

槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究

王丽华,段玉峰,马艳丽,丁红军,李尔春

(陕西师范大学 食品工程系,陕西 西安 710062)

【摘要】 【目的】探讨槐花水溶性多糖提取的工艺条件及其抗氧化活性。【方法】采用四因素三水平正交试验设计,研究了提取温度、时间、次数和料液比等因素对槐花多糖提取率的影响,考察了Sevage法、三氯乙酸法、盐酸法、胰蛋白酶+Sevage法对槐花多糖所含蛋白的脱除效果,并对槐花多糖的还原能力,及清除羟基自由基、超氧阴离子自由基能力进行了研究。【结果】提取槐花多糖的工艺条件为:料液比1:25,提取温度80℃,提取时间6h,提取次数4次。槐花多糖的最佳清除蛋白方法为胰蛋白酶+Sevage法,蛋白清除率为85.23%。抗氧化试验结果表明,槐花多糖具有较好的抗氧化活性,是一种效果好、安全性高的新型天然抗氧化物质。【结论】获得了槐花水溶性多糖提取的最佳工艺条件,该工艺下槐花多糖的得率为3.40%。

【关键词】 槐花多糖;提取工艺;抗氧化活性

【中图分类号】 S792.26;TQ911

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)08-0213-05

Studies on extraction and antioxidant function of polysaccharides from *Sophora japonica*

WANG Li-hua, DUAN Yu-feng, MA Yan-li, DING Hong-jun, LI Er-chun

(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: 【Objective】 The extraction technology and antioxidant of polysaccharides from *Sophora japonica* were studied. 【Method】 The effect of each factor such as temperature, time, times and ratio of solid-liquid on the extraction of the water-soluble polysaccharides from *Sophora japonica* was investigated using the methods of single factor test and orthogonal design test. Sevage method, TCA method, HCL method and combining enzyme and Sevage method were used to remove protein of polysaccharide from *Sophora japonica*. Antioxidant activities of polysaccharides from *Sophora japonica* were evaluated by reduction capabilities, scavenging effects to hydroxyl radicals and oxygen radicals. 【Result】 The result showed that the highest extraction rate of polysaccharides from *Sophora japonica* could be obtained with a ratio of solid to liquid as 1:25, 80℃ for 6h and 4 times of extraction. The enzymatic+Sevage removal of protein was an effective method and the removal of protein reached 85.23%. Anti-oxidative results showed polysaccharides from *Sophora japonica* had the effect of anti-oxidation. *Sophora japonica* polysaccharides were a potential product of natural, safe and effective antioxidant. 【Conclusion】 The best condition for the extraction of polysaccharides from *Sophora japonica* was obtained with the yield of extraction 3.40%.

Key words: *Sophora japonica* polysaccharides; extraction technology; antioxidant activity

* 【收稿日期】 2007-08-07

【基金项目】 陕西省自然科学基金项目(2006B18)

【作者简介】 王丽华(1981—),女,满族,河北沧州人,硕士,主要从事食品功能成分的开发及利用研究。
E-mail: zhipaimimi@126.com

槐花(*Sophora japonica*.)又名槐米、槐蕊、槐花米,始载于《日华子本草》,为豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的干燥花蕾或花,微寒、味苦^[1]。槐花具有止血、促血凝、利尿、抗真菌、清热泻火、清肝明目等功效,临床上可用作防治高血压、动脉硬化以及治疗皮肤炎症的辅助药物^[2]。20 世纪初,国内外开始对槐花中的化学成分进行研究,已确定其中含有黄酮、植物甾类、鞣质、氨基酸、蛋白质、烯酸及微量元素等多种成分。目前,对槐花的研究主要集中在黄酮类化合物上,把槐花作为提取芦丁的主要原料^[3]。槐花的药理作用多样,化学成分复杂。为合理开发利用槐花资源,必须对槐花进行全面的研究。近年来,随着分子生物学的发展,人们逐渐认识到多糖与蛋白质、核酸一样,是涉及生命活动本质的三类生物大分子之一。多糖具有提高免疫能力、降血糖、抗肿瘤、抗病毒等功能,是药理学研究的热点^[4]。目前对槐花多糖的研究国内外尚未见报道,本研究采用正交试验优化槐花多糖的提取工艺,并考察了槐花粗多糖的体外抗氧化活性,旨在为槐花药品和功能食品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

1.1.1 材料与试剂 槐花(购于西安市藻露堂大药房,未经过生物学鉴定);无水葡萄糖(西安化学试剂厂);浓硫酸(西安化学试剂厂);苯酚、盐酸、氯仿、正

丁醇、三氯乙酸(上海试剂三厂);胰蛋白酶(北京鼎国生物技术有限责任公司);其他试剂均为分析纯。
1.1.2 仪 器 T6-新世纪可见紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;PHS-4CT 酸度计,上海康仪仪器有限公司;PL203 电子天平,梅特勒-脱利多仪器(上海)有限公司;HHW-21CU-600 电热恒温水槽,上海福玛试验设备有限公司;TDL-4 离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 槐花多糖的提取工艺 采用水提法,具体工艺为:干槐花→粉碎→过孔径为 0.425 mm 筛→乙醚脱脂→干燥后得脱脂样品→取脱脂样品,加适量蒸馏水→80 ℃浸提 6 h→离心(4 000 r/min,15 min)→沉淀加蒸馏水进行第 2 次提取(提取 4 次)→合并 4 次离心上清液→减压浓缩→浓缩液中加入乙醇,使其体积分数为 80%→沉淀依次用无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤→干燥,得粗多糖样品→取粗多糖样品,加适量蒸馏水→脱蛋白→透析→冷冻干燥→槐花多糖。

1.2.2 槐花多糖提取工艺的正交试验设计 影响槐花多糖得率的主要因素有提取温度、提取时间、液料比和提取次数等。根据预试验结果,选择浸提时间、浸提温度、液料比和提取次数 4 因素为考察因素,每个因素各取 3 个较优的水平,进行四因素三水平正交试验设计(表 1)。

表 1 槐花多糖提取的正交试验因素水平表

Table 1 Levels of orthogonal of polysaccharides extraction

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	温度/℃ Extracted temperature	时间/h Extracted time	料液比 Extracted vol	提取次数 Extracted number
1	75	4	1 : 20	3
2	80	5	1 : 25	4
3	85	6	1 : 30	5

槐花多糖得率按下式计算:

槐花多糖得率/% = $\frac{\text{多糖质量}}{\text{槐花干重}} \times 100\%$ 。

1.2.3 槐花多糖脱蛋白方法的优选 水提法提取的多糖中,其蛋白质占有很大的比例。因此,尽可能地除去蛋白质而保留多糖就显得比较重要。为了探讨槐花多糖脱蛋白的最佳方法,本试验以蛋白质清除率及多糖损失率为指标,对槐花多糖脱蛋白的方法进行了优化,其中蛋白清除率和多糖损失率按下式计算:

蛋白清除率/% = $\frac{\text{脱蛋白前蛋白质量} - \text{脱蛋白}}$

$\frac{\text{后蛋白质量}}{\text{脱蛋白前蛋白质量}} \times 100\%$;

多糖损失率/% = $\frac{\text{脱蛋白前多糖质量} - \text{脱蛋白后多糖质量}}{\text{脱蛋白前多糖质量}} \times 100\%$ 。

(1) Sevage 法^[5]。称取槐花粗多糖适量,加一定量蒸馏水使其充分溶解。加入 1/5 体积氯仿,随之再加入氯仿体积 1/5 的正丁醇,将混合物剧烈振摇 30 min 后在 5 000 r/min 条件下离心 5 min ,除去变性蛋白质沉淀,取水相。重复 2 次,取水相低温干燥。

(2)三氯乙酸法(TCA)^[6]。称取槐花粗多糖适量,加一定量蒸馏水使其充分溶解,按 1 : 1 的比例

等体积加入体积分数 5%三氯乙酸溶液,放置过夜。在 5 000 r/min 条件下离心 5 min,弃去沉淀,低温干燥。

(3)盐酸法^[7]。称取槐花粗多糖适量,加一定量蒸馏水使其充分溶解,用 2 mol/L 盐酸调节其 pH 为 5,放置过夜,在 5 000 r/min 条件下离心 5 min,弃去沉淀,低温干燥。

(4)胰蛋白酶+Sevage 法^[8]。取 50 m L 多糖液,调节 pH 至 8.5,加入相当于多糖质量 1.5%的胰蛋白酶,于 37 ℃恒温磁力搅拌器中保温 5 h,加入 1/5 体积氯仿,随之再加入氯仿体积 1/5 的正丁醇,将混合物剧烈振摇 30 min 后在 5 000 r/min 条件下离心 5 min,除去变性蛋白质沉淀,取水相。重复 2 次,得脱蛋白液。

1.2.4 槐花多糖及蛋白质含量的测定 多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[9];蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法^[10-11]。

1.2.5 槐花多糖抗氧化活性的测定 (1)还原能力的测定。采用普鲁士兰法^[12]。取 0.25 mL 不同质量浓度(0.50,0.75,1.00,1.25,1.50,1.75 mg/mL)槐花多糖溶液,加入 200 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 10 g/L K₃ Fe(CN)₆ 各 2.5 mL,混合均匀后于 50 ℃反应 20 min。取出后再加入 2.5 mL 体积分数 10%三氯乙酸混匀,于 3 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液 5.0 mL,分别加入蒸馏水 5.0 mL、1 mg/mL FeCl₃ 1.0 mL,测定波长 700 nm 处的吸光度(A₇₀₀)。

(2)清除羟基自由基(·OH)能力的测定。采用水杨酸法^[13]。水杨酸法用 FeSO₄ + H₂O₂ 产生·OH,以·OH 氧化水杨酸钠所得产物的吸光值表

示·OH 的大小,吸光值越大,·OH 越多。反应体系中含 2 mL 9 mmol/L FeSO₄,2 mL 9 mmol/L 水杨酸及 3 mL 不同质量浓度的槐花多糖(0.7,0.9,1.1,1.3,1.5,1.7 mg/mL),最后加入 8.8 mmol/L H₂O₂ 2 mL 启动反应,37 ℃水浴 1 h,于波长 510 nm 处测量吸光值。清除率(E)计算公式如下:

$$E/\%=[A_0-(A_i-A_{i0})]/A_0\times100\%$$

式中:A₀ 为槐花多糖质量浓度为 0 mg/mL 时的吸光值;A_i 为槐花多糖质量浓度为 i 时的吸光值;A_{i0} 为无显色剂、槐花多糖质量浓度为 i 时的吸光值。

(3)清除超氧阴离子自由基能力的测定。采用邻苯三酚自氧化法^[14]。取 pH 为 8.12 的 Tris-HCl 缓冲液 6 mL 和 0.15 mL 蒸馏水混匀,37 ℃水浴 10 min,加入 37 ℃预热过的 7 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液(PR)1 mL,迅速摇匀,倒入比色皿,在波长 325 nm 处每隔 30 s 测定 1 次吸光值(A),线性范围内每 1 min A 的增加值即为邻苯三酚的自氧化速率 A_{对照}。取 pH 为 8.12 的 Tris-HCl 缓冲液 6 mL,分别加入不同质量浓度(0.3,0.6,0.9,1.2,1.5,1.8 mg/mL)槐花多糖溶液 0.15 mL,37 ℃水浴 10 min,最后加入 37 ℃预热过的 7 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液(PR)1 mL,其他步骤同上,线性范围内每 1 min 吸光值的增加量即为加药后邻苯三酚的自氧化速率 A_{样品}。清除率(E)计算公式如下:

$$E/\%=(A_{\text{对照}}-A_{\text{样品}})/A_{\text{对照}}\times100\%$$

2 结果与分析

2.1 槐花多糖提取的正交试验结果

槐花多糖提取的正交试验结果如表 2 所示。

表 2 槐花多糖提取工艺优化的正交试验结果

Tab 2 Orthogonal experiment for the extraction of polysaccharides

序号 No.	A 温度/℃ Extracted temperature	B 时间/h Extracted time	C 料液比 Extracted vol	D 提取次数 Extracted number	多糖得率/% Yield
1	1(70)	1(4)	1(1 : 20)	1(3)	1.11
2	1(70)	2(5)	2(1 : 25)	2(4)	2.73
3	1(70)	3(6)	3(1 : 30)	3(5)	2.54
4	2(80)	1(4)	2(1 : 25)	3(5)	2.89
5	2(80)	2(5)	3(1 : 30)	1(3)	1.81
6	2(80)	3(6)	1(1 : 20)	2(4)	3.32
7	3(85)	1(4)	3(1 : 30)	2(4)	2.50
8	3(85)	2(5)	1(1 : 20)	3(5)	2.36
9	3(85)	3(6)	2(1 : 25)	1(3)	1.50
K ₁	2.13	2.13	2.18	1.48	
K ₂	2.55	2.28	2.33	2.73	
K ₃	2.10	2.37	2.27	2.57	
R	0.45	0.24	0.14	1.26	

由表 2 可见,影响槐花粗多糖得率 4 个因素的主次顺序为提取次数(D)、提取温度(A)、提取时间(B)、料液比(C)。最优组合为 A₂B₃C₂D₂,即提取温度为 80 ℃,提取时间为 6 h,料液比为 1∶25,提取 4 次。

表 3 槐花多糖提取工艺优化的正交试验方差分析结果
Table 3 Analysis of variance of polysaccharides extraction

方差来源 Regression	平方和 Sum of squares	自由度 df	方差 Variance	F 值 F value	显著水平 Significant level
A	0.771	2	0.385	25.111	$P<0.05$
B	0.178	2	0.089	5.820	
C	0.064	2	0.032	2.097	
D	5.631	2	2.815	183.246	
误差 Error	0.122	8	0.015		

对优化提取工艺条件(提取温度 80 ℃,料液比 1∶25,提取时间 6 h,提取 4 次)进行验证试验,重复 2 次,此条件下槐花多糖的得率为 3.40%。

2.2 4 种槐花多糖脱蛋白方法的比较

由表 4 可知,4 种脱蛋白方法中,胰蛋白酶+Sevage 法对蛋白质的清除能力最强,蛋白清除率可达 85.23%,同时多糖损失率也最小,为 55.31%;三氯乙酸法对蛋白质的去除能力次之,但此方法反应剧烈,容易引起某些多糖降解,导致多糖损失率较大,因此该法不适合槐花多糖脱蛋白;Sevage 法与盐酸法对于蛋白质的去除率均较低,多糖的损失率均较大。故胰蛋白酶+Sevage 法为槐花多糖提取时脱蛋白的最佳方法。

表 4 4 种槐花多糖脱蛋白方法的比较

Table 4 Comparison between methods for de-protein

方法 Method	蛋白清除率/% Yield of de-protein	多糖损失率/% Loss of polysaccharides
Sevage 法 Sevage	75.23	74.03
三氯乙酸法 TCA	80.51	85.43
盐酸法 HCl	65.21	64.72
胰蛋白酶+Sevage 法 Combining enzyme and Sevage	85.23	55.31

2.3 槐花多糖的抗氧化活性

2.3.1 槐花多糖的还原能力 一般情况下,样品的还原能力与抗氧化活性之间有显著的相关性^[15]。因此,首先对槐花多糖的还原能力进行测定,其中吸光度越大表示还原能力越大。

由图 1 可知,槐花多糖具有一定还原能力,且还原能力随着多糖质量浓度的增加而增大。当浓度达到 1.5 mg/mL 时,还原能力基本稳定。槐花多糖具

有还原能力,这为其清除活性氧等自由基提供了可能。

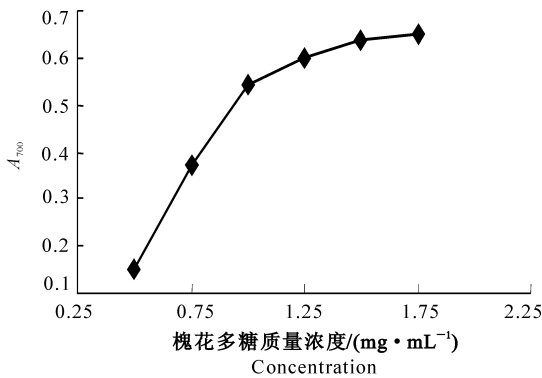


图 1 槐花多糖的还原能力

Fig.1 Reducing capacity of polysaccharides
from *Sophora japonica*

2.3.2 槐花粗多糖对羟基自由基的清除作用 由图 2 可见,槐花多糖对羟基自由基有明显的清除作用,并且随着多糖质量浓度的增加,清除能力增强,表明槐花多糖对羟基自由基的清除能力与多糖质量浓度有明显的量效关系,其中槐花多糖质量浓度为 0.9 mg/mL 时,羟基自由基的清除率为 50.2%;多糖质量浓度为 1.5 mg/mL 时,羟基自由基清除率高达 80.1%。

2.3.3 槐花多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

从图 2 可以看出,槐花多糖对超氧阴离子自由基具有一定的清除作用,并且随着多糖质量浓度的增加其清除率逐渐上升,多糖质量浓度为 1.5 mg/mL 时,超氧阴离子自由基的清除率为 55%。说明槐花多糖对超氧阴离子自由基具有较好的清除作用。

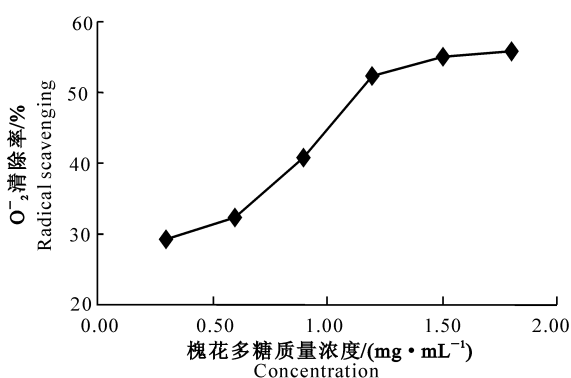
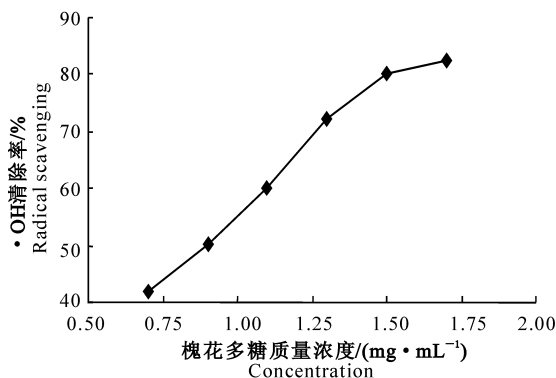


图 2 槐花多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging activities on $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ of polysaccharides from *Sophora japonica*

3 结 论

1) 正交试验及方差分析结果表明,槐花多糖得率影响因素的主次顺序为提取次数、提取温度、提取时间、料液比。水提法提取槐花多糖的最优工艺条件为:提取温度为 80 ℃、料液比为 1 : 25、提取时间为 6 h、提取次数为 4 次,在该工艺条件下多糖得率达 3.40%。

2) 4 种脱蛋白方法中,Sevage 法、三氯乙酸法、胰蛋白酶+Sevage 法和盐酸法的脱蛋白率分别为 75.23%,80.51%,85.23%和 65.21%,槐花多糖的损失率分别为 74.03%,85.43%,55.31%和 64.72%。表明胰蛋白酶+Sevage 法的脱蛋白效果最好。

3) 抗氧化活性测定结果表明,槐花多糖不仅具有很强的还原能力,而且对羟基自由基、超氧阴离子自由基均有较好的清除能力,且在一定范围内对二者的清除作用呈现良好的量效关系。

槐花多糖具有的抗氧化活性,使其有望作为天然抗氧化剂和功能性食品而得到开发应用,具有较高的研究开发价值。对于槐花多糖的其他方面,如分离纯化、组分鉴定、分子量测定及其他生物活性测定等,还有待于今后进一步研究。

[参考文献]

[1] 李尧尧,原思通,肖永庆. 中药槐花化学成分、药理作用及炮制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志,2002,9(6):77-82.
Li R R, Yuan S T, Xiao Y Q. Research progress on chemical constituents, pharmacological action and processing of *Sophora japonica* [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2002, 9 (6): 77-82. (in Chinese)

[2] 董艳芬,李 坚. 槐花的现代研究与临床应用 [J]. 中药药信

息,2001,18(6):21-23.

Dong Y F, Li J. Modern study and clinical application of *Sophora japonica* [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2001, 18(6): 21-23. (in Chinese)

[3] 吴虹霁,兰昌云,陈 媛. 槐花的研究进展 [J]. 广东微量元素科学,2006,13(6):1-6.

Wu H J, Lan C Y, Chen Y. Study development of *Sophora japonica* [J]. Guangdong Trace Elements Science, 2006, 13(6): 1-6. (in Chinese)

[4] 王晨明. 植物多糖的药理作用 [J]. 中国药业,2002,11(11):73-74.

Wang C M. Pharmaceutical effects of plant polysaccharides [J]. China Pharmaceuticals, 2002, 11(11): 73-74. (in Chinese)

[5] 闫巧娟,韩鲁佳,江正强. 酶法脱除黄芪多糖中的蛋白质 [J]. 食品科技,2004(6):23-26.

Yan Q J, Han L J, Jiang Z Q. Removal of protein from the crude astragalus polysaccharides by proteases [J]. Food Science and Technology, 2004(6): 23-26. (in Chinese)

[6] 曲晓兰,吴从平,曹明亮. 马齿苋多糖脱蛋白工艺的研究 [J]. 泰山医学院学报,2007,28(3):215-216.

Qu X L, Wu C P, Cao M L. Study on removal of protein from polysaccharide of portulaca oleracea [J]. Journal of Taishan Medical College, 2007, 28(3): 215-216. (in Chinese)

[7] 史德芳,杨 洋,任 红. 仙人掌多糖提取过程中三种脱蛋白方法的比较研究 [J]. 山东食品发酵,2006(2):42-44.

Shi D F, Yang Y, Ren H. Comparison of three methods of removing protein from polysaccharide extract in the cactus [J]. Shandong Food Ferment, 2006(2): 42-44. (in Chinese)

[8] 张 强,牟雪姣,周正义. 洋葱多糖的提取及其抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵工业,2007,33(1):138-141.

Zhang Q, Mu X J, Zhou Z Y. Study on the extraction and antioxidant activity of onion polysaccharide [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(1): 138-141. (in Chinese)