

荚果蕨中多糖的超声辅助提取及其 DPPH 自由基清除作用的研究

王倩倩,马 骥*,牛俊峰,王 璐

(1.陕西师范大学生命科学学院,陕西西安 710062;

2.教育部药用植物资源及天然药物化学重点实验室,陕西西安 710062)

摘 要:以荚果蕨(*Matteuccia struthiopteris*(L.)Todaro)根状茎为材料,采用单因素实验和正交实验探讨超声辅助提取多糖的最佳工艺条件,应用 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基清除法评价荚果蕨根状茎中多糖的抗氧化活性。实验结果表明,超声辅助提取该多糖的最佳工艺参数为:提取温度为 80℃、料水比为 1:50(g/mL)、超声时间为 30min、超声功率为 150W。在此条件下提取的荚果蕨根状茎、营养叶、孢子叶 3 个部位中粗多糖的提取率分别为 9.67%、3.30%、3.43%。同时,荚果蕨根状茎中多糖有较强的抗氧化作用,对 DPPH 自由基半数抑制浓度(IC₅₀)为 68.68μg/mL。研究荚果蕨多糖的超声辅助提取工艺及抗氧化活性,对荚果蕨天然保健食品的开发利用有重大指导意义。

关键词:荚果蕨,多糖,超声提取,1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)

Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Matteuccia struthiopteris* and their DPPH free radical scavenging activity

WANG Qian-qian, MA Ji*, NIU Jun-feng, WANG Lu

(1.Life Science College, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2.Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an 710062, China)

Abstract: The condition for ultrasonic extraction of polysaccharides from *Matteuccia struthiopteris* were optimized by one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods. Polysaccharide from *Matteuccia struthiopteris* was tested with DPPH · to estimate their antioxidative activity. The results showed that the best extraction conditions were determined as below: ethanol liquid ratio was 1:50 (g/mL), extraction temperature was 80℃, ultrasonic power was 150W, ultrasonic time was 30min. The extraction yield of polysaccharide in rhizome, trophophyll and sporophyll was 9.67%, 3.30% and 3.43% respectively. The polysaccharide had high antioxidative activity, revealing an IC₅₀ of 68.68μg/mL. Investigating ultrasonic traction of polysaccharides from *matteuccia struthiopteris* and their DPPH free radical scavenging activity, it is a great direction significance in the development and utilization of *matteuccia struthiopteris*.

Key words: *Matteuccia struthiopteris*; polysaccharide; ultrasonic extraction; 1,1-diphenylhydrazyl (DPPH)

中图分类号:TS255.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2012)15-0220-04

荚果蕨(*Matteuccia struthiopteris*(L.)Todaro)别名黄瓜香、广东菜,属球子蕨科荚果蕨属多年生植物。在我国东北、华北、四川、陕西及西藏等地的林区分布广泛,多生长于灌木丛中、林下及河岸湿地上。荚果蕨幼叶清香适口,质地脆嫩,现已开发成罐头制品^[1]。其根状茎作为中药材贯众应用于临床,具有清热解毒、杀虫、止血等功效^[2]。荚果蕨富含多糖、蛋白质及多种微量元素,还有绿原酸、黄酮、蜕皮甾酮等活性成分,是营养价值极高的山野菜,更是难得的药、食同源植物^[3-4]。蕨类植物多糖具有多种生理活

性和药理活性,如抗肿瘤、抗凝血、降血糖等作用^[5]。就已报道的研究成果可知,荚果蕨多糖具有免疫促进等活性^[6-7]。由此可见,荚果蕨多糖具有很大的开发潜力。超声波辅助提取技术作为一种天然产物活性成分分离提取的新技术,利用超声波的空化作用加速植物多糖成分的浸出从而实现其提取,可缩短提取时间,提高提取效率,具有较高的实用价值^[8]。本实验采用超声辅助提取法对荚果蕨根状茎中多糖的提取工艺进行研究,选择出最佳提取条件,并评价其 DPPH 自由基清除能力,旨在为荚果蕨天然保健食品的开发利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荚果蕨 新鲜野生,采自陕西省宁陕县旬阳坝地区;葡萄糖标准品 中国药品生物制品检定所;

收稿日期:2012-02-16 *通讯联系人

作者简介:王倩倩(1985-),女,硕士研究生,研究方向:药用植物资源研究。

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划课题(2011BAI06B05)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) Sigma 公司;无水乙醇、浓硫酸、苯酚 国产分析纯;水 蒸馏水。

752N 紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;KQ-300DE 型超声波清洗器 昆山超声仪器有限公司;SL202N 型药物电子天平 上海明桥精密科学仪器有限公司;HH-6B 数显恒温水浴锅 江苏常州国华电器有限公司;SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵 郑州南北仪器设备有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;FZ102 微型植物粉碎机 黄骅市中兴有限责任公司;500g 多功能粉碎机 上海将新科技有限公司;冷冻台式离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荚果蕨多糖的提取工艺 荚果蕨(分成根状茎、营养叶、孢子叶)→阴干→粉碎→过 65 目筛→石油醚脱脂→超声辅助提取→浓缩→无水乙醇沉淀→干燥→粗多糖→Sevage 法脱蛋白→透析除盐→冷冻干燥→精制多糖

1.2.2 荚果蕨多糖的含量测定^[9-11]

1.2.2.1 对照品溶液的制备 称取无水葡萄糖标准品 5mg,加水定容至 50mL,得浓度为 0.1mg/mL 的对照品溶液。

1.2.2.2 供试品溶液的制备 将 1.2.1 中所得粗多糖加水溶解,即得供试品溶液。

1.2.2.3 标准曲线绘制 吸取浓度为 0.1mg/mL 的葡萄糖对照品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL,分别置于 10mL 的具塞试管中,加水至 1.0mL,然后各加 5% 苯酚溶液 1.0mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0mL,摇匀,置于沸水中 15min,流动水冷却至室温,然后于 490nm 处测吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标, A_{490} 为纵坐标,得回归方程为: $Y = 8.6994X - 0.0052$, 相关系数 $R^2 = 0.9991$ 。

1.2.2.4 多糖含量的测定 取不同部位的荚果蕨材料,按照 1.2.2.3 中的方法显色,于 490nm 处测定吸光度,计算粗多糖的提取率。

多糖提取率(%) = $C \times V \times D / W \times 100$

其中, C 表示供试品溶液中葡萄糖的浓度(mg/mL), V 表示供试品溶液定容的体积(mL), W 表示荚果蕨脱脂粉的重量(mg), D 稀释倍数(均为 40)。

1.2.3 单因素实验^[12] 以荚果蕨的药用部位根状茎为材料,粗多糖的提取率为指标,研究料水比、提取温度、超声功率、超声时间对多糖提取工艺的影响。

1.2.3.1 料水比对多糖提取率的影响:在温度为 60℃,超声功率为 180W 的条件下,超声作用 20min,研究不同料水比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对荚果蕨多糖提取效果的影响。

1.2.3.2 提取温度对多糖提取率的影响:在料水比为 1:30,超声功率为 180W 的条件下,超声作用 20min,研究不同提取温度(40、50、60、70、80℃)对荚果蕨多糖提取效果的影响。

1.2.3.3 超声功率对多糖提取率的影响:在温度为 60℃,料水比为 1:30 的条件下,超声作用 20min,研究不同超声功率(120、150、180、210、240W)对荚果

蕨多糖提取效果的影响。

1.2.3.4 超声时间对多糖提取率的影响:在温度为 60℃,超声功率为 180W,料水比为 1:30 的条件下,研究不同超声时间(10、20、30、40、50min)对荚果蕨多糖提取效果的影响。

1.2.4 正交实验 以荚果蕨的药用部位根状茎为材料,粗多糖的提取率为指标,选取料水比、提取温度、超声功率、超声时间 4 个因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行实验。

表 1 正交实验因素水平表
Table 1 Experimental design for orthogonal array

水平	因素			
	A 提取温度 (℃)	B 料水比 (g/mL)	C 超声时间 (min)	D 超声功率 (W)
1	60	1:30	10	120
2	70	1:40	20	150
3	80	1:50	30	180

1.2.5 清除 DPPH 自由基能力的测定^[12-15] 分别在 2.0mL DPPH · 溶液(0.08mg/mL,用 85% 乙醇配制)中加入 2.0mL 不同浓度的溶液,混匀,室温放置 30min 后,于 517nm 处测定吸光度,即为 A_i ;同时在 2.0mL DPPH · 溶液中加入 2.0mL 溶剂,同样条件下测定吸光度,即为 A_0 ;用 2.0mL 溶剂取代 DPPH · 溶液,测得吸光值为 A_j ,按下式计算 DPPH · 清除率(Y):

$$Y(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

其中, A_i : 2.0mL DPPH · 溶液加 2.0mL 待测溶液的吸光度; A_j : 2.0mL 85% 乙醇溶液加 2.0mL 待测溶液的吸光度; A_0 : 2.0mL DPPH · 溶液加 2.0mL 85% 乙醇溶液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 料水比对多糖提取率的影响

不同料水比对荚果蕨多糖提取率的影响见图 1,可知多糖的提取率随料水比的提升而升高,在 1:40 时最高,但之后再增大料水比,提取率反而下降。料水比为 1:40 时,超声辅助提取多糖的效果最佳。

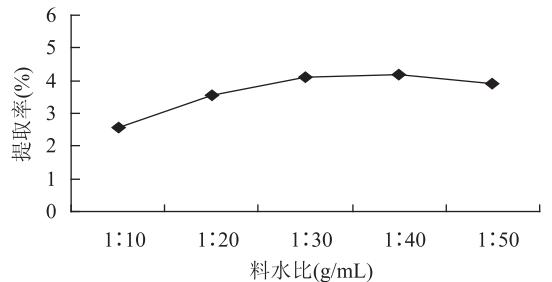


图 1 料水比对荚果蕨多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of material/water ratio on polysaccharide yield

2.2 提取温度对多糖提取率的影响

由图 2 可知,荚果蕨多糖提取率随温度的提升而增加,在 80℃ 时达到最高。虽然单就趋势图而言,如果继续升高温度,多糖的提取率还会继续增加,但是过高的温度,在超声波机械的共同作用下,荚果蕨多糖的某些结构会被破坏而影响其活性。因此综合考虑,认为超声波辅助提取荚果蕨多糖的最佳温度

在 70~80℃ 范围内。

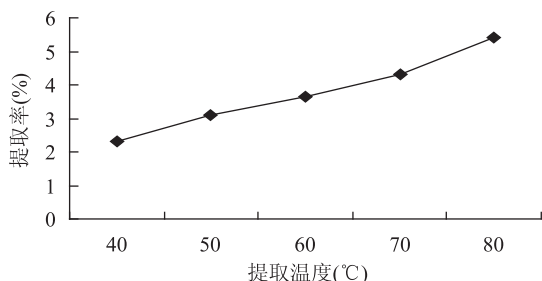


图2 提取温度对荚果蕨多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on polysaccharide yield

2.3 超声功率对多糖提取率的影响

由图3可知,当功率较低时,多糖提取率随超声波功率的加大而增加,因为超声波的空化作用比较弱,所以多糖提取率也比较低。当超声功率在150W时达到最大,而后随功率的加大,多糖的提取率不断下降。究其原因,可能是因为过大的功率加快多糖糖苷键的断裂而导致其降解。因此,超声功率选择150W为宜。

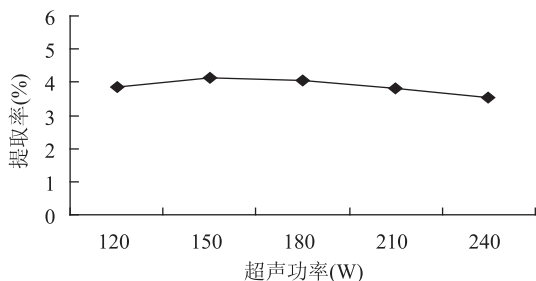


图3 超声功率对荚果蕨多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on polysaccharide yield

2.4 超声时间对多糖提取率的影响

由图4可知,该多糖的提取率随超声时间的增加而呈现先上升后下降的趋势。多糖的提取率在20min时最高,随后,提取率随超声时间的增加而下降。原因可能是,超声波的空化、机械振荡作用造成溶液的局部过热,而导致部分多糖的降解。所以,本实验选用最佳的超声时间为20min。

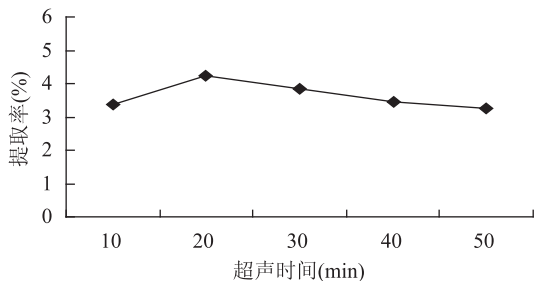


图4 超声时间对荚果蕨多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic times on polysaccharide yield

2.5 正交实验结果与分析

在单因素实验的基础上,采用正交实验研究料水比、提取温度、超声功率、超声时间这四个因素对多糖提取率的影响,结果见表2。

表2极差显示,所考察的提取温度、料水比、超声时间、超声功率四个因素对超声辅助提取多糖的

影响顺序大小为: A > B > C > D, 提取温度是最主要的影响因素,其次是料水比和超声时间,最后是超声功率。通过正交实验,得出超声辅助提取的最佳条件组合为 A₃B₃C₃D₂, 即提取温度为 80℃、料水比为 1:50 (g/mL)、超声时间为 30min、超声功率为 150W。

表2 正交实验设计与结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for orthogonal array

实验号	A	B	C	D	粗多糖提取率 (%)
1	1	1	1	1	4.29
2	1	2	2	2	5.00
3	1	3	3	3	6.21
4	2	1	2	3	5.94
5	2	2	3	1	6.83
6	2	3	1	2	7.41
7	3	1	3	2	8.71
8	3	2	1	3	8.44
9	3	3	2	1	8.91
K ₁	15.50	18.94	20.14	20.03	
K ₂	20.18	20.27	19.85	21.12	
K ₃	26.06	22.53	21.75	20.59	
R	3.52	1.20	0.63	0.36	
主→次					A > B > C > D
最优组合					A ₃ B ₃ C ₃ D ₂

2.6 验证实验

以荚果蕨的药用部位根状茎为材料,粗多糖的提取率为指标,按照 1:50 (g/mL) 的料水比,超声功率为 150W,在 80℃ 下超声提取 30min,进行三次实验,验证正交实验结果。结果显示,提取率分别为 9.61%、9.65%、9.58%,平均提取率为 9.61%。

2.7 荚果蕨不同部位中粗多糖提取率的比较

称取荚果蕨根状茎、营养叶、孢子叶的脱脂粉末,采用超声辅助提取最优条件组合进行粗多糖的提取,按 1.2.2.3 中的方法显色,于 490nm 处测定吸光度,计算粗多糖的提取率。

由表3可以看出,荚果蕨根状茎中粗多糖的提取率最高,营养叶和孢子叶中粗多糖的提取率相对较低。总多糖在荚果蕨根状茎、营养叶、孢子叶3个部位中的分布比例为 2.93:1:1.04。从这些数据中可以看出,多糖在荚果蕨不同部位中的分布呈现不均匀性,在根状茎中最为丰富。

表3 荚果蕨不同部位中粗多糖的提取率

Table 3 The extraction yield of polysaccharide in rhizome, trophophyll and sporophyll

不同部位	根状茎	营养叶	孢子叶
提取率 (%)	9.67	3.30	3.43

2.8 清除 DPPH 自由基的能力

由图5可以看出,随着多糖浓度的增大,对 DPPH 自由基的清除率呈上升趋势并且精制多糖对 DPPH 自由基的清除效果明显优于粗多糖,当精制多糖浓度为 400μg/mL 时,清除率达到了 84.02%。提取液在多糖浓度较低的情况下也表现出较强的清除效果,50μg/mL 时清除率也可达到 44.50%,可见荚果蕨根状茎中多糖对 DPPH 自由基有良好的清除效

果,半数抑制浓度 IC_{50} 仅为 $68.68 \mu\text{g/mL}$ 。

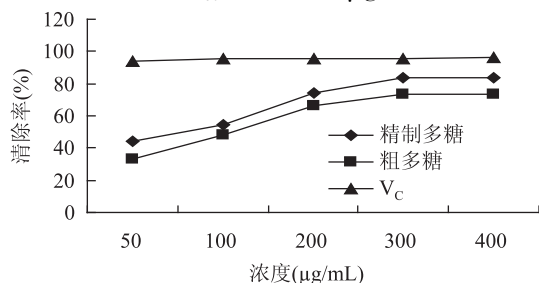


图5 荚果蕨根状茎中多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.5 The DPPH · scavenging capacity of polysaccharide from *Matteuccia struthiopteris*

3 结论

采用超声辅助提取荚果蕨多糖,可缩短提取时间,提高提取得率,为荚果蕨多糖的深入研究及开发利用提供理论基础,也为进一步阐明荚果蕨的化学成分及其潜在的应用价值奠定基础。同时,荚果蕨多糖无论是粗提取物还是精制提取物对 DPPH 自由基都有较高的清除抑制效果,而且浓度越高,清除效果越好。由此可知,荚果蕨多糖作为一种天然的具有抗氧化活性的物质,可进一步开发为天然无副作用的保健品或药物。

参考文献

[1] 董然,文连亏,李丹茹,等.广东菜、歪头菜、蟹麻子菜的营养成分及保健作用分析[J].中国林副特产,1996,39(4):24-25.
[2] 李晓,杨利民,王少江.不同采收时期荚果蕨营养叶中总黄酮含量测定[J].林业科技,2011,36(3):29-31.
[3] 荆洪晨,尹振波.黄瓜香深开发浅析[J].林业勘查设计,2001,120(4):45-45.

[4] A I Syrchina, N N Pechurina, A L Vereshchagin. A chemical investigation of *Matteuccia struthiopteris* [J]. Chemistry of compounds, 1993, 29(4): 535-536.
[5] 罗娅君,杨葵华.药用蕨类植物多糖研究进展[J].绵阳师范学院学报,2008,27(11):71-74.
[6] 王铮,谢俊云,徐晗,等.贯众总多糖对空肠弯曲杆菌诱导的系统性红斑狼疮样综合症小鼠的作用[J].药理学,2010,45(6):711-717.
[7] 赵莉,杨文钰.蕨类植物活性成分研究进展[J].中药材,2004,27(6):452-456.
[8] 许燕燕.植物多糖的提取方法和工艺[J].福建水产,2006,8(3):32-36.
[9] 历博文,张东,杨岚,等.紫萁贯众中多糖的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):41-43.
[10] 夏海涛,刘玉芬,王蓉,等.花果山野生蕨菜多糖和黄酮的提取及含量测定[J].食品科学,2010,31(24):124-127.
[11] 何先元,许晋芳,王秋霜,等.当归多糖的超声提取及含量测定[J].药物鉴定,2010,19(19):34-35.
[12] 祝元婷,吴文琳,张利,等.超声提取鼠尾草叶多糖工艺优化及其 DPPH 自由基清除能力评价[J].食品科学,2011,32(16):76-79.
[13] 于曙光,蒋海燕,任春艳,等.蕨菜粗多糖的抗氧化活性研究[J].莱阳农学院学报:自然科学版,2006,23(1):41-43.
[14] Cengiz Sarikurku, Bektas Tepe, Deniz Karslfi Semiz, et al. Evaluation of metal concentration and antioxidant activity of three edible mushrooms from Mugla, Turkey [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(5): 1230-1233.
[15] Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea seed (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) extracts [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 101(1): 10-19.

(上接第 219 页)

氧化活性研究[J].食品科学,2007,28(8):100-103.
[4] 陆蓓,叶灵静,颜文钦,等.柑橘黄酮对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗氧化作用[J].中药新药与临床药理,2006,17(5):343-345.
[5] Zhao-Xuan, Chen-Fusheng, Li-Hongliang, et al. Study on extract technology of antioxidant from Pericarpium citric reticulate [J]. Zhengzhou Institute of Technology, 2003, 24(1): 24-26.
[6] 张爱珍,张丽芳.修饰柑橘果胶对高脂血症大鼠脂质过氧化调节作用的研究[J].浙江预防医学,2007,12(19):1-3.
[7] 李春明,管春梅,郑晶,等.果胶对大鼠血脂及抗氧化功能的影响[J].中国公共卫生,2004,20(6):721-723.
[8] 莫云燕,黄庆华,殷光玲,等.新会陈皮多糖的体外抗氧化作用及总糖含量测定[J].今日药学,2009,19(10):22-25.
[9] 凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004:2-5.
[10] 苏东林,单杨,李高阳,等.响应面法优化柑桔皮总黄酮提

取工艺的研究[J].中国食品学报,2009,9(3):70-77.
[11] 马亚琴,孙志高,吴厚玖,等.响应面法优化提取甜橙皮渣中果胶的工艺[J].食品科学,2010,31(14):10-13.
[12] 陈复生,李红良,赵琳.陈皮中抗氧化成分的提取工艺研究[J].郑州工程学院学报,2003,24(1):24-26,34.
[13] 方允中,郑荣梁.自由基生物学的理论与应用[M].北京:科学出版社,2002:440.
[14] 贾之慎,鄢建敏,唐孟成.比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(2):184-186.
[15] W Brand-Williams, M E Cuvelier, C Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. Lebensm-Wiss u-Technol, 1995, 28(1): 25-30.
[16] Iris F F Benzie, J J Strain. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239: 70-76.