

提取方法对荷叶多糖得率及抗氧化活性的影响

Effects of different extraction methods on yield and antioxidant activity of lotus leaves polysaccharide

邢颖 景艳芳

XING Ying JING Yan-fang

(运城学院生命科学系, 山西 运城 044000)

(Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000, China)

摘要:采用热水法、超声波法、酶法和碱法提取荷叶多糖,考察4种提取方法对荷叶多糖得率、结构及抗氧化活性的影响。结果表明:多糖得率依次为超声波法>酶法>热水法>碱法;4种方法提取的多糖在3 388, 1 617, 1 400, 1 137 cm^{-1} 处有典型的吸收峰;热水法提取的多糖其抗氧化性最好,但提取时间较长,若考虑时间,可采用超声波法对荷叶多糖进行提取。

关键词:荷叶;多糖;提取方法;抗氧化活性

Abstract: The effects of four extraction methods, which include hot water extraction, ultrasonic extraction, enzyme extraction and alkali extraction on the yield, structure and antioxidant activity of crude polysaccharide of lotus leaf were investigated. The results showed that the yields of polysaccharide were as follows: ultrasonic extraction > enzymatic extraction > hot water extraction > alkali extraction. The polysaccharide extracted by four methods had four characteristic absorption peaks, including 3 388, 1 617, 1 400 and 1 137 cm^{-1} . The polysaccharides obtained by hot water extraction showed the best antioxidant capacity, but the extraction time was longer. In contrast, ultrasonic method is recommended with concerning about extraction time.

Keywords: lotus leaves; polysaccharide; extraction method; antioxidant activity

荷叶为睡莲科水生植物莲(*Nelumbo nucifera*)的叶片,又被称为莲叶、藕叶,是中国传统的药食同源植物^[1-2]。荷叶中含有多种生物活性成分,如多酚、类黄酮、多糖及生物碱等^[3]。研究^[4]表明,植物多糖对人体具有多种功能,如抗肿瘤、增强免疫力、调节血糖血脂、抗辐射等。

多糖的提取方法主要有热水浸提法、酸碱提取法、超声波辅助法、微波提取法、酶法辅助提取、超高压及超临界萃取法等^[5]。汪瑞敏等^[6]对比了热水、微波、超声、微波结合超声4种提取方式对天麻多糖含量及抗氧化活性的影响,洪军等^[7]对比了热水、超声波及微波对禹州漏芦多糖提取率、抗菌及抗氧化的影响。而不同提取方法对荷叶多糖的影响尚未见报道。试验拟采用热水法、碱法、超声波法及酶法4种提取方式对荷叶多糖进行提取纯化,并以DPPH·、ABTS⁺·、·OH及还原力为指标分析荷叶粗多糖的抗氧化活性,旨在为荷叶多糖的加工利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

干荷叶:60℃烘至恒重,粉碎后过0.25 mm筛,4℃密封保存备用,市售;

无水乙醇、三氯甲烷、乙醚、氢氧化钠、盐酸、硫酸、过硫酸钾、葡萄糖、过氧化氢、硫酸亚铁、水杨酸、溴化钾:分析纯,天津大茂化学试剂厂;

纤维素酶:≥30 U/mg,西陇化工有限公司;

V_C:分析纯,西陇化工有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

数控超声波清洗器:KQ-500DE型,昆山市超声仪器有限公司;

循环水真空泵:SHZ-DⅢ型,郑州英峪予华仪器有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-5200型,上海元析仪器有限公司;

pH计:PHS-3C型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

离心沉淀机:LXJ-II型,上海医分仪器制造有限公司;

粉末压片机:769YP-15A型,天津市科器高新技术

基金项目:山西省重点学科建设经费资助项目(编号:FSKSC)

作者简介:邢颖(1988—),女,运城学院讲师,硕士。

E-mail: xingyingnice@163.com

收稿日期:2020-02-18

公司;

傅立叶红外光谱分析仪: NICOLET380 型, 天津天光光学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 荷叶多糖的提取

(1) 超声波法: 称取一定量荷叶粉, 加入 20 倍量蒸馏水, 超声功率 400 W, 提取时间 40 min, 提取两次, 抽滤, 合并提取液。

(2) 热水法: 称取一定量荷叶粉, 加入 20 倍量蒸馏水, 90 °C 水浴提取两次, 每次 2 h, 抽滤, 合并提取液。

(3) 酶法: 称取一定量荷叶粉, 按固液比 1 : 15 (g/mL) 加入蒸馏水, 加入 0.1 g 纤维素酶, 用缓冲溶液调节 pH 为 4.5, 50 °C 恒温震荡 1 h, 提取两次, 抽滤, 合并提取液。

(4) 碱法: 称取一定量荷叶粉, 按固液比 1 : 20 (g/mL) 加入 1.2 mol/L 氢氧化钠溶液, 60 °C 提取 2 h, 提取两次, 抽滤, 合并提取液。

1.2.2 荷叶多糖的纯化 采用 Sevag 脱蛋白、醇沉静置过夜, 3 500 r/min 离心 20 min, 取杯底沉淀冷冻干燥, 即荷叶粗多糖。

1.2.3 多糖含量测定 采用苯酚—硫酸法^[8]。称取 10 mg 粗多糖定容至 100 mL, 配制成 0.1 mg/mL 的粗多糖溶液。以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 0.615X + 0.0289$, $R^2 = 0.9957$, 并按式(1)计算多糖得率。

$$Y = \frac{C \times V}{M}, \quad (1)$$

式中:

Y——多糖得率, mg/g;

C——荷叶粗多糖配制液中多糖浓度, mg/mL;

V——配制液体积, mL;

M——荷叶质量, g。

1.2.4 红外光谱表征 取粗多糖 1 mg 进行溴化钾压片, 扫描范围 400~4 000 cm^{-1} , 扫描次数 15~16 次。

1.2.5 抗氧化活性测定

(1) DPPH·清除能力: 参照文献[9]并修改。取不同浓度的多糖溶液 2 mL, 加入 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液 4 mL, 摇匀, 避光反应 1 h, 测定 517 nm 处吸光度值。以蒸馏水作空白对照, V_c 作阳性对照, 并按式(2)计算 DPPH·清除率。

$$S_1 = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S_1 ——自由基清除率, %;

A_0 ——空白组吸光度;

A——样品吸光度。

(2) ABTS⁺·清除能力: 参照文献[10]并修改。取 7.4 mmol/L ABTS 溶液和 2.6 mmol/L 过硫酸钾溶液各 0.2 mL, 混匀, 暗处反应 12~16 h 形成 ABTS⁺·母液, 用无水乙醇稀释至 $A_{734 \text{ nm}}$ 为 0.68~0.72。取多糖溶液 0.8 mL, 加入 ABTS⁺·溶液 3.2 mL, 摇匀, 避光反应 10 min, 测定 734 nm 处吸光度值, 以无水乙醇作空白对照, V_c 作阳性对照, 并按式(2)计算 ABTS⁺·清除率。

(3) ·OH 清除能力: 参照文献[11]并修改。取 1 mL 多糖溶液, 加入 9 mmol/L 乙醇—水杨酸溶液、9 mmol/L FeSO_4 溶液、8.8 mmol/L H_2O_2 溶液及蒸馏水各 1 mL, 摇匀, 37 °C 水浴 30 min, 冷却, 测定吸光度值。用蒸馏水代替样液作空白对照, 蒸馏水代替 H_2O_2 溶液作样品对照, V_c 作阳性对照, 按式(3)计算·OH 清除率。

$$S_2 = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S_2 ——·OH 清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度;

A_x ——样品吸光度;

A_{x_0} ——样品对照组吸光度。

(4) 还原力: 参照文献[12]并修改。取 1 mL 多糖溶液, 依次加入 2 mL 磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH 6.6) 和 1% 铁氰化钾溶液, 摇匀, 50 °C 水浴 20 min, 冷却, 加入 2 mL 10% TCA 溶液、2 mL 蒸馏水、0.4 mL 0.1% FeCl_3 溶液, 摇匀, 50 °C 保温 10 min, 测定 700 nm 处吸光度值, 以 V_c 作阳性对照, 蒸馏水作空白对照。

1.2.6 数据处理 试验数据均为 3 次重复的平均值, 表示为“平均值±标准偏差”, 采用 SPSS 15.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 多糖得率比较

由图 1 可知, 不同提取方法对多糖得率影响差异显著 ($P < 0.05$), 其中超声波法的得率最高, 为 14.11 mg/g, 其次为酶法和热水法。超声波作用过程中其空化作用、机械作用可加速荷叶细胞壁的破碎, 有利于胞内物质的释放, 提高多糖浸出率, 且超声波法相比于其他提取方式明显节约时间^[13-14]。

2.2 红外光谱分析

由图 2 可知, 荷叶多糖在 4 000~500 cm^{-1} 内具有多糖的典型吸收峰, 且 4 种方法的峰形总体相似。其中 3 388 cm^{-1} 处有较强且宽的吸收峰, 是多糖分子中 O—H 的伸缩振动, 说明荷叶多糖存在分子内氢键^[15]; 1 617 cm^{-1} 处振动峰是 C=O 的非对称性伸缩振动^[16]; 1 400 cm^{-1} 处为全集—CHO 的 C—H 变形振动吸收峰^[17]; 1 137 cm^{-1} 处是吡喃糖环内酯和羟基产生的吸收

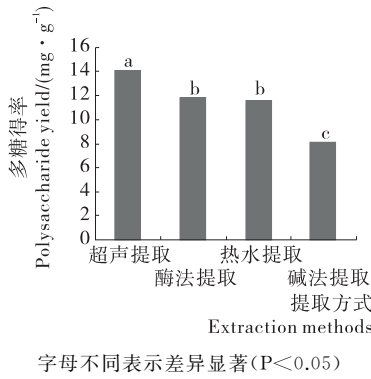


图 1 提取方法对荷叶多糖得率的影响

Figure 1 The effect of different extraction methods on the polysaccharides yield of lotus leaves

峰,是由糖环上 C—O—C 的 C—O 伸缩振动和 C—O—H 的 O—H 变角振动引起的,为葡聚糖较为典型的红外光谱特征^[18-19]。综上,不同提取方式的荷叶多糖具有多糖化合物的特征吸收峰。

2.3 抗氧化活性比较

2.3.1 DPPH · 清除能力 由图 3 可知,4 种荷叶粗多糖浓度在 0.013~0.520 mg/mL 范围内对 DPPH · 有一定的清除能力,且随多糖浓度的增大而增强,并呈明显的剂量依赖性,其清除率大小依次为热水法>超声波法>碱法>酶法。当样液浓度为 0.013 mg/mL 时,热水法提取的多糖对 DPPH · 的清除率为 V_C 的 0.23 倍,而酶法提取

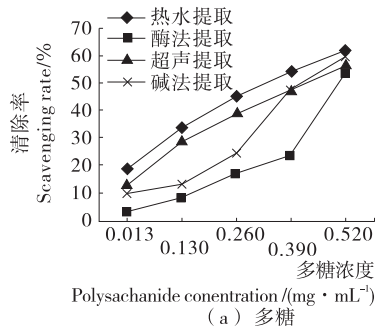


图 3 粗多糖的 DPPH · 清除能力

Figure 3 DPPH · scavenging capacity of crude polysaccharides

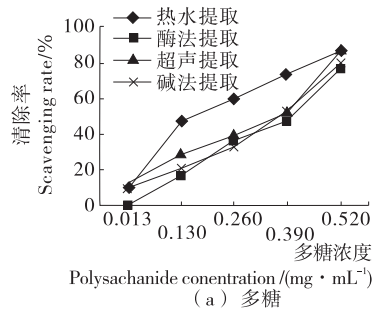


图 4 粗多糖的 ABTS⁺ · 清除能力

Figure 4 ABTS⁺ · scavenging capacity of crude polysaccharides

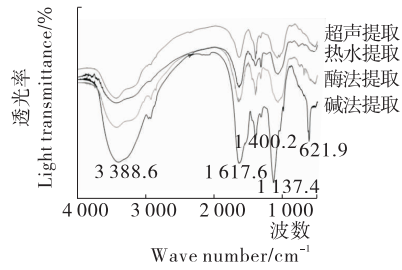


图 2 荷叶多糖红外光谱图

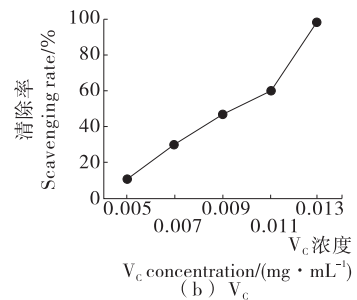
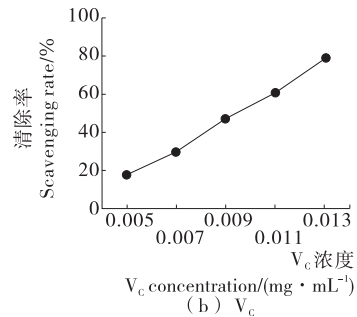
Figure 2 IR spectrum of crude polysaccharides from lotus leaves

的仅为 V_C 的 0.03 倍。

2.3.2 ABTS⁺ · 清除能力 由图 4 可知,4 种荷叶多糖对 ABTS⁺ · 有一定的清除能力,且随多糖浓度的升高依次增大,并呈剂量依赖关系,其清除能力依次为热水法>超声波法>碱法>酶法,当多糖浓度为 0.52 mg/mL 时,其清除率分别为 85.9%,87.9%,79.4%,76.5%,均低于 V_C 的。

2.3.3 ·OH 清除能力 由图 5 可知,4 种荷叶多糖对 ·OH 的清除能力随多糖浓度的增加而增加,并呈剂量依赖关系,但远不如 V_C 的。当多糖浓度为 16 mg/mL 时,热水法、超声波法、酶法及碱法提取粗多糖的清除率分别为 30.22%,27.90%,26.20%,25.80%。

2.3.4 还原力 由图 6 可知,4 种荷叶粗多糖均具有一定的还原力,且随浓度的增大而增强,但相比于 V_C,其还原



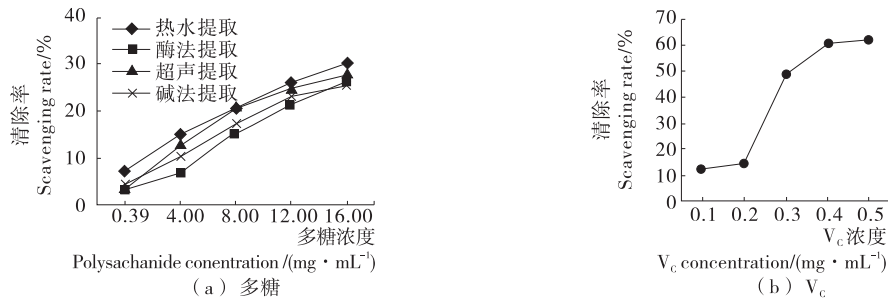


图5 粗多糖的·OH清除能力

Figure 5 ·OH scavenging capacity of crude polysaccharides

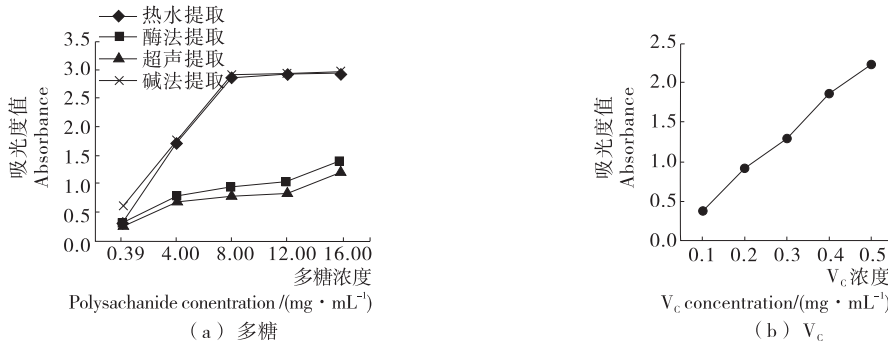


图6 粗多糖的还原力

Figure 6 Reducing ability of crude polysaccharides

力较弱。当多糖浓度为 8 mg/mL 时,热水法和碱法的 $A_{700\text{ nm}}$ 达 2.91, 2.89, 而超声波法和酶法的 $A_{700\text{ nm}}$ 仅为 0.93, 0.81。

3 结论

试验表明,超声波法、酶法、热水法及碱法 4 种提取方式的多糖得率依次为 14.11, 11.83, 11.60, 8.19 mg/g, 且红外光谱相似,均具有典型多糖的特征吸收峰。当浓度为 0.013~0.520 mg/mL 时,4 种粗多糖对 DPPH· 和 ABTS⁺· 具有显著的抗氧化活性;当浓度为 0.39~8.00 mg/mL 时,4 种粗多糖对还原力和·OH 的清除效果较好,且清除率与多糖浓度呈正相关,其中热水法和超声波法的抗氧化活性较好,但均低于 V_c 的。综上,超声波法的多糖得率最高,抗氧化活性较强,提取时间最短。后续可对荷叶多糖的单糖组成及活性进行研究。

参考文献

- [1] 陈曦, 戚进. 荷叶中黄酮和生物碱的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 219-222.
- [2] 王智能, 王允, 吴光旭, 等. 体外模拟胃肠消化对不同热处理荷叶中酚类物质释放量及抗氧化活性的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(10): 1 975-1 982.
- [3] 涂宗财, 寇玉, 王辉, 等. 荷叶多糖的超声波辅助提取和抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 108-112.
- [4] 蔡铭, 陈思, 骆少磊, 等. 膜分离与醇沉技术纯化猴头菇粗

多糖的比较[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 83-90.

- [5] ZHANG Zuo-fa, LV Guo-ying, HE Wei-qiang, et al. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(2): 1 524-1 531.
- [6] 汪瑞敏, 朱秋劲, 张春花, 等. 不同提取方法对天麻多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(3): 208-213.
- [7] 洪军, 胡建业, 张慧敏, 等. 不同提取方法对禹州漏芦多糖含量及抗菌抗氧化活性的影响[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 238-241.
- [8] 梁琰, 赵志国, 张敏敏, 等. 超声辅助提取苯酚—硫酸法测定野生平盖灵芝多糖含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 133-137.
- [9] IMJONGJAI RAK S, RATANAKHANOKCHAI K, LAO-HAKUNJIT N, et al. Biochemical characteristics and antioxidant activity of crude and purified sulfated polysaccharides from *Gracilaria fisheri*[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2016, 80(3): 524-532.
- [10] SHAH S R, UKAEGBU C I, HAMID H A, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the stems of *Flammulina velutipes* and *Hypsizygus tessellatus* (white and brown var.) extracted with different solvents[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12(3): 1 947-1 961.
- [11] 范三红, 任嘉兴, 张锦华, 等. 响应面优化羊肚菌多糖提取工艺及抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 179-185, 192.

(下转第 175 页)

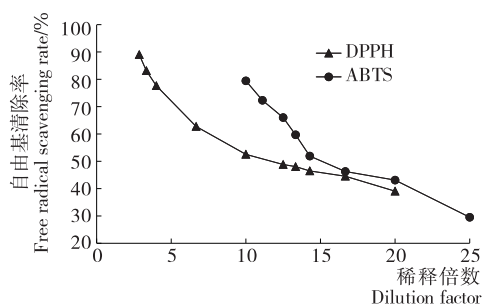


图4 正山小种精油的抗氧化活性

Figure 4 The antioxidant activity of Lapsang Souchong essential oil

稀释 20 倍后,该正山小种精油的 DPPH 自由基清除率为 39.1%;稀释 25 倍后,正山小种精油的 ABTS 自由基清除率仍有 29.5%。对比抗坏血酸的 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率可知,该正山小种精油的 DPPH 自由基清除活力为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸当量;ABTS 自由基清除活力为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸当量。

茶叶中的抗氧化成分主要认为是多酚类物质^[7-9],试验结果表明,正山小种的挥发性香气成分也具有一定的抗氧化活性,是一种潜在的天然抗氧化剂。Yu 等^[10]探究了 6 种不同来源的老鹰茶挥发油的抗氧化活性,结果表明这些挥发油均有一定的抗氧化和抗菌特性;田光辉等^[11]研究发现新鲜茶叶挥发油和加工后新茶的挥发油对 OH 自由基均有清除作用,而新鲜茶叶挥发油对 OH 自由基有较强的清除作用;Yanagimoto 等^[12]探究了绿茶、乌龙茶、红茶挥发性成分的抗氧化活性,发现绿茶挥发性成分的抗氧化活性最好。

3 结论

试验以正山小种为原料,通过大孔树脂吸附法制备了正山小种精油,优化了制备工艺。以该优化工艺所制备的正山小种精油具备典型的正山小种的香气特征,香气成分的浓缩倍数为 35,回收率约为 51%,并且具备一定的抗氧化活性。但该方法的整体香气回收率还有待提高;或者也可通过开发以正山小种加工下脚料为原料制备精油的方法,以降低精油的生产成本。

参考文献

[1] 郭雯飞, 吕毅, 江元勋. 正山小种和烟小种红茶的香气组成[J]. 中国茶叶加工, 2005(4): 18-22.
 [2] 李健权. 不同产地红茶香气成分的测定及分析[J]. 湖南农业科学, 2017(8): 85-92.
 [3] 廉明, 吕世懂, 吴远双, 等. 我国 4 种红茶的挥发性成分分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2015(3): 301-309.
 [4] 何理琴, 王彩楠, 倪莉, 等. 正山小种挥发性香气组成及其在多次沸水浸提下的释放规律研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2018(5): 23.

[5] LV Shi-dong, WU Yuan-shuang, SONG Yu-zhu, et al. Multivariate analysis based on GC-MS fingerprint and volatile composition for the quality evaluation of pu-erh green tea[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(2): 321-333.
 [6] 郭虹雯, 赵惠茹, 倪莉, 等. 武夷岩茶多酚组分及其抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2018(12): 319-325.
 [7] 李丹, 曹永, 王华, 等. 茶叶提取物体外抗氧化活性与其功能性成分含量的相关性研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 163-168.
 [8] 谢虹, 罗志聪, 李熙灿. 茶黄素抗氧化化学机制研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 23-26.
 [9] 王学渊, 刘静宜, 洪艳平, 等. 不同类型江西名茶儿茶素含量及体外抗氧化能力比较[J]. 食品与机械, 2019, 35(6): 152-158.
 [10] YU Bao, ZHANG Dan, YAN Xue-wei, et al. Comparative evaluation of the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the volatile oils of hawk tea from six botanical origins[J]. Chemistry and Biodiversity, 2016, 13(11): 1 573-1 583.
 [11] 田光辉, 刘存芳, 赖普辉, 等. 茶叶挥发性成分及其生物活性的研究[J]. 食品科技, 2007(12): 78-82.
 [12] YANAGIMOTO K, OCHI H, LEEK G, et al. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(25): 7 396-7 401.

(上接第 169 页)

[12] 许女, 贾瑞娟, 陈旭峰, 等. 鸡腿菇子实体多糖的体内、体外抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 40-46.
 [13] 高行恩, 王洪新. 不同提取方法对山药多糖含量及其体外抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 256-262.
 [14] 葛智超, 李燕, 施文正, 等. 裸藻多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 186-191.
 [15] 景永帅, 张丹参, 张瑞娟, 等. 提取方法对北沙参多糖性质及生物活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 149-153.
 [16] 黄玉龙, 高清雅, 全婷, 等. 不同提取方法对兰州百合多糖结构及抗氧化活性的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 126-131, 94.
 [17] 黄依佳, 吴剑荣, 朱莉, 等. 蓝藻多糖的分离、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 176-180.
 [18] ZHU Yang, LI Qian. Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Herici-umerinaceus*[J]. Carbohydr Polym, 2014, 101(1): 606-613.
 [19] 张鹏, 张静. 碱提虎奶菇菌核多糖的分离纯化及结构分析[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 41(4): 105-108.