

文章编号:1001-6880(2015)6-1022-07

# 三峡库区乌皮香核桃隔膜粗多糖的提取及抗氧化活性

陈林, 汪开拓, 王兆丹, 吴应梅, 张成庭, 曲留柱\*

重庆三峡学院生命科学与工程学院 生物与食品基础实验教学中心(市级实验教学示范中心), 万州 404100

**摘要:**本实验对三峡库区城口乌皮香核桃内隔膜为原料,采用超声波提取粗多糖。在单因素实验基础上,以超声功率、时间及料液比为实验因素,以粗多糖提取率为响应值,采用三因素五水平的响应面分析方法进行实验,优化提取工艺参数。同时考察了隔膜粗多糖对DPPH和ABTS<sup>+</sup>自由基的清除效果。结果显示超声波提取隔膜粗多糖的最佳工艺条件为:提取功率310 W,提取时间87 s,料液比1:24(g/mL)。在该条件下乌皮香核桃隔膜粗多糖提取率预测值为26.94 mg/g,验证值为24.88 mg/g。抗氧化活性实验表明隔膜粗多糖具有自由基清除效果,对DPPH和ABTS<sup>+</sup>自由基的EC<sub>50</sub>分别为1.91 mg/mL和1.21 mg/mL。

**关键词:**隔膜粗多糖;超声波提取;响应面分析;抗氧化性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.015

## Extraction and Antioxidant Activity of Crude Polysaccharide from the Dissepiments of Wu Walnut from Three Gorges Reservoir Area

CHEN Lin, WANG Kai-tuo, WANG Zhao-dan, WU Ying-mei, ZHANG Cheng-Ting, QU Liu-zhu\*

Biotechnology and Food Basic Experimental Teaching Center (municipal Experimental Teaching Demonstration Center) College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China

**Abstract:** Ultrasonic extraction method was adopted to extract polysaccharide from the dissepiments of Wu walnut from Three Gorges Reservoir area. On the basis of single factor test, response surface analysis with 3 factors including ultrasonic power, ultrasonic treatment time and solid-to-liquid ratio on the extraction yield of polysaccharide was adopted. Meanwhile, the antioxidant activity of the extracted polysaccharide was tested. The results showed that, the optimal extraction conditions were as follows: ultrasonic power of 310 W, ultrasonic time of 87 s and solid-to-liquid ratio of 1:24 (g/mL), the predicted value and measured value of the dissepiments polysaccharide were 26.94 mg/g and 24.88 mg/g, respectively. The antioxidant activity testing results showed that, the dissepiments polysaccharide from Wu walnut had strong radical scavenging activity and reducing capacity, the EC<sub>50</sub> of DPPH and ABTS<sup>+</sup> assays were 1.91 mg/mL and 1.21 mg/mL, respectively.

**Key words:** dissepiments crude polysaccharide; ultrasonic extraction; response surface method; antioxidant

核桃隔膜中医又称分心木(*Diaphragma juglandis* Fructus),为带骨质内果皮的种隔,完整呈类圆形或椭圆形,直径约2.5 cm。核桃隔膜中药制品用于肾虚遗精,滑精,遗尿,泻痢<sup>[1-3]</sup>。国内外对核桃属植物<sup>[4-7]</sup>药用性研究较多,从核桃仁、青皮、壳枝叶等部位发现抗肿瘤、抗氧化活性成分。新疆医科大学对新疆地区核桃品种内隔膜研究发现<sup>[8]</sup>,多糖是核桃隔膜主要有效成分之一。目前对于核桃内隔膜粗多糖未有系统的测定方法,造成资源浪费。

超声波提取法利用超声波的空化效应<sup>[9,10]</sup>,保持体系稳定温度,使植物活性成分在不被破坏的情况下溶出。响应面分析方法<sup>[11,12]</sup>(response surface methodology, RSM)可用于确定各种因素及其交互作用在工艺过程中对指标(响应值)的影响,精确的表述因素和响应值之间的关系。本实验主要以三峡库区城口乌皮香核桃品种为原料,探索其隔膜粗多糖的提取工艺并进行抗氧化测定,以期对核桃的综合利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

核桃隔膜,选自重庆城口乌皮香品种,经重庆三峡学院生物与食品基础实验教学示范中心主任周浓

收稿日期:2015-02-10 接受日期:2015-04-20

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5236);2014年重庆三峡学院科学研究青年项目(14QN26)

\*通讯作者 Tel:86-018290251368;E-mail:friendlin@126.com

副教授鉴定为胡桃科核桃属乌皮香核桃的果核内木质隔膜;粉碎机将其打成粉末,过40目筛;葡萄糖标准品(色谱纯),上海楚定分析仪器有限公司;其他试剂为常规试剂。

## 1.2 仪器与设备

JY92-II超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;FZ102微型植物粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;ZXFD-A5250型电热恒温培养箱,上海恒科学仪器有限公司;AL104电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;5417R冷冻离心机,德国eppendorf公司;HH-4数显恒温水浴锅,江苏金坛市荣华仪器制造有限公司;RE-52型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-95B型循环水式多用真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;UV-2450型紫外可见分光光度计,日本岛津公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 葡萄糖标准曲线

准确称取105℃烘干至恒重的葡萄糖50mg于500mL容量瓶中配成0.1mg/mL的标准溶液,分别精密吸取标准对照品溶液0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL置于带塞试管中,然后依次精密加入2.0、1.8、1.6、1.4、1.2、1.0mL蒸馏水,在标准液中分别加入5%苯酚溶液1mL,并迅速加入浓硫酸5mL,静置10min。摇匀,30℃条件下放置30min后于490nm测定吸光值,以葡萄糖含量为横坐标,吸光

值为纵坐标,制作标准曲线。

### 1.3.2 隔膜粗多糖提取

称取核桃隔膜2.0g,适当粉碎,室温浸泡过夜,加去离子水40mL,然后滤取提取液,离心提取液(8000 rpm,15 min),上清液即为隔膜多糖粗提液。在多糖粗提液中加入3倍90%乙醇沉淀隔膜多糖,然后将所得的沉淀重新用蒸馏水溶解、定容、备用。吸取1.0mL样品溶液,按照上述步骤测出在490nm处的吸收值,并代入标准曲线中算出样品的多糖含量,平行测定3次。

### 1.3.3 单因素试验

在料液比为1:40(m:V),超声功率105W,超声温度60℃下研究超声波处理时间分别为0.5、1.0、1.5、2.0min对隔膜多糖提取率的影响;在料液比为1:40(m:V),超声功率105W,超声提取时间为30min下研究超声波处理功率分别为100、200、300、400W对隔膜多糖提取率的影响;在超声温度60℃,超声功率105W,超声提取时间为30min下研究超声波处理料液比分别为1:10、1:20、1:30、1:40(m:V)对隔膜多糖提取率的影响。

### 1.3.4 响应面方法的确定

在单因素试验的基础上分别以提取功率、提取时间及料液比3个因素为考察对象(表1),以粗多糖提取率为响应值,利用SAS9.2统计软件分析进行提取条件的优化。

表1 分心木粗多糖提取响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of central composite test on extraction of crude polysaccharide

水平 Level	因素 Factor		
	提取功率 X <sub>1</sub> Extraction power (W)	提取时间 X <sub>2</sub> Extraction time (min)	液料比 X <sub>3</sub> Liquid-to-solid ratio (mL/g)
1.68	468	2.34	46.8
1	400	2	40
0	350	1.5	30
-1	200	1	20
-1.68	132	0.66	13.2

### 1.3.5 隔膜对DPPH自由基清除作用

准确量取3.9mL 25.61mg/L的DPPH溶液,加入0.1mL体积分数70%的乙醇溶液,混匀,在517nm波长处测吸光度(A<sub>e</sub>)。将各待测样品用相应的提取溶剂配成10、20、40、80、160μg/mL分别准确量取0.1mL不同浓度的各样品溶液,加入3.9mL DPPH溶液(25.61mg/L),混合均匀,室温避光

反应30min后于517nm处测定吸光度(A<sub>i</sub>)。同时测定3.9mL体积分数70%乙醇溶液中加入0.1mL不同浓度样品溶液的吸光度(A<sub>j</sub>)<sup>[13]</sup>,以BHT作为阳性对照。DPPH清除率按以下公式计算:

$$\text{DPPH自由基清除率\%} = \left( 1 - \frac{A_i - A_j}{A_e} \right) \times 100\%$$

式中:A<sub>i</sub>为样品DPPH溶液的吸光度;A<sub>j</sub>为样

品乙醇溶液的吸光度;  $A_c$  为空白对照的吸光度。

### 1.3.6 隔膜对 ABTS<sup>+</sup>自由基清除作用

取 5 mL 7 mmol/L 的 ABTS<sup>+</sup> 溶液, 加入 88.0  $\mu$ L 140 mmol/L 的过硫酸钾在室温下置于暗处反应 12~16 h 形成 ABTS<sup>+</sup> 自由基储备液。在 734 nm 处, 用体积分数 70% 的乙醇将 ABTS<sup>+</sup> 自由基储备液稀释至吸光度为  $0.70 \pm 0.02$  备用。准确量取 0.1 mL 浓度 10、20、40、80、160  $\mu$ g/mL 的样品溶液, 加入 3.9 mL ABTS<sup>+</sup> 溶液, 混匀, 在室温下反应 6 min 后 734 nm 处测定吸光度  $A_E^{[14-16]}$ 。同时吸取 3.9 mL ABTS<sup>+</sup> 溶液, 加入 0.1 mL 体积分数 70% 的乙醇溶液于 734 nm 处测定吸光度  $A_B$ 。ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率\%} = \frac{A_B - A_E}{A_B} \times 100\%$$

式中:  $A_B$  为样品 ABTS<sup>+</sup> 溶液的吸光度;  $A_E$  为空白对照的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的测定

将配制好的不同浓度葡萄糖标准品对照溶液在 490 nm 波长处测定吸光度  $A$ , 得到回归方程  $Y = 12.92X + 0.013$ ,  $R = 0.9998$ 。表明葡萄糖浓度在 0.0050~0.0135 mg/mL 范围内线性良好。

### 2.2 回收率实验

将一定量的葡萄糖标准品放入已知多糖含量的隔膜中, 由表 2 可见, 回收率实验符合定量分析要求。

表 2 葡萄糖含量回收率实验

Table 2 Recovery experimental results

编号 No.	葡萄糖标准品加入量 Added amount of glucose (mg)	回收葡萄糖量 Detected amount of glucose (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD(%)
1	3.121	2.861	91.67		
2	3.147	2.834	90.05		
3	3.104	2.765	89.08	90.15	
4	3.122	2.843	91.06		
5	3.119	2.772	88.87		

### 2.3 隔膜粗多糖提取的单因素实验

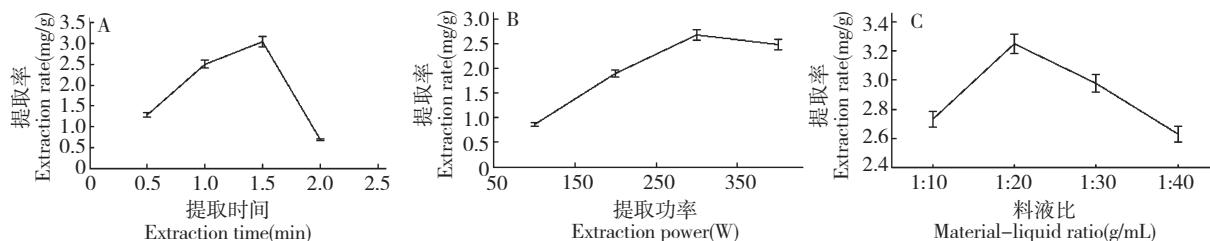


图 1 不同提取时间(A)、功率(B)及料液比(C)对提取率的影响

Fig. 1 Effects of extraction time (A), extraction power (B) and solid-to-liquid ratio (C) on the extraction rate of polysaccharide

图 1 为不同提取功率、提取时间及料液比下隔膜粗多糖的提取率。总的来说, 提高超声波功率会得到较高提取率。但功率超过 300 W 时, 高强度会破坏粗多糖结构, 影响提取率。当提取时间超过 1.5 min, 粗多糖溶解度达到饱和状态, 粗多糖提取率反而逐渐下降。随着超声时间延长, 植物细胞被破坏, 内溶物流出影响粗多糖提取率, 故提取时间为 1.5 min。超声功率 300 W, 提取时间 1.5 min 的条件下, 料液比从 1:10 提高到 1:20 时, 提取率从

2.73% 增加到 3.25%, 进一步提高料液比, 提取率下降。

### 2.4 响应面实验

根据 Box-Benhnken 的中心组合试验设计原理, 在单因素试验基础上, 确定中心组后试验的因素和方法, 以粗多糖得率为响应值。超声波辅助提取隔膜粗多糖的响应面试验的 3 因素 5 水平进行优化试验设计与结果(表 3)对试验数据进行回归分析, 回归模型的方程为:

$$Y = -70.64 + 0.242X_1 + 71.17X_2 + 1.80X_3 - 0.000663X_1X_3 - 0.3075X_2X_3 - 0.033X_3^2 \\ 0.000482X_1X_2 + 0.03X_1X_2 - 25.22X_2X_3 +$$

表3 隔膜粗多糖提取响应面试验设计方案及结果

Table 3 Experimental design and result of central composite test on extraction of polysaccharide

组别 Group	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	粗多糖含量 Crude polysaccharide content (mg/g)
1	1	1	1	12.8
2	1	1	-1	22.5
3	1	-1	1	24.8
4	1	-1	-1	27.9
5	-1	1	1	8.7
6	-1	1	-1	20.6
7	-1	-1	1	26.3
8	-1	-1	-1	32.5
9	1.68	0	0	35.4
10	-1.68	0	0	20.7
11	0	1.68	0	28.4
12	0	-1.68	0	19.3
13	0	0	1.68	23.4
14	0	0	-1.68	41.2
15	0	0	0	42.3
16	0	0	0	36.1
17	0	0	0	34.7
18	0	0	0	40.2

对该响应面回归模型进行方差分析(表4)。从此模型的方差分析表可知,响应面回归模型达到显著水平( $P = 0.0352 < 0.05$ ),复相关系数 $R^2$ 为

0.7158,说明该二次模型能够拟合真实的试验结果,试验误差小。

表4 回归方程的方差分析表

Table 4 Analysis of variance of the regression model

回归模型 Regression	自由度 DF	平方和 Sum of squares	复相关系数 R-squares	F 值 F value	P 值 P value
线性 Linear	3	388.529563	0.2486	2.33	0.1505
平法 Quadratic	3	689.440300	0.4411	4.14	0.0480
交互 Crossproduct	3	40.72375	0.0261	0.24	0.0630
模型 Total Model	9	1118.693613	0.7158	2.24	0.0352

从二次多项式回归模型系数的显著性检验结果(表5)可知,在所选的各因素水平范围内,对乌皮香核桃隔膜粗多糖提取影响因素大小顺序为:提取时间>提取功率>料液比。由显著性检验可知 $X_2$ 、 $X_1X_3$ 对核桃隔膜粗多糖提取率极显著( $P < 0.01$ ), $X_1$ 、 $X_3$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_2X_3$ 的影响显著( $P < 0.05$ ),

$X_1X_1$ 、 $X_3X_3$ 不显著。

根据回归方程做出响应面图(图2)。图2可直观反映各因素对响应值的影响。超声功率、时间及料液比的交互作用对隔膜粗多糖提取均有一定影响,其中以 $X_1$ 和 $X_3$ 之间的交互影响明显,表现为曲面较陡。 $X_1$ 和 $X_2$ 、 $X_2$ 和 $X_3$ 交互影响不显著。

表 5 二次多项式回归模型系数的显著性检验结果  
Table 5 Regression coefficients of predicted quadratic polynomial model

参数 Parameter	自由度 DF	估计值 Estimate	标准差 Standard error	T 值 T value	P 值 P value
截距 Intercept	1	-70.644407	55.415524	-1.27	0.2382
X <sub>1</sub>	1	0.241772	0.1695624	1.43	0.0317
X <sub>2</sub>	1	71.172801	33.912490	2.10	0.0091
X <sub>3</sub>	1	1.803354	1.695624	1.06	0.0486
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	1	-0.000482	0.000210	-2.30	0.0508
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	0.030250	0.052692	0.57	0.0417
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1	-25.218787	8.393244	-3.00	0.0170
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	0.000663	0.002635	0.25	0.0078
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	-0.307500	0.526920	-0.58	0.0256
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	1	-0.033108	0.020983	-1.58	0.1533

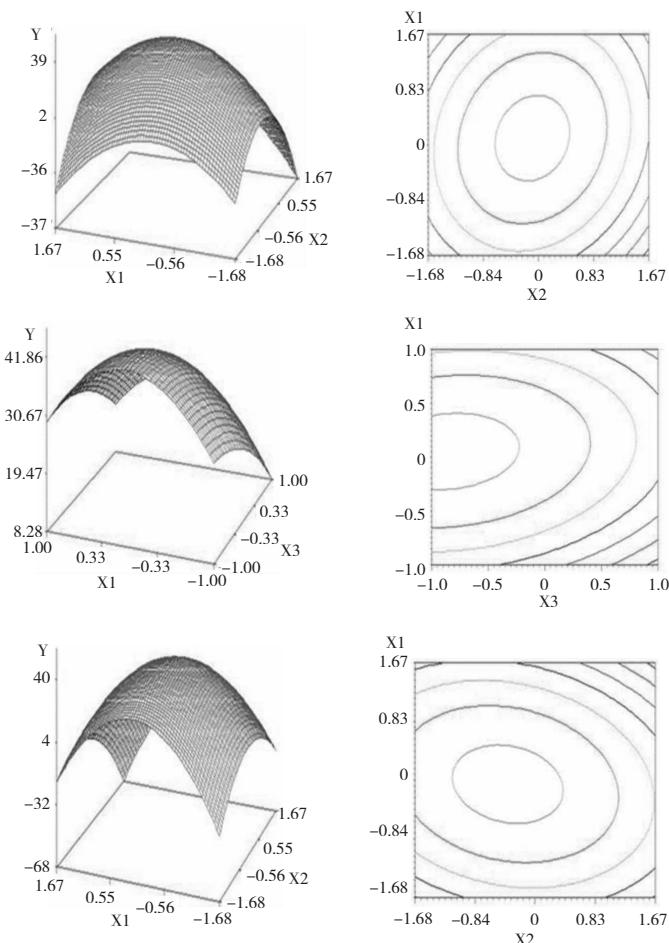


图 2 因素交互作用对隔膜粗多糖提取率影响的响应曲面和等高线

Fig. 2 Response surface plots and contour plots showing the interactive effects of different factors on the extraction yield of polysaccharide

由 SAS 分析得到响应值 Y 最大估计值为 26.94 mg/g, 此时  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  对应的编码值分别为 0.076778、-0.053771、-0.380417, 实际值为超声功率:312.9 W, 提取时间为 1.45 min, 料液比为 1:23.61。为了实际操作方便选择超声功率 310 W, 提取时间为 87 s, 料液比为 1:24 g/mL 对核桃隔膜粗多糖提取进行验证试验。3 次平行试验得到的实际皂苷提取率为 24.88 mg/g, 与预测值非常接近, 相对误差 7.65%。因

此利用响应面发优化隔膜粗多糖提取条件是可行的。

## 2.5 乌皮核桃隔膜粗多糖抗氧化性分析

乌皮香核桃隔膜粗多糖的抗氧化活性实验结果如表 6 所示。从表 6 可以看出, 以 BHT 为阳性对照<sup>[17]</sup>, 隔膜皂苷对 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup>自由基均有清除能力<sup>[18]</sup>, 并随着质量浓度的增加而加强, 呈一定线性关系,  $R^2$  分别为 0.9325 和 0.9655, 其 EC<sub>50</sub> 分别为 1.19 mg/mL 和 1.21 mg/mL。

表 6 乌皮香核桃隔膜粗多糖清除 DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基能力

Table 6 Antioxidant effect and scavenging capacity against DPPH and ABTS<sup>+</sup> of Wu walnut polysaccharide

样品浓度 Sample concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate (%)	ABTS <sup>+</sup> 清除率 ABTS <sup>+</sup> scavenging rate (%)	BHT (%)
0.5	55.967 ± 0.160 <sup>c</sup>	0.897 ± 0.003 <sup>e</sup>	13.518 ± 0.722 <sup>e</sup>
1.0	68.213 ± 0.195 <sup>d</sup>	14.023 ± 0.087 <sup>e</sup>	19.728 ± 0.521 <sup>d</sup>
1.5	77.647 ± 0.317 <sup>c</sup>	21.087 ± 0.163 <sup>d</sup>	30.961 ± 0.224 <sup>d</sup>
2.0	79.933 ± 0.061 <sup>a</sup>	43.053 ± 0.127 <sup>b</sup>	38.127 ± 0.105 <sup>c</sup>
2.5	85.597 ± 0.563 <sup>b</sup>	47.653 ± 0.241 <sup>a</sup>	52.792 ± 0.076 <sup>a</sup>
线性方程 Linear equation	$Y = 14.196x + 52.177$	$Y = 24.508x - 11.420$	$Y = 19.389x + 1.9419$
R <sup>2</sup>	0.9325	0.9655	0.9807
EC <sub>50</sub>	1.19	1.21	1.31

注: 不同小写字母代表该列数据存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: different lowercase letters indicated significant difference existed between the columns of data ( $P < 0.05$ ).

## 3 结论

核桃隔膜为民间用药,许多地区用隔膜代茶饮用有固肾涩精的疗效,但其药用价值没有得到足够的重视。研究发现,隔膜含多种活性成分<sup>[19,20]</sup>,但目前没有系统的提取方法和药理活性鉴定。根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,在单因素试验的基础上采用了 3 因素 5 水平的响应面分析方法对乌皮香核桃隔膜粗多糖的提取工艺进行了优化。结果显示隔膜粗多糖提取的最佳提取工艺条件为: 超声功率 310 W, 提取时间为 87 s, 料液比为 1:24 g/mL。在此条件下测得实际提取率为 24.88 mg/g 与预测值的相对误差为 7.65%。同时得到了隔膜粗多糖提取率与各因素变量的二次多项式回归方程,该模型回归显著,实验拟合较好,具有实际应用价值。抗氧化活性实验表明隔膜粗多糖对自由基清除效果明显,有较强的抗氧化活性。本研究对开发库区资源乌皮香核桃农副产品加工利用提供一定的研究基础。

## 参考文献

1 Xi RT(郗容庭), Zhang YP(张毅萍). Chinese Walnut. Beijing: Chinese Forestry Press, 1992. 20-50.

- 2 The Writing Group of the Compilation of Chinese Herbal Medicine(全国中草药汇编编写组). The Dictionary of Traditional Chinese Medicine: Volume (1) (中药大辞典上册). Beijing: People's Medical Publishing, 1975. 667.
- 3 Jing YC(景援朝), Zhao HX(赵焕新), Bai H(白虹). Research progress of *Diaphragma juglandis* fructus. *J Pharm Res*(药学研究), 2014, 33: 167-169.
- 4 Li FS(李福双), Shen J(申健), Tan GS(谭桂山). Advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects of walnut plant. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2007, 29: 1490-1495.
- 5 Yang MZ(杨明珠), Tian XY(田新雁), Xiao CJ(肖朝江), et al. Chemical constituents and bioactivity study of *Diaphragma juglandis* fructus. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 1707-1711.
- 6 Wang Y(王艳), Mahemuti D(迪丽达尔·马合木提), Han YC(韩艳春), et al. Study of uygur medicine *Diaphragma juglandis* fructus on mice model of Kidney-yang deficiency. *J Xingjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2012, 35: 153-157.
- 7 Wang YM(王艳梅), Gao L(高莉), Liu M(刘梦), et al. Study on chemical constituents of Walnut qualitative diaphragm. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2008, 29: 123-124.

(下转第 1046 页)