

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0051-05

# 金银花枝叶中多糖的组成测定及抗油脂氧化研究

陈莉华\*,王晓静,黄浩,罗悠

吉首大学化学化工学院,吉首 416000

**摘要:**用超声波辅助水提取金银花枝叶中的粗多糖,醇沉除色素及蛋白后得到多糖纯化液,使用薄层色谱、红外光谱和紫外光谱鉴定其组成,研究多糖纯化液对油脂氧化的抑制作用。结果表明,金银花枝叶粗多糖得率为13.20%,多糖纯化后葡萄糖含量为70.30%,多糖纯化液经HCl水解后含甘露糖及麦芽糖成分,多糖纯化液对油脂氧化有很好的抑制作用。

**关键词:**金银花枝叶;多糖;组成测定;抗油脂氧化

中图分类号:TQ35

文献标识码:A

## Component Determination and Antioxidant Activity to Lipin of Polysaccharide from *Lonicera Japonica* branches

CHEN Li-hua\*, WANG Xiao-jing, HUANG Hao, LUO You

College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China

**Abstract:** Polysaccharides (PS) were extracted from *Lonicera Japonica* branches by water-extraction and ethanol precipitation with ultrasonic assistance. The crude polysaccharide was purified through decoloration with petroleum ether and deproteinized by Sevag method. Purified polysaccharide was determined by Thin Layer Chromatography (TLC), Infrared Spectroscopy (IR) and Ultraviolet spectroscopy (UV). The antioxidant activities of purified polysaccharide to lipin were investigated. The results showed that yield of crude polysaccharides was 13.20% and glucose component was 70.30% in purified polysaccharides. Mannose and Maltose were detected in purified polysaccharides after HCl hydrolysis. Purified polysaccharide exhibited good inhibitory effect to peroxidation of oils and fats, although its antioxidant activity was weak compare to that of Vc and citric acid.

**Key words:** *Lonicera Japonica* branches; Polysaccharide (PS); Component determination; Antioxidant activity to lipin

金银花为忍冬科多年生半常绿缠绕植物,又名忍冬花、银花、双花等,中国药典2005年版一部收载在药材及饮片部分<sup>[1]</sup>,具有清热解毒、凉热散风的功效<sup>[2]</sup>。长期以来,金银花既用于中成药生产,还作为提取绿原酸的工业原料,价格逐年攀升,但大量金银花的枝叶被视为非药用部位而弃之。研究表明,金银花枝叶和金银花在临幊上均有清热解毒之功效<sup>[3]</sup>。

金银花枝叶中含有黄酮类、有机酸类、多糖类、粗蛋白、粗脂肪等营养物质<sup>[3]</sup>。但近五年来,金银花枝叶中绿原酸的提取仅见于文献<sup>[4]</sup>,有少量文献关于叶中黄酮的提取<sup>[5,6]</sup>,尚未有对金银花枝叶中

黄酮、绿原酸、多糖综合提取的研究报道。

本研究组系统探讨利用价格低廉的金银花枝叶进行黄酮、绿原酸<sup>[7]</sup>、多糖的联合提取并将残渣处理为饲料添加剂,本文通过水提法配合超声波提取金银花枝叶中的粗多糖,用Sevag法除蛋白质及乙醚除色素得到纯化多糖,利用紫外光谱、红外光谱和薄层色谱方法鉴定多糖组成,研究多糖对油脂氧化的抑制作用,为金银花枝叶资源化综合利用提供实验依据。

## 1 实验部分

### 1.1 实验仪器及试剂

UV75TCRT 紫外分光光度计(日本岛津);FT-IR Analyzer 傅立叶变换红外光谱仪(美国 NICOLET);KQ-250E 超声发生器(昆山市超声仪器有限公司);R-201B-II 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);DZF-6020 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)

收稿日期:2013-08-13 接受日期:2014-01-31

基金项目:科技部科技型中小企业技术创新基金(10C26214302421,11C26214305373);湖南省科技厅科技计划(2013FJ3026);湘西自治州科技局科技创新引导计划

\* 通讯作者 Tel:86-013574300264; E-mail:chenlihua99@163.com

公司);层析柱;植物粉碎机等。

金银花枝叶样品采于吉首市寨阳乡金银花种植基地,于50℃干燥后粉碎过40目筛,备用。乙醇、石油醚、氯仿、正丁醇、苯酚、HCl、 $H_3PO_4$ 、冰醋酸、 $H_2SO_4$ 、乙酸乙酯、异丙醇、乙酸、苯胺、二苯胺、KI等均为分析纯;D-半乳糖、D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖、麦芽糖、L(+)鼠李糖、D-果糖均为BR级(上海伯奥生物科技有限公司);葡萄糖(PR,上海伯奥生物科技有限公司)。

## 1.2 金银花枝叶粗多糖的提取

准确称取15 g样品,以水为溶剂,按料液比1:20(g/mL)在超声波功率250 W、80℃提取30 min,过滤分离滤渣和滤液,重复提取2次,将3次滤液合并,低温水浴加热,用旋转蒸发仪浓缩滤液至原液体积的1/10时,冷却浓缩液,加入3倍体积的80%乙醇,封口,静置24 h。倾去上层清液,将絮状沉淀离心,合并抽滤,收集离心后的沉淀物,用烘箱烘干得到金银花枝叶粗多糖,装袋封存备用。按下式计算得率:

$$y(\%) = \frac{m}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

式中:y为粗多糖得率,%;m为粗多糖质量,g;  $m_1$ 为原料枝叶质量,g。

## 1.3 金银花枝叶粗多糖的纯化

准确称取粗多糖样品2.5000 g,溶解于盛有20 mL去离子水的烧杯中,配制成粗多糖溶液,往盛有粗多糖溶液的烧杯中加入多糖溶液总体积1/5体积的石油醚,放入干净的搅拌磁石,磁力搅拌0.5 h。将烧杯中混合溶液全部倒入分液漏斗中,充分振荡,静置0.5 h使之分层,除去含有色素的石油醚。重复多次,直至石油醚萃取层为清澈透明。将Sevag试剂倒入分液漏斗中,充分振荡,静置0.5 h分层,用分液漏斗除去下层白色凝胶状液体的变性蛋白质,重复上述操作直至两相的界面无变性蛋白质产生。将除蛋白后的多糖溶液浓缩至1/3,醇沉得到金银花枝叶多糖沉淀,充分洗涤沉淀去除石油醚,抽滤后,低温通风烘干,得到纯化多糖,封存备用。

## 1.4 多糖含量的测定

以葡萄糖为对照品,硫酸-苯酚法显色,紫外可见分光光度法测定纯化多糖中葡萄糖的含量。

标准曲线的制作:称取干燥至恒重的葡萄糖,配置成100 mg/L标准使用液。分别移取0.00、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mL标准使用液置于10 mL刻度管中,分别加入苯酚试剂1.0 mL,摇匀后,于冷

水浴中加入3.0 mL浓 $H_2SO_4$ ,补充蒸馏水至刻度,立刻摇匀,静置5 min后,置沸水浴中加热15 min,取出后立即以流水冷却至室温,在488 nm处以紫外可见分光光度仪测定吸光值。

准确称量一定质量的金银花枝叶纯化多糖,配成溶液。相同条件下测定吸光度代入回归方程计算葡萄糖含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{m_2}{m_3} \times 100 \quad (2)$$

式中: $m_2$ 为葡萄糖质量,g; $m_3$ 为纯化多糖样品质量,g。

## 1.5 金银花枝叶纯化多糖紫外光谱分析

取适量金银花枝叶纯化多糖,研钵研细,用去离子水配制成1 g/L的溶液,取少许溶液检测pH为中性,将此溶液用紫外光谱在200~800 nm范围内扫描,通过紫外光谱判断有否蛋白质残留。

## 1.6 金银花枝叶纯化多糖薄层色谱分析

准确称取4份0.0500 g纯化多糖样品,置于同型号的洁净安培瓶中(编号分别为A、B、C、D),往其中分别加入2 mL 2 mol/L的HAc(A瓶)、HCl(B瓶)、 $H_2SO_4$ (C瓶)和 $H_3PO_4$ (D瓶),酒精喷灯封口,置于沸水浴中水解8 h。水解完毕后,打开安培瓶,在水解液中加入甲醇3~5次,浓缩水解液并且挥发去除残留的HAc和HCl,得到多糖水解浓缩液,进行薄层色谱分析。

将各单糖标准对照品与多糖样品水解液点样于薄层硅胶G板上,以乙酸乙酯-异丙醇-正丁醇-水-乙酸(60:10:1:6:3,v/v)为展开剂,25℃上行展开,挥去试剂后,以苯胺-二苯胺-磷酸为显色剂,于80℃保持10 min显色。通过比较和分析单糖标样与水解样品比移值( $R_f$ 值)确定单糖组成。

## 1.7 金银花枝叶纯化多糖红外色谱

取2 mg的中性多糖样品,以KBr固体压片并在0~4500 cm<sup>-1</sup>区间扫描,得红外光谱图。

## 1.8 多糖抗油脂氧化研究

在无水酸性条件下,油脂中的过氧化物使I定量氧化成I<sub>2</sub>,I<sub>2</sub>与I结合生成易溶于水的I<sub>3</sub>,利用I<sub>3</sub>的吸光度与标准碘液吸光度进行比较定量。

按照文献<sup>[8]</sup>的处理方法,在353 nm波长下,I<sub>2</sub>含量(W/ $\mu$ g)对吸光度(A)的线性回归方程为: $A = 0.00435W - 0.24996, R^2 = 0.9875$ 。

多糖提取物对油脂的抗氧化性采用国际上通用的烘箱强化贮存法<sup>[8]</sup>:在100 mL三角瓶中加入以溶剂V(油):V(多糖溶液)=5:1的油液溶液24

mL。在一定条件下反应,间隔 70 min 取待测样品(大约 3 滴,不超过 0.12 g)于干燥的 15 mL 比色管中,加入氯仿—冰醋酸溶液 3 mL,混匀,加入 KI 饱和碱液 0.12 mL,轻摇 30 s,置暗处 3 min。然后加蒸馏水至刻度,加塞,颠倒混匀 2~3 次,静置约 5~10 min,待水相澄清后,取上清液于 1 cm 石英比色皿中,在 353 nm 处以空白作参比,读取各管的吸光度 A 并计算出碘生成量,按下式计算过氧化值(POV)。

$$\text{POV} = m_4/m_5 \times 10^6 \quad (4)$$

式中:POV 为油脂的过氧化值,  $m_4$  为碘生成量,  $\mu\text{g}$ ;  $m_5$  为油脂样品质量, g。另分别用 Vc 和柠檬酸溶液按上述方法测定过氧化值,比较各种抗氧化剂的抗氧化能力。

考察了多糖质量浓度分别为 0.096、0.192、0.288、0.384、0.480 g/L 时对油脂抗氧化性能的影响,并用质量浓度均为 0.5 g/L 的多糖、柠檬酸和 Vc 三种抗氧化剂进行抗氧化能力的比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 金银花枝叶纯化多糖水溶液紫外光谱

多糖在 190 nm 处附近有最大吸收峰,其为多糖的特征吸收峰,核酸的特征吸收峰在 260 nm 处,多肽、蛋白质的特征吸收峰在 280 nm 处。将纯化多糖水溶液在 190~400 nm 区间扫描,结果表明样品在 190 nm 处附近有最大吸收峰,是多糖的特征吸收峰,在波长 260 nm 和 280 nm 附近没有明显的吸收峰,表明样品不含有核酸、多肽、蛋白质等物质,纯度较高。

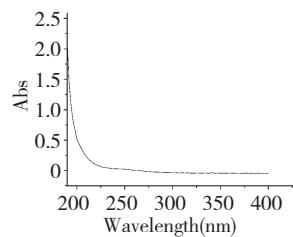


图 1 金银花枝叶纯化多糖紫外光谱

Fig. 1 UV spectrum of polysaccharides from *L. Japonica* branches

### 2.2 金银花枝叶纯化多糖的薄层色谱分析

本实验采用 HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HAc 和 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 水解金银花枝叶纯化多糖,将水解液滴在薄层板上,吹干,显色。实验结果表明只有 HCl 水解液能显色,其余

三种酸均无明显的显色效果。表明 HCl 对金银花枝叶多糖的水解效果比其它 3 种酸的效果好。

将盐酸水解液进行薄层色谱显色,结果如表 1 所示。

表 1 金银花枝叶纯化多糖薄层色谱  
Table 1 TLC of polysaccharides from *L. Japonica* branches

样品 Sample	Rf 值 Rf value	显色情况 Color
麦芽糖(Maltose)	0.27	棕色
D-葡萄糖(D-Glucose)	0.43	棕色—浅蓝
D-木糖(D-Xylose)	0.53	棕褐色
D-甘露糖(D-Mannose)	0.47	黄褐色
D-果糖(D-Fructose)	0.63	蓝褐色
L(+) - 鼠李糖(L-Rhamnose)	0.58	棕褐色
金银花叶茎藤多糖(HCl 水解)(PS)	0.30	浅棕
	0.49	浅黄

表中结果表明,金银花枝叶纯化多糖水解后的样品在薄层板上出现 2 个斑点,颜色呈浅棕色和浅黄色,其 Rf 值分别与标样中的麦芽糖、D-甘露糖接近。表明金银花枝叶纯化多糖中含有麦芽糖和 D-甘露糖。

### 2.3 金银花枝叶纯化多糖的红外光谱

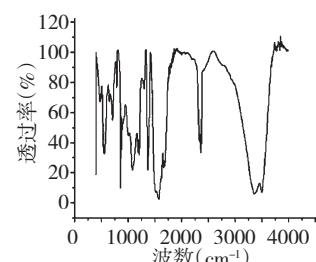


图 2 金银花枝叶纯化多糖的红外光谱

Fig. 2 IR of polysaccharides from *L. Japonica* branches

由图 2 所示:3500~3000 cm<sup>-1</sup> 的宽峰是 O-H 的伸缩振动峰,存在着分子间和分子内的氢键;1450~1120 cm<sup>-1</sup> 的峰是 C-H 的变角振动,这两组峰是糖类的特征吸收峰。1070 cm<sup>-1</sup> 的吸收峰是呋喃糖苷的特征吸收峰。1141~1020 cm<sup>-1</sup> 之间的吸收峰说明有不同的(-C-O-) 键,其中包含(-C-OH) 和(-C-O-C-) 2 种,834 cm<sup>-1</sup> 特征吸收峰是 α-端基差向异构的 -C-H- 的变角振动,834 cm<sup>-1</sup>、918 cm<sup>-1</sup>、763 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰是 α-D- 葡萄糖的特征吸收。结果表明金银花枝叶纯化多糖提取物具有典型的多糖吸收峰。

## 2.4 多糖含量的测定

以葡萄糖为对照品,490 nm 下测得吸光值  $A$  与葡萄糖浓度( $c$ )之间的线性回归方程为: $A = 1.030c - 0.008$ , $R^2 = 0.9995$ ,线性范围:20~100 mg/L。测定了金银花枝叶中粗多糖的得率及精多糖中的葡萄糖含量,结果表明经方法中所述的各步骤,金银花枝叶中粗多糖的得率为 13.20%,纯化多糖中葡萄糖含量为 70.30%。

## 2.5 金银花枝叶纯化多糖对油脂氧化的抑制效果

### 2.5.1 金银花枝叶纯化多糖对动物油的抗氧化作用

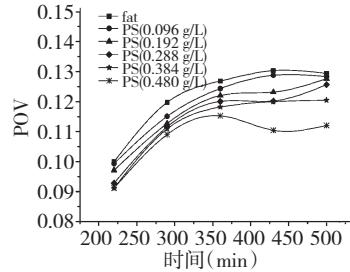


图 3 多糖浓度对动物油 POV 的影响

Fig. 3 Effects of polysaccharides (PS) concentration on POV of fat

由图 3 可知,在烘箱强化放置时间越长,动物油的过氧化值(POV)越大,表明烘箱热能使油脂自氧化反应加剧,但加入了抗氧化剂后,过氧化值均能降低。当烘箱强化放置时间相同时,多糖质量浓度越大,其过氧化值越小,表明油脂中的过氧化物的量一定时,较多的多糖能较好的清除过氧化物。

### 2.5.2 金银花枝叶纯化多糖对植物油的抗氧化作用

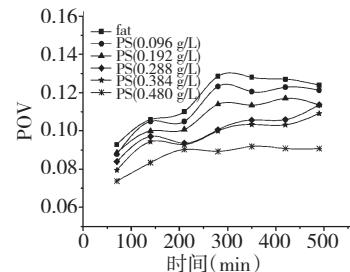


图 4 多糖浓度对植物油 POV 的影响

Fig. 4 Effects of polysaccharides (PS) concentration on POV of oil

表 4 的结果表明,在烘箱强化放置时间越长,植物油的过氧化值(POV)越大,表明烘箱热能使油脂自氧化反应加剧。与动物油类似,加入了抗氧化剂

后,过氧化值降低,且多糖质量浓度越大,过氧化值降低越多,表明金银花枝叶纯化多糖的抗氧化活性与其质量浓度呈正相关效应。

## 2.6 金银花枝叶纯化多糖与其它抗氧化剂抑制油脂氧化能力的比较

### 2.6.1 对动物油抗氧化作用比较

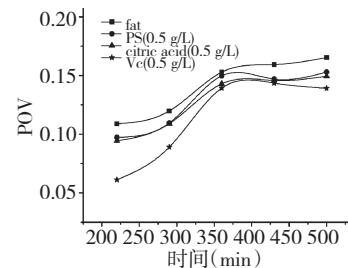


图 5 不同抗氧化剂抑制动物油氧化的比较

Fig. 5 Comparison of antioxidant activities of PS, citric acid and Vc

由图 5 的结果表明,在固定烘箱温度为 40 °C 时,随着油脂在烘箱放置时间延长,空白动物油的过氧化值快速上升,表明油脂自氧化反应程度加大;烘箱放置时间在 350 min 前,柠檬酸的抗氧化能力显著,而 Vc 和纯化多糖的抗氧化能力不显著,POV 值降低不多,但当烘箱放置时间超过 350 min 后,柠檬酸、Vc、纯化多糖的抗氧化能力均不显著,空白动物油与添加抗氧化剂的溶液的过氧化值差距并不明显,说明纯化多糖对动物油的抗氧化性与柠檬酸的相近,但比 Vc 的抗氧化性弱。

### 2.6.2 对植物油抗氧化作用比较

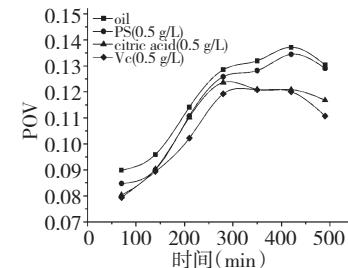


图 6 不同抗氧化剂抑制植物油氧化的比较

Fig. 6 Comparison of antioxidant activities of PS, citric acid and Vc

图 6 的结果表明,在固定烘箱温度为 40 °C 时,随着在烘箱放置时间延长,空白植物油的过氧化值迅速上升,表明油脂自氧化反应程度加大;纯化多糖、柠檬酸、Vc 均能使植物油的 POV 值有不同程度

的降低,但纯化多糖的抗氧化能力比柠檬酸和Vc都要弱。

### 3 结论

试验表明,在提取功率250 W、提取时间50 min、提取温度50℃、料液比1:40(g/mL)的工艺条件下,金银花枝叶中粗多糖得率为13.20%,纯化后葡萄糖含量为70.30%,该纯化多糖经HCl水解后含有D-甘露糖和D-葡萄糖,纯化多糖对油脂的氧化有很好的抑制作用,但弱于常用的柠檬酸和Vc。

### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*(中华人民共和国药典), Beijing: China Medical Science Press, 2005. I. 152-153.
- 2 Cui CY(崔春雨), Liu ZP(刘志平), Su M(苏敏), et al. Chemical constituents of *Lonicera japonica*. *J Guangxi Univ, Nat Sci Ed*(广西大学学报,自科版), 2012, 37: 530-533.
- 3 Wu XF(武雪芬), Jing XQ(景小琦), Li GR(李国茹). Extracting of medicinal components in *Lonicera japonica* thunb' leaf and studying of their restraining bacteriumtest. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2001, 13: 43-44.
- 4 Yang JX(杨军宣), Yin RL(尹蓉莉), Chen JY(陈金玉), et al. Study on purification of chlorogenic acid from *Lonicera Japonica* leaves with macroporous resin. *Chin J Expeim Trad Med Formulae*(中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 20-23.
- 5 Jiang HF(姜洪芳), Zhang WM(张卫明), Zhang J(张玖). Isolation and identification of flavonoids from the leaves of *Lonicera japonica* Thunb. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 2008, 36: 11795-11797.
- 6 Wang LT(王丽婷), Wang LJ(王丽娟). The separation and purification procedures of total flavonoids in honeysuckle leaves. *West Chin J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2010, 25: 575-576.
- 7 Luo Y(罗悠), Chen LH(陈莉华), Liang X(梁炫), et al. Simultaneous extraction and isolation of chlorogenic acid and flavonoids from leaves and rattan of *Lonicera japonica*. *J Jishou Univ, Nat Sci*(吉首大学学报,自科版), 2011, 32: 91-94.
- 8 Chen LH(陈莉华), Long JG(龙进国), Tan LY(谭林艳), et al. Extraction and purification of polysaccharides from *Hong Guo Ginseng* and the comparison of antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25: 170-173.

(上接第50页)

- 6 Bi LW(毕良武), Zhao ZD(赵振东), Li DM(李冬梅), et al. Study on comprehensive extraction from rosemary(I) of antioxidant and essential oil Two-step extraction. *Chem Industry Forest Prod*(林产化学与工业), 2007, 27: 11-15.
- 7 Bi LW(毕良武), Zhao ZD(赵振东), Li DM(李冬梅), et al. Study on comprehensive extraction of antioxidant and essential oil from rosemary(II)-one-step extraction. *Chem Industry Forest Prod*(林产化学与工业), 2007, 27: 11-14.
- 8 Huang JN(黄纪念). Study on antioxidative activity and its mechanism of rosemary and development of natural functional food. Beijing: China Agricultural University, PhD. 2003.
- 9 Yang L(杨磊), Xiao CW(肖长文), Zhao CJ(赵春建), et al. The technology of pH controlled homogenate extraction of carnosic acid in *Rosmarinus officinalis*. *J Nat Sci Heilongjiang Univ*(黑龙江大学,自然科学学报), 2008, 25: 514-518.
- 10 Bi LW(毕良武), Zhao ZD(赵振东), Li DM(李冬梅), et al. Study on comprehensive extraction of antioxidant and essential oil from rosemary(III)—Supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Chem Industry Forest Prod*(林产化学与工业), 2007, 27: 8-12.
- 11 BEN-YOSEF G, ARKADY G. Process to produce stabilized carnosic acid in high concentration: US, 6335373. 2002-01-01.
- 12 Bailey D T, Richheimer S L, Bank V R, et al. High purity carnosic acid from rosemary and sage extracts by pH-controlled precipitation: US, 5859293. 1999-01-12.
- 13 Du JQ(杜纪权), Xu H(徐鸿), Chen XX(陈香雪), et al. Separation and purification of carnosic acid from rosemary and determination of oxygen radical absorbance capacity. *Food and Machinery*(食品与机械), 2011, 27(6): 87-91.
- 14 Zu YG(祖元刚), Yang L(杨磊), Zu BS(祖柏实), et al. A continuous medium pressure column chromatography preparation of high purity carnosic acid method: China, 101851158A. 2010-10-06.
- 15 Reschbach R, Philippsson G. Carnosic acid obtention and uses: US, 5256700. 1993-10-26.
- 16 Li DW(李大伟). Study on ultrasound-assisted extraction and isolation of bioactive components from rosemary leaves. Beijing: Chinese Academy of Forestry, MSc. 2012.
- 17 Chen SL(陈四利). Study on active ingredients and structures of rosemary extracts. Haikou: Hainan University, MSc. 2009.
- 18 Liu F(刘芳). Study on the extraction and purification of carnosic acid from rosemary and its antioxidative activity. Harbin: Northeast Forestry University, MSc. 2010.