Lobelia chinensis* Lour. 全草),纤维素酶(1 400 U·g<sup>-1</sup>),果胶酶(1 000 U·g<sup>-1</sup>),葡萄糖对照品(天津市化学试剂三厂,AR),苯酚、无水乙醇、浓硫酸等均为分析纯。

UV2501型紫外分光光度计(日本岛津公司),FZ102型微型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),AE240S型电子分析天平(扬州东方集团有限公司),E201 C型数显酸度计(上海精密科学仪器有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 半边莲预处理** 用植物粉碎机粉碎半边莲,过20目筛后得到半边莲粉末,以无水乙醇为溶剂,料液比1:5,浸泡24 h脱脂,抽滤,滤渣于45℃恒温烘干,得到脱脂半边莲粉末<sup>[4]</sup>。

**2.2 对照品溶液的制备** 准确称取0.1 g经过105℃干燥至恒重的葡萄糖,加水溶解定容至100 mL,摇匀,备用。

**2.3 标准曲线的绘制**<sup>[5]</sup> 分别精确吸取0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL葡萄糖对照品溶于50 mL量瓶中,稀释至刻度。精密吸取1.0 mL于25 mL具塞比色管,加5%苯酚1.0 mL,摇匀,缓慢加浓硫酸5.0 mL,摇匀,室温静置30 min。以蒸馏水1.0 mL同上操作加苯酚和硫酸进行显色反应,作为空白对照,在490 nm处测吸光度,以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光值(A)为纵坐标作标准曲线,得线性方程 $A = 0.0048C - 0.0158$  ( $R^2 = 0.9977$ ),线性范围0.02~0.12 g·L<sup>-1</sup>。

**2.4 半边莲粗多糖的提取** 准确称取经脱脂干燥的半边莲粉2.00 g,置250 mL量瓶中,料液比1:30,提取溶剂用蒸馏水,pH 4.5,复合酶(纤维素酶-果胶酶1:1,下同)用量1.0%,超声30 min,沸水浴

灭酶后抽滤,将半边莲多糖的提取液浓缩至原体积的1/3,加入少量的活性炭进行脱色并过滤,滤液加3倍量95%乙醇混合,冷藏24 h,抽滤,沉淀分别用95%乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤,60℃烘箱中烘干直至恒重,即得半边莲的粗多糖。

**2.5 换算因子的测定及多糖得率计算** 精密称取半边莲粗多糖25 mg,加水溶解并定容至100 mL。准确移取1.0 mL溶液,按标准曲线的方法测定其吸光度,平行测定3次,计算换算因子。

$$f = W / (CD)$$

式中W为半边莲粗多糖的质量;C为半边莲多糖中葡萄糖的质量浓度;D为半边莲多糖溶液的稀释倍数。计算得 $f = 0.478$ 。

$$\text{多糖得率} = CDf / W \times 100\%$$

式中W为半边莲粗多糖的质量;C为半边莲多糖中葡萄糖的质量浓度;D为半边莲多糖溶液的稀释倍数。

## 2.6 单因素试验

**2.6.1 pH对多糖得率的影响** 准确称取经脱脂干燥的半边莲粉5份,每份1.00 g,置于100 mL碘量瓶中,料液比1:30,复合酶用量1.0%,样品pH分别为4.0,5.0,5.5,6.0,超声30 min,功率50%,沸水浴灭酶后抽滤,滤液定容到250 mL量瓶中,取1.0 mL提取液于50 mL量瓶中,定容,按2.3方法显色,测定吸光度。结果半边莲多糖得率分别为3.8%,5.0%,4.1%,4.0%,3.7%,pH 4.5最佳。

**2.6.2 复合酶用量对多糖得率的影响** 按2.6.1方法操作,pH 4.5条件下,复合酶用量分别0.6%,0.8%,1.0%,1.2%,1.4%,按2.3方法显色,测定A。结果半边莲多糖得率分别为4.7%,4.5%,6.0%,4.8%,4.4%。复合酶酶量不是越多越好,高酶量与超声波协同作用过于强烈,致使多糖结构受破坏,含量反而降低。

**2.6.3 超声波时间对多糖得率的影响** 按2.6.1方法操作,pH 4.5,复合用量1.0%,超声时间分别为20,25,30,35,40 min,按2.3方法显色,测吸光度。结果半边莲多糖得率分别为2.0%,3.2%,2.8%,2.5%,2.4%。由结果可知超声25 min最佳,时间过长,含量反而降低,可能是多糖结构受破坏所致。

**2.6.4 料液比对多糖得率的影响** 按2.6.1方法,pH 4.5,酶用量1.0%,料液比分别为1:10,1:30,1:40,1:50,按2.3方法显色,测定A。结果半边莲多糖得率分别为3.9%,4.1%,5.8%,5.0%,4.8%,

料液比 1:40 最佳,随着料液比的降低,样品中复合酶浓度和底物浓度都逐渐减少,有效碰撞减少,因此反应呈缓慢下降趋势。

**2.7 正交试验** 试验选取 pH,复合酶用量,超声波处理时间,料液比 4 个主要因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验,以半边莲多糖得率作为评价指标,确定最佳提取工艺条件,参照单因素试验结果设计正交试验因素及水平(表 1),结果见表 2。

表 1 半边莲多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A pH	B 酶用量 /%	C 超声时间 /min	D 料液比
1	4.0	0.8	20	1:20
2	4.5	1.0	25	1:30
3	5.0	1.2	30	1:40

表 2 半边莲多糖提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	得率/%
1	1	1	1	1	4.084
2	1	2	2	2	4.968
3	1	3	3	3	4.245
4	2	1	2	3	4.046
5	2	2	3	1	3.511
6	2	3	1	2	3.362
7	3	1	3	2	3.835
8	3	2	1	3	4.096
9	3	3	2	1	4.071
$K_1$	13.297	11.965	11.542	11.666	
$K_2$	10.919	12.575	13.085	12.165	
$K_3$	12.002	11.678	11.591	12.387	
R	0.792	0.299	0.515	0.240	

由结果可知,各因素对多糖得率的影响顺序为 pH > 超声波时间 > 复合酶用量 > 料液比。最佳提取条件为  $A_1B_2C_2D_3$ ,即 pH 4.0,超声波提取 25 min,复合酶用量 1.0%,料液比 1:40。

**2.8 验证试验** 为了考察上述工艺的稳定性,按该工艺的最佳提取条件  $A_1B_2C_2D_3$  进行重复性试验 3 次,半边莲多糖平均得率为 6.072%,RSD 2.48%。

### 3 讨论

在多糖的提取过程中,使用酶可降低提取条件,在比较温和的条件中分解植物组织,加速多糖的释放或提取。而每种酶都有最适 pH,在此 pH 下催化反应的速率最高,过酸或过碱都会使酶的空间结构受到破坏,影响其与底物的结合,从而使多糖得率下降。

在单因素试验基础上,采用正交试验对半边莲水溶性多糖的提取工艺进行了初步研究,采用苯酚-硫酸法测定半边莲多糖的得率。结果表明,pH 对半边莲多糖得率的影响最大,超声波时间次之,其次复合酶用量,料液比的影响最小,得到最佳提取工艺。超声波协同复合酶提取法比传统的提取法具有节省能源、提取时间短、提取效率高、简单易行等多种优点。

### [参考文献]

- [1] 粟君,谭兴,李劲涛,等.半边莲生物碱的提取及其对胃癌细胞的抑制作用[J].西华师范大学学报:自然科学版,2007,28(4):311.
- [2] 张钰.中药多糖临床应用研究进展[J].甘肃医药,2008,27(4):31.
- [3] 石奇,樊君,石异.中性蛋白复合酶法提取大枣多糖的研究[J].时珍国医国药,2009,20(1):7.
- [4] 赖红芳,黄秀香,吴志鸿,等.鸡血藤多糖提取工艺研究[J].时珍国医国药,2010,21(8):1872.
- [5] 朱胤龙,陈萍,张亚环.稀针嗜蓝孢孔菌多糖分析方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(9):1.
- [6] 陈敏,林淑芳,邵爱娟,等.桑叶、茶叶及枸杞叶粗多糖样品的含量分析[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(8):6.

[责任编辑 仝燕]