

# 紫红薯多糖的提取纯化 及抗氧化作用研究

李翔,上官新晨\*,蒋艳,吴少福,陈继光

(江西农业大学 食品科学与工程学院/江西省高校天然产物研究与开发重点实验室;江西 南昌 330045)

**摘要:**实验优化了从紫红薯中提取多糖的工艺,利用 DEAE-52 柱层析分离纯化出紫红薯多糖 I 和 II 两个组分,并测定了对  $\cdot\text{OH}$ 、DPPH $\cdot$  和 ABTS 的清除作用。结果表明:紫红薯多糖最佳提取条件为提取时间 60 min、料液比为 1:8、超声功率为 240 W。经纯化后的紫红薯多糖 I 和 II 具有较好的清除自由基的能力。

**关键词:**紫红薯;多糖;提取;纯化;抗氧化

中图分类号:S531;Q591.4 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)04-0823-07

## Extraction, Purification and Antioxidant of Polysaccharide from Purple Sweet Potato

LI Xiang, SHANGGUAN Xin-chen\*, JIANG Yan, WU Shao-fu, CHEN Ji-guang

(College of Food Science and Engineering, The Key Laboratory for Research and Development of Natural Products, JAU, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The technology for extraction of polysaccharide from purple sweet potato was optimized by orthogonal array design. After removal of pigment and protein by X-5 and sevag method respectively, I and II of polysaccharide portions were obtained by further purification by cellulose Chromatography DEAE. Additionally, the antioxidant capacity of the purified polysaccharide was evaluated by determining their DPPH $\cdot$  and  $\cdot\text{OH}$  and ABTS scavenging activities. The results indicated that the obtained optimum conditions are material to water ratio 1:8, extraction time 60 min, extraction power 240 W. The yield of polysaccharide is 5.44% under the optimal conditions. After purification, I and II of polysaccharide portions showed considerable antioxidant capacity.

**Key words:** purple sweet potato; polysaccharide; extraction; purification; antioxidant

活性多糖存在于生物体中,广泛参与细胞识别、细胞生长、分化、代谢、胚胎发育、细胞癌变、病毒感染、免疫应答等各项生命活动,是现代医学和食品功能化学共同关注的研究热点之一<sup>[1]</sup>。植物多糖为活性多糖的主要来源,开发活性强含量高的植物多糖资源成为植物资源开发研究者关注的焦点。

紫甘薯作为甘薯中特有的品种,该品种不仅含有多种营养成分,同时富含丰富的花青素和多糖<sup>[2]</sup>。王建明等<sup>[3]</sup>分析了日本紫甘薯川山紫主要营养成分,得出茎、叶、叶柄总糖含量为 11.08%~15.86%。关于紫甘薯多糖方面的研究比较少,但从目前已有的研究表明紫甘薯多糖具有降血糖、抗肿瘤及抗氧化等多种功效<sup>[1-2,4-6]</sup>。叶小利等<sup>[2]</sup>证实了紫色甘薯多糖 SPPS 的抗肿瘤活性。江雪等人<sup>[4]</sup>用一定浓度

收稿日期:2011-03-22 修回日期:2011-05-12

基金项目:国家科技部农业成果转化资金(2006GB2C500149)

作者简介:李翔(1985—),硕士生,主要从事植物资源开发与利用研究; \* 通讯作者:上官新晨,教授,博士生导师,主要从事农产品贮藏与加工研究。

的紫甘薯多糖溶液灌胃给被  $4 \text{ Gy}^{137}\text{Cs}\gamma$  辐射损伤过的小鼠,通过实验发现紫甘薯多糖有很强的对抗辐射的作用。高秋萍等<sup>[1]</sup>通过水提醇沉从紫甘薯中分离出粗多糖 PPSP,研究表明,PPSP 具有一定的降血糖调血脂作用和较强的体内外抗氧化活性。以上对紫红薯多糖生理活性所展开的研究均以粗纯化物为研究对象,其作用机理并不十分明确。

本文以紫甘薯特色品种“川山紫”为原料,探索了以水作溶剂、超声波提取得到紫红薯多糖,通过强阴离子交换色谱分离得到高纯度多糖组分 I、II 对其抗氧化能力进行探讨,以期为深入了解及利用紫红薯多糖提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜川山紫采自于江西省余江县,经清洗干净后切块打浆,备用。

cellulose DE-52 Whatman; Tris(国药集团化学试剂有限公司)、DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼)、ABTS[2,2'-联苯-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)美国 Sigma 公司]、无水乙醇、浓硫酸、苯酚、氯仿、正丁醇、碳酸氢钠均为分析纯。

723 可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;HF-2.5B 超声循环提取机:北京弘祥隆生物技术开发有限公司;DTQ-100L 型多功能提取器:湖南衡阳东泰医药机械制造有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 紫红薯多糖的提取 准确称取 10 g 紫红薯块茎预处理原料(经清洗切块打浆),按一定的时间、料液比、超声功率浸提后,离心合并上清液,浓缩至一定体积,加入 3 倍体积 85% 的乙醇  $4^\circ\text{C}$  冰箱中过夜沉淀<sup>[7-8]</sup>,次日离心后,将沉淀用无水乙醇、丙酮、无水乙醚依次洗涤,真空干燥后即得紫红薯粗多糖提取物。

1.2.2 超声波辅助法提取紫红薯中多糖的优化工艺研究 超声波辅助法以提取时间、料液比、超声功率以及 pH 为单因素,分别研究各因素的不同水平对多糖得率的影响。在单因素实验的基础上,按  $L_9(3^3)$  正交试验,以多糖得率为考核指标,分析获得最佳提取工艺。

1.2.3 紫红薯多糖的纯化工艺 称取紫红薯粗多糖提取物适量,用蒸馏水溶解,使其以一定的流速通过 X-5 大孔树脂装填的树脂柱,达到泄漏点,即用体积分数为 60% 的乙醇<sup>[9]</sup>洗脱,收集洗脱液。将洗脱液浓缩至一定体积,按照 Sevag 法除蛋白,真空冷冻干燥得粗多糖 CBS。然后将 CBS 溶解在 pH 7.9 的 Tris-HCl 缓冲液中,每次取 5 mL 上样,样液浓度为 20 mg/mL。先用 3 倍柱床体积的缓冲液平衡,之后用 0.05~0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,每 5 mL 一管,硫酸苯酚法跟踪监测,将得到的不同多糖组分分别予以收集。

1.2.4 紫红薯多糖组分的体外抗氧化实验 (1) 紫红薯多糖清除 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH·)能力的测定<sup>[10]</sup>先加入 200  $\mu\text{L}$  紫红薯多糖溶液于试管中,再加水至 2 mL,与 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液混匀,置暗处反应 30 min 后,在 517 nm 处测定其吸光度值  $A_i$ ,同时测定 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液与等体积无水乙醇混合液的吸光度  $A_0$ ,以及紫红薯多糖溶液与等体积无水乙醇混合液的吸光度  $A_j$ 。根据公式  $\text{DPPH 清除率}(\%) = \left[ \frac{1 - (A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100$  计算清除率。用 VC 做阳性对照。

(2) 紫红薯多糖羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除能力的测定。对羟基自由基的清除作用<sup>[11-13]</sup>利用 Smironff 等的改进方法,在 10 mL 的试管中依次加入 2 mL 6 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$ 、2 mL 不同浓度的多糖溶液或 VC 溶液,以及 6 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 2 mL,摇匀,静置 10 min,再加入 6 mmol/L 的水杨酸溶液 2 mL,摇匀,静置 30 min 后,于 510 nm 处测定吸光值,以 VC 作阳性对照,按以下公式计算各试样对羟基自由基的清除率:

$$\text{清除率}/\% = \left[ \frac{A_0 - (A_s - A_r)}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

(1) 式中:  $A_0$ —不加样品溶液的吸光值;  $A_s$ —加入紫红薯多糖溶液反应后的吸光值;  $A_r$ —不加水杨酸溶液时紫红薯多糖溶液的吸光值。

(3) ABTS 法抗氧化性的测定<sup>[14]</sup>。取过硫酸钾溶液(140 mmol/L) 440  $\mu$ L 与 ABTS 溶液 25 mL (7 mmol/L) 混合,避光反应 12~16 h,然后用乙醇稀释避光反应后的 ABTS 混合溶液至吸光值为  $0.7 \pm 0.002$ ,取 4.9 mL 避光反应后的 ABTS 混合溶液与 0.1 mL 提取液反应 10 min 后于 734 nm 下测吸光值,空白为 0.1 mL 蒸馏水。

$$\text{ABTS 清除率}/\% = \left[ \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100 \quad \text{其中: } A_0 \text{ 为加空白蒸馏水的 ABTS 的吸光值, } A_t \text{ 为紫红薯多}$$

糖溶液与 ABTS 反应后的吸光值,以 VC 作阳性对照。

1.2.5 多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法<sup>[15-16]</sup> 标准曲线回归方程为:  $A = 5.594C + 0.1743$  ( $R = 0.9998$ ), 浓度在 0~50  $\mu$ g/mL 呈现良好的线性关系。精密称取各提取物干燥粉末 20~100 mg,用蒸馏水定容于 50 mL 容量瓶,取 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,按方法操作测定 490 nm 的吸光值,根据标准曲线计算多糖含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

2.1.1 超声时间对紫红薯多糖得率的影响 按原料与蒸馏水质量比为 1:8 加入蒸馏水,超声功率为 240 W,自然 pH,超声时间分别为 20,30,40,50 和 60 min,测定得率,结果如图 1 所示。

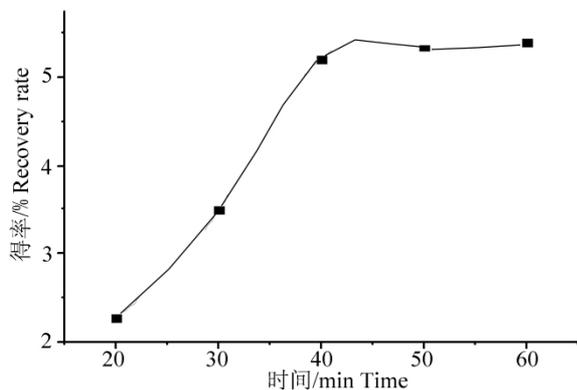


图1 超声时间对多糖提取得率的影响

Fig.1 Effect of different extraction ultrasonic time on polysaccharide recovery rate

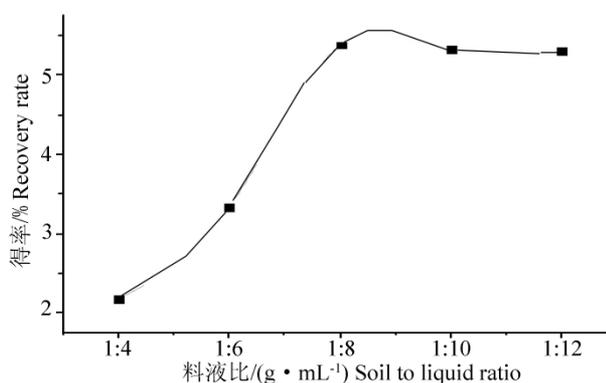


图2 料液比对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of solid to liquid ratio on polysaccharide recovery rate

随着超声时间的延长,提取出的紫红薯总糖的得率逐渐增高,其中 20~40 min 的得率增幅较大,而超声时间到 40 min 时增加的幅度很小(图 1)。可能原因是由于长时间超声波的机械剪切作用使大分子多糖断裂而损失,考虑到超声提取时间继续延长时,多糖结构易受到破坏且溶剂蒸发较快,故取 40 min 为最佳点。

2.1.2 料液比对青钱柳多糖得率的影响 超声功率为 240 W, pH = 7, 超声时间为 40 min,料液比分别为 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 测定得率,结果如图 2 所示。料液比是提取过程的一个重要影响因素,主要表现在影响固相主体和液相主体之间的浓度差,即传质推动力。料液比偏小时,固液相中有效成分的浓度差偏小,提取过程中传质速度慢,多糖溶入溶剂中的量偏少,随着料液比的增大,两相浓度差增大,传质速度加快,多糖不断溶出,故在料液比在 1:4~1:8,紫红薯多糖得率随料液比的增大而增加。当料液比增加到一定程度时,两相中浓度差依然存在,但可能由于传质动力增加不大,多糖溶出量加不多,而其他物质溶出量较之前有增加,故多糖得率稍微降低(图 2)。考虑到用水的体积增大会延长浓缩时间,增加操作费用,因此选取料液比为 1:8 为佳。

2.1.3 超声功率对紫红薯多糖得率的影响 自然 pH,超声时间分别为 40 min,料液比为 1:8,超声功率分别为 80,120,160,200,240,280 W,测定得率,结果如图 3 所示。

超声功率对紫红薯多糖的提取率有一定的影响,在 80~240 W 时,随超声功率的增加,多糖提取率逐渐增大,240 W 时,提取率达最大值 5.4%。当超过 240 W 时,随着超声功率的增加,曲线趋于平缓(图 3),

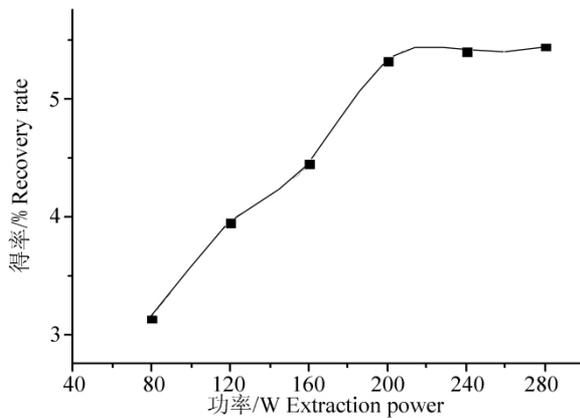


图3 超声功率对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of extraction power on polysaccharide recovery rate

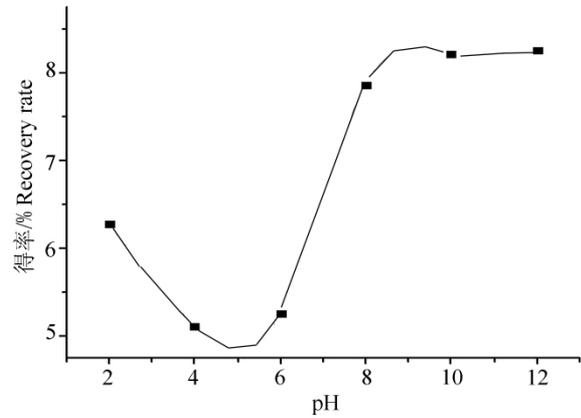


图4 pH值对多糖得率的影响

Fig.4 Effect of pH value on polysaccharide recovery rate

其原因可能是由于增大超声功率可加快水的循环速度,强化传质;同时使细胞的破碎程度增加,有利于多糖的提取。但功率过大时,容器内会发生局部瞬时升温现象<sup>[17]</sup>,使杂质溶出量增加,干扰多糖含量测定。

2.1.4 pH值对紫红薯多糖得率的影响 超声时间为40 min,料液比为1:8,超声功率为240 W,pH为2,4,6,8,10,12,测定得率,结果如图4所示。

pH值对紫红薯多糖得率的影响较为复杂,没有明显的规律。总的来说,在pH>7时,得率较大,pH<7时,得率偏低。在酸性条件下,多糖提取率较低,这可能是由于多糖中的糖苷键在酸性条件下容易水解,在提取过程中部分多糖水解造成的。在碱性条件下,多糖提取率较高,这可能是由于植物细胞结

表1 因素水平

Tab.1 The factors and levels for orthogonal experimental design

因素 Factor	A 提取时间/min Extraction time	B 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> ) Solid to liquid ratio	C 超声功率/W Extraction power
1	40	1:8	200
2	50	1:10	240
3	60	1:12	280

表2 正交试验分析结果

Tab.2 Orthogonal experiments design and results

试验号 Number	A 提取时间/min Extraction time	B 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> ) Solid to liquid ratio	C 超声功率/W Extraction power	D 得率/% Recovery rate
1	1	1	1	5.23
2	1	2	2	5.35
3	1	3	3	5.31
4	2	1	2	5.44
5	2	2	3	5.34
6	2	3	1	5.16
7	3	1	3	5.41
8	3	2	1	5.20
9	3	3	2	5.37
K <sub>1</sub>	5.30	5.36	5.20	
K <sub>2</sub>	5.31	5.30	5.39	
K <sub>3</sub>	5.33	5.28	5.35	
R	0.03	0.08	0.19	

构精密,弱碱性可使细胞结构破坏,有利于多糖的提取;另外,可能紫红薯多糖中含有糖醛酸的多糖及酸性多糖,因此碱性条件下更易于提取<sup>[18]</sup>。考虑到维持多糖的结构稳定、生物活性及提取工艺的简便,确定自然 pH 比较合适。

### 2.2 紫红薯多糖最佳提取工艺的确定

在单因素试验的基础上选取提取时间、料液比和超声功率 3 个因素,每个因素 3 个水平进行正交试验,各因素的试验安排及结果见表 2。

由表 2 正交试验结果可知,得出最优试验方案为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>,即超声时间为 60 min,料液比为 1:8(g/mL),功率为 240 W。用该组合进行 3 次重复性实验,得到得率平均值为 5.52%,影响多糖得率的因素主次顺序为:C(功率)、B(料液比)、A(提取时间)。

表 3 正交实验方差分析

Tab. 3 ANOVA of orthogonal experiments

方差来源 Variance source	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著水平 Significant level
提取时间 Extraction time	0.001 4	2	0.000 7	8.714 3	0.102 9
料液比 Solid to liquid ratio	0.010 7	2	0.005 3	68.714 3	0.014 3
超声功率 Extraction power	0.061 8	2	0.030 9	397.000 0	0.002 5
误差 Error	0.002 0	2	0.000 1		
总和 Total	0.074 0	8			

从表 3 的方差分析可知:超声功率对多糖得率的影响极为显著( $P < 0.01$ ),料液比对多糖得率的影响显著( $P < 0.05$ ),而提取时间对多糖得率的影响不显著( $P > 0.05$ ),这与直观分析的结果一致。

### 2.3 DEAE-52 柱层析纯化紫红薯多糖效果

紫红薯提取液经过 X-5 大孔树脂脱色、Sevag 除蛋白等处理后经真空冷冻干燥得灰白色的紫甘薯多糖粗品。粗品经 DEAE-52 柱层析获得紫甘薯多糖纯化组分(图 5)。在 0.05 mol/L 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L NaCl 洗脱下分别得到了 3 个组分: I、II 和 III。经考马斯亮蓝法检测, I、II 不含蛋白,测定其纯度分别为 83.9% 和 92.45%, III 为含蛋白成分,疑似为糖蛋白,不予收集。

### 2.4 紫红薯多糖 I、II 组分清除 DPPH 能力

DPPH· 是一种稳定的自由基,其甲醇溶液呈紫红色,在 517 nm 处有最大的吸光度。抗氧化剂能够给自由基提供氢原子和电子并使其褪色。该方

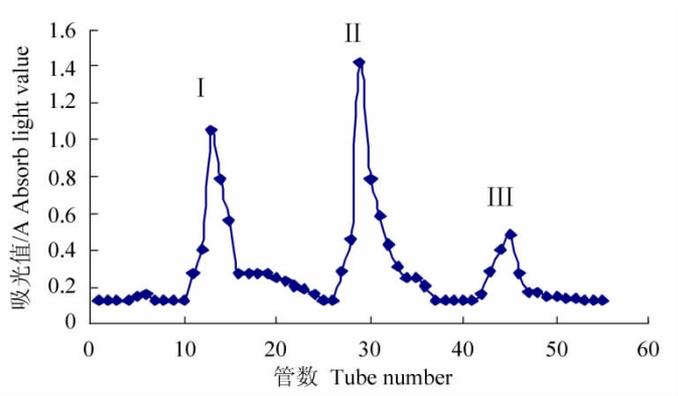


图 5 紫甘薯多糖 DEAE-52 离子交换层析洗脱曲线  
Fig. 5 Elution curve of polysaccharide from purple sweet potato on DEAE-52 column

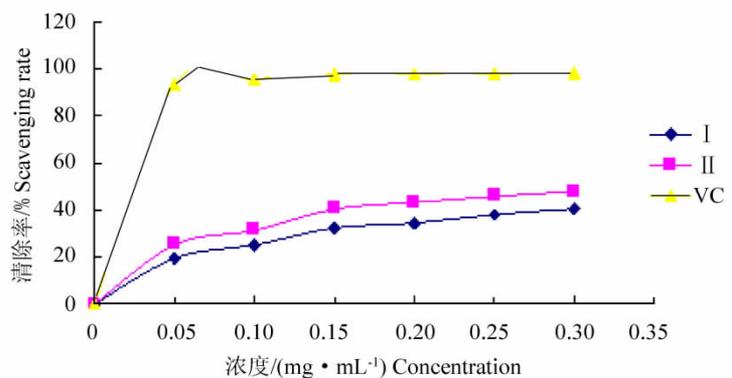


图 6 紫红薯多糖 I、II 组分对 DPPH· 的清除作用  
Fig. 6 Scavenging activities of I、II on DPPH·



境的条件下,对多糖抗氧化活性的研究才能得到更加可靠的信息,从而为开发利用具有较高的生物活性的多糖奠定基础。

#### 参考文献:

- [1]高秋萍.紫心甘薯多糖的提取与生物活性研究[D].杭州:浙江大学,2010.
- [2]叶小利,李学刚,李坤培.紫色甘薯多糖对荷瘤小鼠抗肿瘤活性的影响[J].西南师范大学学报,2005,30(2):333.
- [3]干建民,王永久.日本川山紫的食用价值及栽培技术[J].陕西农业科学,2005(1):126-127.
- [4]須田郁夫.健康機能性を活用した甘しょと大豆の高付加価値化[J].九州農業研究,2001,63:29-34.
- [5]古田收,須田郁夫,西場洋一,等.紫甘しょに認められる強い抗酸化能・ラジカル消去能[J].九州農業研究,1997,59:24.
- [6]江雪,吕晓玲,李津,等.紫甘薯多糖对辐射的防护作用[J].食品与生物技术学报,2010,29,5:665
- [7]刘成梅,游海.天然产物有效成分的分离与应用[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [8]季宇彬.中药多糖的化学与药理[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [9]沈勇根,上官新晨,徐明生,等.紫红薯色素的提取和精制[J].江西农业大学学报,2004,26(6):912-916.
- [10]朱洪梅.玉米黄色素提取工艺及其抗氧化活性研究[J].中国粮油学报,2010,25(2):16.
- [11]赵二芳,张海容,盖青青,等.沙棘黄酮的测定及其抗氧化作用[J].化学应用与研究,2003,15(2):284-285.
- [12]杨方美,王林,胡秋辉.江苏鼠尾藻多糖的制备及其抗氧化活性[J].食品科学,2005,26(2):224-228.
- [13]贾之慎,邱建敏,唐孟成.比色法测定 Fenton 反应产生的羟基自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(2):184-186.
- [14]Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation recolorization assay[J]. Free Radical Biology Medical, 1999, 26: 1231-1237.
- [15]许旋,骆晓枫,陈兆星,等.正交试验优化绿茶中茶多糖醇析水提法的实验研究[J].中药材,2005,28(4):327-329.
- [16]吴向阳,范群艳,仰榴青,等.匙羹藤粗多糖的提取及其清除羟自由基活性研究[J].食品科学,2008,29(1):107-110.
- [17]王琴,邹杰,温其标.超声强化提取银杏多糖[J].食品与发酵工业,2006,32(1):126-128.
- [18]高秋萍,阮红.紫心甘薯多糖提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(20):115.
- [19]Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation recolorization assay[J]. Free Radical Biology Medical, 1999, 26: 1231-1237.
- [20]杨磊,贾佳,祖元刚.山楂果实提取物的体外抗氧化活性[J].中国食品学报,2009,9(4):30.