

# 果胶酶法提取棉花根多糖的工艺研究<sup>△</sup>

包淑云<sup>1,2\*</sup>, 吴敏<sup>2</sup>, 朋礼备<sup>2</sup>, 张艳华<sup>1,2</sup> (1. 皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽省多糖药物工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241002)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3131-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.33

**摘要** 目的: 优选果胶酶法提取棉花根多糖的工艺。方法: 利用果胶酶水解与传统热水浸提相结合的方法提取棉花根多糖, 以多糖提取率为评价指标, 结合单因素试验和正交设计, 考察酶解温度、酶解时间、酶添加量和酶解 pH 4 个因素对多糖提取率的影响并进行验证试验。结果: 果胶酶法提取棉花根多糖的最优工艺为酶解温度 40 ℃、酶解时间 150 min、酶添加量 2.0%、酶解 pH 4.6。在此条件下, 棉花根多糖的平均提取率为 2.474% (RSD=3.34%, n=5)。结论: 果胶酶法是一种有效的棉花根多糖提取方法; 本试验优选工艺合理、可行。

**关键词** 果胶酶; 棉花根; 多糖; 提取; 单因素试验; 正交设计

## Study on Extraction Technology of Polysaccharides from *Gossypium herbaceum* L. by Pectinase Hydrolysis

BAO Shu-yun<sup>1,2</sup>, WU Min<sup>2</sup>, PENG Li-bei<sup>2</sup>, ZHANG Yan-hua<sup>1,2</sup> (1. School of Pharmacy, Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241002, China; 2. Polysaccharides Pharmaceutical Engineering Technology Research Center of Anhui Province, Anhui Wuhu 241002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of polysaccharides from *Gossypium herbaceum* L. by pectinase hydrolysis. METHODS: Polysaccharides were extracted from *G. herbaceum* L. by pectinase hydrolysis combined with traditional hot water extraction. With the extraction rate of polysaccharides as the evaluated index, single factor test and orthogonal design were applied to investigate the effects of 4 factors including enzymolysis temperature, enzymolysis time, the amount of enzyme and pH value on polysaccharides extraction rate, and verification tests were conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as enzymolysis temperature of 40 ℃, enzymolysis time of 150 min, enzyme accounting for 2.0%, pH value for enzymolysis of 4.6. Under the above conditions, the average extraction rate of polysaccharides from *G. herbaceum* L. was 2.474% (RSD=3.34%, n=5). CONCLUSIONS: Pectinase hydrolysis is an effective method to extract polysaccharides from *G. herbaceum* L.. The optimal extraction technology is reasonable and feasible.

**KEYWORDS** Pectinase; *Gossypium herbaceum* L.; Polysaccharides; Extraction; Single factor test; Orthogonal design

棉花根为锦葵科 Malvaceae 棉属植物草棉 *Gossypium herbaceum* L.、树棉 *G. arboreum* L. 及陆地棉 *G. hirsutum* L. 的根, 具有补气血、止咳、平喘、调经的作用, 能提高患者机体免疫功能, 民间常用于治疗咳嗽、哮喘、老年慢性支气管炎等<sup>[1-2]</sup>。据报道, 棉花根的醇提物与水提物具有止咳、祛痰、抗炎的作用<sup>[3]</sup>, 棉花根大枣煎剂对防治化疗引起的白细胞减少有较好的效果<sup>[4]</sup>; 棉花根可使老年小鼠红细胞和脑内丙二醛(MDA)含量明显下降、超氧化物歧化酶(SOD)活性增强、SOD/MDA 的比值显著升高<sup>[5]</sup>。棉花根多糖可能是棉花根的药效成分之一。笔者曾用超声波法提取棉花根多糖<sup>[6]</sup>。由于酶法作用条件温和、操作相对简单且具有较高的提取率, 也常用于多糖的提取。其中果胶酶可除去细胞壁中的果胶质, 从而有效地破除细胞壁, 使细胞中的多糖溶解出来<sup>[7]</sup>。因此, 本文主要探讨果胶酶法提取棉花根多糖的效果和工艺。

## 1 材料

△ 基金项目: 安徽省高等学校省级优秀青年人才基金项目 (No.2012SQRL126); 2013 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目 (No.201310368030)

\* 副教授, 博士。研究方向: 生药学及天然药物化学的教学及研究。电话: 0553-3932497。E-mail: bsyjx@163.com

## 1.1 仪器

UV-2550 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); FA2004 型电子分析天平 (上海良平仪器仪表有限公司); FW177 型中草药粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); HH 数显恒温水浴锅 (金坛市金城国胜电子实验仪器厂); TDL-5 型低速大容量离心机 (上海安亭科学仪器厂); SHB-3 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); Nicolet 380 型傅里叶红外光谱仪 (美国热电公司)。

## 1.2 药材、药品与试剂

棉花根于 2008 年 10 月采收于安徽省芜湖市, 经笔者鉴定为陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 的根, 洗净晾干, 经粉碎得棉花根粉末; D-无水葡萄糖对照品 (以下简称葡萄糖对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-200904, 供含量测定用, 纯度以 100% 计); 果胶酶 (上海华蓝化学科技有限公司, 活性: 1 000 u/mg); 苯酚、无水乙醇、浓硫酸、柠檬酸、柠檬酸钠等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法<sup>[8-9]</sup>测定多糖含量。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取105℃下干燥至恒质量的葡萄糖对照品20.0 mg,用蒸馏水溶解,定容至100 ml,摇匀,即得葡萄糖对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 采用果胶酶水解结合热水浸提法提取。精密称取棉花根粉末5.0 g,在加入一定量的果胶酶,于一定的温度、pH下酶解一定时间后,移入100℃水浴中加热5 min以灭活果胶酶,再加入100 ml蒸馏水,90℃浸提2 h,抽滤,得多糖提取液;滤液浓缩至10 ml,3 000 r/min离心(离心半径16 cm)30 min,取上清液,加入5倍体积无水乙醇,室温静置24 h,多糖沉淀析出;用95%乙醇洗涤3次,真空干燥得多糖。用蒸馏水溶解多糖并定容至100 ml,得供试品溶液。

2.1.3 吸收波长的选择 精密吸取棉花根多糖提取液和葡萄糖对照品溶液各0.5 ml,分别置于20 ml具塞试管中,依次加入5%苯酚溶液1.0 ml、浓硫酸5.0 ml,摇匀,室温放置30 min后在波长200~800 nm处进行扫描,测得二者的最大吸收波长均为484 nm波长,故选择484 nm作为多糖含量测定的波长。

2.1.4 标准曲线的制备 分别吸取葡萄糖对照品溶液5.625、11.25、16.875、22.5、28.125 ml至50 ml量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为22.5、45.0、67.5、90.0、112.5 μg/ml的葡萄糖对照品溶液;再分别吸取上述葡萄糖对照品溶液0.5 ml置于具塞试管中,分别加5%苯酚1.0 ml、浓硫酸5.0 ml,摇匀,室温放置30 min;以0.5 ml蒸馏水为空白,用紫外-可见分光光度计测定484 nm波长处的吸光度。以吸光度(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为 $y=0.006 0x+0.209 0$ ( $r=0.999 2$ )。结果表明,葡萄糖检测质量浓度线性范围为22.5~112.5 μg/ml。

2.1.5 精密度试验 按照“2.1.4”项下方法,测定67.5 μg/ml葡萄糖对照品溶液的吸光度,重复测定6次,结果吸光度的RSD=0.318%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.6 加样回收率试验 取2 ml棉花根多糖浓缩提取液,测定其多糖含量,然后分别加入相当于棉花根多糖含量80%、100%和120%的葡萄糖对照品,每组设3个平行样,按“2.1.4”项下方法测定吸光度,计算加样回收率,结果平均回收率为98.7%(RSD=0.42%, $n=3$ )。

2.1.7 多糖提取率的测定 吸取供试品溶液0.5 ml置于具塞试管中,参照2010年版《中国药典》方法(枸杞多糖的含量测定)加5%苯酚1.0 ml,摇匀,迅速精密加入浓硫酸5.0 ml,摇匀,室温放置30 min。以水为空白,照紫外-可见分光光度法,于484 nm波长处测定吸光度。将吸光度代入线性回归方程计算多糖质量浓度,再按此公式计算棉花根多糖提取率:多糖提取率=多糖质量/棉花根粉末质量×100%。

## 2.2 单因素试验

2.2.1 酶添加量对多糖提取率的影响 称取6份棉花根粉末5.0 g,分别加入0、0.02、0.04、0.06、0.08、1.0 g果胶酶(果胶酶添加质量相对于棉花根质量的占比分别为0、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%),然后保持酶解时间、温度和pH等其他提取条件不变,考察果胶酶添加量对多糖提取率的影响。具体为:在加入不同量的果胶酶后,均加入pH 5.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液

50 ml,于50℃水浴酶解120 min,移入100℃水浴加热5 min以灭活果胶酶,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液;取供试品溶液5 ml用蒸馏水稀释,定容至100 ml,吸取0.5 ml置于具塞试管中,加5%苯酚1.0 ml、浓硫酸5.0 ml,摇匀,室温放置30 min;以蒸馏水为参比,于484 nm波长处测定吸光度。结果显示,随着果胶酶量的增加,吸光度缓慢增加;至酶量达到1.6%时,吸光度达到0.83;再继续增加酶量,吸光度增加缓慢。从提取率和经济成本两方面考虑,最优酶用量为1.6%,故选择1.2%、1.6%、2.0%为正交试验中酶添加量的3个考察水平(但在下述单因素试验中均固定酶添加量为0.4%)。酶添加量对多糖提取率的影响见图1A。

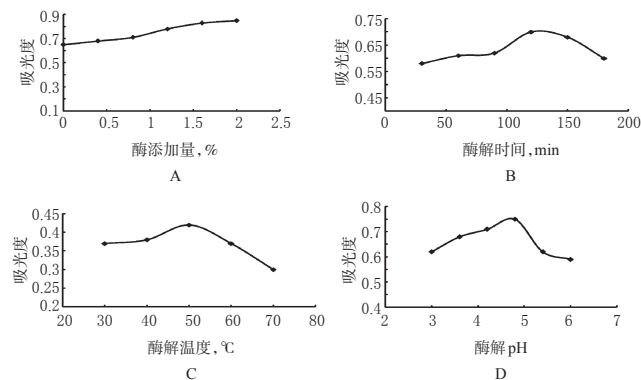


图1 各因素对多糖提取率的影响

A. 酶添加量; B. 酶解时间; C. 酶解温度; D. 酶解pH

Fig 1 Effects of the factors on the extraction rate of polysaccharides

A. amount of enzyme; B. enzymolysis time; C. enzymolysis temperature; D. pH value for enzymolysis

2.2.2 酶解时间对多糖提取率的影响 称取6份棉花根粉末5.0 g,各样品固定加入0.02 g果胶酶(添加量为0.4%),再加入pH 5.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液50 ml,于50℃水浴酶解30、60、90、120、150、180 min,后续操作同“2.2.1”项,考察不同酶解时间对多糖提取率的影响。结果显示,酶解不同时间处理得到的多糖溶液的吸光度分别为0.58、0.61、0.62、0.70、0.68、0.60。吸光度随酶解时间延长而增大,酶解120 min时的吸光度最大,若继续延长时间,吸光度反而下降,可能是长时间高温导致部分酶失活所致。因酶解120 min时的提取率最大,故选择90、120、150 min作为正交试验中提取时间的3个考察水平。酶解时间对多糖提取率的影响见图1B。

2.2.3 酶解温度对多糖提取率的影响 称取5份棉花根粉末5.0 g,各样品固定加入0.02 g果胶酶(添加量为0.4%),再加入pH 5.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液50 ml,分别在温度为30、40、50、60、70℃水浴中酶解120 min,然后移入100℃水浴加热5 min以灭活果胶酶,后续操作同“2.2.1”项,考察酶解温度对多糖提取率的影响。结果显示,经不同温度水浴酶解处理所得多糖溶液的吸光度分别为0.37、0.38、0.42、0.37、0.30。吸光度随酶解温度的升高而增大,50℃时的吸光度最大;若继续升温,吸光度减小,多糖提取率降低。故选择40、50、60℃作为正交试验中酶解温度的3个考察水平。酶解温度对多糖提取率的影响见图1C。

2.2.4 酶解 pH 对多糖提取率的影响 称取 6 份棉花根粉末 5.0 g,各样品固定加入 0.02 g 果胶酶(添加量为 0.4%),分别加入 pH 3.0、3.6、4.2、4.8、5.4、6.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 50 ml,于 50 ℃ 水浴酶解 120 min,后续操作同“2.2.1”项,考察不同酶解 pH 对多糖提取率的影响。结果显示,随着 pH 升高,吸光度逐渐增加;至 pH 4.8 时吸光度最大,随后下降,可见最优 pH 为 4.8。故选择 pH 4.6、4.8、5.0 作为正交试验中酶解 pH 的 3 个考察水平。酶解 pH 对多糖提取率的影响见图 1D。

### 2.3 正交试验设计

根据单因素试验结果,以果胶酶法提取的酶解温度(A)、酶解时间(B)、酶添加量(C)和酶解 pH(D)为考察因素,每个因素设 3 个水平,采用  $L_9(3^4)$  正交设计,以多糖提取率为评价指标,确定最优工艺参数。因素与水平见表 1,  $L_9(3^4)$  正交试验与结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 因素与水平  
Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(酶解温度),℃	B(酶解时间),min	C(酶添加量),%	D(酶解 pH)
1	40	90	1.2	4.6
2	50	120	1.6	4.8
3	60	150	2.0	5.0

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验与结果

Tab 2  $L_9(3^4)$  orthogonal design and results

试验号	因素				多糖提取率,%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.073
2	1	2	2	2	1.940
3	1	3	3	3	2.807
4	2	1	2	3	2.073
5	2	2	3	1	2.273
6	2	3	1	2	2.007
7	3	1	3	2	1.940
8	3	2	1	3	1.607
9	3	3	2	1	2.340
$K_1$	6.82	6.09	5.69	6.69	
$K_2$	6.35	5.82	6.35	5.89	
$K_3$	5.89	7.15	7.02	6.49	
R	0.31	0.44	0.44	0.27	

表 3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F
A	0.15	2.00	0.07	1.21
B	0.33	2.00	0.17	2.77
C	0.30	2.00	0.15	2.47
D	0.12	2.00	0.06	0.96
E(误差)	0.12	2.00	0.06	

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$

从表 3 可知,基于单因素试验确定的各因素水平,在正交试验方差分析结果中差异无显著性。由正交试验结果得出最优组合为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,即最优提取条件为酶解温度 40 ℃、酶解时间 150 min、酶添加量 2.0%、酶解 pH 4.6。

### 2.4 验证试验

分别称取 5 份棉花根粉末 5.0 g,依据最优工艺条件进行提取,再按“2.1.7”项下方法测定吸光度并计算,结果多糖提取率分别为 2.538 7%、2.546 7%、2.376 7%、2.515 3%、2.392 0%,平均提取率为 2.474%(RSD=3.34%,n=5)。

### 3 讨论

苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法是多糖含量测定的两种经典方法,本试验选用了前者测定棉花根多糖的含量。因苯酚在空气中会氧化而影响测定结果,故试验中使用的苯酚需要重新蒸馏后再使用。重蒸后的苯酚以及试验中制备好的 5% 苯酚溶液均需要避光冷藏保存,以尽量减少苯酚的氧化,保证测定结果的准确性。

本文通过单因素和正交试验设计,得出果胶酶法提取棉花根多糖的最优工艺条件为:酶解温度 40 ℃、酶解时间 150 min、酶添加量 2.0%、酶解 pH 4.6。在此优化工艺条件下,棉花根多糖的平均提取率为 2.474%,而超声波提取法的多糖提取率为 1.477%<sup>[6]</sup>,可见果胶酶法的多糖提取率略高于超声波提取法,是一种有效的多糖提取方法,这可能与果胶酶促进细胞壁破裂而增加多糖的溶出有关。

酶法提取除了可选用果胶酶外,常用的还有纤维素酶和蛋白酶,因此后续研究将关注单独应用纤维素酶或蛋白酶以及多种酶联用的复合酶法提取棉花根多糖的效果,并可进一步探索酶法与超声波法联用提取棉花根多糖的工艺。

### 参考文献

- [1] 贾美华.棉花子及其根皮的临床应用[J].上海中医药杂志,1992,26(4):31.
- [2] 马铁瑛.棉花根治疗老年慢性支气管炎 60 例[J].中国民间疗法,2000,8(3):31.
- [3] 包淑云,喻丽珍,于禧龙,等.棉花根醇提物与水提物的止咳祛痰抗炎作用研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(4):730.
- [4] 王擎玉,侯恩存.棉花根大枣煎剂防治化疗引起的白细胞减少临床研究[J].山东中医杂志,1996,15(9):392.
- [5] 欧芹,王玉民,白书阁,等.棉花根对老年小鼠红细胞和脑内 SOD 活性及 MDA 含量的影响[J].中国老年学杂志,1994,14(2):106.
- [6] 包淑云,赵志刚,陈靠山,等.超声波提取棉花根多糖的工艺研究[J].时珍国医国药,2013,24(1):118.
- [7] 李玲,王维香,王晓君.果胶酶法提取川芎多糖工艺的研究[J].中药材,2008,31(4):600.
- [8] 孔繁晟,李日许,蔡焕哲,等.响应面分析法优选南方红豆杉中多糖的提取工艺[J].中国药房,2014,25(7):614.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010 年版.北京:中国医药科技出版社,2010:232-233、附录 IV A.

(收稿日期:2014-11-03 修回日期:2014-12-10)

(编辑:刘 萍)