

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90203

超声细胞破碎仪辅助提取桑葚多糖及其抗氧化性分析

Extraction of mulberry polysaccharide by ultrasonic cell crusher-assisting and its antioxidant activity analysis

张秋红

ZHANG Qiu-hong

(商丘学院风景园林学院, 河南 商丘 476000)

(College of Landscape Architecture, Shangqiu University, Shangqiu, Henan 476000, China)

摘要:目的:研究细胞破碎仪辅助热水浸提法提取桑葚多糖工艺和抗氧化活性。方法:以浸提时间、料液比、超声时间、超声功率、浸提温度为试验条件,通过四因素三水平正交试验考察桑葚多糖最优提取条件。并通过对比维生素 C 和桑葚多糖对 1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)和羟自由基(·OH)的清除率来测定桑葚多糖的抗氧化能力。结果:当浸提时间为 30 min、超声功率为 160 W、超声时间为 12.5 min、料液比为 1:30 (g/mL)、浸提温度为 30 ℃ 时桑葚多糖得率最高为 (6.63 ± 0.07)%。桑葚多糖溶液对 ·OH 具有较大的清除能力,达 (76.21 ± 2.21)%,但维生素 C 的抗氧化能力优于桑葚多糖。结论:超声细胞破碎仪辅助热水浸提法有利于桑葚多糖提取,且能保持其高效的抗氧化活性。

关键词:细胞破碎仪;桑葚多糖;热水浸提;抗氧化性

Abstract: Objective: The cell crusher-assisted hot water extraction and antioxidant activity of mulberry polysaccharide were investigated. Methods: Extraction time, solid-liquid ratio, ultrasonic time, ultrasonic power and extraction temperature were used as the test conditions, the optimum extraction conditions of mulberry polysaccharide were investigated by four factors and three levels of orthogonal test. The antioxidant capacity of mulberry polysaccharide was determined by comparing the scavenging rates of V_C and mulberry polysaccharide to DPPH· and hydroxyl radical (·OH). Results: The results showed that the highest yield of mulberry polysaccharide was (6.63 ± 0.07)%, when the extraction time was 30 min, the ultrasonic power was

160 W, the ultrasonic time was 12.5 min, the solid-liquid ratio was 1:30 (g/mL), and the extraction temperature was 30 ℃. In the scavenging test of DPPH· and ·OH, mulberry polysaccharide concentration was positively correlated with the clearance rate, and the scavenging ability of ·OH was (76.21 ± 2.21)%. In the comparison test with the antioxidant capacity of V_C, the results showed that the antioxidant capacity of V_C was better than that of mulberry polysaccharide. Conclusion: Ultrasonic cell crusher-assisted extraction is beneficial to the extraction of mulberry polysaccharide.

Keywords: cell crusher; mulberry polysaccharide; hot water extraction; antioxidant activity

桑葚(*Fructus Mori*)为桑科植物的成熟果穗,是一种药食同源植物,具有抗炎症^[1]、预防脑缺血^[2]等作用。多糖作为桑葚的主要活性物质之一,具有降血糖、抗氧化、保护肾脏调节免疫等药理作用^[3-4]。目前桑葚多糖的提取方法有酶法提取、超声波辅助提取、酶—超声波联合提取、微波辅助提取、大孔吸附树脂纯化提取、热水提取法、高速剪切提取等^[5-7]。但这些方法工艺复杂、提取时间长、提取率低。王庆等^[8]报道了提取方法对多糖得率和活性都有一定的影响。祝新媛^[9]研究了不同提取方法对桑葚多糖提取率的影响,得出超声辅助提取法的提取率比单独热水提取法的高。与传统超声波清洗机辅助提取法比较,细胞破碎仪在桑葚样品中可形成更强烈的空化效应,桑葚样品的细胞壁被仪器形成的高度局部化温度、冲击波和剪切力破坏,增大了样品与萃取浸提液的接触面积^[10]。因此,研究拟采用超声波细胞破碎仪辅助热水浸提法提取桑葚多糖,并对桑葚多糖的抗氧化能力进行分析,为今后桑葚多糖的分离、纯化提供依据。

基金项目:河南省民办教育协会项目(编号:HNMXL20210639);
河南省新农科研究与实践项目(编号:2020JGLX52)

作者简介:张秋红(1986—),女,商丘学院讲师,硕士。

E-mail: 570073063@qq.com

收稿日期:2022-03-01

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑桑葚干:新疆和田市丝路果果特产;

石油醚(沸程 30~60 °C)、三氯甲烷、正丁醇、95%乙醇:分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

超声波细胞破碎仪:TL-ST400 型,江苏天翎仪器有限公司;

高速多功能粉碎机:RHP-2000A 型,天津荣浩机电设备有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-4 型,上海树立仪器仪表有限公司;

高速离心机:TCL-16 型,常州金坛良友仪器有限公司;

粗脂肪测定仪:SZF-06A 型,上海洪纪仪器设备有限公司;

电热鼓风干燥箱:DGH-9140A 型,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 桑葚样品处理 将桑葚干样品烘干至恒重,粉碎,过 70 目筛后密封保存备用。

1.3.2 脱脂 参照 GB 5009.6—2016 并修改。称取处理好的桑葚样品 4.000 g,水浴温度 70 °C 回流抽提 4 h,控制每分钟 80 滴左右。脱脂后滤掉废液得桑葚样品。

1.3.3 细胞破碎仪辅助热水浸提桑葚多糖 称取脱脂后的桑葚样品 1.000 g,按料液比 1:30 (g/mL)加入蒸馏水,65 °C 恒温水浴锅中用细胞破碎仪辅助浸提,将超声波细胞破碎仪变幅杆末端插入液面 8 mm 并使其位于容器中心位置。变幅杆转换开关打到 $\Phi 6$,设置超声时间 1.2 s,间歇时间 1.5 s,用纱布过滤混合物,3 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,65 °C 水浴浓缩至液体体积为 10 mL。

1.3.4 桑葚多糖的脱蛋白 根据文献[9]稍作修改:将浓缩后的桑葚样品置于分液漏斗中,按体积比 1:2 加入 Sevag 试剂($V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$),充分摇匀,静置,待分液漏斗中液体分层完毕后,除去底层的有机溶剂及中间层的蛋白质,收集上层液,3 500 r/min 离心 10 min,除去残留蛋白质,收集上清液备用。

1.3.5 桑葚多糖的制备 向脱蛋白后的上清液中加入 4 倍体积 95%乙醇,混匀静置片刻后沉淀析出,3 500 r/min 离心 10 min,弃上清,将沉淀放置于蒸发皿中,65 °C 干燥 1.5 h,即为桑葚多糖提取物。

1.3.6 桑葚多糖得率测定 按式(1)计算桑葚多糖得率^[9]。

$$X = M/m \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

X ——桑葚多糖得率,%;

M ——桑葚多糖的质量,g;

m ——脱脂桑葚粉的质量,g。

1.3.7 单因素试验

(1) 浸提时间:固定料液比 1:30 (g/mL),浸提温度 60 °C,细胞破碎仪超声时间 7.5 min,超声功率 100 W,考察浸提时间^[11](20,30,40,50,60 min)对桑葚多糖得率的影响。

(2) 料液比:固定浸提时间 30 min,浸提温度 60 °C,超声时间 7.5 min,超声功率 100 W,考察料液比[1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60 (g/mL)]对桑葚多糖得率的影响。

(3) 超声时间:固定浸提时间 30 min,料液比 1:30 (g/mL),浸提温度 60 °C,超声功率 100 W,考察超声时间(7.5,10.0,12.5,15.0,17.5 min)对桑葚多糖得率的影响。

(4) 超声功率:固定浸提时间 30 min,料液比 1:30 (g/mL),超声时间 15 min,浸提温度 60 °C,考察超声功率(100,120,140,160,180 W)对桑葚多糖得率的影响。

(5) 浸提温度:固定浸提时间 30 min,料液比 1:30 (g/mL),细胞破碎超声时间 15 min,超声功率 160 W,考察浸提温度(30,40,50,60,70 °C)对桑葚多糖得率的影响。

1.3.8 桑葚多糖的抗氧化性

(1) DPPH 自由基清除能力:根据文献[9]。

(2) 羟自由基清除能力:根据文献[9]并修改,取 1 mL 硫酸亚铁溶液(9 mmol/mL),1 mL 水杨酸的无水乙醇溶液(9 mmol/mL),1 mL 不同质量浓度桑葚多糖样液(0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 mg/mL),1 mL H_2O_2 溶液(8.8 mmol/mL)后摇匀,37 °C 反应 30 min,测定 517 nm 处吸光值 A_1 。用 1 mL 蒸馏水代替桑葚多糖样液,记 517 nm 处吸光值为 A_0 ,用 1 mL 蒸馏水代替过氧化氢溶液,记 517 nm 处吸光值为 A_2 。以维生素 C 为对照品,按式(2)计算羟自由基清除活性。

$$X = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

X ——羟自由基清除率,%。

1.4 数据处理

试验数据以平均值±标准差表示,每个试验重复 3 次,利用 SPSS 22.0、Office 2016 软件绘图和统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

由图 1(a)可知,在一定浸提时间内,多糖溶出量会增加,但长时间的高温浸提也会导致桑葚多糖的降解^[12],桑

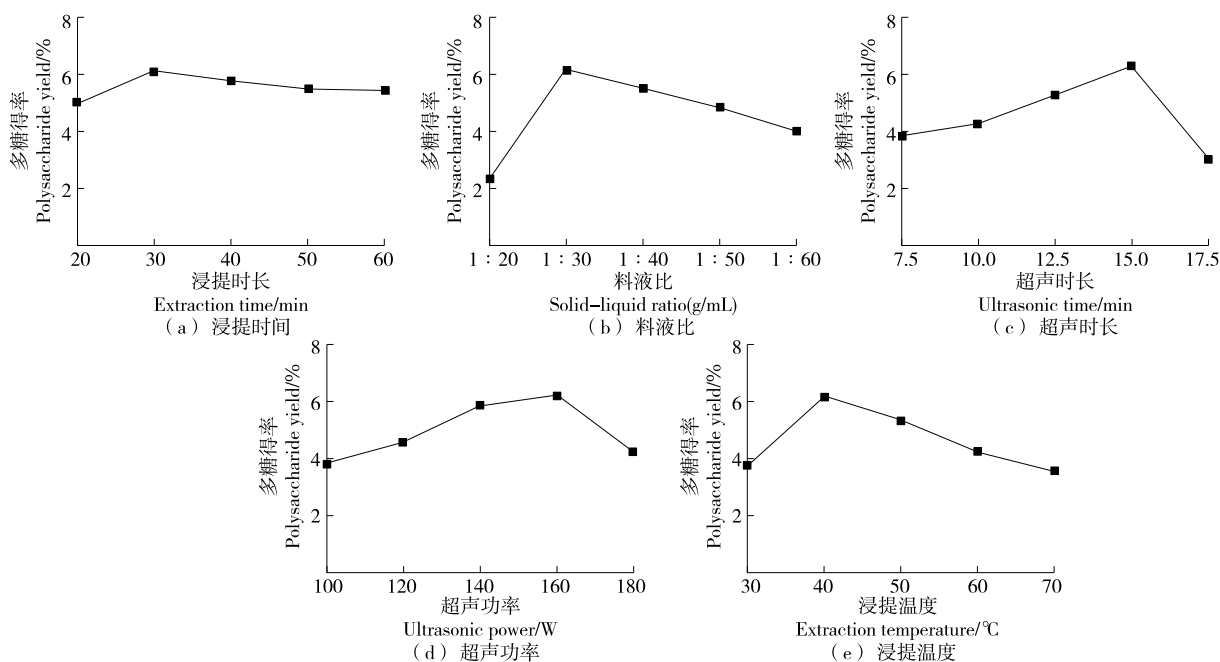


图 1 各因素对桑葚多糖得率的影响

Figure 1 Effects of various factors on yields from mulberry polysaccharides

葚多糖在浸提时间为 30 min 时得率达到最大值(6.16 ± 0.02)%。因此,适宜的浸提时间为 30 min,与谭西^[13]的研究相比,细胞破碎仪辅助提取的效果更好,但浸提时间对得率的影响变化趋势较小。

由图 1(b)可知,料液比过小,不利于桑葚多糖的溶出,料液比增大桑葚多糖溶出量增加,料液比为 1:30 (g/mL)时,桑葚多糖得率达最高值(6.19 ± 0.06)%。当桑葚多糖充分溶出后,溶剂中桑葚多糖的量已基本恒定,再增大溶剂的量,溶剂中桑葚多糖的量也不会增加^[14],因此适宜的料液比为 1:20~1:40 (g/mL)。

由图 1(c)可知,一定范围内超声时间延长有助于提高桑葚多糖得率,但长时间超声会导致部分多糖结构发生降解,使得到的水溶性多糖分支增加^[15],得率下降,在 15 min 时达最大值(6.20 ± 0.10)%。因此适宜的超声时间为 12.5~17.5 min。景荣琴等^[11]研究得到的超声时间为 23.5 min,较试验时间长,说明细胞破碎仪辅助提取桑葚多糖更省时高效。

由图 1(d)可知,随着超声功率的增大,超声波空化作用增强,产生的空化泡破碎越剧烈,桑葚多糖得率越高。但超声功率过高,桑葚多糖结构可能被破坏而相对减少^[16],在 160 W 时达最大值(6.23 ± 0.04)%。魏然等^[17]研究得到的最佳超声功率为 360 W,远高于试验的超声功率,进一步证实细胞破碎仪的空化效应比超声波清洗机更强。因此,适宜的超声功率为 140~180 W。

由图 1(e)可知,桑葚多糖得率随浸提温度的升高而增大,当浸提温度为 40 °C 时,多糖得率达最大值($6.25 \pm$

0.02)% ,之后逐渐下降,与陈禹等^[18]、廖登未等^[19]的变化趋势一致。浸提液温度的升高会加速水分子运动,促进桑葚多糖溶出,提高桑葚多糖得率,但过高的温度可能会使桑葚多糖发生降解,破坏多糖的糖苷键,使桑葚多糖得率降低。故适宜的浸提温度为 30~50 °C。

2.2 正交试验优化

以单因素试验结果为依据,选择细胞破碎仪超声功率、料液比、超声时间以及浸提温度为因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。正交试验因素水平见表 1,正交试验设计及结果见表 2。

由表 2 可知,各因素对桑葚多糖得率的影响主次关系为超声功率>浸提温度>超声时间>料液比。由表 3 可知,超声功率、超声时间及浸提温度对桑葚多糖得率的影响均显著($P < 0.05$),料液比的影响不显著,与极差分析结果一致。桑葚多糖最优的提取条件组合为 $A_2B_1C_2D_1$,即超声功率 160 W、超声时间 12.5 min、料液比 1:30 (g/mL)、浸提温度 30 °C。但实际最优组合为 $A_2B_3C_1D_2$,即超声功率 160 W、超声时间 17.5 min、料液

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels table

水平	A 超声 功率/W	B 超声 时间/min	C 料液比 (g/mL)	D 浸提 温度/°C
1	150	12.5	1:20	30
2	160	15.0	1:30	40
3	170	17.5	1:40	50

表 2 正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal test results

试验号	A	B	C	D	多糖得率/%
1	1	1	1	1	6.14±0.03
2	1	2	2	2	5.80±0.01
3	1	3	3	3	5.86±0.06
4	2	1	2	3	6.26±0.04
5	2	2	3	1	6.20±0.11
6	2	3	1	2	6.28±0.02
7	3	1	3	2	5.96±0.07
8	3	2	1	3	5.66±0.03
9	3	3	2	1	6.12±0.04
k_1	5.93	6.12	6.03	6.15	
k_2	6.25	6.06	6.06	6.01	
k_3	5.91	6.09	6.01	5.93	
R	0.33	0.06	0.05	0.23	

表 3 正交设计方差分析[†]
Table 3 Orthogonal design analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	0.210	2	52.500	19.000	*
B	0.096	2	24.000		*
C	0.004	2	1.000		
D	0.078	2	19.500		*
误差	0.010	2			

[†] * 表示差异显著($P<0.05$)。

比 1:20 (g/mL)、浸提温度 40℃。由于两组试验结果不一致,进行验证实验($n=3$),得桑葚多糖得率分别为(6.63±0.07)%, (6.28±0.12)%。因此桑葚多糖最佳浸提条件为超声功率 160 W、超声时间 12.5 min、料液比 1:30 (g/mL)、浸提温度 30℃。

2.3 桑葚多糖的抗氧化能力

2.3.1 清除 DPPH· 活性 由图 2 可知,当桑葚多糖样品质量浓度从 0.10 mg/mL 升高至 0.90 mg/mL 时,其对 DPPH· 的清除率随溶液质量浓度的增加逐渐增大,与祝新媛^[9]的研究结论一致。当样品质量浓度>0.70 mg/mL,桑葚多糖对 DPPH· 的清除率趋于平缓,显著弱于相同浓度下维生素 C 的清除能力($P<0.05$)。

2.3.2 清除·OH 活性 由图 3 可知,桑葚多糖对·OH 有较强的清除能力,且清除活性与样品质量浓度呈正比。当多糖质量浓度为 0.90 mg/mL 时,桑葚多糖对·OH 的清除率达(76.21±2.21)%,但显著低于对照品维生素 C 的[(87.29±3.15)%]($P<0.05$),说明桑葚多糖对·OH 有一定的清除力,与李德龙等^[20]研究的结论一致。

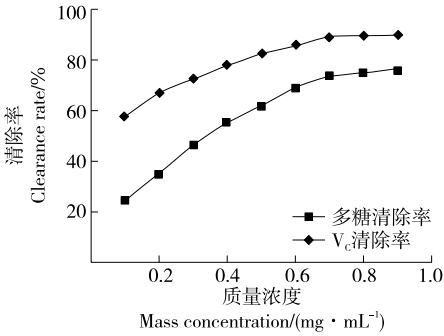


图 2 对 DPPH· 的清除能力
Figure 2 Scavenging ability on DPPH·

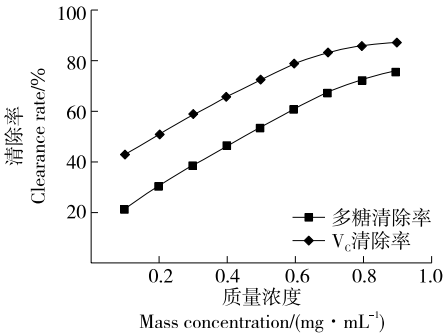


图 3 对·OH 的清除能力
Figure 3 Scavenging ability on·OH

3 结论

采用超声波细胞破碎仪辅助热水浸提法提取了桑葚多糖。结果表明,各因素对桑葚多糖提取率影响顺序为超声功率>浸提温度>超声时间>料液比,且最佳提取工艺条件为浸提时间 30 min、料液比 1:30 (g/mL)、超声功率 160 W、超声时间 12.5 min、浸提温度 30℃,该条件下桑葚多糖得率为(6.63±0.07)%。此外,桑葚多糖具有一定的抗氧化性,但清除 DPPH· 和·OH 的能力较维生素 C 的弱。

后期研究将进一步从以下方面入手:① 对桑葚多糖抗氧化活性成分构效关系进行研究;② 对桑葚多糖进行分离纯化以提高多糖纯度;③ 对桑葚多糖的药理效果如溃疡性结肠炎保护作用、抗急性酒精性肝损伤活性进行探究。

参考文献

[1] LIN J Y, TANG C Y. Strawberry, loquat, mulberry, and bitter melon juices exhibit prophylactic effects on LPS-induced inflammation using murine peritoneal macrophages[J]. Food Chemistry, 2008, 107 (4): 1 587-1 596.
[2] KANG T H, HUR J Y, KIM H B, et al. Neuroprotective effects of the cyaniding-3-O-β-D-glucopyranoside isolated from Mulberry fruit against cerebral ischemia[J]. Neuroscience Letters, 2006, 391:

- 168-172.
- [3] EREISLI S, ORHAN E. Chemical composition of white (Morusalba), red (Morusrubra) and black (Morusnigra) mulberry fruits[J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1 380-1 384.
- [4] LI X M, MA Y L, LIU X J. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice[J]. Journal of Ethno Pharmacology, 2007, 111(3): 504-511.
- [5] 彭赛男. 桑葚中主要化学成分的研究[D]. 西安: 西北大学, 2019: 23-27.
- PENG Sai-nan. Chemical constituents from *Fructus Mori*[D]. Xi'an: North University, 2019: 23-27.
- [6] 伍艳华, 梁艳玲, 蒙秋燕. 桑葚提取物功能性研究进展[J]. 轻工科技, 2020, 36(10): 1-4, 15.
- WU Yan-hua, LIANG Yan-ling, MENG Qiu-yan. Research progress on functionality of mulberry extract[J]. Light Industry Science and Technology, 2020, 36(10): 1-4, 15.
- [7] 刘梦, 林强. 桑葚多糖的研究进展[J]. 北京联合大学学报, 2016, 30(4): 63-66.
- LIU Meng, LIN Qiang. Progress on mulberry polysaccharide[J]. Journal of Beijing Union University, 2016, 30(4): 63-66.
- [8] 王庆, 李丹丹, 潘芸芸, 等. 提取方法对天麻多糖提取率及其抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 146-150.
- WANG Qing, LI Dan-dan, PAN Yun-yun, et al. Effect of different extraction methods on the extractio ratio and antioxidant activity of polysaccharide from *Gastrodia elata* BI.[J]. Food & Machinery, 2017, 33(9): 146-150.
- [9] 祝新媛. 桑葚多糖的提取纯化及其对溃疡性结肠炎小鼠保护作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020: 12-14.
- ZHU Xin-yuan. Extraction and purification of polysaccharide from mulberry and its protective effect on mice with ulcerative colitis[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020: 12-14.
- [10] 倪悦伟. 桑葚多糖的提取工艺研究概况[J]. 种子科技, 2018, 36(12): 111-112.
- NI Zhen-wei. Research on extraction technology of mulberry polysaccharide[J]. Seed Technology, 2018, 36(12): 111-112.
- [11] 景荣琴, 熊清平, 景怡. 响应面法优化桑葚多糖的超声波辅助提取工艺条件[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(4): 570-574.
- JING Rong-qin, XIONG Qing-ping, JING Yi. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Fructus Mori* by response surface methodology[J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(4): 570-574.
- [12] 贺银菊, 杨再波, 彭莘媚, 等. 响应面优化瓶尔小草多糖超声提取工艺及体外抗氧化活性[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(9): 19-27.
- HE Yin-ju, YANG Zai-bo, PENG Xin-mei, et al. Response suiface analysis of ultrasound extraction optimization and in vitro antioxidant ability of polysaccharides from *ophioglossum vulgatum* [J]. China Food Additives, 2020, 31(9): 19-27.
- [13] 谭西. 桑葚多糖低浓度乙醇分级纯化、分子修饰及抗急性酒精性肝损伤活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019: 27-28.
- TAN Xi. Study on fractional purification with low concentration alcohol, molecular modification of *Mori Fructus* polysaccharides and its anti-acute alcoholic liver injury activity [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2019: 27-28.
- [14] 张闪闪, 杨嘉丹, 赵文婷, 等. 加压热水浸提银耳多糖的工艺优化、结构鉴定及抗氧化活性分析[J/OL]. 吉林大学学报. (2020-09-11) [2022-02-13]. <http://www.cnki.com.cn/Article/CJFD-Total-JLNY2020090900G.htm>.
- ZHANG Shan-shan, YANG Jia-dan, ZHAO Wen-ting, et al. Optimization of pressurized hot water extraction, structure identification of *tremella fuciformis* polysaccharide and analysis of its antioxidant activity[J/OL]. Journal of Jilin University. (2020-09-11) [2022-02-13]. <http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-JLNY2020090900G.htm>.
- [15] 侯冉冉, 李雨婷, 于晓华, 等. 响应面法优化一支黄花多糖超声波辅助提取工艺: CN202110107708.7[P]. 2021-04-30.
- HOU Ran-ran, LI Yu-ting, YU Xiao-hua, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction process of *solidago decurrens* lour polysaccharide by response surface methodology: CN202110107708.7[P]. 2021-04-30.
- [16] 唐长波, 刘臣. 响应面法优化微波提取桑葚多糖工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(18): 12-15.
- TANG Chang-bo, LIU Chen. Optimization of microwave extraction technology of mulberry Polysaccharide by RSM of Box-Behnken[J]. Food Research and Development, 2013, 34(18): 12-15.
- [17] 魏然, 陈义伦, 邹辉, 等. 超声波提取条件对圆铃大枣多糖提取率的影响[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 253-257.
- WEI Ran, CHEN Yi-lun, ZOU Hui, et al. Effect of ultrasonic extraction conditions on the extraction rate of polysaccharide from *Yuanling jujube* [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 253-257.
- [18] 陈禹, 陶志杰, 罗璇, 等. 超声波辅助提取宣木瓜多糖工艺优化[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(22): 128-131.
- CHEN Yu, TAO Zhi-jie, LUO Xuan, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Papaya* [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(22): 128-131.
- [19] 廖登未, 黄德春, 程抒劼, 等. 姜多糖提取方法工艺优化及分析[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 152-156.
- LIAO Deng-wei, HUANG De-chun, CHENG Shu-jie, et al. Optimization of Polysaccharides extracted and analysis from *Zingiber officinale rosc* [J]. Food & Machinery, 2018, 34(9): 152-156.
- [20] 李德龙, 伊丽则热·艾拜杜拉, 陈冰婷, 等. 响应面优化药桑椹多糖超声提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(7): 14-22.
- LI De-long, YILZERA Aibaidula, CHEN Bing-ting, et al. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from medicinal mulberry by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2021, 32(7): 14-22.