

樟树叶片水溶性粗多糖提取及抗氧化活性研究

王 娜, 王凯旋, 李 静, 苏柳依

(江苏科技大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018)

摘 要:以樟树叶片为试材,通过 $L_9(3^4)$ 正交实验,研究了水溶性多糖的最佳提取工艺和抗氧化活性。结果表明:以水为提取溶剂,料液比 1:110(g/mL),温度 80℃,提取 2 h 的条件下提取 2 次,多糖提取效果较好。在此组合条件下四季干叶片多糖含量分别为:93.8、77.00、83.35、116.55 mg/g。樟树叶片水溶性粗多糖在一定浓度范围内具有较强的清除过氧化氢能力,清除羟自由基、DPPH 自由基和还原能力较弱;抗氧化能力不如同浓度的 VC。

关键词:樟树;多糖;提取;抗氧化活性

中图分类号:S 792.23 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)24-0070-04

多糖是一类由单糖组成的天然高分子化合物,广泛存在于植物、动物、微生物等有机体中,由于多糖具有多种多样的生物功能,如免疫调节、抗肿瘤、抗炎、降血糖、抗衰老等,使得多糖生物资源的开发利用和研究日益活跃,成为天然药物、生物化学、生命科学的研究热点^[1-3]。樟树[*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.] 为樟树属常绿乔木植物,是我国特产珍贵用材和经济林树种,利用价值很高,可制香料、油脂、优质木材、工艺品、医药、日用化工品等^[3-4]。目前对樟树叶片黄酮、色素以及樟油和樟脑已有研究^[4-5],而对粗多糖的研究还未见报道。该研究采用了水提和加热相结合的方法,在研究樟树叶片水溶性多糖提取工艺的基础上,探讨了四季叶片粗多糖的含量以及其抗氧化性能,为樟树的综合利用提供依据。

1 材料与设备

1.1 试验材料

樟树成熟叶片,采自江苏科技大学校园内,洗净自然晾干后粉碎过 100 目筛,干粉于干燥器中密封保存。四季叶片分别在晴天采自 4、7、10 月和 1 月初。

1.2 主要试剂

葡萄糖、硫酸、苯酚、乙醇、邻苯三酚、三氯乙酸、硫酸亚铁、水杨酸、铁氰化钾等,均为国产分析纯;DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼),Sigma 公司。

1.3 主要仪器及设备

UV-9600 紫外可见分光光度计, KQ5200DB 型数控超声波清洗器, FA2104 型电子精密天平, Avanti J-25 高效大容量冷冻离心机(Beckman), DHG-9203A 型电热恒温鼓风干燥箱, HWS-20 恒温水浴箱等。

第一作者简介:王娜(1976-),女,山东烟台人,硕士,讲师,研究方向为植物生理生化。E-mail: biojustwn@126.com。

收稿日期:2010-10-08

2 试验方法

2.1 多糖含量测定

采用硫酸-苯酚法^[6]。准确称取 105℃干燥至恒重的葡萄糖,用蒸馏水配置成浓度为 0.04 mg/mL 的标准溶液。精密吸取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 的葡萄糖标准溶液于试管中,分别加蒸馏水到 2.0 mL,各加入 6%的苯酚溶液 1.0 mL,摇匀后再加入浓硫酸 5.0 mL,充分混匀后放置 30 min,冷却到室温后,在波长 490 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线(回归方程为 $Y=0.0107X+0.0377$, $r=0.9936$)。

2.2 多糖提取工艺

选用夏季的叶片,按料液比 1:10 加入比例为 1:9 的 95%乙醇和乙醚混合物(V/V)对樟树叶片进行静态脱脂,脱脂后 50℃烘干备用。以水为提取溶剂进行回流提取,选择料液比、提取温度和提取时间 3 个因素,各取 3 个水平,以 OD₄₉₀为试验指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验。

2.3 多糖抗氧化活性研究

2.3.1 清除 DPPH 能力测定^[7] 各取 2 mL 不同浓度的多糖溶液于试管中,再加入 2 mL 浓度为 0.04 mg/mL 的 DPPH 溶液,混合均匀,反应 20 min 后在 517 nm 处测其吸光值为 A_i ;另各取 2 mL 上述浓度多糖溶液于试管中,分别加入无水乙醇 2 mL,反应 20 min 后在 517 nm 处测其吸光值为 A_j ;以 2 mL 0.04 mg/mL DPPH 溶液和 2 mL 无水乙醇反应作参比,其吸光值记为 A_0 。相同浓度梯度 VC 溶液代替多糖溶液做同样处理,作为对照。清除率(%) = $[1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$ 。

2.3.2 清除羟自由基($\cdot OH$)能力测定 参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型^[8]。各取 2 mL 上述不同浓度多糖溶液,依次加入 2 mL 6 mmol/L 的 $FeSO_4$ 和 2 mL 6 mmol/L 的 H_2O_2 ,混合均匀后静置 10 min,再加入 2 mL 6 mmol/L 的水杨酸,混匀,静置 30 min,在 510 nm

处测其吸光值记为 A_i ; 用双蒸水代替水杨酸时的吸光度值记为 A_j 。空白对照组以双蒸水代替多糖溶液, 吸光值为 A_0 。清除率(%)=[1-(A_i-A_j)/ A_0] \times 100%。

2.3.3 还原能力测定 用普鲁士蓝法测定^[9], 在 2.5 mL pH 6.6 的磷酸盐缓冲液中加入不同浓度多糖溶液 1 mL、1% 铁氰化钾 2.5 mL, 混合物 50℃ 恒温 20 min 后, 再加 2.5 mL 10% 三氯乙酸 3 500 r/min 离心 10 min。取上清液加蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% FeCl₃ 0.5 mL, 700 nm 处测其吸光度值。吸光度越高, 表明样品的还原力越强。用 VC 溶液作为对照。

2.3.4 清除过氧化氢能力的测定 参照赵二芳^[10]的方法, 用 pH 7.4 的磷酸缓冲液配制 10 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液。取 5 mL 此 H₂O₂ 溶液分别加入上述不同浓度的多糖溶液 5 mL, 摇匀, 10 min 后用紫外分光光度计测定其在 230 nm 处的吸光度值, 记为 A_1 。实验中以不加样

品液的 H₂O₂ 溶液吸光度值为 A_0 , 以不加 H₂O₂ 溶液的样品液吸光值为 A_2 。按公式 $E=[A_0-(A_1-A_2)]/A_0\times 100\%$ 计算过氧化氢的清除率。

3 结果与分析

3.1 多糖提取工艺

3.1.1 料液比对多糖提取的影响 在水为提取溶剂, 提取时间 3 h, 提取温度 60℃ 条件下, 取不同的料液比 (1:80、1:90、1:100、1:110 和 1:120) 提取多糖, 提取 2 次, 合并滤液, 等量定容后计算多糖含量。结合考虑, 溶剂用量对提取液中的多糖含量有一定的影响。随着提取溶剂用量的逐渐上升, 物料与溶剂的接触面扩大, 多糖自细胞溶出后能更加充分的扩散到溶液中, 多糖含量逐渐上升, 当料液比 1:110 时达到最大值。此后随着提取溶剂的继续增加, 物料过于分散, 使多糖溶出量较少, 多糖含量下降。综合考虑, 料液比选择 1:110 为宜。

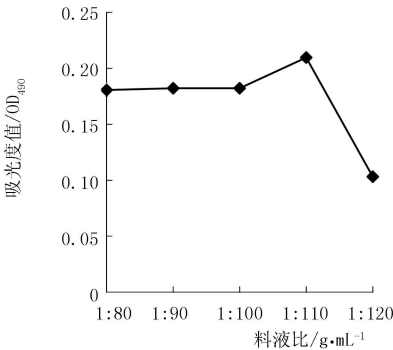


图1 料液比对多糖提取的影响

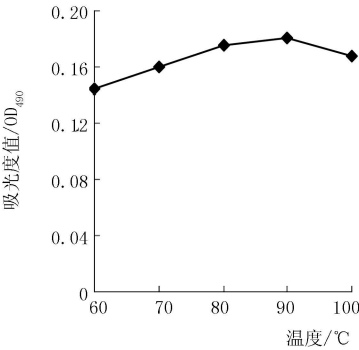


图2 温度对多糖提取的影响

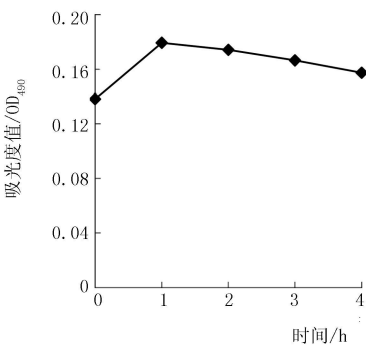


图3 时间对多糖提取的影响

3.1.2 温度对多糖提取的影响 水为提取溶剂, 固定料液比 1:110, 提取时间 3 h, 按照不同的提取温度提取多糖 2 次, 合并滤液, 等量定容后测定多糖含量, 由图 2 可知, 随着温度的增加, 吸光度逐渐增加, 即多糖含量增大, 温度 90℃ 时达到最大值, 随后, 温度增大多糖含量反而有所下降。综合考虑, 温度 90℃ 为最佳提取温度。

3.1.3 时间对多糖提取的影响 固定料液比 1:110, 按照不同的处理时间, 在 90℃ 下分别提取 2 次, 合并滤液, 等量定容后计算多糖含量, 由图 3 可知, 当提取时间为 1 h 时多糖含量最大, 超过 1 h 后多糖含量逐渐下降, 提取时间过长, 可能导致多糖的分解而致使多糖含量下降, 综合考虑, 1 h 为最佳提取时间。

3.1.4 正交分析 在单因素试验的基础上, 以提取温度、浸提时间和料液比作为主要因素进行正交实验设计, 对提取液中的多糖含量进行测定计算, 由表 1 可知, 在所试的 3 个因素中, 料液比对提取液中多糖含量影响最大, 时间次之, 温度影响最小。其理论最优提取工艺为 $A_3B_2C_2$, 即料液比 1:110、时间 2 h、温度 80℃, 其组合条件不在该正交实验组中, 按照 $A_3B_2C_2$ 进行补充试验, 其提取液中的 OD₄₉₀ 值为 0.157, 高于正交实验中的

最高值。因此, 采用水提加热提取樟树叶多糖时, 按 1:110 料液比, 80℃ 提取温度, 浸提 2 h 时, 多糖含量达到最高值。在此最佳提取组合条件下测定四季干叶片多糖含量分别为: 93.8、77.00、83.35、116.55 mg/g。冬季含量最高, 这与植物积蓄渗透调节物质以度过低温冬天有关。

表 1 正交实验结果

编号	料液比/g·V ⁻¹	时间/h	温度/℃	OD 值/490 nm
1	1:90	1	70	0.082
2	1:90	2	80	0.086
3	1:90	3	90	0.069
4	1:100	1	80	0.087
5	1:100	2	90	0.093
6	1:100	3	70	0.063
7	1:110	1	90	0.100
8	1:110	2	70	0.118
9	1:110	3	80	0.124
10*	1:110	2	80	0.157
K1	0.237	0.269	0.263	
K2	0.243	0.297	0.297	
K3	0.342	0.256	0.262	
R	0.105	0.041	0.035	

注: *表示补充试验。

3.2 多糖抗氧化活性

3.2.1 清除 DPPH 自由基 樟树叶片多糖具有一定的

清除 DPPH 自由基能力, 在既定浓度范围内, 各溶液清除 DPPH 的能力均随浓度的升高而有所增强, 但多糖的清除能力不及同浓度 VC(图 4)。在较低浓度 (< 0.04

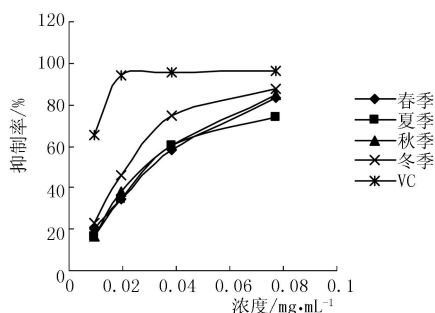


图 4 多糖对 DPPH 自由基的清除能力

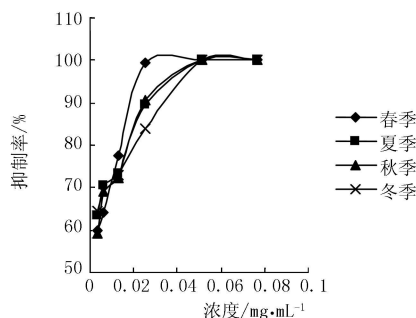


图 6 多糖对过氧化氢的清除能力

3.2.2 清除羟自由基 樟树叶片多糖清除羟自由基能力如图 5 所示, 在既定浓度范围内, 叶片多糖清除羟自由基的能力随着溶液浓度增高而加强, 但总体清除能力较弱, 抑制率均在 50% 以下。在较低浓度范围内 (< 0.04 mg/mL), 春、冬季清除能力高于夏、秋季, 而后逐渐趋于缓和, 随浓度的增加变化不大; 夏、秋季清除能力一直增强, 在 0.07 mg/mL 以后, 明显高于春、冬季。

3.2.3 清除过氧化氢 由图 6 可知, 在既定浓度范围内, 随着浓度的增大, 多糖清除过氧化氢的能力显著增强, 在 0.05 mg/mL 时甚至可达到 100% 清除, 说明樟树叶片多糖具有较强清除过氧化氢的能力。四季叶片清除能力趋势一致, 能力相当。

3.2.4 多糖的还原能力 吸光度值越高, 说明溶液的还原性越强。由图 7 可知, 各溶液还原能力都随着溶液浓度的增高而增强。在测定浓度范围内, 多糖的还原能力均明显低于 VC。且四季叶片多糖的还原能力基本相当。

4 结论

樟树叶片多糖的加热水提法工艺简单, 成本较低, 提取含量较高。最佳提取工艺为: 料液比为 1:110, 提取温度为 80℃, 提取时间为 2 h, 提取 2 次。樟树叶片多糖具有一定的抗氧化能力, 清除过氧化氢能力较强, 清

mg/mL) 下春、夏、秋季的清除能力相当, 均达到 50% 以上, 而在较高浓度时, 夏季多糖清除率明显低于春、秋季; 冬季多糖的清除能力略强于春、夏、秋季。

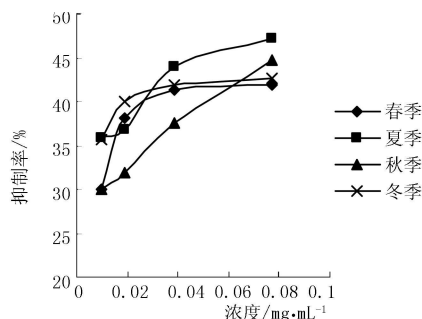


图 5 多糖对羟自由基的清除能力

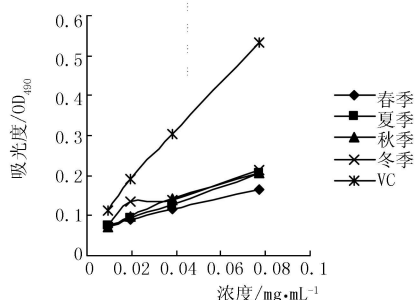


图 7 多糖的还原能力

除羟自由基、DPPH 自由基和还原能力较弱, 抗氧化能力不如同浓度的 VC。

参考文献

- [1] 张彦民, 李宝才, 朱利平, 等. 多糖化学及其生物活性研究进展[J]. 昆明理工大学学报(理工版), 2003, 28(3): 140-145.
- [2] 金春雁, 张卫明, 顾冀平, 等. 药用植物多糖的结构与生物活性[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(1): 15-18.
- [3] 王春台, 刘学群. 樟树落叶棕黑色色素的稳定性及其应用[J]. 中南民族学院学报(自然科学版), 1997, 16(1): 44-47.
- [4] 孙崇鲁, 黄克瀛, 陈丛瑾, 等. 香樟叶中黄酮类化合物提取方法和抗氧化性的研究[J]. 化学工程师, 2006(7): 4-6.
- [5] 汤青云, 李界斌, 雷存喜. 樟树中樟油和樟脑的提取[J]. 益阳师专学报, 2000, 17(5): 49-50.
- [6] 沈爱英. 叶面消毒对桑叶有机养分的影响[J]. 蚕业科学, 2003, 29(2): 189-192.
- [7] Decker E A, Welch B I. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(3): 674-677.
- [8] 李贵荣, 杨胜圆. 党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 化学世界, 2001, 42(8): 421-422.
- [9] 吕晓玲, 曹东旭. 天然萝卜红色素的抗脂质过氧化功能[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 19-21.
- [10] 赵二芳, 梁泽, 张海容. 沙棘叶对亚硝酸盐清除作用的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 81-82.

新疆树上干杏不定芽再生影响因子的研究

周 黎¹, 王晓军¹, 刘 敏¹, 刘 峰¹, 郝秀英²

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆农业科学院 微生物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要:以新疆树上干杏茎段为材料, 研究了外植体消毒、植物激素的种类及其浓度和取材时间等因素对茎段不定芽再生的影响。结果表明:75%酒精 30 s+0.1% HgCl₂ 5 min+15% H₂O₂ 20 min 具有较好的灭菌效果, 且不会较大影响茎段不定芽的再生; 最适诱导不定芽再生的培养基为改良 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 培养 15 d 后出芽率可达到 90.8%; 分裂素 TDZ 促进不定芽再生的效果优于 6-BA; 春季取材效果明显优于夏季取材。

关键词:杏; 不定芽; 再生

中图分类号: S 662.2(245) 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)24-0073-03

新疆树上干杏, 又名吊树干, 因其果实成熟后可一直在树上脱水风干不落果而得名。该杏原为山上野杏, 被果农发现后经栽培嫁接被广泛种植^[1], 现为新疆兵团农四师六十一团独特的优良品种。树上干杏无论是干果还是鲜果品味都极好, 其核壳极薄, 轻磕即破, 果仁香甜可口, 实为风沙地区的无价之宝^[2]。自 RACHE^[3]报道杏离体叶片经胚状体培养获得再生植株以来, Tornero^[4-5]、马峰旺^[6]、石荫坪^[7]等对杏的离体再生系统

的建立做了详细的研究。由于杏的再生体系的建立受基因型、组织来源、生理状态等多种因素的影响, 每一种杏再生体系的建立所需的条件都不相同。到目前为止只有特早熟杏、大扁杏^[8]、山杏等某些品种上初步建立了离体器官再生体系, 而树上干杏至今尚未建立完善的再生体系。试验对树上干杏不定芽再生的有关因素进行了研究, 以期建立完善的再生体系, 为进一步开展树上干杏的遗传育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以新疆伊犁清水县六十一团果园内树上干杏的当年新生杏枝为试材。

1.2 试验方法

试验均采用改良 MS 为基本培养基, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 5.8。培养温度为 20℃, 光照强度为 2 000 lx, 光周期(昼/夜)为 15 h/9 h。

第一作者简介:周黎(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物生理生化。E-mail: 1483548161@qq.com。
通讯作者:王晓军(1962-), 男, 硕士, 研究员, 现从事植物资源利用研究工作。E-mail: wangxj@ms.xjb.ac.cn。
基金项目:中科院“西部行动计划高新技术”资助项目(KGCXZ-YW-509)。
收稿日期:2010-10-25

Study on Extraction and Antioxidant Activity of Water-soluble Coarse Polysaccharides from Camphor Tree

WANG Na WANG Kai-xuan, LI Jing, SU Li-yi

(College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018)

Abstract: Taking leaves of camphor tree as test material, through L₉(3⁴)orthogonal experiment, the extraction method of the water-soluble polysaccharides and antioxidation activity were studied. The results showed that the ratio of sample to water was 1 : 110, the temperature of extraction was 80℃, the time of extraction was 2 hours and extracting two times. The contents of polysaccharides in leaves of four seasons were respectively 93.8, 77.00, 83.35 and 116.55 mg/g. The water-soluble coarse polysaccharides had higer scavenging ability to H₂O₂, but lower to hydroxyl radical, DPPH free radica and restoring ability in a certain range of concentration. The antioxidant activity was not as good as VC.

Key words: camphor tree; polysaccharides; extraction; antioxidant activity