

匙羹藤粗多糖的提取及其清除羟自由基活性研究

吴向阳¹, 范群艳², 仰榴青³, 马维坤³, 朱晓宦², 茆广华²

(1. 江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013

2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 目的: 研究匙羹藤粗多糖的水提法优化工艺和清除羟自由基活性。方法: 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 以多糖得率为考察指标, 在单因素试验结果的基础上, 进行正交试验设计, 考察温度、时间、固液比、提取次数等因素对多糖得率的影响。采用水杨酸法考察匙羹藤粗多糖清除羟自由基活性。结果: 影响多糖得率最主要的因素是温度, 其次是提取时间。水提法优化工艺条件为温度 100℃, 时间 3h, 固液比 1:15, 提取次数 2 次。此条件下多糖得率达 2.21%, 粗多糖中多糖含量为 25.57%。匙羹藤粗多糖具有清除羟自由基能力, 并且其清除能力与浓度有明显的量效关系, 匙羹藤粗多糖浓度为 3.5mg/ml 时清除率达 50%, 浓度为 12mg/ml 时其清除率高达 94.42%。结论: 该优化工艺可用于匙羹藤粗多糖的提取, 高浓度匙羹藤粗多糖具有较好的抗氧化活性。

关键词: 匙羹藤; 多糖; 提取工艺; 抗氧化; 羟自由基

Study on Polysaccharides Extraction and Ability to Scavenge Hydroxyl Radicals from *Gymnema sylvestre*

WU Xiang-yang¹, FAN Qun-yan², YANG Liu-qing³, MA Wei-kun³, ZHU Xiao-huan², MAO Guang-hua²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

3. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Objective: To study the polysaccharides extraction technology and antioxidant activity from *Gymnema sylvestre*. Methods: The content of polysaccharides of *Gymnema sylvestre* was determined by the method of phenol-sulphate acid. On the basis of single factors tests, the four factors including temperature, time, solid-liquid ratio and the extraction times on the yield of the polysaccharides were studied by orthogonal test design. The salicylic acid method was used to inspect the capability to scavenge hydroxyl radicals of the polysaccharides from *Gymnema sylvestre*. Results: The results showed that temperature is the most important factor for the extraction percentage of the polysaccharides, and the time unit is the second. The optimal extraction technology conditions are: temperature 100℃, extraction time 3h, solid-liquid ratio 1:15 and extraction times 2 times. The yield of the polysaccharides is 2.21%, and the content of polysaccharides 25.57%. The polysaccharides have good capability to scavenge the hydroxyl radicals, and the scavenging capability is obviously related to the concentrations. The scavenging rate is 50% at the concentration of 3.5 mg/ml, while the scavenging rate is 94.42% at the concentration of 12 mg/ml. Conclusion: This extraction technology can be used for the extraction of the polysaccharides from *Gymnema sylvestre*. The polysaccharides have good antioxidant activity at a high concentration.

Key words *Gymnema sylvestre*; polysaccharide; extraction technology; antioxidant activity; hydroxyl radicals

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0107-04

匙羹藤(*Gymnema sylvestre* (Retz.) Schult, 简称GS)为萝藦科匙羹藤属(*Gymnema* R. Br.)类植物, 又称武靴藤、羊角藤、金刚藤, 主要含有皂甙、萜类、黄酮、多肽、

果胶、生物碱等化学成分, 研究表明^[1], 匙羹藤叶提取物具有降血糖、降血脂、抗龋齿、抑制甜味和抑制肥胖等作用, 可用来防治糖尿病和肥胖症, 目前对其主要活

收稿日期: 2006-11-30

基金项目: 江苏大学微纳米科学技术研究开放基金项目

作者简介: 吴向阳(1965-), 男, 教授, 博士, 主要从事天然产物活性成分及其应用研究。E-mail: yangliuqing@ujs.edu.cn

性成分三萜皂甙类物质研究较多,而对其它活性成分研究少。多糖是一重要的活性成分,目前国内外有关多糖研究报导较多,但未见有关匙羹藤多糖的提取、生物活性、组成和结构方面的研究报道。本实验以匙羹藤叶为原料,对匙羹藤粗多糖的提取工艺及其抗氧化活性进行研究,以期对匙羹藤多糖的研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

匙羹藤叶购于广西武鸣医药公司,经江苏大学药学院生药学教授张朝晖鉴定系萝藦科植物 *Gymnema sylvestre* (Retz.) Schult. 的叶。石油醚80℃脱脂12h,风干备用。

医用酒精纯度95%;所用试剂均为分析纯。

VIS-7220型可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; R-200 旋转蒸发器 瑞士Büchi 公司; 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 方法

1.2.1 匙羹藤粗多糖的提取

称取适量匙羹藤叶置于圆底烧瓶中,按一定水浴温度、浸提时间和固液比在热水浴中回流浸提数次,冷却后过滤,合并上清液;上清液经真空减压浓缩,加入一定体积95%乙醇,使终浓度为80%进行沉淀,所得沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,干燥后得匙羹藤粗多糖样品粉末。

1.2.2 多糖含量测定^[2-3]

1.2.2.1 标准曲线的制作

精确称取105℃干燥至恒重的标准葡萄糖20mg,用100ml 重蒸水定容。标准液稀释成浓度为30、60、90、120、150、180μg/ml的溶液,分别吸取稀释液0.6ml,加入50g/L苯酚1.2ml混合后迅速加入6ml浓硫酸,混合均匀后,30℃放置30min,在波长490nm处测定吸光度,空白对照以重蒸水代替糖溶液。以糖浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,制作标准曲线。标准曲线线性回归方程为: $A = 0.0047C - 0.0221$, $r = 0.9998$,式中,A为吸光度;C为葡萄糖溶液浓度(μg/ml)。

1.2.2.2 匙羹藤粗多糖中多糖含量测定

称取适量粗多糖样品,蒸馏水定容至10ml,精密吸取0.6ml按1.2.2.1中方法操作,测定吸光度,根据标准曲线计算多糖的浓度,再计算求得样品中多糖的质量和含量。

1.2.3 多糖得率的计算

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{\text{粗多糖样品中多糖质量}}{\text{原料质量}} \times 100$$

1.2.4 单因素试验

影响多糖得率的主要因素有温度、时间、固液比和提取次数等。提取温度选取60、70、80、90、100℃五个水平,提取时间选取1、2、3、4、5h五个水平,固液比选取1:10、1:15、1:20、1:25、1:30五个水平,提取次数选取1、2、3、4、5次五个水平,分别进行单因素试验。

1.2.5 正交试验设计

在单因素试验基础上,选择提取温度、时间、次数、固液比为考察因素,采用正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,以多糖得率为考察指标,利用DPS 3.01数据处理系统进行方差分析,筛选匙羹藤多糖最佳提取条件,并对最佳条件进行验证试验。

1.2.6 体外抗氧化-清除羟自由基活性实验^[4]

利用 H_2O_2 和 Fe^{2+} 混合发生Fenton反应,生成具有很高反应活性的 $\cdot OH$,在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot OH$ 并产生有色物质,该物质在510nm下有最大吸收。但若加入具有清除作用的物质,便会与水杨酸竞争,从而使有色产物生成量减少。本实验在Smironff等^[5]报道的方法的基础上进行了改进,在试管中依次加入6mmol/L $FeSO_4$ 溶液2ml、不同浓度粗多糖溶液2ml、6mmol/L H_2O_2 溶液2ml,摇匀,静置10min,再加入6mmol/L水杨酸溶液2ml,摇匀,静置30min后于510nm处测得不同粗多糖浓度下的吸光度 A_i ;用水代替水杨酸时测得某浓度粗多糖的本底吸光度 A_j ;用水代替抗氧化剂时测得空白对照吸光度 A_0 。清除率按下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 温度的影响

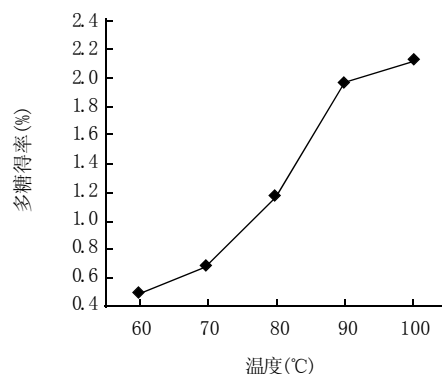


图1 提取温度对多糖得率的影响

Fig.1 Effects of temperature on yield of polysaccharides

图1为固液比1:20、时间3h、提取2次时不同温度对多糖得率的影响。可以看出多糖得率随着温度升高而增加,在温度低于90℃时,温度对多糖得率的影响比较大,高于90℃后,多糖得率增加幅度较小。

2.1.2 提取时间的影响

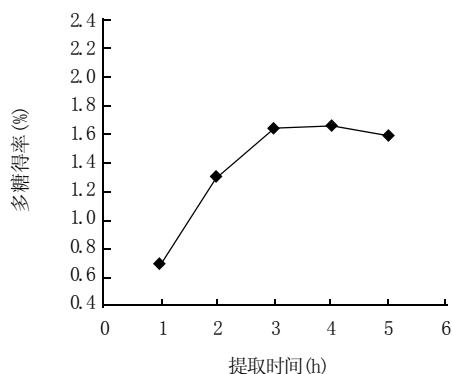


图2 提取时间对多糖得率的影响

Fig.2 Effects of time on yield of polysaccharides

图2为温度90℃、固液比1:20、提取2次时不同提取时间对多糖得率的影响。结果表明,提取时间在3h内,多糖得率随时间的增加而增加,但提取时间超过3h后,多糖得率略有减少。因此提取时间为3h适宜。

2.1.3 固液比的影响

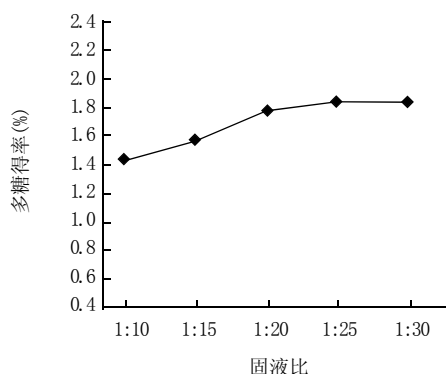


图3 固液比对多糖得率的影响

Fig.3 Effects of ratio of solid-liquid on yield of polysaccharides

图3为温度90℃、时间3h、提取2次时不同固液比对多糖得率的影响。结果表明,固液比低于20时,随着固液比的增加,多糖得率有所增加。当固液比大于20后,多糖得率增加很少。考虑到固液比大,会给后续工序带来困难,消耗较多热能,且长时间浓缩也会破坏匙羹藤多糖,综合各方面考虑,固液比为1:15~1:20较为合适。

2.1.4 提取次数的影响

图4为温度90℃、固液比1:20、时间3h时不同提

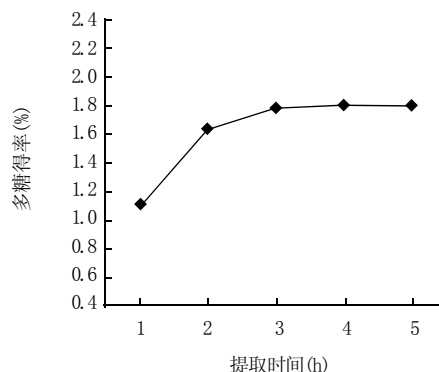


图4 浸提次数对多糖得率的影响

Fig.4 Effects of times on yield of polysaccharides

取次数对多糖得率的影响。实验表明,提取次数在3次内,多糖得率增加明显,3次以后增加缓慢。因此提取次数3次为宜。

2.2 正交试验

2.2.1 正交试验设计和结果的直观分析

在上述单因素试验的基础上,选定四因素三水平作正交试验。因素水平见表1,正交试验结果见表2。

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A温度(℃)	B时间(h)	C 固液比	D 提取次数
1	80	1	1:15	1
2	90	2	1:20	2
3	100	3	1:25	3

表2 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test

序号	A温度(℃)	B时间(h)	C 固液比	提取次数	D 多糖得率(%)
1	1	1	1	1	0.86
2	1	2	2	2	1.13
3	1	3	3	3	1.25
4	2	1	2	3	1.52
5	2	2	3	1	1.49
6	2	3	1	2	1.83
7	3	1	3	2	1.96
8	3	2	1	3	2.15
9	3	3	2	1	2.04
K ₁	1.08	1.45	1.61	1.46	
K ₂	1.61	1.59	1.56	1.64	
K ₃	2.05	1.71	1.57	1.64	
R	0.97	0.26	0.05	0.18	

从表2中的极差分析可知,影响匙羹藤多糖得率因素的主次顺序依次是温度(A)>时间(B)>次数(D)>固液比(C);最优组合为A₃B₃C₁D₂,即温度100℃,时间3h,固液比1:15和提取次数2次。

2.2.2 正交试验的方差分析结果

表3 正交试验方差分析表
Table 3 Table of variance analysis of orthogonal test

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	1.41602	2	0.70801	301.99526	0.00330
B	0.10176	2	0.05088	21.70142	0.04405
C	0.00469	2	0.00234		
D	0.06242	2	0.03121	13.31280	0.06987
误差	0.0047	2	0.00234		
总和	1.58489	8			

由方差分析表的F值可知,各因素对试验结果的影响程度是温度>提取时间>提取次数>固液比,温度有显著性差异,这与直观分析结果相吻合。

2.4 验证实验

以最优工艺条件(温度100℃,提取时间3h,固液比1:15,提取2次)进行验证实验,匙羹藤多糖的得率为2.21%,粗多糖中多糖含量为25.57%。

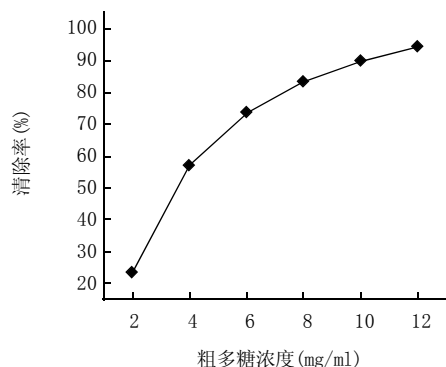


图5 匙羹藤粗多糖对羟自由基的清除作用

Fig.5 Scavenging effects of *Gymnema sylvestre* polysaccharides on hydroxyl radicals

2.5 匙羹藤粗多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

图5为匙羹藤粗多糖对羟自由基的清除率。可见,匙羹藤粗多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用明显,并且随着粗多糖浓度的增加,清除能力增强,表明匙羹藤粗多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力与其浓度具有明显的量效关系,匙羹藤粗多糖浓度为3.50mg/ml时其清除率达50%,浓度为12mg/ml时羟自由基清除率达到94.42%。

3 结论

影响匙羹藤多糖得率因素的主次顺序为温度>时间>提取次数>固液比,水提法提取匙羹藤多糖的最佳工艺条件为:温度100℃,固液比1:15,时间3h和提取次数2次。在该工艺条件下匙羹藤多糖得率为2.21%,粗多糖中多糖含量为25.57%。匙羹藤粗多糖具有清除羟自由基能力,并具有明显的量效关系,粗多糖浓度为3.50mg/ml时其清除率达50%,浓度为12mg/ml时羟自由基清除率高达94.42%。

参考文献:

- [1] 仰榴青,侯会绒,吴向阳,等.匙羹藤的最新研究进展[J].江苏大学学报:医学版,2004,14(6):544-549.
- [2] 董群,郑丽伊,方积年.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):550-553.
- [3] 吴向阳,茆广华,仰榴青,等.银杏外种皮粗多糖提取工艺研究[J].食品科学,2006,27(10):372-375.
- [4] 杨方美,王林,胡秋辉.鼠尾藻多糖的制备及其抗氧化活性[J].食品科学,2005,26(2):224-227.
- [5] SMIMOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057-1060.