

doi:10.11937/bfyy.20170326

银叶树果壳多糖的提取及抗氧化性

庞庭才¹, 胡上英², 黄海¹, 龚斌³, 何小华¹

(1. 广西高校北部湾特色海产品资源开发与高值化利用重点实验室, 钦州学院, 广西 钦州 535000;

2. 钦州学院 电子与信息工程学院, 广西 钦州 535000; 3. 钦州学院 海洋学院, 广西 钦州 535000)

摘要:以银叶树果壳为试材, 采用单因素试验和响应面法研究了水浴醇提银叶树果壳多糖的工艺条件, 并考察其对 DPPH·、·OH 的清除能力。结果表明: 银叶树果壳多糖的最佳提取工艺为, 提取温度 72℃、提取时间 53 min、液料比 64:1 mL·g⁻¹、提取次数 2 次, 该条件下银叶树果壳多糖得率为 14.01%。银叶树果壳多糖对 DPPH·、·OH 均具有一定的清除能力, 其清除能力与多糖浓度呈线性关系, 表明银叶树果壳多糖具有较好的抗氧化能力。

关键词:银叶树; 果壳; 多糖; 抗氧化性

中图分类号:Q 946.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)14-0118-06

银叶树(*Heritiera littoralis*)属梧桐科半红树植物, 是热带、亚热带海岸红树林中比较典型的水陆两栖乔木树种, 主要分布于我国广东、广西和台湾等地区^[1]。其果实形状奇特, 为近椭圆形或扁圆形或近心形, 果皮木质化, 外果皮坚硬^[2]。已有研究表明, 银叶树具有较高的食药价值, 其种子可食用, 也可榨油; 其树皮可熬汁治疗糖尿病、腹泻和赤痢等^[3-6]; 其叶子中提取的物质亦具有一定的抗癌活性^[7]。但目前对银叶树果壳的开发和利用尚鲜见相关研究。

植物多糖常用的提取方法有水提醇沉法、酸(碱)提法、酶解辅助提取、离子交换技术、超滤膜提取技术、超声提取技术以及各种技术合用等^[8], 不同的方法有各自的优缺点以及使用范围。水提

醇沉法是利用多糖不溶于乙醇等有机溶剂从而达到分离提纯的目的, 该提取方法具有操作简单、设备要求比较低等特点, 是当前植物多糖提取领域中应用最为广泛的方法。因此, 现以银叶树果壳为原料, 采用水提醇沉法通过单因素试验和响应面法优化银叶树果壳多糖的提取工艺, 并研究其对 DPPH·、·OH 的清除能力, 以期为进一步开发和利用广西特色红树林资源提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试银叶树果壳采于广西防城港, 70℃烘干后粉碎并过 80 目备用。乙醇、丙酮、乙醚、硫酸、水杨酸、过氧化氢、邻苯三酚、盐酸、硫酸铁、氢氧化钠等均为分析纯; SZ-500A-3 型高速粉碎机(永康市善竹贸易有限责任公司); UV-3200 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); EL20 pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); ZRD-A5110A 型数显电热干燥器(上海智城分析仪器制造有限公司); EL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); RE-3000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

第一作者简介:庞庭才(1985-), 男, 硕士, 实验师, 研究方向为动植物活性成分提取与分析。E-mail: pangtingcai@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31560727); 广西自然科学基金资助项目(2016GXNSFAA380067); 广西高校北部湾特色海产品资源开发与高值化利用重点实验室(钦州学院)基金资助项目(2016ZB08)。

收稿日期:2017-04-06

1.2 试验方法

1.2.1 银叶树果壳多糖提取工艺流程

称取银叶树果壳粉末 2 g, 用一定量的蒸馏水浸泡 30 min, 放入恒温水浴锅提取一定时间, 趁热抽滤。滤液于旋转蒸发仪减压浓缩至适当体积, 冷却至室温后加 95% 乙醇使醇含量达 80% 以上, 静置过夜, 分别用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次, 抽滤取滤渣, 自然干燥, 即得银叶树果壳粗多糖^[9]。

1.2.2 银叶树果壳多糖含量的测定方法

采用蒽酮-硫酸法测定银叶树果壳中多糖含量^[10]。多糖得率(%) = 粗多糖的质量/银叶树果壳粉末质量 × 100。

1.2.3 单因素试验设计

根据不同因素对多糖得率的影响, 选取提取温度、提取时间、液料比、提取次数 4 个因素, 进行单因素试验。提取温度的影响: 在设定提取时间 40 min, 液料比为 60 : 1 mL · g⁻¹, 提取次数 1 次条件下, 温度分别设置为 40、50、60、70、80 °C, 探究提取温度对银叶树果壳多糖得率的影响。提取

时间的影响: 在设定提取温度为 70 °C, 液料比为 60 : 1 mL · g⁻¹, 提取次数 1 次条件下, 提取时间分别设置为 30、40、50、60、70 min, 探究提取时间对银叶树果壳多糖得率的影响。液料比的影响: 在设定提取温度为 70 °C, 提取时间为 50 min, 提取次数 1 次条件下, 液料比分别设置为 30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1 mL · g⁻¹, 探究液料比对银叶树果壳多糖得率的影响。提取次数的影响: 在设定提取温度为 70 °C, 提取时间为 50 min, 液料比为 60 : 1 mL · g⁻¹ 条件下, 提取次数分别设置为 1、2、3、4、5 次, 探究提取次数对银叶树果壳多糖得率的影响。

1.2.4 响应面试验设计

在单因素试验基础上, 以提取温度 A、提取时间 B、料液比 C、提取次数 D 为自变量, 银叶树果壳多糖得率 Y 为响应值, 利用 Design-Expert 统计分析软件, 采用响应面分析方法对银叶树果壳多糖提取工艺进行优化分析。响应面试验因素水平见表 1。

表 1

响应面因素水平

Table 1

Factors and levels in Box-Behnken design

水平	A 提取温度	B 提取时间	C 液料比	D 提取次数
Level	Extraction temperature/°C	Extraction time/min	Liquid-solid ratio/(mL · g ⁻¹)	Times of extraction/次
-1	60	40	50 : 1	1
0	70	50	60 : 1	2
1	80	60	70 : 1	3

1.2.5 多糖抗氧化性试验

对 DPPH 自由基清除率测定: 在 25 mL 比色管中分别加入 2 mL 浓度为 0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 mg · mL⁻¹ 的银叶树果壳多糖溶液。再加入 2 mL 0.2 mmol · L⁻¹ DPPH · 溶液, 摇匀, 室温置于避光处反应 0.5 h, 取一定量的溶液在波长 517 nm 处测定吸光度 A₁。等量无水乙醇代替 DPPH · 溶液的吸光度 A₂, 以 2 mL DPPH · 溶液加 2 mL 蒸馏水为空白吸光度 A₀。同时用维生素 C 作为参照^[11]。DPPH · 清除率(%) = $\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$ 。式中, A₀: 2 mL DPPH · + 2 mL 蒸馏水吸光值; A₁: 2 mL DPPH · + 2 mL 样品溶液吸光值; A₂: 2 mL 样品溶液 + 2 mL 无

水乙醇吸光值, 以无水乙醇溶液作为参比。对羟基自由基清除率测定: 在 10 mL 的试管中加入 2 mL 6 mmol · L⁻¹ FeSO₄ 溶液, 再分别加入 2 mL 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg · mL⁻¹ 的银叶树果壳多糖溶液, 再加入 2 mL 6 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 溶液, 摇匀, 静置 10 min, 后加入 2 mL 6 mmol · L⁻¹ 的水杨酸溶液, 摇匀, 静置 30 min, 在波长 510 nm 处测吸光度^[12], 以维生素 C 作阳性对照组, 按以下公式算出各试样对羟基自由基的清除率。·OH 清除率(%) = $\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$ 。式中, A₀: 以蒸馏水代替样品的空白吸光值; A₁: 为样品组吸光值; A₂: 不加水杨酸溶液时样品吸光值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取温度对银叶树果壳多糖得率的影响

由图 1 可知,随着提取温度的升高,银叶树果壳多糖的得率呈递增趋势,并在 70 °C 时达到最大值。70 °C 之后多糖得率随温度的升高呈降低趋势。这可能是在低温条件下,分子的运动速度随着温度的升高而加快,使得多糖的溶出速率加快,但温度过高造成多糖水解,从而降低了得率^[13],因此,选择最佳提取温度为 70 °C。

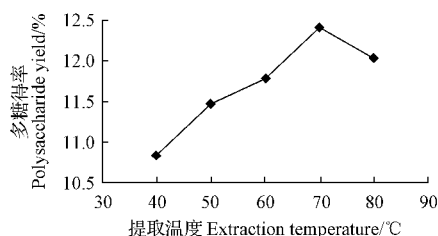


图 1 提取温度对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on extraction yield of polysaccharides

2.1.2 提取时间对银叶树果壳多糖得率的影响

由图 2 可知,随着提取时间的增加,银叶树果壳多糖的得率呈现先增长后下降的趋势,当提取时间为 50 min 时得率达到最大值。这是因为适当的提取时间有利于样品中多糖成分的浸出,但时间过长则容易引起多糖结构变化和破坏^[14]。因此,选择最佳提取时间为 50 min。

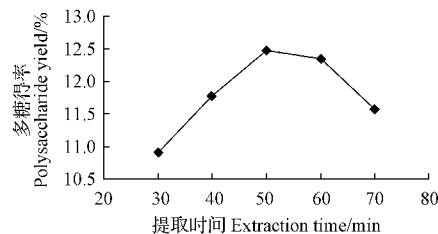


图 2 提取时间对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on extraction yield of polysaccharides

2.1.3 液料比对银叶树果壳多糖得率的影响

由图 3 可知,随着液料比的增大银叶树果壳多糖的得率呈逐渐上升随后下降的趋势,液料比

为 60 : 1 mL · g⁻¹ 时得率达到最大值。这可能是因为提取溶剂过大造成浓缩困难,浓缩时间的延长破坏多糖结构,使多糖损失率增加^[15]。因此,综合考虑选择液料比 60 : 1 mL · g⁻¹ 为宜。

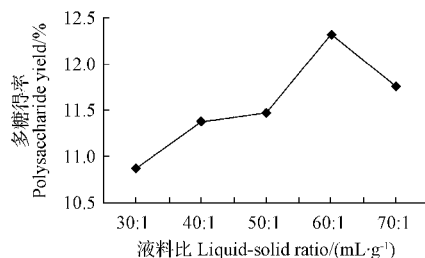


图 3 液料比对多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of liquid-solid ratio on extraction yield of polysaccharides

2.1.4 提取次数对银叶树果壳多糖得率的影响

由图 4 可知,多糖在提取 2 次以后其得率呈逐渐平缓的趋势,这是因为当提取次数达到一定值时多糖基本被提取出来,而过多的提取次数不但没有较好的效果反而会造成资源的浪费。因此,考虑生产成本选择最佳提取次数为 2 次。

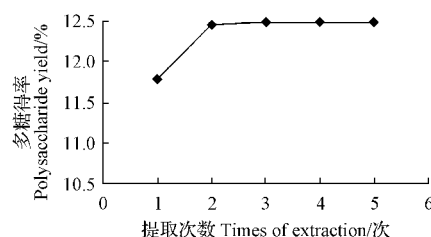


图 4 提取次数对多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of times on extraction yield of polysaccharides

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面试验结果与显著性分析

通过 Design-Expert 软件对响应面试验结果(表 2)进行回归拟合后,得到回归方程: $Y = -46.71042 + 1.22742A + 0.55708B + 0.085333C - 0.67500D - 1.35000 \times 10^3 AB + 4.77500 \times 10^3 AC + 9.25000 \times 10^3 AD + 3.07500 \times 10^3 BC - 0.021500BD + 0.094000CD - 0.010312A^2 - 5.80000 \times 10^3 B^2 - 6.2875 \times 10^3 C^2 - 1.05750D^2$ 。

表 2 响应面分析试验结果

Table 2 Design and results of response surface methodology test

试验号	因素 Factor				得率
No. of test	A	B	C	D	Yield/%
1	-1	-1	0	0	11.68
2	-1	1	0	0	12.39
3	1	-1	0	0	12.34
4	1	1	0	0	12.51
5	0	0	-1	-1	12.92
6	0	0	1	-1	11.07
7	0	0	-1	1	11.36
8	0	0	1	1	13.27
9	-1	0	0	-1	11.08
10	1	0	0	-1	11.51
11	-1	0	0	1	11.92
12	1	0	0	1	12.72
13	0	-1	-1	0	12.46
14	0	1	-1	0	12.64
15	0	-1	1	0	12.12
16	0	1	1	0	13.53
17	-1	0	-1	0	11.67
18	1	0	-1	0	11.93
19	-1	0	1	0	11.82
20	1	0	1	0	12.99
21	0	-1	0	-1	11.78
22	0	1	0	-1	12.47
23	0	-1	0	1	12.71
24	0	1	0	1	12.54
25	0	0	0	0	14.19
26	0	0	0	0	13.76
27	0	0	0	0	13.82

由表 3 可知,模型 $P < 0.000 1$ 达到极显著水平,而失拟项 $P = 0.553 5$ 不显著,表明试验数据可信。由于相关系数 $R^2 = 95.5\%$,说明回归方程拟合度良好。由 P 值可知,方程的 D 、 A^2 、 C^2 、 D^2 均为极显著项, A 、 B 、 AC 、 BC 、 B^2 为显著项,表明各因素交互作用对多糖得率有显著影响。由 F 值可知,各因素对多糖得率的影响次序是提取次数>提取时间>提取温度>液料比。

2.2.2 各因素交互作用分析

由图 5 可知,各因素之间在多糖提取过程中相互作用,响应面斜度越陡峭,表明响应值受提取条件改变的影响就越大,反之如果响应面斜度相对较平,表明响应值受提取条件改变的影响就越小。

2.3 最佳提取工艺与验证试验

对响应面优化分析可知,银叶树果壳多糖的最佳提取参数为提取温度 $71.87\text{ }^\circ\text{C}$,提取时间 52.48 min ,液料比 $63.50 : 1\text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,提取次数 2.26 次,在此条件下,多糖理论得率为 14.03% 。从实际操作性方面考虑,将最佳提取参数修正为提取温度 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 、提取时间 53 min 、液料比 $64 : 1\text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,提取次数为 2 次,实际测得银叶

表 3 方差结果分析

Table 3 Analysis of variance of the regression model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	$\text{Prob} > F$	显著性
Source	Sum of squares	Df	Mean square	F value		Significance
模型 Model	16.35	14	1.17	18.12	$< 0.000 1$	**
A	0.54	1	0.54	8.34	0.013 6	*
B	0.70	1	0.70	10.80	0.006 5	*
C	0.056	1	0.056	0.87	0.369 6	
D	1.13	1	1.13	17.60	$< 0.000 1$	**
AB	0.073	1	0.073	1.13	0.308 5	
AC	0.91	1	0.91	14.15	0.002 7	*
AD	0.034	1	0.034	0.53	0.480 2	
BC	0.38	1	0.38	5.87	0.032 2	*
BD	0.18	1	0.18	2.87	0.116 1	
CD	3.53	1	3.53	54.83	$< 0.000 1$	**
A^2	5.67	1	5.67	87.98	$< 0.000 1$	**
B^2	1.79	1	1.79	27.83	0.000 2	*
C^2	2.11	1	2.11	32.71	$< 0.000 1$	**
D^2	5.96	1	5.96	92.52	$< 0.000 1$	**
纯误差	0.12	2	0.058			
失拟项	0.66	10	0.066	1.14	0.553 5	
残差	0.77	12	0.064			
总差	17.12	26				

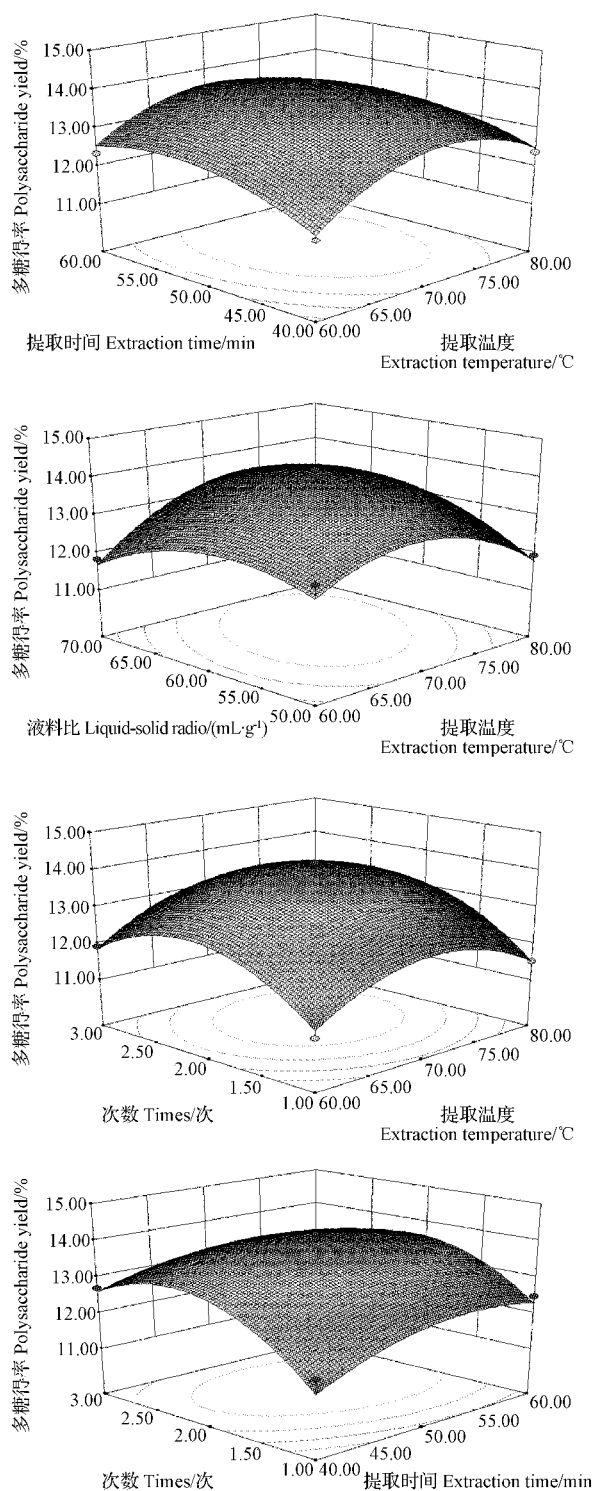


图5 各因素交互作用对多糖得率影响的
曲面图和等高线

Fig. 5 Response surface plots and contour line of the effects of interaction between each factor on polysaccharides yield

树果壳多糖平均得率为 14.01%, 与理论得率相差 0.02 个百分点, 说明回归模型能够准确预测各因素对得率的影响。

2.4 抗氧化性结果与分析

2.4.1 DPPH 自由基的清除结果

从图 6 可以看出, 银叶树果壳多糖对 DPPH 自由基具有良好的清除效果, 随着多糖浓度的增大, 对 DPPH 自由基的清除效果也呈现增强的趋势, 当多糖浓度达到 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 清除率达到 60% 以上, 但仍稍逊于同等浓度维生素 C 溶液。由此可见, 银叶树果壳多糖对 DPPH 自由基具有比较良好清除能力。

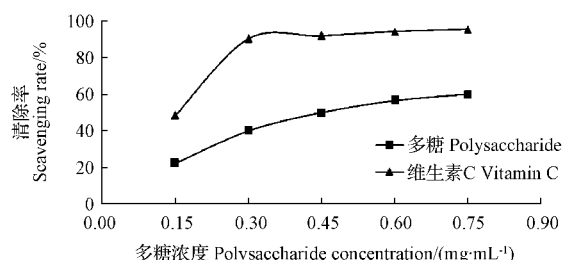


图6 银叶树果壳多糖清除 DPPH 自由基的能力

Fig. 6 Scavenging activity of polysaccharide on DPPH radical

2.4.2 羟基自由基的清除结果

由图 7 可以看出, 银叶树果壳多糖对羟基自由基表现出较好的清除效果, 当银叶树果壳多糖浓度达到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 对羟基自由基的清除率达到 56.8%, 其清除能力不及同等条件下的维生素 C 溶液, 但仍表明银叶树果壳多糖对羟基自由基具有一定的清除能力。

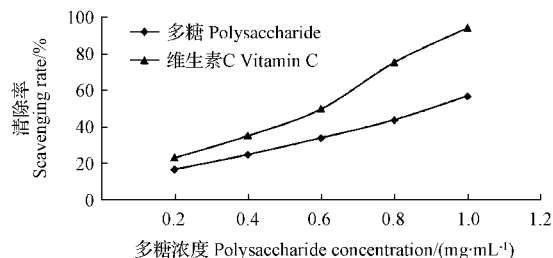


图7 银叶树果壳多糖清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的能力

Fig. 7 Scavenging activity of polysaccharide on hydroxyl radical

3 结论

通过单因素试验和响应面分析法对银叶树果壳多糖的提取工艺进行优化分析,得出最佳提取工艺理论条件为:提取温度 71.87 °C,提取时间 52.48 min,液料比 63.50 : 1 mL · g⁻¹,提取次数 2.26 次,预测多糖得率为 14.03%。从可操作性方面考虑,将最佳提取工艺条件调整为 72 °C、提取时间 50 min、液料比为 64 : 1 mL · g⁻¹、提取次数 2 次。在此条件下,银叶树果壳多糖的实际得率为 14.01%,与理论得率相差 0.02 个百分点,说明回归模型能够准确预测各因素对得率的影响。

银叶树果壳多糖对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除效果均呈量效递增的趋势,当多糖浓度达到 0.75 mg · mL⁻¹时,对 DPPH 自由基清除率达到 60%以上;当多糖浓度达到 1.0 mg · mL⁻¹时,对羟基自由基的清除率达到 56.8%,说明银叶树果壳多糖对 DPPH 自由基、羟基自由基均具有较为良好的清除能力。

参考文献

- [1] 韩维栋,王秀丽. 银叶树研究进展[J]. 广东林业科技,2013,29(6):80-84.
- [2] 曾聪,范航清. 红树植物银叶树果实和种子的形态结构研究[J]. 广西科学,2006,13(2):147-150.
- [3] 林鹏. 我国药用的红树植物[J]. 海洋药物,1984(4):45-51.
- [4] TOMLINSON P B. The botany of *Mangroves* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1986: 374-381.
- [5] DAS P, BASAK U C, DAS A B. Metabolic changes during rooting in pre-girdled stem cuttings and air-layers of *Heritiera* [J]. Botanical Bulletin of Academic Sinica, 1997, 38: 91-95.
- [6] BANDARANAYAKE W M. Traditional and medicinal uses of mangroves [J]. Mangroves and Salt Marshes, 1998(2): 133-148.
- [7] TIAN Y, WU J, ZHANG S. Flavonoids from leaves of *Heritiera littoralis* D [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2004, 13(3): 214-216.
- [8] 王涛,赵谋明. 多糖的研究进展[J]. 现代食品科技,2007,23(1):103-106.
- [9] 陈耀华,陈健. 响应面法优化鸡枞菌多糖的提取工艺[J]. 现代食品科技,2012,28(5):541-544.
- [10] 庞庭才,钟秋平,熊拯,等. 响应面分析法优化碱蓬多糖提取工艺及其抗氧化性分析[J]. 南方农业学报,2015,46(7):1280-1286.
- [11] 祝元婷,吴文林,张利,等. 超声提取鼠尾草叶多糖工艺优化及其 DPPH 自由基清除能力评价[J]. 食品科学,2011,32(16):76-79.
- [12] 李翔,上官新晨,蒋艳,等. 紫红薯多糖的提取纯化及抗氧化作用研究[J]. 江西农业大学学报,2011,33(4):823-829.
- [13] 岳金玖,蒲彪,陈安均,等. 响应面法优化块菌多糖的提取工艺[J]. 食品工业科技,2012,33(16):271-274.
- [14] 任丹丹,陈谷. 响应面法优化黄秋葵多糖超声提取工艺[J]. 食品科学,2011,32(8):143-146.
- [15] 张晓伟,王淑敏,王德国,等. 银条多糖的提取工艺及其抑菌性研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(7):25-28.

Extraction Conditions and Antioxidation Activity of *Heritiera littoralis* Shell Polysaccharide

PANG Tingcai¹, HU Shangying², HUANG Hai¹, GONG Bin³, HE Xiaohua¹

(1. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Development and High-value Utilization of Beibu Gulf Seafood Resources/Qinzhou University, Qinzhou, Guangxi 535000; 2. School of Electronics and Information Engineering, Qinzhou University, Qinzhou, Guangxi 535000; 3. Ocean College, Qinzhou University, Qinzhou, Guangxi 535000)

Abstract: *Heritiera littoralis* shell was used as materials, the process conditions of using alcohol water bath method to extract *Heritiera littoralis* shell polysaccharide was studied by single factor test and response surface analysis, as well as the scavenging effect of *Heritiera littoralis* shell polysaccharide on DPPH · and hydroxyl radical were studied. The results showed the optimal extracting conditions were as follows, extracting temperature 72 °C, extracting time 53 minutes, liquid-solid ratio 64 : 1 mL · g⁻¹, extracting twice. Under such conditions, the extraction ratio of *Heritiera littoralis* shell polysaccharide was 14.01%. Scavenging effect of *Heritiera littoralis* shell polysaccharide on DPPH · and hydroxyl radical were obvious, which appeared linear. It showed that the antioxidation activity of *Heritiera littoralis* shell polysaccharide appeared well.

Keywords: *Heritiera littoralis*; shell; polysaccharide; antioxidation activity