

酶法联合闪式提取红叶李花多糖及单糖初步分析

卫 强*, 纪小影

安徽新华学院药学院, 合肥 230088

摘要: 采用酶法联合闪式提取红叶李花中多糖, 对多糖进行纯化和分离, 利用气相色谱-质谱(GC-MS)初步分析多糖的组成。以单因素实验为基础, 以响应面设计优化确立最佳提取工艺, 以 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-150 分离多糖, 乙酰化后分析单糖组成。最佳提取工艺为: 酶解温度为 45 °C, 酶解时间为 2 h, 酶用量为 0.17%, 闪式提取时间为 3 min, 液料比 35 倍, 转速为 3000 rpm。多糖得率达到 13.02%。多糖由 PPCS-I 和 PPCS-II 两部分构成, PPCS-I 的单糖组成和比例为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖和葡萄糖(摩尔比为 12.11: 3.16: 7.06: 1: 4.92), PPCS-II 的单糖组成和比例为鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖(摩尔比为 5.02: 1: 13.65: 11.76: 8.39)。

关键词: 红叶李花; 闪式; 酶; 多糖; 响应面设计; 单糖分析

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.020

Enzymatic Coupled with Smashing Tissue Extraction of Polysaccharides from Flowers of *Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *Atropurpurea* Jacq. and Their Monosaccharide Composition

WEI Qiang*, JI Xiao-ying

Pharmacology College, Anhui Xinhua University, Anhui Hefei 230088, China

Abstract: The aim of this study were to optimize the process of enzymatic coupled with smashing tissue extraction and purification of polysaccharides from the flowers of *Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *Atropurpurea* Jacq and to analyze their monosaccharide compositions by GC-MS. Based on single-factor tests, response surface design was used to assure the optimal process. Polysaccharides which were separated by DEAE-52 cellulose column and Sephadex G-150 chromatography and treated by acetylation was determined by GC-MS. The results showed the optimal extraction parameters as follows: enzymatic temperature was 45 °C, enzymatic time was 2 h, enzymatic dosage was 0.17%, extraction time was 3 min, liquid-solid ratio was 35:1, revolution speed was 3000 rpm. Under the optimized conditions, the yield of polysaccharides yield 13.02%. Polysaccharides were composed of PPCS-I and PPCS-II, in which PPCS-I contained Rhamnose, Arabinose, Xylose, Mannose, and Glucose with a molar ratio of 12.11: 3.16: 7.06: 1: 4.92, PPCS-II contained Rhamnose, Xylose, Mannose, Glucose and Galactose with a molar ratio of 5.02: 1: 13.65: 11.76: 8.39.

Key words: *Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *Atropurpurea* Jacq.; smashing tissue; enzyme; polysaccharides; response surface design; monosaccharide analysis

红叶李 [*Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *Atropurpurea* Jacq.] 又名紫叶李或櫻桃李, 是落叶乔木, 为蔷薇科 (*Rosaceae*) 李亚科 (*Prunoideae*) 李属 (*Prunus*) 植物, 原产于亚洲, 为我国最常用的城市景观植物之一^[1]。红叶枝和叶呈褐红, 有光泽, 花色粉红, 深红色果实。以叶色闻名, 在整个生长期叶色呈紫红色,

尤其春秋两季叶色更艳, 且具有较强的耐湿、耐寒力, 为园林常用的彩叶树种, 极具观赏价值^[2,3]。现代研究表明, 红叶李枝叶中黄酮类成分含量丰富, 以山奈酚较为突出^[4]。红叶李叶中红色素可经 80% 乙醇提取得到, 红色素在酸性下稳定, 而中性和碱性下不稳定, 且不耐热^[5]。进一步研究红叶李叶、枝不同方位和部位中花色素含量分布情况表明, 朝南方叶、枝优于朝北方, 叶中花青素含量优于枝条^[6]。

植物多糖具有良好的降血糖、降血脂^[7]、抗肿瘤^[8]、免疫调节作用^[9]和改善学习记忆能力^[10]等,

收稿日期: 2015-08-14

接受日期: 2015-10-10

基金项目: 国家大学生创新创业训练项目 (201412216008, 201412216009)

* 通讯作者 Tel: 86-551-65872078; E-mail: weiqiang509@sina.com

目前对红叶李花中多糖的提取和单糖组成研究鲜有报道。植物细胞壁是由纤维素、半纤维素、果胶质等物质构成的致密结构,多糖成分与维生素、蛋白质、果胶、淀粉、植物纤维等成分共存,普通提取难以破壁溶解,提取率较低^[11]。酶解作用可破坏细胞壁致密结构,使细胞壁组织水解,打开胞内成分溶出的屏障,解决多糖的溶出问题。闪式技术也具有高效破壁功能,酶法与闪式联合使用可有效发挥破壁功能,大大提高对多糖的提取效能。本文对红叶李花中多糖类成分进行酶法和闪式提取,以 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-150 进行分离纯化得到多糖的组分,对多糖组分进行乙酰化,以气相色谱-质谱(GC-MS)初步分析其单糖组成,可为其多糖进一步开发应用提供基础。

1 材料与仪器

红叶李花采自合肥大蜀山区,经安徽新华学院李启照副教授鉴定为蔷薇科植物红叶李(*Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *Atropurpurea* Jacg.)的花。复合酶(其中纤维素酶 5000 IU/g、酸性蛋白酶 2000 IU/g、果胶酶 2000 IU/g、木聚糖酶 5000 IU/g,宁夏夏盛实业集团有限公司)。鼠李糖(批号:111668-200602)、阿拉伯糖(批号:111506-200001)、木糖(批号:111508-200404)、甘露糖(批号:140651-200602)、葡萄糖(批号:110833-201205)、半乳糖标准品(批号:100226-201105)(中国药品生物制品鉴定院,含量均为 98% 以上),其它试剂均为分析纯,水为纯化水。

JHBE-50 型闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司);LDZ4-1.2 型低速离心机(北京京立离心机有限公司);KJ-SY-150 超声提取器(北京同德创业科技有限公司);CNWB-C 型微波萃取器(广州万程微波设备有限公司);UV-4802 型紫外-可见分光光度计(美国尤尼柯仪器有限公司);Agilent 6890-5973N 气相色谱仪(美国安捷伦公司);FA1004 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 提取方法

2.1.1 酶法联合煮沸提取

精密称取干燥红叶李花粗粉 5 g 两份,一份置于 500 mL 具塞锥形瓶中,加入 100 mL 蒸馏水浸泡 12 h,再加入 0.1% 的植物复合酶 35 °C 酶解 2 h,再加入 200 mL 蒸馏水煮沸提取 2 h。另一份不加

酶,直接加入 300 mL 蒸馏水同前煮沸提取。

2.1.2 酶法联合超声提取

精密称取干燥红叶李花粗粉 5 g 两份,一份同 2.1.1 酶解后,再加入 200 mL 蒸馏水超声提取 30 min,超声功率 2 kW。另一份不加酶,直接加入 300 mL 蒸馏水同前超声提取。

2.1.3 酶法联合微波提取

精密称取干燥红叶李花粗粉 5 g 两份,一份同 2.1.1 酶解后,再加入 200 mL 蒸馏水微波提取 5 min,微波功率 2 kW。另一份不加酶,直接加入 300 mL 蒸馏水同前微波提取。

2.1.4 酶法联合闪式提取

精密称取干燥红叶李花粗粉 5 g 两份,一份同 2.1.1 酶解后,再加入 200 mL 蒸馏水闪式提取 3 min,功率 2 kW。另一份不加酶,直接加入 300 mL 蒸馏水同前闪式提取。

上述提取方法均重复 3 次,每次提取液均减压回收至约 100 mL,以石油醚萃取、Sevag 法除蛋白,取少量样品过 0.45 μm 滤膜,稀释适当倍数按照 2.2 项下测定多糖含量。

2.2 多糖含量测定

参考文献^[12],精密称取 20.56 mg 葡萄糖标准品,以蒸馏水定容于 100 mL 容量瓶。精密移取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8 mL 葡萄糖标准品溶液,置于 8 只 10 mL 刻度试管中,分别加入蒸馏水至 2 mL,再分别加入 1.0 mL 的 5% 的苯酚溶液及 7 mL 的浓硫酸溶液,摇匀,水浴加热 25 min,冷却至室温,以去离子水为空白对照,在 490 nm 下测定吸光度,以吸光度 A_1 为纵坐标,葡萄糖浓度 C_1 为横坐标,绘制标准曲线 $A_1 = 0.0036C_1 - 0.0024$,线性范围为 0 ~ 16.45 μg/mL,测定样品总糖得率。

分别精密量取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8 mL 葡萄糖标准品溶液,置于 10 mL 刻度试管中,分别加入蒸馏水定容至 4 mL,再分别加入 5 mL 浓度为 6.5 mg/mL 的二硝基水杨酸(DNS)溶液,摇匀,沸水浴中加热 5 min,冷却至室温,蒸馏水定容至 10 mL,于 540 nm 波长下测定吸光度,以吸光度 A_2 为纵坐标,葡萄糖浓度 C_2 为横坐标,绘制标准曲线 $A_2 = 0.0049C_2 - 0.0042$,线性范围为 0 ~ 16.45 μg/mL,测定样品还原糖得率。多糖得率计算公式为:多糖得率(%) = (总糖质量-还原糖质量)/原料质量 × 100%。

2.3 单因素实验

因酶解与提取为两个不同的处理过程,涉及因素多,为了简化实验流程,将单因素实验分成单因素实验一和单因素实验二分别考察。

2.3.1 单因素实验一

设定闪式提取因素(提取时间 2 min,液料比 20 倍,转速 2000 rpm),当酶解 2 h 和酶用量 0.10% 时,研究酶解温度(15、25、35、45、55、60 °C)的多糖得率;当酶解温度 35 °C 和酶用量 0.10% 时,研究酶解时间(0.5、1、2、3、4、5 h)的多糖得率;当酶解温度 35 °C 和酶解时间 3 h 时,研究酶用量(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3%)的多糖得率。

表 1 酶法提取响应面因素及水平

Table 1 Factors and levels of the enzymatic extraction of polysaccharides

因素 Factor	代码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
酶解温度 Enzymatic temperature (°C)	A	35	40	45
酶解时间 Enzymatic time (h)	B	2	2.5	3
酶用量 Enzymatic dosage (%)	C	0.15	0.17	0.20

2.5 多糖的单糖组分分析

将红叶李花提取总多糖以蒸馏水溶解配制浓度为 120 mg/mL 的溶液,离心后取上清液 1 mL 上 DEAE-52 纤维素柱(1.5 cm × 60 cm),以蒸馏水及 0.1、0.2、0.4、0.6 mol/L 氯化钠溶液依次洗脱,流速为 0.5 mL/min,每管收集量为 3 mL,于 490 nm 处以苯酚-硫酸测定吸光度,绘制洗脱曲线。洗脱液浓缩,再经透析、浓缩、干燥,得红叶李花粗多糖(简称 PCS)。多糖溶解于 5 mL 蒸馏水中,离心得上清液过 Sephadex G-150 凝胶柱,用蒸馏水进行洗脱,苯酚-硫酸法跟踪测吸光值,绘制洗脱曲线,按照洗脱峰收集合并组分,透析冷冻干燥得精多糖 I(简称 PPCS-I)和精多糖 II(简称 PPCS-II)。

衍生化处理:称取精多糖 I、精多糖 II 和等量的鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖标准品分别加入蒸馏水溶解,加入硼氢化钠还原 3 h,以冰乙酸调 pH 4~5,加入甲醇,浓缩至干。加入醋

2.3.2 单因素实验二

设定酶解因素(酶解温度 45 °C、酶解时间 2 h,酶加入量 0.17%),当液料比 20 倍,转速 2000 rpm 时,研究提取时间(1、2、3、4、5、6 min)的多糖得率;当提取时间 4 min,转速 2000 rpm 时,研究不同液料比(10、20、30、40、50、60 倍)的多糖得率;当提取时间 4 min,液料比 40 倍时,考察不同转速(1000、2000、3000、4000、5000、6000 rpm)的多糖得率。

2.4 响应面分析

以 Design-Expert 8.0.6 统计软件进行 Box-Behnken 中心组合实验设计和分析。见表 1。

酞,90 °C 下水浴 1.5 h,冷却,加入甲苯 3 mL, N₂ 吹干,加入乙醇,反复吹干 3 次后,2 mL 三氯甲烷萃取,过滤得乙酰化产物。

GC-MS 条件:气相色谱配毛细管管柱(HP-5, 30 × 0.32 mm × 0.25 μm);氮气,流速 1 mL/min。进样量 1 μL;程序升温:柱初始温度 160 °C,以 6 °C/min 升至 200 °C,保持 6 min;进样口和检测器温度均为 250 °C。质谱条件:EI 电离源,电离电压 70 eV;离子源温度 250 °C;扫描范围:m/z 30~600;分流比:30:1。

3 结果与分析

3.1 提取方法

由表 2 可知,酶处理前煮沸法、超声、微波和闪式提取的平均提取率为 5.14 ± 0.75%,加酶后平均提取率提高至 7.20 ± 0.52%,可见酶处理对多糖得率有较大贡献。从酶处理和提取方式的结合角度考虑,酶法联合闪式提取多糖得率最高,提取率达到 7.98%。

表 2 不同提取方法提取多糖的比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Comparison of different extraction methods($\bar{x} \pm s, n = 3$)

序号 No.	提取方法 Extraction methods	提取时间 Extraction time	多糖得率 Polysaccharide yield (%)
1	酶法联合煮沸法 Enzymatic and boiling extraction	2 h	6.88 ± 0.19
2	煮沸法 Boiling extraction	2 h	6.05 ± 0.26

3	酶法联合超声 Enzymatic and supersonic extraction	0.5 h	7.01 ± 0.34
4	超声 Supersonic extraction	0.5 h	4.22 ± 0.38
5	酶法联合微波 Enzymatic and microwave extraction	5 min	6.95 ± 0.16
6	微波 Microwave extraction	5 min	5.05 ± 0.10
7	酶法联合闪式 Smashing tissue and enzymatic extraction	3 min	7.98 ± 0.22
8	闪式 Smashing tissue extraction	3 min	5.26 ± 0.15

3.2 单因素实验

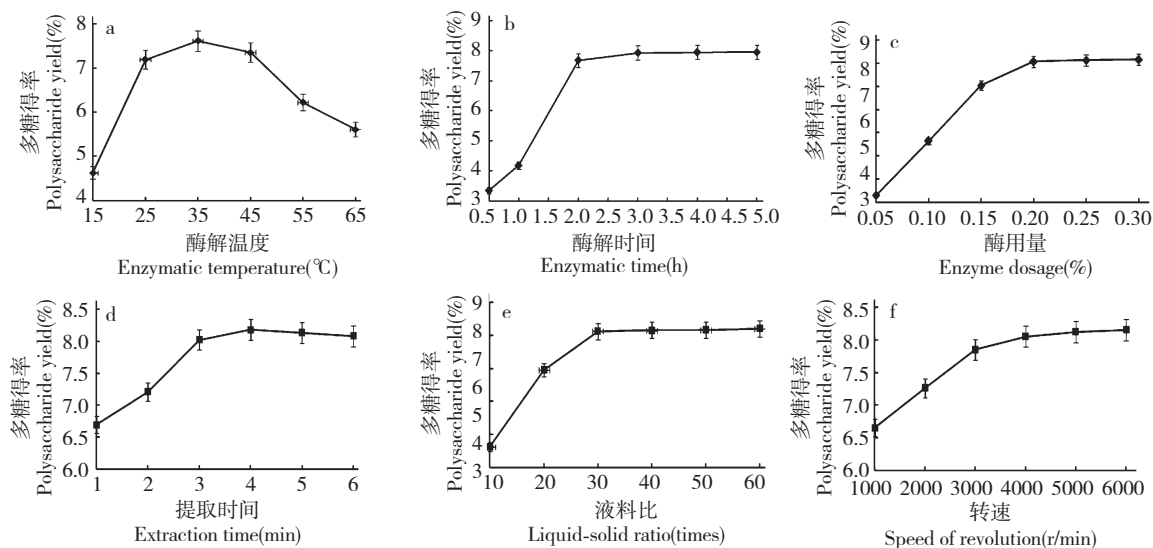


图1 酶解温度(a)、酶解时间(b)、酶用量(c)、提取时间(d)、料液比(e)及转速(f)对多糖得率的影响

Fig. 1 Effects of enzymatic temperature (a), enzymatic time (b), enzyme dosage (c), extraction time (d), liquid-solid ratio (e) and speed of revolution (f) on polysaccharides yield

结果见图1(a~f)。由图1a可知,随着酶解温度的提高,多糖得率逐步提高,但温度高于45℃,可导致酶解迅速,性能下降,故酶解温度在35~45℃为宜。图1b显示,酶解2~3h有利于发挥最佳酶解效果。图1c显示,随着酶用量加大,多糖得率逐步提高,酶用量>0.20%时多糖得率几乎不变,以0.15%~0.20%为宜。图1d显示,随着提取时间的增加,多糖得率逐步提高,但提取时间>4min时多糖得率反而略有下降,这可能与瞬间产生的热能对成分影响有关。图1e显示,随着液料比倍数的增加,

多糖得率显著增加,以30~40倍为宜。图1f显示,随着转速的增加,多糖得率持续增加,但转速>4000rpm时增加缓慢,考虑到能耗因素,以3000~4000rpm较合适。

3.3 响应面分析

3.3.1 酶法响应面设计与结果

在单因素实验基础上,选择酶解温度、酶解时间和酶加入量三个因素进行Box-Behnken中心实验设计,实验结果见表2、3、4和图2(a~c)。

表3 酶法响应面分析设计及实验结果

Table 3 Design and results of response surface methodology of the enzymatic extraction

实验号 No.	因素 Factor			多糖得率(M) Polysaccharide yield (M, %)
	A 酶解温度 Enzymatic temperature (°C)	B 酶解时间 Enzymatic time (h)	C 酶用量 Enzymatic dosage (%)	
1	0	0	0	8.26
2	0	-1	1	8.12

3	-1	1	0	7.65
4	0	0	0	8.29
5	0	1	1	8.61
6	1	0	-1	7.62
7	0	0	0	8.31
8	0	1	-1	8.05
9	0	-1	-1	7.61
10	1	0	1	8.33
11	1	1	0	8.22
12	-1	0	1	7.43
13	0	0	0	8.28
14	0	0	0	8.32
15	-1	-1	0	7.01
16	-1	0	-1	7.02
17	1	-1	0	7.95

表4 酶法回归分析结果

Table 4 The results of variance analysis of the enzymatic extraction

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	$P > F$	显著性 Significance
A	3.609357	9	0.40104	1057.355	< 0.0001	**
B	1.132513	1	1.132513	2985.909	< 0.0001	**
C	0.4232	1	0.4232	1115.782	< 0.0001	**
AB	0.599513	1	0.599513	1580.636	< 0.0001	**
AC	0.034225	1	0.034225	90.2354	< 0.0001	**
BC	0.0225	1	0.0225	59.32203	0.0001	**
A ²	0.000625	1	0.000625	1.647834	0.2401	
B ²	1.232341	1	1.232341	3249.11	< 0.0001	**
C ²	0.007967	1	0.007967	21.00624	0.0025	**
残差 Residual	0.002655	7	0.0003793			
失拟项 Loss of quasi item	0.0003750	3	0.0001250	0.22	0.8785	不显著 Not significant
总和 Sum	3.61	16				

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Notes: ** means extremely significant difference ($P < 0.01$).

由表4可知, A、B、C三个因素, AB、AC、BC交互因素和 B²、C²二次响应面模型效果极显著 ($P < 0.01$), 表明三个因素及其交互作用对红叶李花多糖得率均有显著影响。由图2a可知, 酶解时间在2 min和酶解温度在35℃时多糖得率较低, 随着时间的延长, 温度的提高, 多糖得率逐步提高。但提取时间过长, 温度过高反而会降低多糖得率。由图2b可知, 随着酶用量加大和酶解时间延长, 多糖得率呈现平稳增长, 又平稳下降的趋势, 表明两者交互作用相

对较弱。由图2c可知, 随着酶用量增加和酶解温度提高, 多糖得率呈现大幅度增加, 后又明显下降, 提示两者交互作用明显。说明酶用量需要与温度协调, 达到酶解细胞壁的临界点, 同时不致水解多糖结构, 才能提高提取效果。

对模型进行优化, 得回归方程为:

$$M = 8.29 + 0.38A + 0.23B + 0.27C - 0.093AB + 0.075AC + 0.012BC - 0.54A^2 - 0.043B^2 - 0.15C^2$$

优化后模型 $R^2 = 0.9993$, 失拟向检验 (lack of

f_{it}) P 值为 0.8785, 不显著, 表明模型充分拟合。以温度为 45 °C, 酶解时间为 2 h, 酶用量为 0.17%。软件 Expert-design 8.0 预测酶法最佳工艺为: 酶解

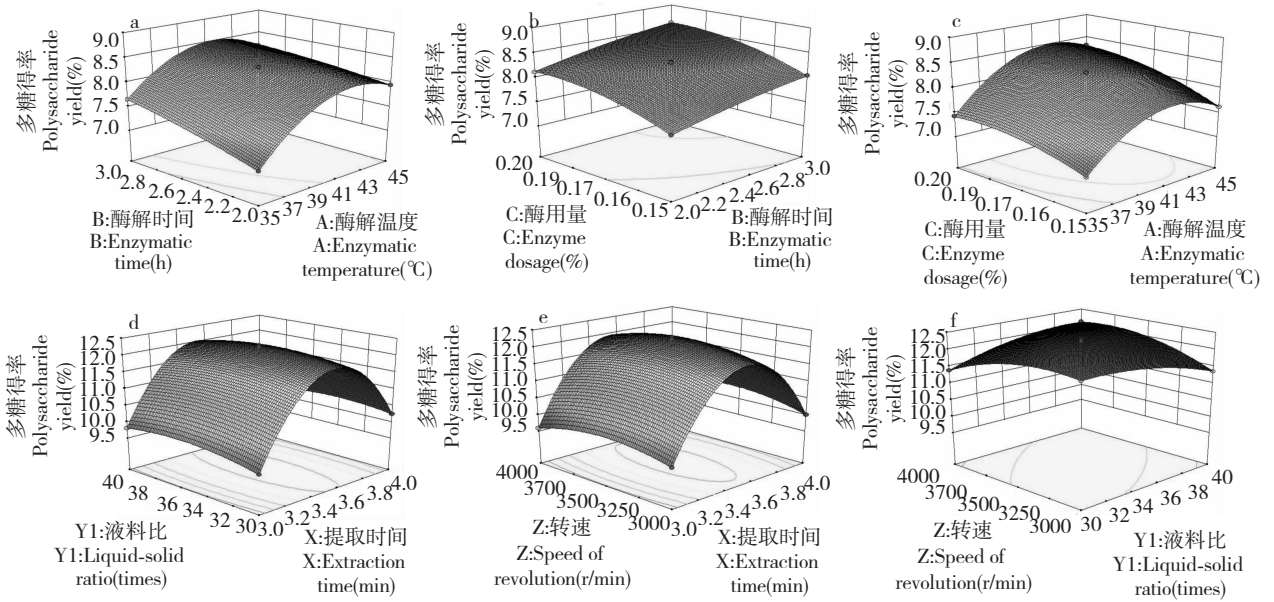


图 2 酶解时间和酶解温度 (a)、酶用量和酶解时间 (b)、酶用量和酶解温度 (c)、液料比和提取时间 (d)、转速和提取时间 (e) 及转速和液料比 (f) 对多糖得率影响的响应曲面图

Fig. 2 Response surface plots showing mutual effects of enzymatic time and enzymatic temperature (a), enzyme dosage and enzymatic time (b), enzyme dosage and enzymatic temperature (c), liquid-solid ratio and extraction time (d), speed of revolution and extraction time (e) as well as speed of revolution and liquid-solid ratio (f)

3.3.2 闪式提取响应面设计与结果

三个因素进行 Box-Behnken 中心实验设计, 实验结果见表 5 ~ 7 和图 2 (d ~ f)。

选择 3.3.1 最佳工艺优化结果进行酶解。同时在单因素实验基础上, 选择提取时间、液料比和转速

表 5 闪式提取响应面因素及水平

Table 5 Factors and levels of the smashing tissue extraction

因素 Factor	代码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
提取时间 Extraction time (min)	X	3	3.5	4
液料比 The ratio of liquid-solid (times)	Y	30	35	40
转速 Speed of revolution (rpm)	Z	3000	3500	4000

表 6 闪式提取响应面分析设计及实验结果

Table 6 Design and results of response surface methodology of smashing tissue extraction

实验号 No.	因素 Factor			多糖得率 (N) Polysaccharide yield (N, %)
	X 提取时间 Extraction time (min)	Y 液料比 Liquid-solid ratio (times)	Z 转速 Speed of revolution (rpm)	
1	1	-1	0	10.25
2	0	0	0	12.22
3	0	0	0	12.29
4	0	1	-1	11.36

5	0	0	0	12.25
6	0	1	1	12.09
7	-1	1	0	9.81
8	-1	-1	0	9.66
9	-1	0	-1	9.68
10	-1	0	1	9.59
11	0	-1	-1	12.02
12	0	0	0	12.23
13	0	-1	1	11.39
14	1	0	1	10.15
15	0	0	0	12.16
16	1	1	0	10.12
17	1	0	-1	10.01

表 7 闪式提取回归分析结果

Table 7 The results of variance analysis of the smashing tissue extraction

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	$P > F$	显著性 Significant
X	0.400513	1	0.400513	299.0493	< 0.0001	* *
Y	0.00045	1	0.00045	0.336	0.5803	
Z	0.002813	1	0.002813	2.1	0.1906	
XY	0.0196	1	0.0196	14.63467	0.0065	* *
XZ	0.013225	1	0.013225	9.874667	0.0163	
YZ	0.4624	1	0.4624	345.2587	< 0.0001	* *
X^2	17.9329	1	17.9329	13389.9	< 0.0001	* *
Y^2	0.179112	1	0.179112	133.7368	< 0.0001	* *
Z^2	0.401375	1	0.401375	299.6933	< 0.0001	* *
残差 Residual	0.009375	7	0.001339			
失拟项 Loss of quasi item	0.0003750	3	0.0001250	0.056	0.9805	不显著 Not significant
总和 Sum	20.06	16				

注: * * 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Notes: * * means extremely significant difference ($P < 0.01$).

由表 7 可知, X 、 XY 、 YZ 、 X^2 、 Y^2 、 Z^2 对多糖得率影响极显著 ($P < 0.01$) 由图 2d 和 2e 可知, 提取时间在 3 ~ 4 min 内多糖得率呈现快速增加, 快速降低的趋势, 而液料比在 30 ~ 40 倍和转速在 3000 ~ 4000 rpm 范围内曲面较平直, 对多糖提取影响较小。说明在所选的液料比和转速范围内均可显著提升对多糖的提取, 而提取时间不宜过长。由图 2f 分析可知, 随着液料比倍数和转速的增加, 多糖得率平稳增加, 且两个因素对多糖提取影响相近, 交互作用显著。

对模型进行优化, 得回归方程为:

$$N = 12.23 + 0.22X + 0.0075Y + 0.019Z - 0.07XY + 0.058XZ + 0.34YZ - 2.06X^2 - 0.21Y^2 - 0.31Z^2$$

优化后模型 $R^2 = 0.9995$, 失拟项检验 P 值为 0.9805, 不显著, 表明模型充分拟合。以软件 Expert-design 8.0 预测酶法最佳工艺为: 提取时间为 3 min, 液料比 35 倍, 转速为 3000 rpm。

3.3.3 验证性实验

对实验模型进行分析, 得出红叶李花多糖提取最优工艺参数为: 酶解温度为 45 °C, 酶解时间为 2 h, 酶用量为 0.17%, 闪式提取时间为 3 min, 液料比 35 倍, 转速为 3000 rpm。多糖得率理论值为

13.10%。以上述条件进行工艺验证实验,测得多糖得率实际值为 13.02% ($n=3$, $RSD=1.01\%$),与理论预测值相比,相对偏差较小,说明工艺稳定。

3.4 多糖的单糖组分分析

如图 3a 所示,红叶李花多糖经 DEAE-52 柱层

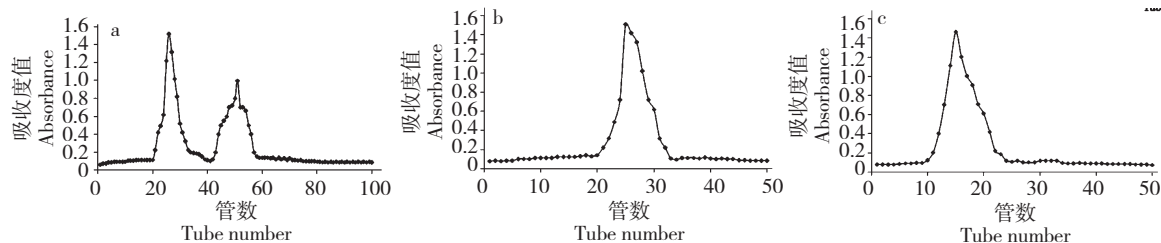


图 3 DEAE-52 纤维素柱洗脱 (a)、Sephadex G-150 洗脱得 PPCS-I (b) 及 Sephadex G-150 洗脱得 PPCS-II (c) 的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves of DEAE-52 cellulose column chromatography (a), PPCS-I by Sephadex G-150 (b) and PPCS-II by Sephadex G-150 (c)

由图 4a 对照可知,图 4b 显示 PPCS-I 由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖和葡萄糖构成,摩尔比为 12.11:3.16:7.06:1:4.92,图 4c 显示 PPCS-II 由鼠

李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,摩尔比为 5.02:1:13.65:11.76:8.39。

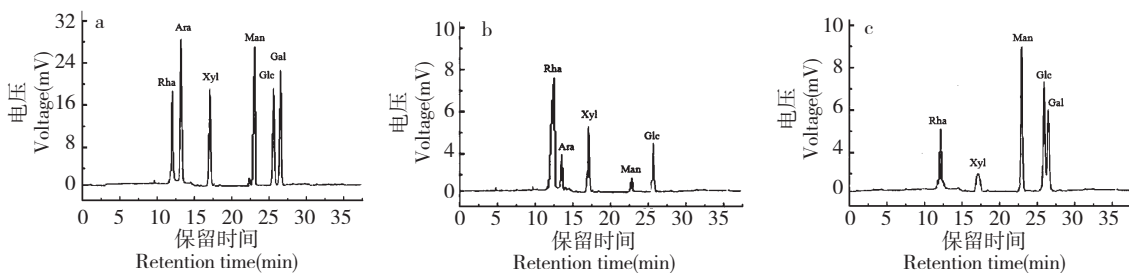


图 4 单糖标准品 (a)、PPCS-I (b) 及 PPCS-II (c) 的 GC-MS 总离子图

Fig. 4 GC-MS total ion chromatograms of standard monosaccharide (a), PPCS-I (b) and PPCS-II (c)

4 结论

多糖分子量大,结构复杂,且与蛋白质、鞣质等大分子共存,提取难度大。采用酶法与闪式联合提取方法,既可以达到快速破壁的效果,又避免了高温对糖链和结构的破坏。其最佳工艺条件为:酶解温度为 45 °C,酶解时间为 2 h,酶用量为 0.17%,闪式提取时间为 3 min,液料比 35 倍,转速为 3000 rpm。多糖实际得率达到 13.02%。由 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-150 分离纯化,对 PPCS-I 和 PPCS-II 纯品进行 GC-MS 分析,得到其单糖组成和比例分别为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖和葡萄糖 (12.11:3.16:7.06:1:4.92),鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 (5.02:1:13.65:11.76:8.39)。本文为红叶李花中多糖的进一步研究和开发提供了基础。

参考文献

- 1 Wang Y, Chen X, Zhang Y, et al. Antioxidant activities and major anthocyanins of Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *J Food Sci*, 2012, 77: C388-393
- 2 Russo A, Vettori L, Felici C, et al. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr. S 2/5 plants. *J Biotechnol*, 2008, 134: 312-319.
- 3 Kyprissis A, Grammatikopoulos G, Manetas Y. Leaf morphological and physiological adjustments to the spectrally selective shade imposed by anthocyanins in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiol*, 2007, 27: 849-857.
- 4 Wu B (吴波), Du SL (杜胜蓝), Liu WJ (刘文杰). Determination of flavonoids in tree leaves by HPLC with fluorescence detector. *Anal Instrum (分析仪器)*, 2009, 4: 41-43.

(下转第 2163 页)