

杨梅叶多糖的提取及抗氧化性研究

李粉玲, 蔡汉权, 林敏

(韩山师范学院, 广东 潮州 521041)

摘要:以杨梅叶为试材,采用超声波辅助提取技术研究了杨梅叶粗多糖的最佳提取工艺条件以及杨梅叶中多糖的抗氧化性。结果表明:超声波辅助提取杨梅叶多糖的最佳工艺为超声波功率 250 W,超声波处理 20 min,超声波温度 65℃,料液比 1:60 g/mL;其中,超声波温度对杨梅叶多糖提取率的影响最大;杨梅叶中的多糖对·OH 和 O_2^- 均有明显的清除作用,具有一定的还原能力,即杨梅叶多糖具有抗氧化性。

关键词:杨梅叶;多糖;超声波;提取率;抗氧化性;最佳工艺

中图分类号:S 667.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0119-05

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)属杨梅科(Myricaceae)杨梅属多年生常绿乔木,是我国特色水果,以浙江省种植面积最大^[1]。杨梅为药食两用芳香植物,已有几千年的利用历史。杨梅叶也具有一定的药用价值,具有燥湿祛风、止痒、治疗皮肤湿疹等功效。杨梅枝叶和根皮在中国和日本等地常用来作为收敛剂、解毒剂和肠胃止泻剂等传统中药的成分^[2]。2011 年李国成等^[3]首次报道了杨梅叶中具有降血糖功效的化学成分,其中包括山奈酚、槲皮素、杨梅素、槲皮素-3-O- α -L-鼠李

糖苷、杨梅苷和杨梅素-3-O- β -D-葡萄糖苷 6 种化合物。但目前,对于杨梅叶的研究多集中于杨梅叶中精油成分、总黄酮、酚类物质的提取及其有效化学成分抗氧化性等方面,对于杨梅叶中多糖提取的研究尚鲜见报道。近年来,随着科技的进步,发现许多植物多糖与生物体维持自身机能的机制密切相关,具有丰富的生物活性,包括免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗辐射、抗菌抗病毒、保护肝脏等保健作用。此外,植物多糖优秀的吸水性和高保湿特性,使得其被广泛运用到化妆品、食品等领域。因此,从杨梅叶中提取多糖,既能“变废为宝”,为促进杨梅叶资源利用,杨梅叶的开发利用提供科学依据,同时也可系统开发杨梅叶在食品保存、医药和保健领域的应用提供理论参考。

对于植物多糖的提取,超声波辅助提取法具有明显

第一作者简介:李粉玲(1970-),女,本科,高级实验师,现主要从事食品化学等研究工作。E-mail:lf18832@126.com.

责任作者:蔡汉权(1967-),男,高级实验师,现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail:hanquan010@126.com.

收稿日期:2013-11-14

Toxicity Test of Different Fungicides and Its Mixed Preparations Against *Sclerotinia schinseng*

WANG Yan, WANG Chun-wei, GAO Jie, MA Jing-jing

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Toxicities of 27 fungicides and 69 proportions of 9 fungicides against *S. schinseng* were tested by mycelium growth rate method in laboratory. The results showed that the inhibitory effect of bacillus subtilis 100 billion/g WP, bacillus cereus 30 billion/g WP(Yiwei), difenoconazole 10% WG, penconazole 10% EC, trichoderma 20 billion/g WP, trichoderma 0.2 billion/g WG, bacillus cereus 30 billion/g WP(Kebanding), dimethachlon 50% WP, propiconazole 25% EC, physcion 0.5% AS was better. Their EC_{50} values were lower than 0.05 mg/L, EC_{90} values were lower than 5.0 mg/L. In different proportions, 46 proportions had synergistic action, the most obvious synergistic action was bacillus cereus 30 billion/g WP(Yiwei)+dimethachlon 95% TC 3:1, the CTC was 988.54. Effective fungicides and proportions were screened out, which had important significance to fungicides control the disease safely and efficiently.

Key words: *Panax ginseng*; *Sclerotinia schinseng*; fungicides; toxicity test; synergistic action

的优势。有研究采用超声波辅助提取多糖,超声技术应用于植物细胞破壁,大大的加快了反应速度,有效提高了多糖提取率^[4]。另外超声波破碎过程是一个物理过程,浸提过程中无化学反应,浸提物在短时间内保持不变,生物活性不减,同时提高了破碎速度,缩短了破碎时间,可极大的提高提取效率^[5]。现如今,超声波技术不仅用于龙眼、荔枝、大枣、香菇等的多糖提取,还应用于多种植物叶子的多糖提取,如厚朴叶子^[6]、柿子叶^[7]、竹叶^[8]等的多糖提取。

羟自由基和超氧自由基是生物体内主要的不稳定的氧自由基,它们是造成机体老化和组织损伤的主要原因,并且对许多疾病的发生变化产生了影响。近年来的研究表明,植物多糖对自由基具有一定的抗氧化作用。该试验通过提取杨梅叶中的多糖,研究杨梅叶中多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除作用以及还原能力,以期对杨梅叶多糖的抗氧化性进行验证。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为杨梅叶,日晒后烘干粉碎备用。

供试试剂:葡萄糖标准品(分析纯)、铝片、碳酸氢钠、氯仿、正丁醇、苯酚、浓硫酸、浓盐酸、无水乙醇、石油醚、硫酸亚铁、水杨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、30%双氧水、三氯乙酸、氯化铁、铁氰化钾、焦性没食子酸(邻苯三酚)均为分析纯、去离子水。

供试仪器:数控超声波清洗器(KQ-500DB)购于昆山市超声仪器有限公司,紫外可见分光光度计(752S)购于上海精密科学仪器有限公司,电热鼓风干燥箱(101A-1)购于上海协达计控设备公司通州医科仪器厂,循环水式多用真空泵(SHD-III)购于保定高新区阳光科教仪器厂,冷藏冷冻箱(BCD-217YB)购于 Haier,多功能粉碎机(ST-02A)购于上海树立仪器仪表有限公司,电子天平(FA2004N)购于上海精密科学仪器有限公司,调温电热套(KDM)购于山东省鄞城永兴仪器厂,台式离心机(KA-1000)购于上海安亭科学仪器厂,气浴恒温振荡器(ET-Q)购于常州荣冠实验分析仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 杨梅叶多糖的提取 杨梅叶的预处理:将杨梅叶晒干到一定程度后,置于电热鼓风干燥箱内以 60℃左右烘干、粉碎、过 50 目筛,于试剂瓶中密封备用。称取样品粉末 10.00 g 于索氏提取器中,用 60 mL 石油醚(80℃左右)回流脱脂 2 次,1 h/次;再用 60 mL 无水乙醇回流 2 次,1 h/次,除去单糖和低聚糖,回流后烘干备用^[9]。将脱脂烘干后的杨梅叶样品粉末进行称重,计算提取率为 88.1%。杨梅叶粗多糖的提取:称取 5 份脱脂烘干后的杨梅叶样品 0.881 g/份,放入 5 个碘量瓶中,加入一定量的去离子水,超声波浸提,浸提结束后进行减压抽滤,收

集滤液。将所收集的滤液在电热套中加热浓缩至 1~2 mL。浓缩液中加入 4 倍体积的无水乙醇,充分搅拌,放入冰箱中静置 2 h 后在 2 500 r/min 下离心 25 min,收集沉淀,沉淀物用无水乙醇洗涤数次直至乙醇接近无色,得到的沉淀烘干后即为杨梅叶粗多糖。粗多糖脱色:粗多糖加适量去离子水溶解,加入 0.010 g 高岭土进行脱色,震荡 10 min 左右静置一段时间,除去色素,减压抽滤,取其滤液。脱色后的滤液,用去离子水定容至 100 mL 容量瓶中,利用苯酚-硫酸法测其吸光度 A,根据回归方程计算多糖的含量 W(mg)。

1.2.2 杨梅叶多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[10]测定杨梅叶多糖含量。标准曲线的制作:准确称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 10 mg,加适量去离子水溶解,移至 100 mL 容量瓶中定容,得浓度为 0.1 mg/mL 的葡萄糖溶液。分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 的 0.1 mg/mL 葡萄糖标准液,加离子水稀释分别至 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 浓度的葡萄糖标准溶液。加入 1.0 mL 的 5% 苯酚溶液,混匀。沿管壁加入 5.0 mL 浓硫酸,静置 5 min 后在 25~30℃ 水浴中加热 15 min,转入冷水浴中冷却。以蒸馏水为空白,置于 490 nm 波长下测定吸光度。杨梅叶多糖含量测定:取杨梅叶多糖浸提液溶于适量去离子水中,转移到 100 mL 容量瓶中,定容。精密吸取上述溶液 1.0 mL,测定吸光度,根据回归方程求出含量。计算公式:提取液多糖含量(mg/g)= $c \times V/W$,式中, c 为标准曲线上查得的葡萄糖浓度(mg/g), V 为杨梅叶多糖溶液稀释后的总体积(mL), W 为提取多糖时称取的杨梅叶重量(g)。

1.2.3 抗氧化性的测定 羟自由基($\cdot OH$)清除试验:将杨梅叶多糖配成 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mg/mL 6 种不同浓度的多糖溶液。反应体系中含有 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL、9 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL、9 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL、不同浓度的多糖溶液 1 mL。最后加 H_2O_2 启动反应,以蒸馏水作为参比,在波长 510 nm 处测定各浓度的吸光度值^[11-12]。自由基清除率的计算公式为: $\cdot OH$ 清除率(%)= $[A_0 - (A_x - A_{x_0})]/A_0 \times 100\%$,其中, A_0 为空白对照液吸光度值,只加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、过氧化氢; A_x 为加入杨梅叶多糖溶液后的吸光度值; A_{x_0} 为不加显色剂 H_2O_2 的吸光度值。超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)清除试验:将 pH 8.2、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 4.5 mL 与 4.2 mL 蒸馏水混匀,于 25℃ 水浴中 20 min 后立即加入 5 mmol/L 邻苯三酚(25℃ 预热)0.3 mL,混匀,在 4 min 内,每隔 30 s 在 325 nm 波长下测定吸光值,计算邻苯三酚溶液的吸光值随时间的变化率 A_0 ^[12]。再将 1.0 mL 不同浓度的杨梅叶多糖与 3.2 mL 蒸馏水混匀,测定添加样品的邻苯三酚溶液在 325 nm 处吸光值,计算其吸光值随时间的变

化率(A_x)。超氧阴离子自由基清除率的计算公式为:清除率(%)=($A_0 - A_x$)/ $A_0 \times 100\%$,其中, A_0 为空白的平均吸光值随时间变化率, A_x 为试样的平均吸光值随时间变化率。还原能力测定:取一定浓度的多糖样品溶液 1 mL 加入 pH 6.6 的磷酸缓冲溶液和 1% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液各 2.5 mL,混匀,在 50℃ 下保温 20 min,加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液,吸取此溶液 2.5 mL,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% $FeCl_3$,混匀,30 min 后于 700 nm 波长处测定吸光度^[12-13]。

1.2.4 单因素试验 料液比对杨梅叶多糖得率的影响:取 5 份处理后的杨梅叶粉末样品各 0.881 g,选择料液比分别为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL,设置超声波功率为 200 W,浸提时间为 15 min,各浸提 1 次,趁热过滤,按苯酚-硫酸法测定多糖含量计算提取量。超声波温度对杨梅叶多糖得率的影响:取 5 份处理后的杨梅叶粉末样品各 0.881 g,选择料液比为 1:50 g/mL,超声波时间为 15 min、超声波功率为 200 W,在 45、50、55、60、65℃ 的环境下各浸提 1 次,趁热过滤,按苯酚-硫酸法测定多糖含量计算提取量。超声波功率对杨梅叶多糖得率的影响:称取 5 份处理后的杨梅叶样品各 0.881 g,选择料液比为 1:50 g/mL,超声波温度为 60℃,在超声波功率分别为 150、200、250、300、350 W 的条件下超声波 15 min,各浸提 1 次,趁热过滤,按苯酚-硫酸法测定多糖含量计算提取量。超声波时间对杨梅叶多糖得率的影响:称取 5 份处理后的杨梅叶样品各 0.881 g,按照料液比为 1:50 g/mL,超声波功率为 200 W,超声波温度为 60℃ 的条件,进行时间分别为 10、15、20、25、30 min 的超声波浸提各 1 次,趁热过滤,按苯酚-硫酸法测定多糖含量计算提取量。浸提次数对杨梅叶多糖得率的影响:称取 3 份处理后的杨梅叶粉末样品各 0.881 g,料液比 1:50 g/mL、超声波温度为 60℃、超声波时间为 15 min、超声波功率为 200 W,分别浸提 1、2、3 次,趁热过滤,按苯酚-硫酸法测定多糖含量计算提取量。

1.2.5 正交实验 在单因素试验的基础上,选取温度、料液比、超声波功率和超声波时间 4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,以多糖含量为指标,筛选最佳工艺(表 1)。

表 1 正交实验因素与水平

水平	因素			
	A 超声波 温度/℃	B 料液比 /g·mL ⁻¹	C 超声波 功率/W	D 超声波 时间/min
1	55	1:40	200	10
2	60	1:50	250	15
3	65	1:60	300	20

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

以吸光度 A 为纵坐标,葡萄糖含量为横坐标,制作苯酚-硫酸法标准曲线(图 1)。

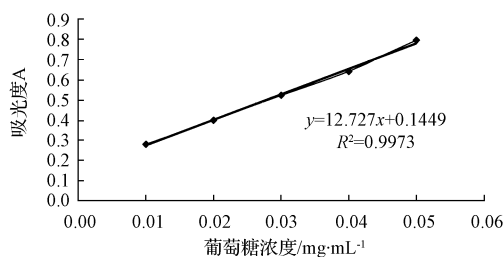


图 1 葡萄糖标准曲线

2.2 单因素试验结果

2.2.1 料液比对杨梅叶多糖得率的影响 由图 2 可知,在料液比为 1:50 g/mL 时杨梅叶多糖提取量达到最高。当料液比大于 1:50 g/mL 时,随着水量的增加,杨梅叶多糖得率反而下降,这可能是因为水量增加过多反而不利于多糖的提取,也会影响后期的浓缩处理。

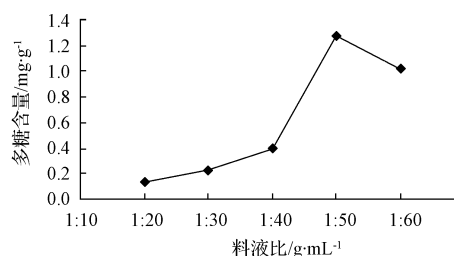


图 2 料液比对杨梅叶多糖得率的影响

2.2.2 超声波温度对杨梅叶多糖得率的影响 由图 3 可知,当温度达到 60℃ 杨梅叶多糖得率最高。刚开始多糖得率随温度的升高而增加,但当温度大于 60℃ 时,多糖得率有下降趋势。这可能是因为高温对杨梅叶细胞壁有一定的破坏作用,增加多糖的溶解度,也有可能使多糖降解变性^[14]。

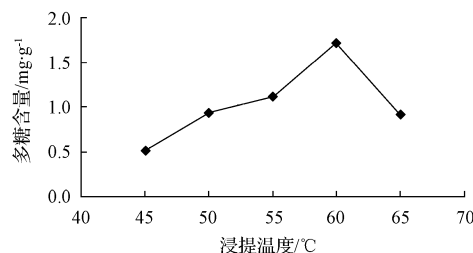


图 3 超声波温度对杨梅叶多糖得率的影响

2.2.3 超声波功率对杨梅叶多糖得率的影响 从图 4 可知,杨梅叶多糖得率随着超声波功率的增加先增后降,功率 200 W 时最大。这是由于超声波功率增大,对细胞壁的破碎作用增强,胞内多糖溶出速度快,得率增加^[15]。但是随着继续加大,提取液流动加速,物料停留在超声场中时间减少,破壁作用也减弱了。

2.2.4 超声波时间对杨梅叶多糖得率的影响 由图 5 可知,超声波浸提 15 min 时多糖的得率最高。浸提时间

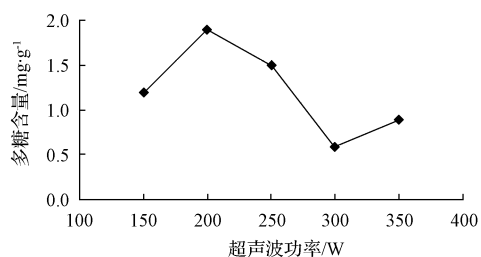


图4 超声波功率对杨梅叶多糖得率的影响

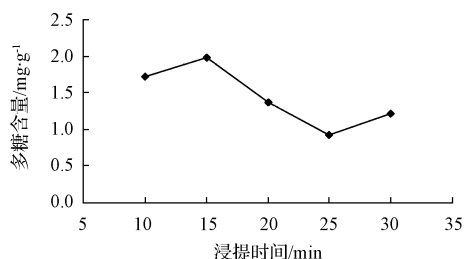


图5 超声波时间对杨梅叶多糖得率的影响

小于 15 min,多糖提取不充分;浸提时间大于 15 min,随着时间的延长,多糖得率逐渐降低,可能是浸提时间过长使某些杂质溶出,使多糖的相对含量下降。

2.2.5 浸提次数对杨梅叶多糖得率的影响 由图 6 可知,杨梅叶多糖得率随浸提次数的增加而增大。但是增幅不大,因此从经济角度考虑,可以认为 2 次浸提已充分。

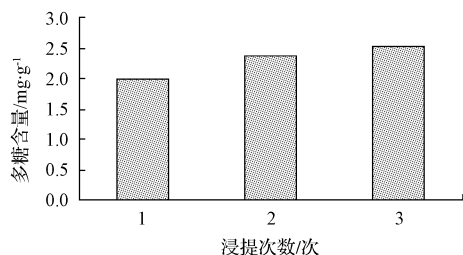


图6 浸提次数对杨梅叶多糖得率的影响

2.3 正交实验结果

由表 2 可知,影响杨梅叶中多糖提取的主次因素顺序为 $B>A>D>C$,即超声波温度>超声波时间>超声波功率>料液比,超声波温度对多糖提取率的影响最大,所以要严格控制好温度的高低。根据最优水平确定超声波辅助法萃取杨梅叶多糖的工艺为 $A_3B_3C_2D_3$,即超声波温度 65℃,料液比 1:60 g/mL,超声波功率 250 W,超声波时间 20 min。由于该组合未出现在正交组合中,故须进行验证。

2.4 验证试验

为了验证正交实验最优条件,在此工艺条件下进行验证试验。经测定,杨梅叶在此条件下的提取量为

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果分析

试验号	A 超声波温度/℃	B 料液比 /g·mL ⁻¹	C 超声波功率 /W	D 超声波时间 /min	杨梅叶多糖含量 /mg·g ⁻¹
1	1(55)	1(1:40)	1(200)	1(10)	0.528
2	1	2(1:50)	2(250)	2(15)	0.281
3	1	3(1:60)	3(300)	3(20)	0.873
4	2(60)	1	2	3	0.946
5	2	2	3	1	0.625
6	2	3	1	2	0.916
7	3(65)	1	3	2	0.789
8	3	2	1	3	1.771
9	3	3	2	1	2.237
K_1	0.754	0.561	1.072	1.130	
K_2	0.892	0.829	1.155	0.662	
K_3	1.342	1.599	0.762	1.196	
R	0.588	1.038	0.393	0.535	
最优水平	A_3	B_3	C_2	D_3	
影响因素	超声波温度>超声波时间>超声波功率>料液比				

2.344 mg/g,多糖含量高于正交实验组合中的任何 1 组,由此说明正交实验中确定的最优提取工艺是合理的。

2.5 抗氧化性的测定结果

2.5.1 杨梅叶多糖清除羟自由基($\cdot OH$)的能力 由图 7 可知,杨梅叶多糖对 $\cdot OH$ 有明显的清除作用,随着多糖浓度的增加,清除 $\cdot OH$ 的能力增强,浓度达到 0.20 mg/mL 后清除能力开始下降并趋于平缓。

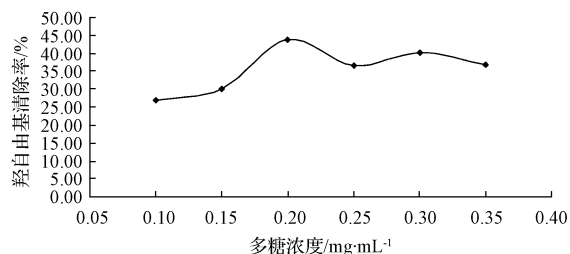


图7 不同多糖浓度对羟自由基清除率的影响

2.5.2 杨梅叶多糖清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)的能力

由图 8 可知,杨梅叶多糖对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)具有一定的抑制作用,并且随着多糖浓度的增大,清除 $O_2^{\cdot -}$ 的能力逐渐增强。并且杨梅叶多糖清除 $O_2^{\cdot -}$ 的能力比清除 $\cdot OH$ 的强。

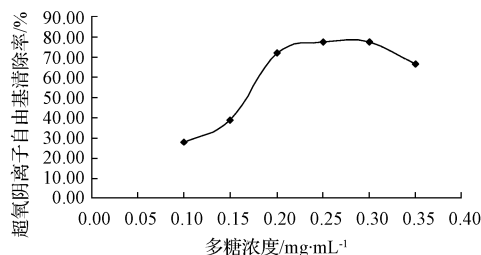


图8 不同多糖浓度对超氧阴离子自由基清除率的影响

2.5.3 还原能力 吸光度越大,则表明样品的还原能力越强,由图 9 可知,在该浓度范围内杨梅叶多糖的还原能力随着多糖浓度的增加而逐步增强。

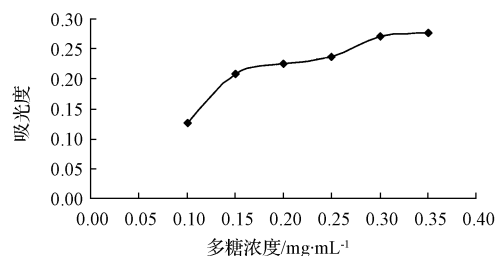


图 9 不同多糖浓度对还原能力的影响

3 结论与讨论

该试验结果表明,超声波辅助提取杨梅叶多糖的最优工艺为超声波功率 250 W,超声波处理 20 min,超声波温度 65℃,料液比 1:60 g/mL。其中,影响杨梅叶多糖提取的主次因素依次为超声波温度>超声波时间>超声波功率>料液比。另外,杨梅叶中的多糖对·OH 和 O₂⁻ 都有明显的清除作用,且具有一定的还原能力,即杨梅叶多糖具有抗氧化活性。

在生命活动的氧化代谢过程中,会不断产生各种自由基。超氧阴离子自由基和羟自由基是最具代表性的活性氧自由基。在机体的氧化反应中,超氧阴离子自由基通常最先形成,可通过形成其它多种有破坏作用的自由基而使其功能放大。羟自由基毒性最强,几乎能与所有功能性生物大分子起反应,造成生物体的巨大伤害^[16]。该研究证明了杨梅叶多糖具有较好的清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力,有望进一步开发杨梅叶多糖,使之成为新型天然抗氧化及自由基清除剂。

参考文献

- [1] 李兴军,吕均良,李三玉. 中国杨梅研究进展[J]. 四川农业大学学报, 1999,17(2):224-229.
- [2] Matsuda H, Morikawa T, Tao J, et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicine. VII. Inhibitors of degranulation in RBL-2H₃ cells and absolute stereostructures of three new diarylheptanoid glycosides from the bark of *Myrica rubra*[J]. Chem Pharm Bull, 2002,50:208-215.
- [3] 李国成,陈楚雄,罗嘉玲,等. 杨梅叶降血糖有效部位的化学成分研究[J]. 中草药, 2011,42(5):863-865.
- [4] Zhao B, Wang Y C, Ou Y F, et al. Ultrasonic technique applied in extraction of plant[J]. Chin Tradit Herb Drug, 1999(9):2.
- [5] 张智芳,林文庭,陈灿坤. 植物多糖提取工艺的研究进展[J]. 海峡预防医学杂志, 2008,14(3):18-20.
- [6] 邓芬,张芳芹,王焯,等. 厚朴叶子中多糖的超声波法提取及抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2011(8):173-175.
- [7] 谷维娜,肖颖,牟薇,等. 超声波提取柿叶多糖的研究[J]. 河北农业科学, 2010,14(3):157-158.
- [8] 周跃斌,王伟,李适,等. 竹叶多糖提取条件的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006,32(2):206-209.
- [9] 张桂,赵国群. 超声波萃取植物多糖的研究[J]. 食品科学, 2005,26(9):302-304.
- [10] 董群. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996,31(9):550.
- [11] 郭守军,杨永利,施楚彬,等. 超声波辅助提取龙须菜多糖的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2006(27):10.
- [12] 赵二芳,李满秀,梁兴红. 超声波提取南瓜多糖的研究[J]. 声学技术, 2008,27(1):58-60.
- [13] 郑少泉,姜帆,高慧颖,等. 超声波法提取龙眼多糖工艺研究[J]. 中国食品学报, 2008(2):76-79.
- [14] 胡炜东. 内蒙古地区天然螺旋藻多糖分离纯化及其生物活性研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2010,31(3):300-303.
- [15] 孙瑞敏,刘冬平,陈俊. 黄芩多糖的提取[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2005,38(1):33-36.
- [16] Liu F, Ng T B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs[J]. Life Sci, 2000,66(8):725-735.

Study on the Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides From Bayberry Leaf

LI Fen-ling, CAI Han-quan, LIN Min

(Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041)

Abstract: Taking bayberry leaf as material, the ultrasonic assisted extraction technology of bayberry leaf crude polysaccharide optimum extraction conditions and bayberry leaf antioxidant activity of polysaccharide were studied. The results showed that the ultrasonic assisted extraction of the better programs bayberry leaves polysaccharide; ultrasonic power was 250 W, ultrasonic time was 20 min, ultrasonic temperature was 65℃, the solid to liquid ratio was 1:60 g/mL; the ultrasonic temperature had the greatest influence on extraction rate. In addition, the of bayberry leaves in the polysaccharide ·OH and O₂⁻ had significant scavenging effect, the reduction ability, bayberry leaves polysaccharides had antioxidant activity.

Key words: bayberry leaves; polysaccharide; ultrasonic; extraction rate; antioxidant activity; optimum technology