

雪松松针多糖超声波酶法提取及其抗氧化性

周思杰¹, 张智红¹, 段久芳^{1,2}, 蒋建新^{1,2}, 朱莉伟^{1,2*}

¹北京林业大学材料科学与技术学院;²林业生物质材料与能源教育部工程研究中心,北京 100083

摘要:为优化雪松松针多糖超声波酶法的提取工艺,并研究多糖结构及其抗氧化性。通过响应面法分析确定最佳提取参数为:3.0 g 松针粉末,液料比 20:1 (mL:g),提取温度 80 °C,超声功率 560 W,超声时间 47 min,纤维素酶用量 12 FPU/g 原料,提取两次,多糖得率高达 10.39%。采用高效液相色谱、红外光谱和核磁共振光谱等对松针多糖进行了结构表征,松针多糖以 β -糖苷键为主要连接方式,并由葡萄糖、果糖、阿拉伯糖和半乳糖等单糖组成。体外抗氧化性研究表明:松针粗多糖对羟基自由基(\cdot OH)和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH \cdot)的清除能力远高于纯化多糖,呈现出良好的量效关系,粗多糖对 \cdot OH 和 DPPH \cdot 的半抑制浓度 IC₅₀ 分别为 0.47 g/L 和 0.076 g/L。

关键词:雪松松针;多糖;超声波酶法提取;响应面法;表征;抗氧化性

中图分类号:R284.2;R965

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0284-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.017

Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharide from *Cedrus deodara* pine needles

ZHOU Si-jie¹, ZHANG Zhi-hong¹, DUAN Jiu-fang^{1,2}, JIANG Jian-xin^{1,2}, ZHU Li-wei^{1,2*}

¹College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University;

²MOE Engineering Research Center of Forestry Biomass Materials and Bioenergy, Beijing 100083, China

Abstract: In order to optimize the ultrasonic-assisted enzymatic extraction process of polysaccharide from *Cedrus deodara* pine needles, and investigate the structure of polysaccharide and its antioxidant activity. The optimal extraction parameters were determined by response surface methodology as follows: 3.0 g pine needle powder, liquid to material ratio 20:1 (mL:g), extraction temperature 80 °C, ultrasonic power 560 W, ultrasonic extraction time 47 min with the amount of cellulase 12 FPU/g raw material, and extraction twice, the polysaccharide yield was as high as 10.39%. The structure of pine needle polysaccharide was characterized by high performance liquid chromatography, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The purified polysaccharide, linked mainly by β -glycosidic bonds, consisted of monosaccharides such as glucose, fructose, arabinose and galactose. Antioxidant activities of the polysaccharides were evaluated on the basis of hydroxyl radical (\cdot OH) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot). The scavenging ability of the crude polysaccharide was much higher than that of purified polysaccharide, which showed a good dose-effect relationship. The semi-inhibitory concentrations IC₅₀ of the crude polysaccharide on \cdot OH and DPPH \cdot were 0.47 g/L and 0.076 g/L, respectively.

Key words: *Cedrus deodara* pine needles; polysaccharide; ultrasonic-assisted enzymatic extraction; response surface methodology; characterization; antioxidant activity

雪松是松科 Pinaceae 植物雪松属 *Cedrus* Trew 树种的统称,在中国长江流域各大城市广泛种植,被作为城市环境大气污染的指示植物。雪松不仅具有观赏价值,也具有较突出的药用价值,其针叶为 13

个可供药用的松针之一^[1]。松针是松树药用的代表部位,其作为松类植物的主要副产物,具有采收便捷、分布广泛、天然蓄积量大等特点,是一种丰富的天然再生资源。在我国古代就有用松针来治疗疾病的记载,其不但含有丰富的生物黄酮类、挥发油类物质,还富含脂肪酸、叶绿素、维生素等^[2]。现代研究表明,松针提取物具有抗炎镇痛、抗氧化、抗惊厥、抗糖尿病、抗癌抑菌等多种药理活性^[3,4],其研究开发

收稿日期:2018-07-24 接受日期:2019-01-10

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0600803);北京林业大学大学生创新训练项目(X201710022104)

* 通信作者 Tel:86-013683064890; E-mail:13683064890@163.com

日益受到重视。随着松针提取物产业的发展,松针药用活性成分在市场上形成了系列产品,但松针醇提后的残渣未得到有效利用,其中含有丰富的植物多糖。

近年来大量研究表明,植物多糖是一种具有多种生理功能和开发价值的活性多糖,对人体有独特的保健功效,许多植物多糖具有提高免疫力、抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、抗感染、抗溃疡等多种生理功能^[5,6]。目前,已有相关文献研究了松针多糖的提取工艺,葛霞^[7]等人采用水提法提取雪松松针多糖,正交优化后最高得率为4.91%;许小向^[8,9]等人采用超声波辅助热水浸提火炬松松针多糖,响应面法优化后最高得率为1.87%,采用微波辅助法提取马尾松松针多糖,正交优化后最高得率为2.17%。但使用超声波酶法提取松针多糖工艺的研究以及松针多糖的结构分析还未见报道。

本研究采用超声波酶法从雪松松针中提取多糖,在单因素基础上采用响应面分析法对其提取工艺进行优化,通过现代仪器表征了多糖结构,并测定其体外抗氧化活性,以期对松针多糖的高值化利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雪松(*Cedrus deodara*)松针,4月份采摘于北京林业大学校园内的成年雪松,经北京林业大学林木育种国家工程实验室康向阳教授鉴定。

菠萝蛋白酶(120万U/g)南京东恒华道公司;纤维素酶(160 FPU/mL)诺维信(中国)公司;1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)标准品、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、果糖、甘露糖标准品SIGMA公司;半乳糖醛酸标准品Fluka公司;Bradford蛋白浓度测定试剂盒北京鼎国昌盛公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

BILON-1000CT型多用途恒温超声波提取机,上海比朗公司;UV-6100A型紫外-可见分光光度计,上海比朗公司;318C⁺酶标仪,上海欧沛公司;Bruker-ALPHA傅里叶变换红外,美国Bruker公司;Waters 2695高效液相色谱(配有Aminex HPX-87P柱子,Sugar Park I柱和2414 RID示差折光检测器),美国Waters公司;Bruker UltrashieldTM 400 PLUS核磁共振分析仪,美国Bruker公司。

1.3 方法

1.3.1 松针预处理及提取方法预实验

将采摘的雪松松针除杂、清洗、干燥、粉碎,过40目筛,石油醚和无水乙醇抽提,气干后得预处理松针粉末,测定含水率密封,备用。

首先进行提取方法的预实验,比较U法(超声不加酶提取)、EU法(加酶后超声提取)、UE法(超声后加酶提取)三种方法对多糖得率的影响。

超声提取条件:称取3.0 g预处理松针粉末,按液料比30:1(mL:g),pH5.0,温度80℃,功率300 W,超声处理30 min。酶处理条件:纤维素酶用量为12 FPU/g原料,50℃振荡2 h,灭酶20 min。后续操作:将多糖提取液离心,残渣用水二次提取,合并清液,浓缩,醇沉,4℃静置12 h,离心,沉淀依次用无水乙醇、乙醚、丙酮洗涤^[10],冻干后得松针粗多糖。

测得三种方法多糖得率分别为5.73%、7.27%和8.23%,表明超声结合酶处理可以提高多糖的得率,并且UE法效果最好,所以采用超声波酶法进行后续工艺优化研究。

1.3.2 葡萄糖标准曲线制作和多糖得率的测定

采用苯酚硫酸法制作标准曲线^[11]。以糖液质量浓度 X 为横坐标(单位mg/L),吸光度 A 为纵坐标,通过线性回归求出方程 $A = 0.0057X - 0.0755$ ($R^2 = 0.995$)。将提取的粗多糖配成1 mg/mL的糖液,稀释一定倍数后同样采用苯酚硫酸法测其吸光度(A),测定粗多糖纯度,进一步用下列公式计算多糖得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{(A + 0.0755) \times n}{0.0057 \times 10^3 \times 1} \times \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

式中: m_1 —预处理松针粉的绝干质量,g; m_2 —提取的粗多糖质量,g; n —稀释倍数。

1.3.3 单因素试验

按1.3.1节中的超声波酶法,依次比较超声温度(65、70、75、80℃)、超声时间(15、30、45、60 min)、超声功率(200、400、500、600 W)和液料比(20:1、30:1、40:1和50:1)(mL:g下同)的条件下单因素对松针多糖得率的影响。

1.3.4 响应面分析工艺优化

在单因素试验基础上,利用Design Expert 8.0.6.1软件中Box-Behnken设计方法对超声波酶法提取松针多糖工艺进行优化,对超声温度、超声时间、超声功率这三个因素进行响应面优化试验设计,并对试验数据进行二次多项回归拟合。以多糖得率为响应值,比较三个自变量对多糖得率影响的显著性,

优选出提取的最佳工艺条件。按最佳工艺条件验证三次,将得率与预测值进行对比。

1.3.5 粗多糖的纯化

采用酶法与Sevage法联用的方法来脱蛋白^[12]。调节糖液pH至7.0左右,加入粗多糖质量0.1%~0.5%的菠萝蛋白酶,53℃,振荡1h。灭酶后加入Sevage试剂,剧烈振荡30min,静置分层,取上层清液,按上述方法重复处理2次。

采用双氧水与活性炭联用的方法脱除色素。将脱除蛋白的糖液pH调至9.0左右,加入3%过氧化氢和5%的活性炭,50℃,振荡1h。过滤、浓缩后移入分子截留量为3500的透析袋中,流动的自来水和蒸馏水中各透析两天,冻干后得到纯化多糖。

1.3.6 多糖结构初步表征

将纯化多糖样品配成一定浓度的溶液,在波长200~800nm范围进行紫外可见光全波长扫描,检

$$\text{多糖纯度}(\%) = \frac{\text{五碳糖总质量浓度}(\text{g/L}) \times 0.88 + \text{六碳糖总质量浓度}(\text{g/L}) \times 0.9}{\text{多糖样品测试前的配制质量浓度}(\text{g/L})} \times 100$$

采用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定粗多糖和纯化多糖中的蛋白质含量的测定。

分别准确称取适量粗多糖和纯化多糖,用纯净水配制质量浓度为3~5mg/mL的溶液,参考文献方法^[15],采用HPLC检测糖醛酸含量。

1.3.8 松针多糖的体外抗氧化性

采用1,10-菲罗啉-Fe²⁺氧化法,测定松针粗多糖和纯化多糖对Fenton反应产生的羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力^[16]。其中A₀是不存在H₂O₂和样品的对照吸光度,A₁是没有样品但存在H₂O₂的对照吸光度,A₂是样品的吸光度,平行测定三次,取平均值,以Vc作阳性对照。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100$$

参考文献^[17]测定松针粗多糖和纯化多糖对DPPH \cdot 的清除能力,并以Vc作阳性对照。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中:A₀—2mL去离子水+2mL DPPH醇溶液的吸光度值;A₁—2mL多糖样品+2mL DPPH醇溶液的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 单因素对松针多糖得率的影响

在液料比30:1,超声功率400W,超声时间30

测其有无核酸、多肽、蛋白吸收。

称取干燥纯化多糖2mg,加200mgKBr,研磨,压片,在4000~400cm⁻¹的波数范围内进行红外光谱扫描,绘制红外光谱图,分析其主要官能团。

取适量纯化多糖溶解于氘水中,并加入一滴氢氧化钠溶液振荡使其形成透明均匀溶液后,装入干燥、洁净的核磁管中,放入核磁共振仪中进行一维氢谱分析^[13]。

1.3.7 单糖组分分析

分别准确称取适量粗多糖和纯化多糖,按1:4体积比加入1MH₂SO₄,100℃,封管水解1h,冷却中和,离心,上清液用0.22μm滤器过滤,滤液高效液相色谱检测^[14]。

色谱条件:柱温为85℃,检测器温度为35℃,进样量为10μL,流动相为双蒸水,流速为0.6mL/min。

min,纤维素酶用量为12FPU/g原料条件下,研究超声温度对多糖得率的影响。由图1(a)可知:在65~80℃范围内,随超声温度的升高多糖得率呈现先升后降的趋势。这是因为高温可以加快多糖的溶出;但温度过高会导致多糖的部分降解,故最佳提取温度选择75℃。

超声温度为75℃时,研究超声时间对多糖得率的影响。如图1(b)所示:随着超声提取时间的延长,多糖得率逐渐提高,在60min时达到最大。但是考虑到超声时间过长容易造成多糖结构的破坏,故最佳提取时间选择60min。

超声温度为75℃,时间为60min时,研究超声功率对多糖得率的影响。如图1(c)所示:在超声功率200~600W的范围内,松针多糖得率先增后降的趋势。超声功率增大有助于多糖溶解,但大于500W时,会对多糖结构造成破坏,发生降解,使多糖得率下降,故最佳超声功率选择500W。

超声温度为75℃,时间为60min,功率为500W时,研究液料比对多糖得率的影响。如图1(d)所示:随着液料比的加大,多糖得率呈小幅下降的趋势,故最佳液料比确定为20:1(mL:g)。

2.2 响应面分析法对雪松松针多糖提取工艺的优化

2.2.1 响应面法试验设计及结果

在单因素试验基础上,以对超声波酶法提取雪

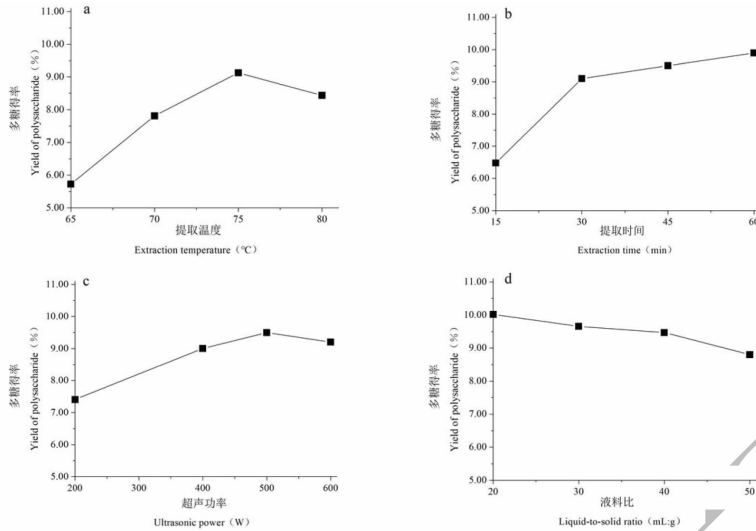


图 1 提取的单因素试验

Fig. 1 Simple factor experiments on extraction

松松针多糖得率影响效果显著的 3 个因素—超声温度、超声时间和超声功率为自变量,多糖得率为响应值 Y,采用 Box-Behnken 设计模型进行三因素三水平响应面分析。试验设计及结果如表 1 所示。

表 1 响应面试验设计及结果

Table 1 Response surface design arrangement and experimental results

试验号 No.	A 超声温度 Temperature (°C)	B 超声时间 Time (min)	C 超声功率 Ultrasonic power (W)	Y 多糖得率 Polysaccharide yield (%)
1	80	45	400	9.48
2	70	60	500	8.92
3	80	30	500	9.43
4	70	45	400	9.44
5	75	45	500	9.87
6	70	30	500	8.89
7	75	60	400	9.30
8	75	30	400	9.16
9	75	45	500	10.01
10	80	60	500	9.78
11	75	30	600	9.18
12	75	45	500	9.94
13	70	45	600	8.74
14	75	45	500	9.95
15	75	60	600	9.22
16	75	45	500	9.91
17	80	45	600	10.14

通过 Design Expert 8.0.6.1 软件对各因素进行二次响应面回归分析,得出多元二次响应面回归拟

合模型为:

$$Y = -27.6835 + 1.021A + 0.1162B - 0.024075C$$

+0.00106667AB + 0.00068AC - 0.0000166667BC
- 0.00892 A² - 0.00203556 B² - 0.0000263 C²。

该模型的方差分析结果见表2。

表2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance table

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	3.06	9	0.34	149.2	<0.0001	***
A	1.01	1	1.01	441.92	<0.0001	***
B	0.039	1	0.039	17.18	0.0043	**
C	1.25 × 10 ⁻³	1	1.25 × 10 ⁻³	0.55	0.4833	
AB	0.026	1	0.026	11.22	0.0123	*
AC	0.46	1	0.46	202.68	<0.0001	***
BC	2.5 × 10 ⁻³	1	2.5 × 10 ⁻³	1.1	0.33	
A ²	0.21	1	0.21	91.78	<0.0001	***
B ²	0.88	1	0.88	387.13	<0.0001	***
C ²	0.29	1	0.29	127.66	<0.0001	***
残差 Residual	0.016	7	2.281 × 10 ⁻³			
失拟值 Lack of fit	5.25 × 10 ⁻³	3	1.75 × 10 ⁻³	0.65	0.6217	Not significant
纯误差 Pure error	0.011	4	2.68 × 10 ⁻³			
总离差 Cor total	3.08	16				
R ² = 0.9948		R ² _{Adj} = 0.9881				

注: *** 差异极显著 $P < 0.0001$; ** 差异高度显著 $0.0001 < P < 0.01$; * 差异显著 $0.01 < P < 0.05$ 。

Note: *** extremely significant difference $P < 0.0001$; ** highly significant difference $0.0001 < P < 0.01$; * significant difference $0.01 < P < 0.05$.

由表2可以看出整体模型的 $P < 0.0001$, 差异极显著, 失拟项的 P 值为 0.6217, 极不显著, 说明选用的二次回归模型显著性极高, 能较好地描述各因素与响应值之间的关系, 可以对该试验进行分析。确定系数 $R^2 = 0.9948$, 校正确定系数 $R^2_{Adj} = 0.9881$, 表明此模型拟合度良好, 能解释 98.81% 响应值的变化, 真实值与预测值间相关性较高, 实验误差较小, 可以利用该回归模型确定最佳提取工艺条件。此外还可以看出, A、B 有显著的影响, C 不显著, 即超声温度和超声时间对松针多糖得率起较大的影响, 而超声功率影响较小; 交互项 AB 和 AC 影响显著, BC 不显著, 二次项 A²、B² 和 C² 影响都极显著, 说明各个影响因素与响应值之间存在复杂的交互影响。

2.2.2 最优工艺参数的确定

通过对所得回归模型的分析, 确定雪松松针多糖最佳提取条件为: 超声温度 80 °C, 超声功率 561.66 W, 超声时间 47.17 min, 在此条件下模型预测松针多糖提取得率为 10.18%。为了给实际操作带来方便, 修正最佳工艺条件为: 提取温度 80 °C, 超

声功率 560 W, 超声时间 47 min, 且在此条件下进行 3 次验证实验, 平均得率为 10.39%, 与模型预测值的相对误差为 2.06%, 实际值与理论值基本相符, 说明优化后的工艺条件准确可靠, 具有一定的应用价值。

2.3 松针多糖结构初步表征结果

2.3.1 紫外可见光扫描和红外光谱分析

纯化多糖光谱图中波长 260 nm 和 280 nm 处未发现明显的吸收峰, 表明其中不含核酸, 并且多肽和游离蛋白等物质含量较低。

图2是雪松松针纯化多糖的红外图谱, 3400 ~ 3300 cm⁻¹处的宽峰是由多糖分子中 O-H 的伸缩振动产生, 2925 cm⁻¹处的吸收峰是由 -CH₂-或 -CH₃ 的 C-H 键的伸缩振动产生, 它们是多糖物质的特征吸收峰。1620 cm⁻¹处的吸收峰可能由 -CHCOONH₃ 基团中 C=O 的非对称伸缩振动产生, 1400 cm⁻¹处的吸收峰也可能是由 -COOH 中 C-O 的伸缩振动产生, 说明纯化的多糖中可能存在少量蛋白质或多酚。此外 1030 cm⁻¹, 1152 cm⁻¹处的一组强烈吸收峰是吡喃环

中 C-O-C 和 C-O-H 的吸收, 944 cm^{-1} 和 762 cm^{-1} 处的吸收峰分别是由 D-葡萄糖吡喃糖的 C-O-C 骨架非对称和对称伸缩振动产生, 而呋喃糖相应的峰出现在 944 cm^{-1} 和 853 cm^{-1} , 880 cm^{-1} 为 β -吡喃糖苷键的特征吸收峰。因此雪松松针纯化多糖中可能同时含有吡喃糖和呋喃糖, 并且以 β -糖苷键为主要连接方式。

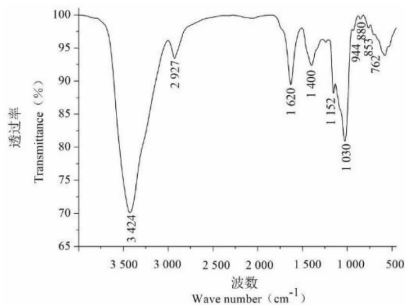


图2 雪松松针纯化多糖的红外光谱

Fig. 2 Infrared spectrum of pine needles purified polysaccharides

2.3.2 纯化多糖 ^1H NMR 分析

从图3中可以观察到松针多糖的异头质子产生的信号集中出现在 $\delta 4.64 \sim 4.99$ ppm 的范围内, 表明雪松松针多糖具有 β 构型的糖苷键, 该结果与红外谱图中对糖苷键构型判断是一致的。异头氢质的化学位移处于较低场, 一般在 $4.5 \sim 5.5$ ppm 的区域内有几个质子信号, 即表示有几种单糖组分。 ^1H -NMR 谱表明有4个主要的异头质子信号: $\delta 4.99, \delta 4.93, \delta 4.76, \delta 4.64$, 初步推断松针多糖有4种单糖组分。

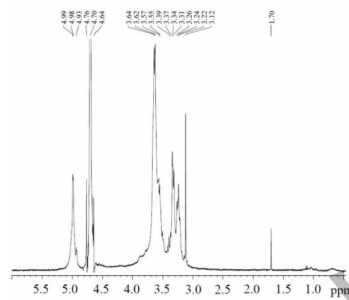


图3 松针纯化多糖的 ^1H NMR

Fig. 3 ^1H NMR spectrum of pine needles purified polysaccharides

2.3.3 多糖组成分析

从表3中的结果可知, 雪松松针粗多糖中含有葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、果糖和甘露糖5种单糖, 多糖的纯度为60.31%, 其中还含有28.97%的半乳糖醛酸和10.46%蛋白质。纯化多糖中甘露糖未检测出, 只含有其余4种单糖, 多糖的纯度为91.23%, 其次还有质量百分浓度分别为2.41%的半乳糖醛酸和5.40%的蛋白质。这说明经纯化处理后, 粗多糖中的蛋白质、色素等杂质脱除接近一半, 同时因为在碱性条件下采用 H_2O_2 脱色, 半乳糖醛酸发生失稳现象, 主链解聚, 变成了可溶性小分子物质, 在透析时流失, 因此纯化多糖中的半乳糖醛酸含量大幅度降低。此外甘露糖作为中性糖可能处于半乳糖醛酸支链上, 随半乳糖醛酸主链断裂也流失了, 纯化多糖中不含有甘露糖, 其余4种单糖的质量浓度大小为: 葡萄糖 > 果糖 > 阿拉伯糖 \approx 半乳糖, 摩尔比约为23.02:5.40:1.22:1.00, 该结果与核磁共振氢谱的结果一致。

表3 多糖组成分析结果

Table 3 Polysaccharide component analysis results

样品 Sample	单糖组成(摩尔比例) Monosaccharide composition (molar ratio)					多糖纯度 Purity (%)	蛋白质 protein (%)	半乳糖醛酸 Galacturonic acid (%)
	葡萄糖 Glc	半乳糖 Gal	阿拉伯糖 Ara	果糖 Fru	甘露糖 Man			
粗多糖 Crude polysaccharides	27.51	1.00	1.29	4.86	1.70	60.31	10.46	28.97
纯化多糖 Purified polysaccharides	23.02	1.00	1.22	5.40	-	91.23	5.40	2.41

2.4 松针多糖的抗氧化性试验结果

2.4.1 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力

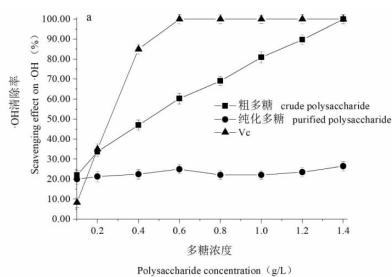
由图4(a)可知: 在 $0.1 \sim 1.4$ (g/L) 的浓度范围

内, Vc 和松针粗多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随浓度的增大而不断增大, 呈现一定的量效关系。Vc 对羟自由基的清除率在 0.6 g/L 达100%, 粗多糖在 1.4 g/L

达 100%,它对羟自由基的半抑制浓度 IC_{50} 为 0.47 g/L,说明雪松松针粗多糖对羟自由基有较好的清除能力。但纯化多糖对 $\cdot OH$ 的清除率保持在 25%左右,并不随浓度的增大产生较明显的变化,在 1.4 g/L 时仅为 26.50%,粗多糖对羟自由基的清除能力远高于纯化多糖。

2.4.2 清除 DPPH· 自由基的能力

由图 4(b)可知:在 0.1~1.4(g/L)的浓度范围内,松针粗多糖和纯化多糖二者对 DPPH· 的清除率随浓度的增大而不断增大,均呈现一定的量效关系,且粗多糖清除 DPPH· 的能力远远强于纯化多糖。Vc 对 DPPH· 的清除率在 0.1 g/L 达到 90%以



上,粗多糖在 0.4 g/L 时也可以达到 90%,它对 DPPH· 的半抑制浓度 IC_{50} 为 0.076 g/L;但是纯化多糖对 DPPH· 的清除率在 1.4 g/L 时仅为 27.71%,粗多糖对 DPPH· 的清除能力远高于纯化多糖,并且与对羟基自由基的清除结果一致。这与茶叶多糖非常类似,茶叶多糖的抗氧化活性与其糖醛酸含量呈正相关,糖醛酸含量越高,其抗氧化能力越强^[18],雪松松针粗多糖中的半乳糖醛酸质量浓度高于纯化多糖,因此粗多糖的抗氧化性要明显优于纯化多糖。松针多糖的抗氧化能力可能主要取决于其中的半乳糖醛酸含量或者是多糖半乳糖醛酸复合物协同作用的结果。

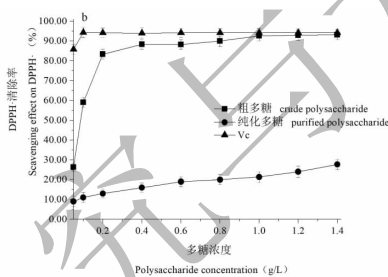


图 4 松针多糖的抗氧化活性

Fig. 4 Antioxidant activities of pine needle polysaccharides and Vc

3 结论

研究采用超声波酶法从雪松松针中提取多糖,在单因素试验基础上,采用响应面分析法对提取工艺进行优化,获得最佳工艺为:3.0 g 松针粉末,液料比 20:1 (mL:g),提取温度 80 °C,超声功率 560 W,超声时间 47 min,纤维素酶用量 12 FPU/g 原料,在此条件下多糖得率高达 10.39%。通过测定松针多糖对 $\cdot OH$ 和 DPPH· 自由基的清除能力评价其体外抗氧化活性,结果表明:雪松松针粗多糖对 $\cdot OH$ 和 DPPH· 自由基有较好的清除能力,且呈现出良好的量效关系,对前者的清除率在 1.4 g/L 达 100%,对后者的清除率在 0.4 g/L 时可以达到 90%,粗多糖对 $\cdot OH$ 和 DPPH· 的半抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.47 g/L 和 0.076 g/L。纯化多糖对两种自由基的清除率在 1.4 g/L 时仅为 26.50% 和 27.71%,粗多糖对 $\cdot OH$ 和 DPPH· 的清除能力远高于纯化多糖,分析原因可能是粗多糖中的半乳糖醛酸质量浓度高于纯化多糖,松针多糖的抗氧化能力可能主要取决于其中的半乳糖醛酸含量或者是多糖半乳糖醛酸复合物协同作用的结果。与传统的水提法相比,超声波酶法提取松针多糖工艺具有较高

的提取效率,雪松松针粗多糖表现出较强的体外抗氧化能力。并且采用高效液相色谱、红外光谱和核磁共振等对松针多糖结构进行了初步表征,为松针多糖结构的进一步研究和多糖的高值化利用提供依据。

参考文献

- 1 Zhao GZ, Shou D, Yu ZM, et al. Pharmacological study on pine needle extract[J]. Mod Hosp(现代医院), 2010, 10: 14-16.
- 2 Zhang X, Sun AD. Study on pine needle extract[J]. Food Nutr Chin(中国食物与营养), 2009, 12(9): 23-25.
- 3 Zhang QL, Gao HQ, Ling LJ, et al. Crude polysaccharides extracted from three characteristic plants in Qinghai province and their activities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 34-39.
- 4 Dhayabaran D, Florance EJ, Nandakumar K, et al. Anticonvulsant activity of fraction isolated from ethanolic extract of heartwood of *Cedrus deodara*[J]. J Nat Med, 2014, 68: 310-315.
- 5 Li PQ, Zhou LG, Mou Y, et al. Extraction optimization of polysaccharide from *Zanthoxylum bungeanum* using RSM and its antioxidant activity[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 72(1):

- 19-27.
- 6 Yuan M, Jia XJ, Yang Y, et al. Effect of light on structural properties and antioxidant activities of polysaccharides from soybean sprouts[J]. *Process Biochem*, 2015, 50:1152-1157.
 - 7 Ge X, Wang WJ, Xu MS, et al. Extract polysaccharide from cedar pine needles with the method of boiling water-extraction[J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2010, 31(7): 20-23.
 - 8 Xu XX, Yin XL, Hong YP, et al. Extraction process and antioxidant activity of *Pinus taeda* L. polysaccharides[J]. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2016, 36:114-120.
 - 9 Xu XX, Hong YP, Hu JM, et al. Study on microwave extraction technology and antioxidant activity of pine needle polysaccharose[J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2015, 36:222-227.
 - 10 Niu YY. Effects of polygonatum odoratum polysaccharide on anti-fatigue in mice[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:1202-1207.
 - 11 Yu F, Jiang CY, Yang AP, et al. Study on extraction and purification technology of yam polysaccharides[J]. *China Condiment* (中国调味品), 2012, 37(12):50-53.
 - 12 Ye M, Wen Z, Wang Q, et al. Effects of deproteinization for dictyophora rubrovalvata polysaccharide by different methods [J]. *Guizhou Agr Sci* (贵州农业科学), 2016, 44:131-135.
 - 13 Zhou CS, Yu XJ, Zhang YZ, et al. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87:2046-2051.
 - 14 Brummer Y, Cui W, Wang Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum[J]. *Food Hydrocolloid*, 2003, 17:229-236.
 - 15 Chen HX, Zhang M, Xie BJ. Quantification of uronic acids in tea polysaccharide conjugates and their antioxidant properties[J]. *J Agr Food Chem*, 2004, 52:3333-3336.
 - 16 Xie JH, Wang ZJ, Shen MY, et al. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* [J]. *Food Hydrocolloid*, 2016, 53:7-15.
 - 17 Xie JH, Wang ZJ, Shen MY, et al. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves [J]. *Food Chem*, 2015, 186:97-105.
 - 18 Nie SP, Xie MY. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities[J]. *Food Hydrocolloid*, 2011, 25:144-149.
-
- (上接第 283 页)
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Drug Standard of Ministry of health of the People's Republic of China, Tibetan drug: Vol I, 64 (中华人民共和国卫生部药品标准, 藏药第一卷) [S]. Beijing: Chinese Ministry of Health Press, 1995: 244-245.
 - 3 Lin XJ, Song TF, Geng YL, et al. The research and development of *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Mod Agric Sci Technol* (现代农业科技), 2012, 23:82-84.
 - 4 Tan R. The basic research and evaluation of the anti-hepatitis pharmacodynamics of *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Acad Dev Chengdu* (学术动态-成都), 2013, 4:25-30.
 - 5 In SJ, Seo KH, Song NY, et al. Lignans and neolignans from stems of *Viburnum erosum* and their neuroprotective and anti-inflammatory activity[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38:26-34.
 - 6 Zhang M, Deng Y, Zhang HB, et al. Two new coumarins from *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56:192-193.
 - 7 Barreo AF, Haidour A, Dorado MM. Lignans from the wood of *Abies Pinsapo* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57:713-719.
 - 8 Wu TS, Yeh JH, Wu PL. The Heartwood constituents of *Tetradium Glabrifolium* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40:121-124.
 - 9 Marzouk MM, Kawashty SA, Saleh NAM, et al. A new kaempferol trioside from *Farsetia aegyptia* [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45:483-486.
 - 10 Bo L, Yang N, Ling-Juan Z, et al. Flavonoids from *Matteuccia struthiopteris* and Their Anti-influenza virus(H1N1) Activity [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78:987-995.
 - 11 Fang QM, Zhang H, Cao Y. Anti-oxidant activities of the seed extracts of *Herpetospermum pedunculatum* against liver injury in rats [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2008, 23:147-149.
 - 12 Yuan HL, Yang M, Li XY, et al. Hepatitis B Virus Inhibitory Constituents from *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54:1592-1594.
 - 13 Kaoudji M, Favre BJ. Herpetrone, a trimeric lignoid isolated from *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1983, 24:5881-5884.
 - 14 Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3: 163-175.
 - 15 Song J, Zhou LQ, Lin ZH, et al. Antibacterial activity of six herbal extract on two oral pathogens *in vitro* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1464-1469.