

胡月芳. 淮山多糖超声辅助提取及清除超氧阴离子自由基的作用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 144–146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.045

淮山多糖超声辅助提取及清除超氧阴离子自由基的作用

胡月芳

(贺州学院化学与生物工程学院, 广西贺州 542899)

摘要:以无水乙醇为提取剂, 采用超声辅助提取淮山中的多糖, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 研究超声功率、液料比、提取时间、提取温度对淮山多糖提取率的影响, 并通过分光光度法分析淮山多糖清除超氧阴离子自由基能力。结果表明, 淮山多糖的最佳提取工艺为超声功率 800 W、液料比 80 mL : 1 g、提取时间 50 min、提取温度 60 ℃, 在此条件下淮山多糖提取率高达 8.53%。结果还表明, 淮山多糖具有较好的清除超氧阴离子自由基的能力, 且其清除能力与多糖浓度有明显的量效关系。

关键词:淮山; 多糖; 超声辅助提取; 清除; 超氧阴离子自由基

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0144-03

淮山别称山药、怀山药, 含有淀粉、多糖、尿囊素、胆碱等成分, 药用价值极高, 是药食两用的食品^[1]。近年来, 淮山多糖已被确定具有抗氧化功能^[2], 有提高人体免疫功能和抗病能力^[3]。超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)是活性氧之一, 具有强烈的氧化能力^[4]。 $O_2^{\cdot-}$ 产生异常会损坏细胞, 直接或间接导致机体衰老、炎症和癌症等某些疾病, 因此对 $O_2^{\cdot-}$ 清除的研究在医学保健中越来越重要^[5]。

在淮山多糖提取方法中, 最常见的有水提取法^[6-7]、微波法^[8-9]、酶解超声辅助提取法^[10]。用水提取山药多糖成本低, 不破坏生物活性, 方便实用且安全性高, 但耗时长、提取率不高。利用微波提取山药多糖具有高效快速的优点, 但微波功率较难控制。酶与超声提取法使用的酶作为一种蛋白质, 其酶解效果受酶解温度、pH 值、底物浓度等多种因素影响, 对

提取会有干扰。超声波提取法主要利用超声波的空化作用产生热效应, 机械作用加速细胞壁的破碎, 促进细胞内多糖的溶出, 达到缩短提取时间和提高多糖提取率的目的, 还具有无需加热的优点。

本试验采用超声辅助提取淮山多糖, 研究淮山多糖的最佳提取工艺。此外, 通过分光光度法研究淮山多糖对超氧阴离子自由基的清除作用, 分析其体外抗氧化活性, 旨在为淮山的深度加工和综合开发利用提供一些参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

淮山购自贺州市阳光市场。所用化学试剂均为分析纯, 试验用水为蒸馏水。可见分光光度计为 722 型(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 淮山多糖的超声辅助提取 将新鲜淮山洗净、去皮切片, 60 ℃烘干后粉碎。称取干燥淮山粉末 2.00 g, 按设定试验条件进行超声波提取、离心, 将上清液浓缩至 15 mL, 再加入 60 mL 乙醇, 在冰箱冷藏室中放置 24 h, 离心, 取沉淀, 用乙

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 广西贺州市科学研究与技术开发计划(编号: 贺科转 1408035)。

作者简介: 胡月芳(1977—), 女, 广西梧州人, 硕士, 副教授, 主要从事食品化学分析研究。E-mail: huyuefang@126.com。

[4] 马陶陶, 张群林, 李俊, 等. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 54–56.

[5] 刘海英, 仇农学, 姚瑞祺, 等. 我国 86 种药食两用植物的抗氧化活性及其与总酚的相关性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(2): 173–180.

[6] 姜洪芳, 石宝俊, 程晶, 等. 凤仙花不同部位乙醇提取物多酚、黄酮含量测定及抗氧化活性研究[J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(6): 9–14.

[7] 周梦娇, 万春鹏, 陈金印. 桂枝提取物抑菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 96–98.

[8] 熊宇, 向妙莲, 陈明, 等. 10 种杀菌剂对柑橘炭疽病菌的室内毒力测定[J]. 中国南方果树, 2014, 43(1): 44–45.

[9] Aaa M, Smetanska I, Ramadan M F, et al. Antioxidant potential of

sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils[J]. Industrial Crops and Products, 2011, 34(1): 952–959.

[10] Lim Y, Kim I, Seo J. *In vitro* activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes* [J]. Journal of Microbiology, 2007, 45(5): 473–477.

[11] Katalinic V, Milos M, Kulisic T, et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols[J]. Food Chemistry, 2006, 94(4): 550–557.

[12] Yen G, Chen H, Peng H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants [J]. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39(11): 1045–1053.

醇洗涤后,再用蒸馏水溶解、稀释到合适的浓度,测定吸光度,按下式计算淮山多糖的提取率:

提取率 = $C \times V / m \times 100\%$ 。

式中: C 为淮山多糖浓度, mg/mL ; V 为淮山多糖提取液的体积, mL ; m 为淮山粉末质量, mg 。

1.2.2 最优提取工艺条件的确定 在单因素试验的基础上,以超声功率、液料比、提取时间和提取温度为影响因素,以淮山多糖的提取率为指标,设计 $L_9(3^4)$ 的正交试验(表 1)确定最优提取工艺。首先,分别称取 5 份 2.00 g 淮山粉末,固定液料比为 60 mL : 1 g,超声时间为 30 min,超声温度为 60 ℃,分别研究 400、600、800、1 000、1 200 W 超声功率对淮山多糖提取率的影响。其次,在确定最佳超声波功率后,分别称取 5 份 2.00 g 淮山粉末,超声时间为 30 min,固定超声功率为 800 W,超声温度为 60 ℃,研究 40 mL : 1 g、60 mL : 1 g、80 mL : 1 g、100 mL : 1 g、120 mL : 1 g 的液料比对淮山多糖提取率的影响。在确定最佳超声波功率、液料比后,称取 5 份 2.00 g 淮山粉末,固定超声功率为 800 W,液料比为 80 mL : 1 g,超声温度为 60 ℃,研究 30、40、50、60、70 min 提取时间对淮山多糖提取率的影响。在确定最佳超声波功率、液料比、提取时间后,分别称取 5 份 2.00 g 淮山粉末,固定超声功率为 800 W,液料比为 80 mL : 1 g,提取时间为 50 min,研究 40、50、60、70、80 ℃ 提取温度对淮山多糖提取率的影响。

表 1 正交试验因子与水平

水平	因素			
	A: 超声功率 (W)	B: 液料比 (mL : g)	C: 提取时间 (min)	D: 提取温度 (℃)
1	600	40 : 1	40	60
2	800	60 : 1	50	70
3	1 000	80 : 1	60	80

1.2.3 多糖含量的测定 称取 0.100 0 g 无水葡萄糖于烧杯中溶解,转移至 100 mL 容量瓶内,加水至刻度处,得 1.00 mg/mL 葡萄糖溶液。分别取 0.40、0.60、0.80、1.00、1.20、1.40 mL 葡萄糖溶液于比色管中定容至 25 mL,各取 2.00 mL 于试管内,加入 1.00 mL 5% 苯酚、5.00 mL 浓硫酸,振荡,静置 30 min,以试剂空白作为参比,于 490 nm 处测定吸光度 $D_{490\text{ nm}}$,绘制标准曲线,得回归方程 $y = 9.483x + 0.005$, $n = 5$, $r = 0.998 5$ 。

1.2.4 多糖对超氧阴离子自由基的清除 以分别加入 4.50 mL Tris - HCl 缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 值 8.2)、2.00 mL H_2O 、0.20 mL HCl 溶液 (0.01 mol/L, pH 值 8.2) 的混合液作为参比溶液,以加入 4.50 mL Tris - HCl 缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 值 8.2)、2.00 mL H_2O 、0.20 mL 邻苯三酚溶液 (0.05 mol/L) 的混合液为空白溶液,以加入 4.50 mL Tris - HCl 缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 值 8.2)、不同浓度多糖溶液和 0.20 mL 邻苯三酚溶液 (0.05 mol/L) 的混合液作为样品液,振荡,最后加入 1 滴 6 mol/L HCl 终止反应,在 37 ℃ 下加热 10 min,冷却 10 min 至室温,在 325 nm 处测定吸光度 $D_{325\text{ nm}}$ 。计算多糖对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率: 清除率 = $(D_{325\text{ nm}(0)} - D_{325\text{ nm}(\text{样})}) / D_{325\text{ nm}(0)} \times 100\%$ 。式中: $D_{325\text{ nm}(0)}$ 代表空白管所测的吸光度; $D_{325\text{ nm}(\text{样})}$ 代表不同浓度样品液所测得的吸光度。

2 结果与分析

2.1 超声功率对淮山多糖提取率的影响

在 800 W 功率范围内,淮山多糖提取率随着超声功率的增大而提高,在 800 W 时出现最高值,多糖提取率达 8.5%;之后随着功率进一步增大,多糖提取率呈平稳下降趋势(图 1)。这可能是超声功率的增加,加速了提取液的流动,使物料在超声场中停留的时间缩短,破壁作用减弱,胞内多糖溶出速率减缓,使多糖提取率降低^[11]。因此,综合考虑最适宜的超声功率为 800 W。

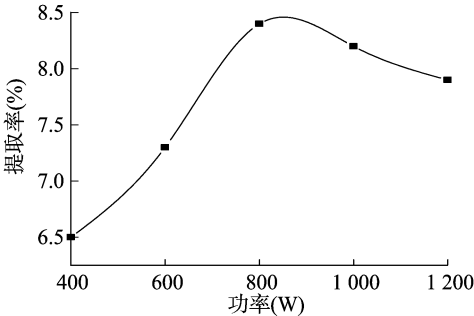


图 1 超声功率对淮山多糖提取率的影响

2.2 液料比对淮山多糖提取率的影响

淮山多糖的提取率随液料比的增大而升高,当液料比为 80 mL : 1 g 时,淮山多糖的提取率基本达到最高值,之后随着液料比的增加提取率升高不明显(图 2)。因此,最佳液料比为 80 mL : 1 g。

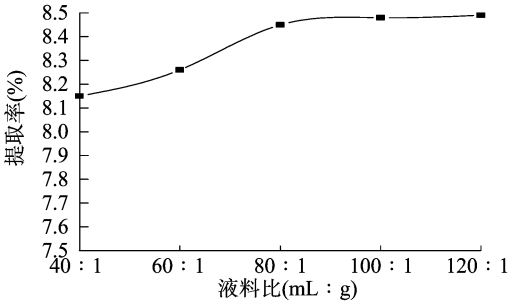


图 2 液料比对淮山多糖提取率的影响

2.3 提取时间对淮山多糖提取率的影响

淮山多糖的提取率随提取时间的延长而逐渐提高,当提取时间为 50 min 时,提取率基本达到最高值,之后随着提取时间的延长提取率变化不明显(图 3)。因此,最佳提取时间为 50 min。

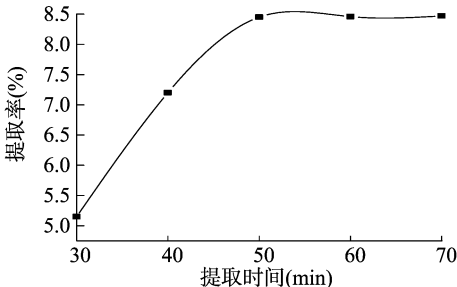


图 3 提取时间对淮山多糖提取率的影响

2.4 提取温度对淮山多糖提取率的影响

淮山多糖的提取率随提取温度的升高而提高,当提取温

度超过 60 ℃ 后,提取率升高不明显,可能因为过高温度会造成多糖黏稠,不易分离(图 4)。因此,综合考虑认为适宜提取温度为 60 ℃。

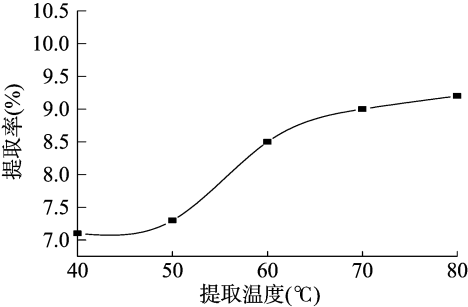


图4 提取温度对淮山多糖提取率的影响

2.5 正交试验

采用表 1 的 $L_9(3^4)$ 因素水平进行正交试验,以淮山多糖提取率为指标。由表 2 可知,影响淮山多糖提取率因素的顺序为 A (超声功率) $> D$ (提取温度) $> B$ (液料比) $> C$ (提取时间),即超声功率的影响最大,提取时间的影响最小。淮山多糖最优提取因素水平的组合为 $A_2B_3C_2D_1$,即超声功率 800 W、液料比 80 mL : 1 g、提取时间 50 min、提取温度 60 ℃。

表 2 淮山多糖提取的正交试验结果

试验号	因素				提取率 (%)
	A: 超声功率	B: 液料比	C: 提取时间	D: 提取温度	
1	1	1	1	1	5.48
2	1	2	2	2	6.23
3	1	3	3	3	5.44
4	2	1	2	3	6.69
5	2	2	3	1	8.52
6	2	3	1	2	7.91
7	3	1	3	2	6.81
8	3	2	1	3	5.66
9	3	3	2	1	8.31
k_1	5.72	6.33	6.35	7.44	
k_2	7.71	6.80	7.08	6.98	
k_3	6.93	7.22	6.92	5.93	
R	1.99	0.89	0.73	1.51	

2.6 验证试验

在最佳提取工艺条件下,即超声功率 800 W、液料比 80 mL : 1 g、提取时间 50 min、提取温度 60 ℃,用相同方法提取 5 个样品,测定多糖提取率分别为 8.52%、8.51%、8.53%、8.54%、8.55%,平均提取率为 8.53%,表明该最佳提取工艺稳定可靠。

2.7 本试验方法与其他方法的比较

通过与与其他提取淮山多糖方法(传统水提法、微波法、复合酶法)的比较,发现采用超声辅助提取淮山多糖的提取率最高,且提取时间比其他方法短(表 3)。

2.8 淮山多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

当向邻苯三酚氧化体系中加入不同浓度的淮山多糖溶液时,吸光度会有所降低,由此可知淮山多糖能催化 O_2^- 与 H^+ 结合,从而降低体系中的超氧阴离子自由基含量。在反应过程中淮山多糖对 O_2^- 清除率越高,表明对 O_2^- 清除作用越强。此外,淮山多糖具有较好的清除超氧阴离子自由基的能

表 3 本试验方法的检测结果与其他方法的比较

提取方法	提取温度 (℃)	提取时间 (h)	提取率 (%)	参考文献
本试验方法	60.0	0.8	8.530	
水提取法	70.0	3.0	0.905	[6]
微波法	64.7	2.3	2.600	[8]
复合酶法	50.0	1.0	5.380	[10]

力,且其清除能力与多糖浓度有明显的量效关系(图 5)。

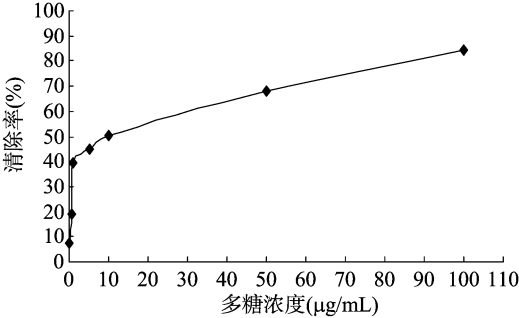


图5 淮山多糖对超氧阴离子自由基清除作用的影响

3 结论

通过单因素试验和正交试验确定淮山多糖的最优超声辅助提取工艺:超声功率 800 W、液料比 80 mL : 1 g、提取时间 50 min、提取温度 60 ℃,在此条件下多糖提取率高达 8.53%,比传统水提法、微波法、复合酶法高,且提取时间也比这些方法短。因此,本试验结果将为淮山多糖提取及淮山多糖抗氧化作用研究提供理论参考,有望促进淮山资源的开发利用。

参考文献:

[1] 雷伏贵,华树妹,涂前程,等. 山药种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 福建农业学报,2013,28(1):27-32.

[2] 胡月芳. 毛细管电泳-电化学检测法测定淮山中 5 种活性成分[J]. 分析科学学报,2014,30(4):533-536.

[3] 盛 玮,薛建平,谢笔钧. 怀山药零余子提取物抗氧化活性的研究[J]. 食品科学,2009,30(3):92-94.

[4] 王 振,张立敏,田 阳. 超氧阴离子自由基电化学分析的新进展[J]. 分析化学,2014,42(1):1-9.

[5] 姜绍峰,何湘平,刘传缙,等. 超氧阴离子自由基诱导皮层神经细胞 Cu/Zn SOD 基因表达的研究[J]. 北京联合大学学报(自然科学版),2003,17(3):9-11.

[6] 赵卫星,姜红波,张来新,等. 山药多糖的提取测定研究[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版),2010,30(3):34-38.

[7] 孙 锋,谷文英,丁霄霖. 山药粗多糖的提取工艺[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(3):79-83.

[8] 王安良,云 霞,杨 红. 响应曲面法优化山药中多糖的微波提取工艺[J]. 食品科技,2007,28(12):86-90.

[9] 余 芳,朱秋红. 山药多糖提取纯化工艺研究进展[J]. 江苏调味副食品,2013(2):13-16.

[10] 葛立军,朱振洪,沙 跃,等. 正交实验优化复合酶法提取山药多糖工艺研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(12):3187-3188.

[11] 李金忠,马海乐,吴沿友. 超声波提取山药多糖的研究[J]. 粮油食品科技,2005,13(5):14-15.