

槐花多糖提取工艺优化及自由基清除活性研究

曹小燕, 杨海涛

(陕西理工学院 化学与环境科学学院, 陕西 汉中 723001)

摘 要:以秦巴山区野生槐花为试材,以 pH 6.0 柠檬酸盐酸性缓冲溶液作为浸提溶剂,采用单因素试验结合正交实验方法研究了纤维素酶—超声辅助提取槐花多糖的工艺条件,并考察其对羟基自由基、超氧阴离子自由基和 ABTS 自由基正离子的清除活性及还原能力。结果表明:槐花多糖的最佳提取工艺为提取温度 60 °C、提取时间 20 min、料液比 1:25 kg·L⁻¹、纤维素酶 10 mg·g⁻¹,该条件下槐花多糖的提取率为 17.1%,槐花多糖对 ABTS 自由基正离子、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除 IC₅₀ 值为 0.047、0.75、0.87 g·L⁻¹,优于同浓度条件下天然抗氧化剂维生素 C。

关键词:槐花多糖;正交实验;纤维素酶;柠檬酸盐酸性缓冲溶液

中图分类号:S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0141-06

槐花(*Sophora japonica* Linn.)为豆科植物槐的干燥花蕾及花,又名槐蕊、槐米、槐花米^[1],具有利尿、止血、抑菌、清肝明目、清热泻火等功效,临床上可用作预防动脉硬化、高血压及治疗皮肤炎症等^[2]。目前已经确定其含有黄酮类化合物、蛋白质、氨基酸、烯酸及微量元素等多种成分,其中黄酮甙—芦丁为槐花的主要成分^[3-5]。宋永芳等^[6]研究发现槐花中蛋白质的含量约为 22%,含有 17 种氨基酸及多种微量元素,同时提取液经活性炭脱色后,分离得到刺槐苷。目前槐花黄酮类化合物的研究比较多,而对槐花多糖的研究相对较少。研究证实,多糖具有抗肿瘤、抗氧化、提高免疫力等多种生理学功能^[7],是现代功能性食品和药品研究的热点之一。目前,专门针对槐花多糖提取工艺的报道相对较少,且提取方法多采用水提法,具有耗时长、效率低、提取率低等缺点,急需优化改进。李环宇等^[8]采用柠檬酸盐酸性缓冲溶液作为木枣多糖的提取溶剂,大大提高了多糖提取效率。故该研究以柠檬酸盐酸性缓冲溶液作为提取溶剂,超声波辅助酶法提取槐花中的多糖,单因素试验结合正交实验优化槐花多糖的提取工艺,并探究了槐花多糖的自由基清除活性,以期对槐花功能性食品和药品的研发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试槐花于 2015 年 5 月采自陕西省勉县连城山,

恒温干燥粉碎,过 60 目筛备用。

供试试剂:纤维素酶(10 000 U·g⁻¹,阿拉丁)、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、邻二氮菲、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、硫酸亚铁、过氧化氢、Tris、邻苯三酚、ABTS(阿拉丁)、过硫酸钾、磷酸二氢钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、维生素 C、葡萄糖,均为国产分析纯,试验所用水均为蒸馏水。

供试仪器:AL204-IC 型电子分析天平(梅特勒—托利多仪器上海有限公司);Cary50 紫外可见分光光度计(美国瓦里安);KQ3200E 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);JXL-2S-6A 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市金祥龙电子有限公司);101A-1 电热鼓风干燥箱(中国重庆银河试验仪器有限公司);SHB-III 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司);800 型离心机(上海手术器械厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 提取工艺流程 将新采摘槐花恒温烘干,粉碎过 60 目筛,乙醚脱脂过夜,干燥备用。称取一定量的槐花脱脂样品,加入一定 pH 的柠檬酸—柠檬酸钠缓冲溶液,超声波辅助提取一定时间,过滤、浓缩提取液,采用 Sevage 法脱蛋白,充分洗涤,依据 40% 甲醇溶液醇沉得槐花粗多糖样品。

1.2.2 葡萄糖标准曲线的绘制 称取葡萄糖 0.100 0 g,蒸馏水定容至 100 mL,摇匀。分别吸取 1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 mL 置于 50 mL 容量瓶中定容,得不同浓度梯度的葡萄糖标准溶液。分别吸取溶液 1.0 mL 于 10 支离心管中,加蒸馏水至 2.0 mL,加入

第一作者简介:曹小燕(1982-),女,河南开封人,博士,讲师,现主要从事有机化学等研究工作。E-mail:ruoshuizhihan@163.com.

收稿日期:2016-02-14

1.0 mL 6% 苯酚,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,摇匀,室温放置 30 min,在 490 nm 处测定其吸收光度。平行 3 组试验,以 3 组吸光度 A 平均值为 Y 轴,3 组浓度平均值为 X 轴,绘制标准曲线^[9]。

1.2.3 槐花多糖的测定 槐花多糖含量的测定采用苯酚—硫酸法^[10]。分别移取一定量的槐花多糖,溶解定容于 50 mL 容量瓶中,混合均匀,分别移取 1 mL,加蒸馏水稀释一定的倍数,加入苯酚—硫酸溶液,室温放置 30 min,490 nm 处测定其吸收光度。依据标准曲线计算槐花多糖的含量及提取率。槐花多糖提取率(%)=(多糖质量/槐花粉质量)×100。

1.2.4 单因素试验 精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末 5 份置于锥形瓶中,在其它条件相同的情况下,分别考察纤维素酶用量、缓冲溶液 pH、提取温度、提取时间、料液比单因素进行超声辅助提取槐花中的多糖,考察不同提取条件对槐花多糖提取率的影响,每组试验平行 3 组取平均值。纤维素酶用量对槐花多糖提取率的影响:精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末 5 份,加入 pH 5.0 柠檬酸钠缓冲溶液 25 mL,放置 50 ℃ 水浴酶解 1 h 后置于功率 300 W,提取温度 50 ℃ 超声波辅助提取 20 min。柠檬酸钠缓冲溶液 pH 对槐花多糖提取率的影响:精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末 5 份,加入不同 pH 柠檬酸钠缓冲溶液 25 mL,纤维素酶 10 mg·g⁻¹ 放置 50 ℃ 水浴酶解 1 h 后置于功率 300 W,提取温度 50 ℃ 超声波辅助提取 20 min。提取温度对槐花多糖提取率的影响:精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末 5 份,加入 25 mL pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲溶液,纤维素酶 10 mg·g⁻¹ 放置 50 ℃ 水浴酶解 1 h 后,置于功率 300 W 的超声波清洗机中在 40、50、60、70、80 ℃ 下超声波辅助提取 20 min。提取时间对槐花多糖提取率的影响:精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末 5 份,加入 25 mL pH 6.0 柠檬酸钠缓冲溶液,纤维素酶 10 mg·g⁻¹ 放置 50 ℃ 水浴酶解 1 h 后,置于功率 300 W 的超声波清洗机中,在 60 ℃ 中超声辅助提取 10、20、30、40、50 min。料液比对槐花多糖产率的影响:精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末 5 份,分别加入 15、25、35、45、55 mL pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲溶液,纤维素酶 10 mg·g⁻¹ 放置 50 ℃ 水浴酶解 1 h 后,置于功率 300 W 的超声波清洗机中在 60 ℃ 中超声辅助提取 20 min。

1.2.5 正交实验 依据单因素试验结果,精确称取 1.000 0 g 的脱脂槐花粉末,设定超声波功率 300 W,柠檬酸钠缓冲溶液 pH 6.0,以提取温度、料液比、提取时间和纤维素酶用量为正交实验的 4 个影响因子,通过 L₉(3⁴) 正交实验优化槐花多糖的提取工艺,具体设计见表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Levels and factors of orthogonal test

水平 Level	因素 Factors			
	A 提取温度 Extraction temperature	B 料液比 Ratio of material to liquid	C 提取时间 Extraction time	D 纤维素酶量 Quantity of cellulase
	/ ℃	/(kg·L ⁻¹)	/min	/(mg·g ⁻¹)
1	50	1:20	10	9
2	60	1:25	20	10
3	70	1:30	30	11

1.3 项目测定

1.3.1 槐花多糖自由基清除活性能力测定 ①槐花多糖清除 ABTS 自由基正离子(ABTS⁺·)能力的测定:采用 ABTS 法^[11]。将 ABTS 先用超纯水配制为 7.0 mmol·L⁻¹,再加入 2.45 mmol·L⁻¹ 过硫酸钾,室温置于黑暗中反应 12~16 h,制成 ABTS⁺·;用乙醇稀释 ABTS⁺·,使其在 734 nm 处的吸光度为 0.700±0.01;然后加入不同浓度的槐花多糖溶液于上述调制好的自由基中,于 30 ℃ 水浴放置 10 min,在 734 nm 处测定吸光度 A ,以不加抗氧化剂测定的吸光度为 A_0 ,平行测定 3 次取平均值。以相同浓度的维生素 C 作对照,按下式计算对 ABTS 自由基正离子(ABTS⁺·)的清除率。ABTS⁺· 清除率(%)=($A_0 - A$)/ A_0 ×100。②槐花多糖清除羟基(·OH)自由基能力的测定:采用邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法^[12]。分别取 8 支 15 mL 的离心管并编号为 1~8,其中 7 号为损伤管,8 号为未损伤管,在 8 支离心管中依次加入 5.0 mmol·L⁻¹ 邻二氮菲 1.0 mL,10.0 mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) 4.0 mL,在 1~6 号管中依次加入不同体积的槐花多糖溶液,再在 1~8 号管中加 7.5 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 1.0 mL,最后在 1~7 号管中加入 1.0 mL 的 0.1% H₂O₂,蒸馏水定容至 10 mL,在 37 ℃ 恒温水浴中放置 1 h,在 512 nm 处分别测定吸光度,平行测定 3 次取平均值。以相同浓度的维生素 C 作对照,按下式计算羟基自由基的清除率。·OH 清除率(%)=($A_1 - A_2$)/($A_0 - A_2$)×100,式中 A_1 为槐花多糖溶液的吸光度; A_0 为未损伤溶液的吸光度; A_2 为损伤溶液的吸光度。

1.3.2 槐花多糖清除超氧阴离子自由基(O₂⁻)能力的测定 采用邻苯三酚自氧化法^[13]。分别取 7 支 15 mL 的离心管,标记为 1~7,向 7 支离心管中分别加入 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.2)的缓冲溶液 5.0 mL,然后置于 37 ℃ 水浴中预热 10 min,在 1~6 号试管中依次加入不同体积的槐花多糖溶液,7 号试管中不加入多糖溶液,再立即向各离心管中加入在 37 ℃ 水浴下预热过的 3.0 mol·L⁻¹ 邻苯三酚 0.1 mL,用蒸馏水定容至 10 mL,置于 25 ℃ 的水浴中准确反应 4 min,于 420 nm 分别测定各管的吸光度 A ,平行测定 3 次。7 号试管的

吸光度为 $A_{\text{空白}}$, 以相同浓度的维生素 C 作对照。相同试验条件下, 再取 6 支 15 mL 的离心管, 标记为 8~13, 在 6 支离心管中分别加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.2) 的缓冲溶液 5.0 mL, 置于 37°C 水浴中预热 10 min, 在 8~13 号试管中依次加入与 1~6 体积相对应的槐花多糖溶液, 不加入 $3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚, 蒸馏水定容至 10 mL, 置于 25°C 的水浴中准确反应 4 min, 于 420 nm 分别测定各管的吸光度 A_0 , 平行测定 3 次。以相同浓度的维生素 C 作对照。按下式计算对超氧阴离子自由基的清除率。 O_2^- 清除率 (%) = $[A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_0)] / A_{\text{空白}} \times 100$ 。

1.3.3 槐花多糖还原能力的测定 采用 OYAIZU^[14] 的方法。于 1.0 mL 不同浓度的槐花多糖溶液中分别加 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.6) 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 5.0 mL, 混匀后置于 50°C 水浴反应 20 min, 然后加入 10% 三氯乙酸溶液 5.0 mL, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。吸取上清液 2.5 mL, 再分别加入蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL。在 700 nm 处测定样品的吸光度。以蒸馏水为空白, 以相同浓度的维生素 C 作对照, 平行测定 3 组取平均值。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

依据 1.2.2 方法绘制葡萄糖浓度标准曲线, 以葡萄糖浓度为自变量, 吸光度为因变量, 得到标准曲线方程为 $y = 10.379x - 0.0439$, $R^2 = 1.0000$ (图 1)。

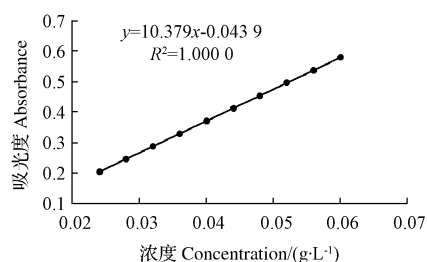


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

2.2 单因素试验

2.2.1 纤维素酶用量对槐花多糖提取率的影响 由图 2 可知, 随着纤维素酶用量的增加, 易于槐花多糖细胞壁的破碎, 槐花多糖的提取率逐渐增加, $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 多糖提取率最大, 进一步增加纤维素酶用量, 提取率反而降低。可能的原因是随着纤维素酶量的增加, 槐花多糖的溶出率逐渐增加, 但是过多的多糖具有粘附性能, 阻塞多糖的溶出通道, 因此其多糖提取率有所下降, 故 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 纤维素酶时槐花多糖提取率最大。

2.2.2 柠檬酸钠缓冲溶液 pH 对槐花多糖提取率的影

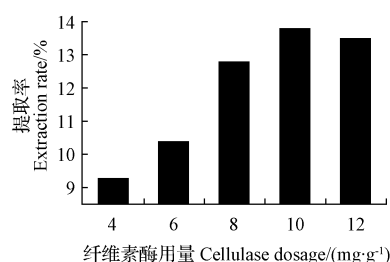


图 2 纤维素酶用量对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of cellulase dosage on extraction rate of polysaccharides

响 由图 3 可知, 随着柠檬酸钠缓冲溶液的 pH 增加, 槐花多糖提取率逐渐增大, 在 pH 6.0 时, 出现最大值, 可能原因是多糖中某些特定的基团在特定的 pH 中溶解度不同造成的。此外, 该试验所得提取率差异性相对较小, 故后续试验柠檬酸钠缓冲溶液 pH 不作为考察因素, 因此固定缓冲溶液的 pH 6.0 进行后续试验。

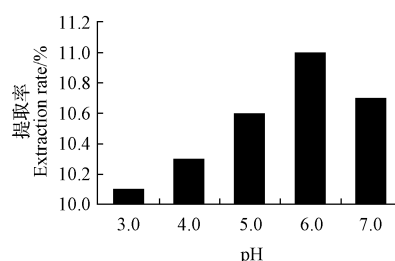


图 3 缓冲溶液 pH 对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of pH on extraction rate of polysaccharides

2.2.3 提取温度对多糖提取率的影响 由图 4 可知, 提取温度对多糖的提取效率影响较大。在 $40 \sim 60^\circ\text{C}$ 范围内, 随着温度的升高, 槐花多糖的提取率逐渐增大, 这可能的原因是超声波的空化作用促使植物细胞壁破裂, 多糖的溶出效果增加。60 $^\circ\text{C}$ 达到峰值, 继续升温, 多糖提取率逐渐下降, 其原因为高温使得多糖类化合物结构发生某些转化, 或高温条件下, 纤维素酶或细胞内某些酶失活, 从而导致提取率下降。因此, 选择提取温度 60°C 为宜。

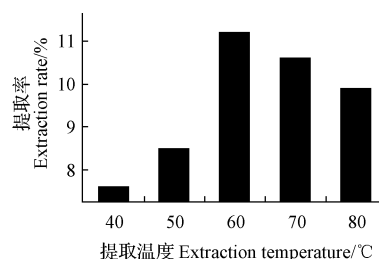


图 4 提取温度对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic treatment temperature on extraction rate of polysaccharides

2.2.4 提取时间对多糖提取率的影响 由图 5 可知,随着提取时间的延长,多糖的提取率增加。提取时间在 20 min 时,提取率最高,其原因可能是随着超声时间的延长,超声波的空化作用促使植物细胞壁快速破裂,多糖的溶出效果增加。但随着超声辅助时间的增长,超声波机械作用可以产生过量的热效应,高温条件下可以促使多糖类物质发生降解,破坏多糖结构的稳定性,从而降低多糖得率。考虑节约成本和提取效率,选择提取时间 20 min。

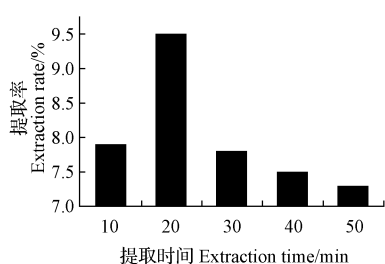


图 5 提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic treatment time on extraction rate of polysaccharides

2.2.5 料液比对多糖提取率的影响 由图 6 可知,液料比对槐花多糖的提取效率影响较大,随着液料比的增大,槐花多糖的提取率是先增加后降低最后趋于平缓,其原因是随着液料比的增加,超声波在液体中能够达到有效的搅动和流动,在 1:25 kg·L⁻¹ 时达到峰值。随着液体的进一步增加,样品中的有效浓度逐渐降低,超声波对溶液中微粒样品的凝聚作用相对减弱,提取率逐渐下降。进一步延长提取时间,提取效果趋于平稳。综合后续处理因素,液料比选择 1:25 kg·L⁻¹ 为宜。

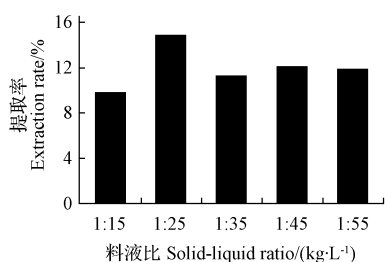


图 6 液料比对提取率的影响

Fig. 6 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of polysaccharides

2.2.6 超声功率对多糖提取率的影响 由图 7 可知,槐花多糖的提取率随着超声功率的增加而提高,于 300 W 时,槐花多糖提取率达到峰值,随着功率的进一步增强,多糖提取率下降明显。这可能是由于超声功率较小时,植物细胞壁破损不完全,多糖的溶出率较低,随着超声功率的持续增大,超声波的空化作用增强,多糖结构稳

定性遭到破坏。综合考虑超声功率对槐花多糖提取率的影响差异性相对较小,因此超声波功率不作为后续试验的考察因素,固定超声波功率 300 W。

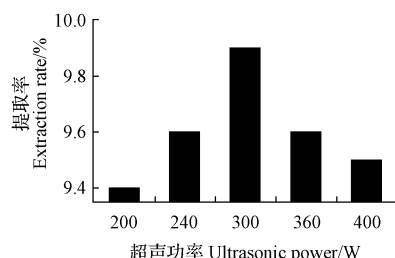


图 7 超声功率对多糖提取率的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic power on extraction rate of polysaccharides

2.3 正交实验测定结果及分析

依据单因素试验结果,固定超声波功率 300 W,柠檬酸钠缓冲溶液的 pH 6.0,选取超声温度、提取时间、料液比和纤维素酶量 4 个因素(表 1),采用 L₉(3⁴)设计正交实验,试验结果见表 2。可知,对槐花多糖提取率的影响因素主次顺序为超声温度>料液比>纤维素酶>提取时间,最佳提取条件为 A₂B₂C₂D₂,即超声温度为 60 ℃,提取时间 20 min,料液比为 1:25 kg·L⁻¹,纤维素酶 10 mg·g⁻¹。

表 2 L₉(3⁴)正交实验结果

Table 2		Result of L ₉ (3 ⁴)orthogonal test			
试验号 Test No.	A 提取温度 Extraction temperature /℃	B 料液比 Ratio of material to liquid /(kg·L ⁻¹)	C 提取时间 Extraction time /min	D 纤维素酶 Quantity of cellulose /(mg·g ⁻¹)	提取率 Extraction rate/%
1	1	1	1	1	11.8
2	1	2	2	2	16.0
3	1	3	3	3	11.9
4	2	1	2	3	15.6
5	2	2	3	1	16.6
6	2	3	1	2	16.1
7	3	1	3	2	12.8
8	3	2	1	3	13.1
9	3	3	2	1	11.6
K ₁	13.233	13.400	13.667	13.333	
K ₂	16.100	15.233	14.400	14.967	
K ₃	12.500	13.200	13.767	13.533	
R	3.600	2.033	0.733	1.634	
最优组	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	
次序	A>B>D>C				

2.4 验证试验

由于表 2 中无最佳提取条件下的工艺组合,因此对其最佳提取工艺进行试验验证。最优条件下平行 3 次试验,取平均值得到槐花多糖的得率为 17.1%,浓度为 3.78 g·L⁻¹,以此浓度的槐花多糖溶液进行后续的抗氧化测定试验。传统的水浸提法提取率仅为 3.16%^[15],相

比之下,柠檬酸钠缓冲溶液作为提取溶剂,槐花多糖的提取效果明显高于传统水提法,为以后槐花多糖的综合利用开发提供试验依据。

2.5 槐花多糖提取液的自由基清除活性研究

2.5.1 清除 ABTS 正离子自由基($\text{ABTS}^+ \cdot$)的能力

由图 8 可知,槐花多糖对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 的清除作用随着浓度的增加而增大,在高浓度条件下其清除活性趋于平缓。在浓度为 $0.1134 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其清除效果为 92.3%,而维生素 C 的清除效果仅仅达到 50.6%,表明相同浓度条件下与天然抗氧化剂维生素 C 相比,槐花多糖的清除效果优于维生素 C 溶液。

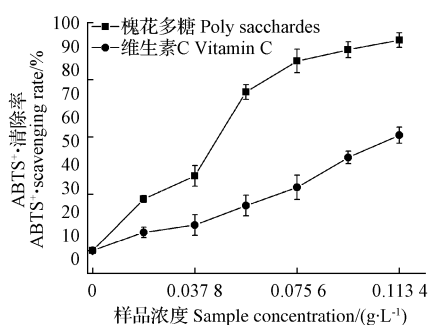


图 8 槐花多糖对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 的清除活性

Fig. 8 $\text{ABTS}^+ \cdot$ scavenging activity of *Sophora japonica* Linn. polysaccharides

2.5.2 清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的能力 由图 9 可知,随着样品浓度的增加,槐花多糖的清除率快速上升而维生素 C 上升缓慢,这说明槐花多糖和维生素 C 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力逐渐增强,当浓度为 $1.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,槐花多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率达到了 100.2%,而维生素 C 仅为 34.2%,远低于槐花多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果。结果表明,相同浓度条件下,槐花多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率远远优于维生素 C 溶液。

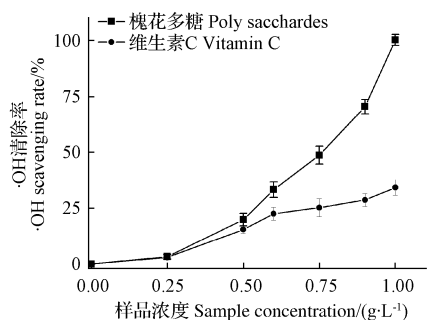


图 9 槐花多糖对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性

Fig. 9 Scavenging $\cdot\text{OH}$ activity of *Sophora japonica* Linn. polysaccharides

2.5.3 槐花多糖清除超氧阴离子自由基能力的测定

由图 10 可知,随着样品浓度的增加,槐花多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的

清除活性逐渐增长,且增长趋势较快,而相同浓度下的维生素 C 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性低于多糖对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性,且增长趋势缓慢,当浓度为 $1.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时槐花多糖对超氧阴离子自由基的清除率高达 82.2%,而维生素 C 仅为 25.6%。这说明相同浓度下槐花多糖对超氧阴离子自由基的清除效率优于维生素 C 溶液。

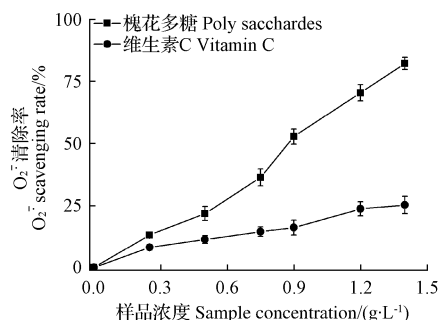


图 10 槐花多糖对超氧阴离子自由基的清除活性

Fig. 10 Scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ activity of *Sophora japonica* Linn. polysaccharides

2.5.4 槐花多糖还原能力的测定 铁氰化钾氧化槐花多糖和维生素 C 表征其还原能力,700 nm 吸光度值越大表示还原能力越强^[14]。由图 11 可知,槐花多糖的还原能力随着体积的增大上升明显,常规抗氧化剂维生素 C 则上升缓慢,且同等体积下槐花多糖的还原能力远大于维生素 C,表明槐花多糖具有良好的抗氧化活性。

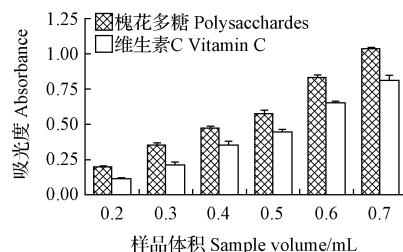


图 11 槐花多糖的还原能力

Fig. 11 Reduction ability of *Sophora japonica* Linn. polysaccharides

3 讨论与结论

目前槐花多糖的研究主要集中于槐花黄酮和多糖的提取及抗氧化活性评价,槐花多糖的提取多采用水提法,而尚鲜见柠檬酸钠缓冲溶液作为提取溶剂提取槐花多糖的研究,超声波酶法提取槐花多糖的研究也相对较少,该试验结合李环宇等^[8]和王晓林等^[16]试验经验,探讨了超声波酶法辅助提取槐花多糖,并评价其自由基清除活性。采用单因素试验,评价不同提取条件下槐花多糖的提取率,设定超声波功率 300 W,柠檬酸钠缓冲溶液 pH 6.0 结合正交实验,探索了槐花多糖的最佳提取工艺

条件为提取温度 60 ℃、料液比 1 : 25 kg · L⁻¹、提取时间 20 min、纤维素酶 10 mg · g⁻¹。在最佳试验条件下平行 3 组槐花多糖的得率为 17.1%，各因素的影响次序为提取温度 > 液料比 > 纤维素酶 > 提取时间。酶法辅助提取大大提高了槐花多糖的收率，其原因为槐花细胞壁含有大量的纤维素，在纤维素酶的作用下，其通透性大大增强易于多糖物质的溢出，达到提高其提取率的目的。

自由基清除活性评价结果显示，槐花多糖具有较强的清除 ABTS⁺ ·、·OH、O₂⁻ 和还原能力，槐花多糖对 ABTS⁺ ·、·OH 和 O₂⁻ 的清除 IC₅₀ 值为 0.047、0.75、0.87 g · L⁻¹，在浓度为 0.113 4 g · L⁻¹ 时对 ABTS⁺ · 清除率高达 92.3%；在浓度为 1.03 g · L⁻¹ 时，槐花多糖对 ·OH 的清除率达到了 100.2%；在浓度为 1.40 g · L⁻¹ 时对 O₂⁻ 的清除率为 82.2%。而同等条件下维生素 C 的清除率分别为 50.6%、34.2%、25.6%，远远低于槐花多糖的清除效果，证明了槐花多糖具有较好的自由基清除能力，而且在一定范围内对三者的抗氧化活性呈现良好的量效关系，该试验结果可为槐花植物资源的合理开发及应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 贾佼佼, 苗明三. 槐花的化学、药理及临床应用[J]. 中医学报, 2013, 29(5): 716-718.
- [2] 王秀丽, 李桂凤. 槐花的营养与药用价值[J]. 东方食疗与保健, 2014, 10(5): 4-5.
- [3] 马利华, 贺菊萍, 秦卫东, 等. 槐花提取物抗氧化性能研究[J]. 食品科

学, 2007, 28(9): 75-77.

- [4] 胡喜兰, 姜琴, 尹福军, 等. 正交实验优选槐花多糖的最佳提取工艺及抑菌活性研究[J]. 食品科技, 2012, 37(4): 164-167.
- [5] 李桂华, 李丽萍, 崔建军. 原子吸收法测定槐花和香椿芽中微量元素含量[J]. 仪器仪表与分析监测, 2005(4): 37-38.
- [6] 宋永芳, 罗嘉梁, 解荷锋. 刺槐花的活血成分研究[J]. 林产化学与工业, 1992(4): 320-326.
- [7] 赵国华, 陈宗道, 李志孝, 等. 活性多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 45-48.
- [8] 李环宇, 王敏, 李五霞, 等. 超声波辅助酸性缓冲液浸提大枣多糖的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 179-184.
- [9] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 36(8): 213-217.
- [10] 王红庆, 赵丽平, 朱晓明. 槐花多糖提取工艺的研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(13): 2733-2735.
- [11] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9/10): 1231-1237.
- [12] SMIRONFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatiblesolutes[J]. Phytochemistry, 2011, 28(21): 1057-1060.
- [13] BUETLER T M, KRAUSKOPF A, RUEGG U T. Role of superoxide as a signaling molecule[J]. Physiology, 2004, 19(3): 120-123.
- [14] OYAZU M. Studies on products of browning reaction-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 40(44): 307-315.
- [15] 徐建国, 田呈瑞, 胡青平, 等. 响应面法优化槐花水溶性多糖的超声波辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 112-116.
- [16] 王晓林, 钟方丽, 薛健飞, 等. 酶法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J]. 北方园艺, 2015(4): 136-139.

Study on Enzymatic-ultrasonic Assisted Extraction of Polysaccharide From *Sophora japonica* Linn. and Its Free Radical Scavenging Activity

CAO Xiaoyan, YANG Haitao

(School of Chemical and Environmental Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract: Taking *Sophora japonica* Linn. from Qinba area as raw material, citrate buffer solution at pH 6.0 as the extraction solvent, based on single factor experiments and orthogonal test, the extraction and scavenging free radicals activities of polysaccharides from *Sophora japonica* Linn. by cellulase-ultrasonic were studied. The results showed that the optimum extraction technology of *Sophora japonica* Linn. polysaccharides were as follows, extraction temperature was 60 ℃, ultrasonic extraction time of 20 minutes, solid-liquid ratio of 1 : 25 kg · L⁻¹, cellulase dosage was 10 mg · g⁻¹, under this condition, the extraction yield of polysaccharide was 17.1%. Scavenging free radicals activities results showed that the IC₅₀ of ABTS⁺ ·, ·OH, O₂⁻ were 0.047 g · L⁻¹, 0.75 g · L⁻¹ and 0.87 g · L⁻¹ respectively, which was superior to the conventional antioxidants of ascorbic acid. The study proved that polysaccharides from *Sophora japonica* Linn. had good reducing capacity and scavenging radical activity.

Keywords: *Sophora japonica* Linn. polysaccharide; orthogonal experiment; cellulase; citrate buffer solution