

李 容,覃福礼,吕佳窈,等. 川木瓜多糖的提取及醇沉工艺研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):328-331.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.093

# 川木瓜多糖的提取及醇沉工艺研究

李 容,覃福礼,吕佳窈,尹建华

(右江民族医学院,广西百色 533000)

**摘要:**为研究川木瓜多糖的提取和醇沉工艺,以多糖得率为提取工艺指标,沉降率为醇沉工艺指标,通过单因素试验和正交试验,分别研究川木瓜多糖的提取和醇沉工艺。结果表明,川木瓜多糖的最佳提取工艺为:超声预处理 50 min,料液比 1 g : 20 mL,浸提温度 100 ℃,浸提时间 2.0 h,多糖得率可达 4% 以上;多糖醇沉的最佳工艺为:乙醇体积分数 85%,乙醇用量 5 倍,醇沉时间 20 h,沉降率可达 90% 以上。

**关键词:**川木瓜;多糖;提取工艺;醇沉工艺;正交试验

**中图分类号:** TQ353.6;R284.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2016)04-0328-03

川木瓜为皱皮木瓜(*Chaenomeles speciosa*)的一个品种,是一种药食兼用的资源,在食用上,可用来制作果脯、罐头、果醋、果酒等产品<sup>[1]</sup>;在医学上用作中药材,具有舒筋活络、和胃化湿的功效,主治风湿痹痛、肢体酸重、筋脉拘挛、吐泻转筋、脚气水肿等症<sup>[2]</sup>。川木瓜化学成分复杂,含有多糖、蛋白质、有机酸、三萜、黄酮、皂苷、氨基酸等多种活性成分<sup>[3]</sup>。植物多糖为一类天然高分子物质,研究表明天然多糖具有抗氧化、降血糖、抗肿瘤、抗病毒等作用<sup>[4]</sup>,成为食品及医药行业的研究热点之一,引起人们的高度关注。多糖为川木瓜主要的主要化学成分之一。热水浸提法是常规的多糖提取方法,其方法简单、成本低、无污染,适合工业化生产,但提取率相对较低<sup>[5]</sup>。超声波提取法利用空化和机械振动作用破坏细胞结构<sup>[6-7]</sup>,使提取液易于渗入细胞内部,加速多糖溶解,提高多糖提取效率。本试验先用超声波预处理原料粉末,再用热水浸提川木瓜多糖,优化多糖提取工艺;在提取的基础上,再对多糖醇沉工艺进行优化,以期获得高效的提取分离方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

川木瓜采自广西壮族自治区百色市凌云县陇浩村,将所采鲜果洗净、切片、去籽、晾干、粉碎过筛备用。

试验试剂主要有:石油醚、苯酚、无水乙醇、乙醚、浓硫酸均为分析纯;无水葡萄糖标准品(上海雅吉生物科技有限公司)。

主要仪器有:CPA64 型电子天平;HHS-21-4 电热式恒温水浴锅;RE-52AA 型旋转蒸发器;TU-1800 紫外-可见分光光度计;FZ102 植物粉碎机;SHB-III 循环水式多用真空泵;3-18K 离心机;KQ5200 超声波清洗器。

### 1.2 方法

**1.2.1 多糖提取与醇沉方法** 取川木瓜粉末,加入 1.5 倍体积石油醚回流 4 h,过滤、挥发干石油醚,脱去脂溶性成分。精确称取脱脂后的川木瓜粉末,加入一定体积蒸馏水,先超声处理,再置水浴锅浸提,减压过滤,定容,得多糖提取液,测定多糖含量。将多糖提取液按一定比例进行浓缩,加入一定体积 95% 乙醇,常温下静置一段时间,离心分离,去掉上清液得多糖沉淀,将多糖沉淀复溶于水,定容,测醇沉后多糖含量。

#### 1.2.2 川木瓜多糖的含量测定

**1.2.2.1 标准曲线的绘制** 采用硫酸-苯酚法<sup>[8-9]</sup>测定川木瓜多糖含量。精确称取葡萄糖标准品 100 mg,用双蒸水溶解定容至 100 mL,配制成浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于 50 mL 容量瓶中,定容得一系列对照品溶液。分别吸取对照品溶液 2 mL 于具塞试管中,依次加入 5.0% 重蒸苯酚溶液 1.00 mL,摇匀,加入浓硫酸 5.0 mL,在沸水浴加热 5 min,室温静置 10 min,测定 490 nm 处的吸光度。以对照品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $y = 12.24x - 0.003$ ,  $r^2 = 0.998$ ,线性范围为 0.01 ~ 0.05 mg/mL。

**1.2.2.2 多糖含量测定** 将提取或醇沉所得的多糖溶液均浓缩、定容至 100 mL,取待测液 2 mL 稀释至 50 mL,取稀释后的溶液 2 mL 于具塞试管中,按“1.2.2.1”节的方法测定多糖含量。

#### 1.2.2.3 多糖得率与收率计算

多糖得率 =  $(C \times V \times n \times 10^{-3} / m) \times 100\%$ 。

式中: $C$  为多糖稀释液质量浓度 (mg/mL); $V$  为稀释液体积 (mL); $n$  为稀释倍数; $m$  为原料药材质量 (g)。

多糖沉降率 =  $[C_1 V_1 / (C_2 V_2)] \times 100\%$ 。

式中: $C_1$  为醇沉后多糖质量浓度 (mg/mL); $V_1$  为醇沉后溶液体积 (mL); $C_2$  为醇沉前多糖质量浓度 (mg/mL); $V_2$  为醇沉前溶液体积 (mL)。

#### 1.2.3 多糖提取工艺优化

**1.2.3.1 单因素试验** 称取 10.0 g 处理后的川木瓜粉末 5 份,在料液比为 1 g : 20 mL,水浴提取温度 90 ℃,水浴提取时间 1.5 h 的固定条件下,改变超声波时间 20、30、40、50、

收稿日期:2015-10-27

基金项目:广西自然科学基金(编号:2015GXNSFBA139163);广西高校科学技术研究项目(编号:KY2015YB226)。

作者简介:李 容(1981—),女,重庆垫江人,硕士,讲师,从事天然产物有效成分提取分离及活性研究。E-mail:lr1218tu@163.com。

60 min,考察超声时间对多糖得率的影响。按料液比(g : mL)1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30 加入蒸馏水,超声时间 40 min,浸提温度 90 ℃,提取时间 1.5 h,考察料液比对多糖得率的影响。在料液比为 1 g : 20 mL,超声时间 40 min,提取时间 1.5 h 的固定条件下,改变浸提温度 60、70、80、90、100 ℃,考察浸提温度对多糖得率的影响。在料液比为 1 g : 20 mL,超声时间 40 min,提取温度 90 ℃的固定条件下,改变浸提时间 0.5、1、1.5、2、2.5 h,考察浸提时间对多糖得率的影响。

1.2.3.2 正交试验 根据单因素试验结果,选取超声波处理时间、料液比、浸提温度、浸提时间为考察因素,以多糖得率为指标,进行  $L_9(3^4)$  正交试验,优化川木瓜多糖提取工艺。正交试验因素水平设置见表 1。

表 1 川木瓜多糖提取工艺因素水平表

水平	因素			
	A:超声时间(min)	B:料液比(g : mL)	C:浸提温度(℃)	D:浸提时间(h)
1	40	1 : 15	80	1.0
2	50	1 : 20	90	1.5
3	60	1 : 25	100	2.0

1.2.4 多糖醇沉工艺优化

1.2.4.1 单因素试验 取 5 份等体积的多糖提取液,分别加入 4 倍用量体积分数分别为 55、65、75、85、95% 的乙醇,在室温下沉降 10 h,考察浓缩比对多糖沉降率的影响。固定乙醇体积分数为 85%,醇沉时间为 10 h,改变乙醇用量 1、2、3、4、5 倍,考察乙醇用量对多糖沉降率的影响。固定乙醇体积分数为 85%,乙醇用量为 4 倍,改变醇沉时间 5、10、15、20、25 h,考察醇沉时间对多糖沉降率的影响。

1.2.4.2 正交试验 根据单因素试验结果,选取乙醇体积分数、乙醇用量、醇沉时间为考察因素,以多糖沉降率为考察指

标,进行  $L_9(3^4)$  正交试验,优化多糖醇沉工艺。因素水平设置见表 2。

表 2 川木瓜多糖醇沉工艺因素水平表

水平	因素		
	A:乙醇体积分数(%)	B:乙醇用量(倍)	C:醇沉时间(h)
1	75	3	10
2	85	4	15
3	95	5	20

2 结果与分析

2.1 多糖提取工艺结果

2.1.1 单因素试验

2.1.1.1 超声时间对多糖提取的影响 由图 1 可知多糖得率与超声时间呈正相关性,超声时间超过 40 min 后得率增加幅度较小。超声时间长有利于原料药材细胞破壁,多糖溶出。综合考虑提取效果与超声能耗,选取 40 min 为超声前处理时间。

2.1.1.2 料液比对多糖提取的影响 由图 2 可知,料液比(g : mL)在(1 : 10) ~ (1 : 20) 范围内多糖得率呈上升趋势,达 1 : 20 时得率最高,(1 : 20) ~ (1 : 30) 呈缓慢下降趋势。提取溶剂少使药材与溶剂接触不充分,多糖得率低;提取溶剂太多,会增加后期浓缩的困难,故料液比为 1 : 20 比较适宜。

2.1.1.3 浸提温度对多糖提取的影响 浸提温度对多糖得率的影响如图 3 所示,由图 3 可知,在提取温度为 60 ~ 90 ℃ 多糖得率随着提取温度升高而增加,90 ℃ 后提取率略下降。提取温度低,溶剂的渗透力差,多糖的溶解度小,不利于有效成分的溶出;温度过高可能会导致多糖降解,提取率反而降低<sup>[10]</sup>。因此,提取温度 90 ℃ 时为宜。

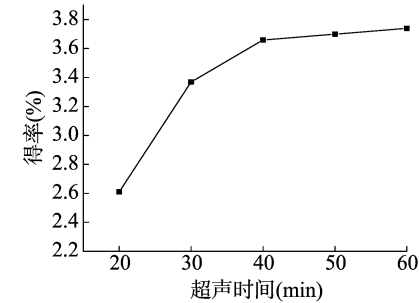


图1 超声时间对多糖得率的影响

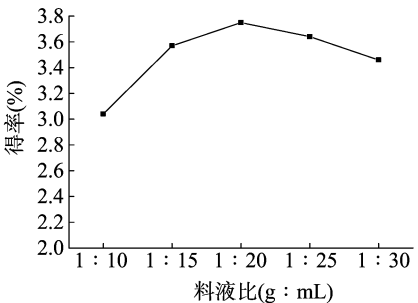


图2 料液比对多糖得率的影响

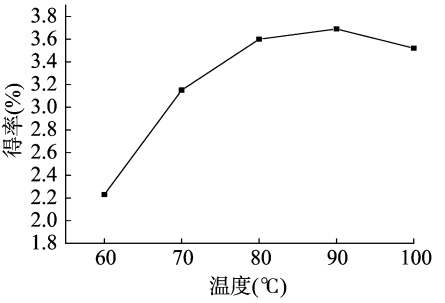


图3 浸提温度对多糖得率的影响

2.1.1.4 浸提时间对多糖提取的影响 从图 4 可知,多糖得率随时间的延长先增加,随后又略有下降,提取时间为 1.5 h 时,多糖得率达最大值。提取时间太短不利于多糖的溶出,时间太长可能导致长时间高温,多糖被破坏。因此,提取时间选取 1.5 h。

2.1.2 正交试验 正交试验结果如表 3 所示。从表 3 分析可知,提取川木瓜多糖各因素对多糖得率的影响顺序为 B > D > A > C,即料液比 > 浸提时间 > 超声时间 > 浸提温度;最优水平是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即提取多糖的最佳工艺为:超声时间 50 min,料液比 1 g : 20 mL,浸提温度 100 ℃,浸提时间 2.0 h。

2.1.3 提取工艺验证试验 取川木瓜粉末 5 份,每份 10 g,

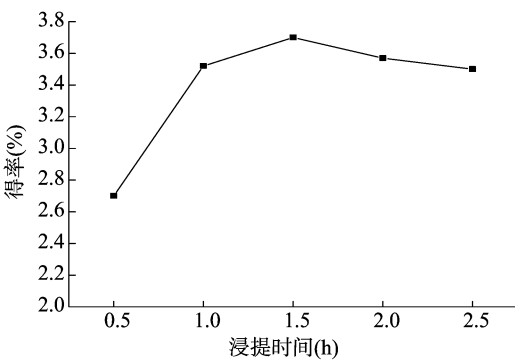


图4 浸提时间对多糖得率的影响

表 3 川木瓜多糖提取工艺正交试验结果

试验号	A	B	C	D	得率(%)
1	1	1	1	1	2.81
2	1	2	2	2	3.68
3	1	3	3	3	3.34
4	2	1	2	3	4.03
5	2	2	3	1	3.97
6	2	3	1	2	3.25
7	3	1	3	2	3.76
8	3	2	1	3	4.14
9	3	3	2	1	2.91
$k_1$	3.28	3.53	3.4	3.23	
$k_2$	3.75	3.93	3.54	3.56	
$k_3$	3.60	3.17	3.69	3.84	
$R$	0.47	0.76	0.29	0.61	

在最佳工艺条件下提取多糖,测定多糖含量,计算多糖得率。5 份川木瓜多糖的得率分别为 4.17%、4.09%、4.15%、4.25%、4.14%,平均为 4.16%,相对标准偏差为 1.40%,表明该提取工艺稳定。

2.2 醇沉工艺结果

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 乙醇体积分数对多糖醇沉的影响 从图 5 可知,乙醇体积分数对醇沉率影响较大,最佳的乙醇体积分数为 85%。多糖分子量分布较广,分子量与溶解性密切相关,不同分子量的多糖在乙醇中的溶出特性不同,在醇沉中会造成不同程度的损失。

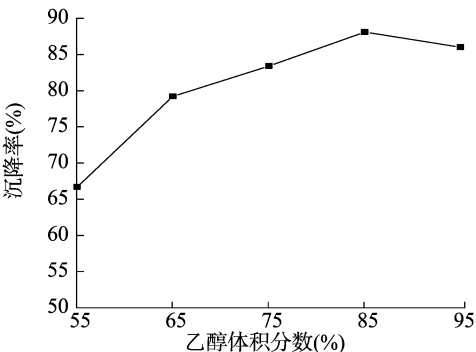


图5 乙醇体积分数对多糖沉降率的影响

2.2.1.2 乙醇用量对多糖醇沉的影响 从图 6 可知,多糖的沉降率随着乙醇用量的增加而增加,当乙醇用量为浓缩液的 4 倍时沉降率达最高大值,最佳的乙醇用量为 4 倍体积。

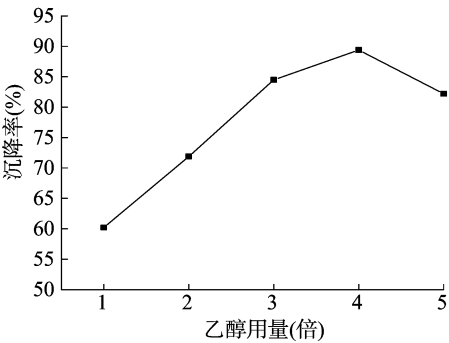


图6 乙醇用量对多糖沉降率的影响

2.2.1.3 醇沉时间对多糖醇沉的影响 从图 7 可知,延长时间有利于多糖沉降,当沉降时间为 10 h 时多糖沉降率达 85%,10 h 后沉降率呈缓慢上升趋势,因此,沉降时间为 10 h 合适。

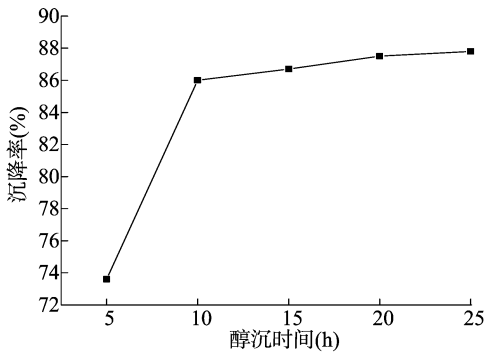


图7 醇沉时间对多糖沉降率的影响

2.2.2 正交试验 醇沉工艺正交试验和直观分析结果如表 4 所示。从表 4 分析可知,各因素对多糖醇沉率的影响顺序为 B>A>C,即乙醇用量>乙醇浓度>醇沉时间;最优水平是 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即醇沉多糖的最佳工艺为:乙醇体积分数 85%,乙醇用量 5 倍,醇沉时间 20 h。

表 4 川木瓜多糖醇沉工艺正交试验结果

实验号	A	B	C	D(空白)	沉降率(%)
1	1	1	1	1	75.4
2	1	2	2	2	82.7
3	1	3	3	3	80.4
4	2	1	2	3	84.1
5	2	2	3	1	82.2
6	2	3	1	2	90.6
7	3	1	3	2	73.9
8	3	2	1	3	80.7
9	3	3	2	1	84.1
$k_1$	79.5	77.8	82.2	80.6	
$k_2$	85.6	81.9	83.6	82.4	
$k_3$	79.6	85.0	78.8	81.7	
$R$	6.1	7.2	4.8	1.8	

2.2.3 醇沉工艺验证试验 取川木瓜多糖浓缩液 5 份,每份 100 mL,在最佳醇沉工艺条件下沉淀多糖,测定多糖含量,计算多糖沉降率,多糖沉降率分别为 89.7%、91.6%、90.9%、92.4%、90.4%,平均沉淀率为 91.0%,相对标准偏差为 1.15%,表明该醇沉工艺稳定。

3 讨论

天然活性多糖的提取和纯化方法对多糖的结构与生理活性有着重要的影响,如何高效地提取和纯化多糖是多糖研究的基础<sup>[11]</sup>。常见的多糖提取方法主要有溶剂提取法、超声波提取法、酶解法、微波提取法和超临界提取法,几种提取方法各有利弊,将几种方法联合使用可以明显提高提取效率。本试验将超声波与传统的水提法联合提取多糖,多糖得率可达 4% 以上。乙醇沉淀多糖的原理为利用乙醇降低多糖溶液的介电常数,破坏多糖分子的水膜,从而增加多糖分子间的相互作用,导致多糖溶解度降低而沉淀<sup>[12]</sup>。通过单因素和正交试验优化醇沉工艺,其沉降率可达 90% 以上;但在多糖醇沉过

吴桂玲, 吴艳玲, 刘品祯. 毛尖茶叶中脂氧合酶活性测定方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 331–333.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.094

# 毛尖茶叶中脂氧合酶活性测定方法的建立

吴桂玲<sup>1</sup>, 吴艳玲<sup>2</sup>, 刘品祯<sup>1</sup>

(1. 黔南民族师范学院化学与化工系, 贵州都匀 558000; 2. 信阳师范学院华锐学院, 河南信阳 464000)

**摘要:**采用紫外分光光度法, 以亚油酸钠为反应底物, 研究毛尖茶叶中的脂氧合酶(LOX)的酶活性测定方法。结果表明, 毛尖茶叶中的脂氧合酶的最适 pH 值为 6.3, 最适温度为 50 ℃, 在底物 300 μL 时酶活性最好, 且有较好的热稳定性, 60 ℃保温 1 h 后仍具有一定活性。

**关键词:**毛尖茶叶; 脂氧合酶(LOX); 活性

**中图分类号:** S571.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0331-03

都匀毛尖别称“白毛尖”“细毛尖”“鱼钩茶”“雀舌茶”, 是中国十大名茶之一, 产于贵州省都匀市, 都匀市属贵州省黔南布依族苗族自治州。都匀毛尖主要产于牛场、白芒、团山一带, 这里山谷起伏, 峡谷溪流, 冬无严寒, 夏无酷暑, 四季怡人, 年均气温 16 ℃, 年均降水量 1 400 mm。加上土层深厚, 泥土疏松湿润, 土质是酸性或微酸性, 内含大量铁质和磷酸盐, 这些特殊的自然条件不仅适宜茶树的生长, 而且也形成了都匀毛尖的独特风格, 都匀毛尖因独特的芳香气味而备受青睐<sup>[1]</sup>。目前分离得到的与茶叶芳香气味有关的物质主要是一些小分子的醇、醛、脂类物质, 在茶叶中这些小分子物质主要是由脂氧合酶、脂氢过氧化物裂解酶联合催化产生, 其中脂氧合酶是关键酶<sup>[2]</sup>。脂氧合酶(lipoxygenase, LOX, EC1.13.11.12)别称脂肪氧化酶、脂氧酶、脂肪加氧酶、脂肪氧合酶(LOX), 是一种含非血红素铁的加氧酶, 专一催化具有顺、

顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸及其相应的脂, 通过对其分子加氧, 形成具有共轭双键的脂氢过氧化物(hydroperoxides, HPOD)<sup>[3]</sup>。在茶叶中 HPOD 进一步被脂氢过氧化物裂解酶(hydroperoxidelyase, HPL)催化, 从而生成各种挥发性的脂类物质, 即茶叶芳香味的来源。因此, 研究茶叶中脂氧合酶的活性, 以及建立一个简便、准确、重现性好的 LOX 活性测定体系可为茶叶芳香气味形成生理的基础研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验材料茶树鲜叶采自贵州省都匀市白芒; 亚油酸(Sigma 公司生产, 纯度为 99.9%); 吐温 20; 麦氏缓冲溶液(pH 值为 6.3, 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液)。其他化学试剂均为分析纯, 试验用水为实验室自制去离子水。

### 1.2 仪器与设备

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; PHS-2C 精密 pH 计, 上海理达仪器厂; HH-S 型数显恒温水浴锅, 巩义市予华仪器有限责任公司; GTR21-1 高速冷冻离心机, 上海赵迪生物科技有限公司; 电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

收稿日期: 2015-03-30

基金项目: 2013 年度贵州省科学技术厅、黔南州科学技术和知识产权局、黔南民族师范学院联合基金(编号: 黔科合 J 字 LKQS[2013]17 号)。

作者简介: 吴桂玲(1985—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物的研究。E-mail: wuguiling1985@163.com。

程中大分子蛋白质、核酸等可能也会随之沉淀, 后期应进一步除去非糖组分, 纯化多糖, 获得高纯度的活性多糖。

## 参考文献:

- [1] 屈国胜, 杨松杰. 药食两用木瓜属植物研究进展[J]. 安康学院学报, 2012, 24(4): 88–90.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 57.
- [3] 尹凯, 高慧媛, 李行诺, 等. 皱皮木瓜的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(12): 760–763.
- [4] 崔青青, 周志勇, 刘朝奇, 等. 植物多糖作为免疫佐剂的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 970–972.
- [5] 佟茵, 吴红娟. 植物多糖的提取方法研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 970–972.
- [6] 张薇, 王成荣, 吴昊, 等. 超声波辅助复合酶法提取姜油的工

艺优化[J]. 中国调味品, 2013, 38(10): 20–26.

- [7] Peng C C, Kong J, You L J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction technology of lentinan polysaccharides by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 21(4): 452–456.
- [8] 葛文漪, 陈建春, 陈兆霓, 等. 正交设计法优选六月青多糖胶囊提取及醇沉工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 42–45.
- [9] 俞娟, 刘劲松, 王刚, 等. 响应面法优化马兰多糖提取工艺研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 222–225.
- [10] 张颖, 潘俊宇. 枇杷叶多糖水提醇沉法的提取条件优化[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(6): 161–163.
- [11] 沈文娟, 岳亮, 何英翠, 等. 天然药物常用提取技术与方法研究概况[J]. 中南药学, 2011, 9(2): 127–130.
- [12] 冯美琴, 邱远, 张琦, 等. 响应曲面法优化植物乳杆菌胞外多糖的醇沉工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 188–192.