

刘秋叶, 刘辉, 陈鑫, 等. 布渣叶多糖的提取工艺优化及生物活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 197–204. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090110

LIU Qiuye, LIU Hui, CHEN Xin, et al. Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Microcos paniculata* and Its Biological Activity Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 197–204. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090110

· 工艺技术 ·

布渣叶多糖的提取工艺优化及生物活性分析

刘秋叶¹, 刘辉², 陈鑫², 左亚杰^{1,*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007;
2. 佛山科学技术学院医学院, 广东佛山 528225)

摘要:目的: 优化布渣叶多糖的提取工艺, 并对布渣叶多糖体外抗氧化、胰脂肪酶抑制、抗菌活性进行评价。方法: 采用超声辅助热水法提取布渣叶多糖, 在单因素实验基础上结合正交试验对提取工艺参数进行优化; 通过测定 DPPH、ABTS⁺和 OH 自由基清除能力来评价布渣叶多糖的抗氧化能力; 通过抑制胰脂肪酶作用测定布渣叶多糖的降脂活性; 采用微量肉汤稀释法测定布渣叶多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌的抑菌作用。结果: 布渣叶多糖最佳提取工艺条件为: 超声功率 225 W, 超声温度 65 °C, 料液比 1:20 (g/mL), 超声时间 35 min, 在此条件下多糖平均得率为 3.76%±0.25%; 布渣叶多糖对 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基清除率的 IC₅₀ 值分别为 0.1430、0.01553 和 0.1451 mg/mL; 在布渣叶多糖质量浓度为 5 mg/mL 时, 布渣叶多糖胰脂肪酶抑制率为 36.22%±1.76%; 此外, 布渣叶多糖对铜绿假单胞菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌均有抑制效果, 其 MIC 分别为 50、100、100、200 mg/mL。结论: 单因素结合正交试验优化所得提取工艺可有效提取布渣叶多糖, 布渣叶多糖具有良好的体外抗氧化、抗菌活性以及有潜在的胰脂肪酶抑制能力, 有深入开发研究的价值。

关键词: 布渣叶多糖, 提取工艺, 抗氧化活性, 抗菌活性, 脂肪酶抑制活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)04-0197-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090110



本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Microcos paniculata* and Its Biological Activity Analysis

LIU Qiuye¹, LIU Hui², CHEN Xin², ZUO Yajie^{1,*}

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;
2. School of Medicine, Foshan University, Foshan 528225, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction process of polysaccharides from *Microcos paniculata*, and evaluate the antioxidant, antibacterial and pancreatic lipase inhibitory activities of *Microcos* polysaccharide. Methods: Ultrasonic-assisted extraction method was employed to extract polysaccharides from *Microcos paniculata*. The single-factor experiments were combined with orthogonal experiment to optimize the parameters of the extraction process. Antioxidant activity of *Microcos* polysaccharide was evaluated by DPPH, ABTS⁺, and OH free radical scavenging assays. The pancreatic lipase test was used to study the lipid lowering activity of *Microcos* polysaccharide. In addition, the antibacterial activity of *Microcos* polysaccharide against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae* were measured by the micro broth dilution method. Results: The optimum conditions of *Microcos* polysaccharide were as follows: Ultrasonic power was 225 W, extraction temperature was 65 °C, solid-liquid ratio was 1:20 (g/mL), extraction time was 35 min. Under these conditions, the yield of *Microcos*

收稿日期: 2023-09-13

基金项目: 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目; 湖南省自然科学基金 (2021JJ8006); 2020 年中药材炮制项目开放基金 (ZYPZ202001); 湖南中医药大学校级基金 (2019XJJJ053)。

作者简介: 刘秋叶 (1992-), 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向: 中药制剂及质量标准研究, E-mail: 736308093@qq.com。

* 通信作者: 左亚杰 (1965-), 男, 硕士, 教授, 主任药师, 研究方向: 中药制剂及质量标准研究, E-mail: yajiezuo@163.com。

polysaccharide was $3.76\% \pm 0.25\%$. *Microcos* polysaccharide exhibited potent scavenging activity on DPPH, ABTS⁺ and OH free radicals, with the half-inhibitory concentrations were 0.1430, 0.01553 and 0.1451 mg/mL, respectively. The inhibition rate of pancreatic lipase was $36.22\% \pm 1.76\%$, when the concentration of *Microcos* polysaccharide was 5 mg/mL. The minimum inhibitory concentrations of *Microcos* polysaccharide against *P. aeruginosa* was 50 mg/mL, against *E. coli* and *K. pneumoniae* were all 100 mg/mL, against *A. baumannii* was 200 mg/mL. Conclusion: The extraction process optimized by single factor experiments combined with orthogonal experiment could effectively extract *Microcos* polysaccharides. The *Microcos* polysaccharide revealed good antioxidant and antibacterial as well as potential pancreatic lipase inhibitory activities, which would be valuable for in-depth developmental research.

Key words: *Microcos* polysaccharide; extraction process; antioxidant activity; antibacterial activity; pancreatic lipase inhibitory activity

布渣叶为椴树科植物破布叶(*Microcos paniculata* L.)的干燥叶,主要生长在我国的南方地区。其具有消食化滞,清热利湿的功效,主要用于治疗饮食积滞,感冒发热,湿热黄疸^[1],是民间药食两用的常用药用植物,岭南居民常以单方或者复方的形式煮水喝以改善消化不良的症状^[2]。此外,布渣叶也被用作多种凉茶的主要配方药物之一,例如“仙草爽凉茶”“广东凉茶”“王老吉”等^[3-4]。布渣叶化学成分主要含有黄酮类^[5]、生物碱类^[6]、有机酸、挥发油等^[7]。肖观林等^[8]应用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间高分辨质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析布渣叶中的化学成分,共鉴别出 28 个黄酮类和 3 个有机酸类成分;李振雨等^[9]对布渣叶标准汤剂中 3 种黄酮类成分的含量进行测定,结果显示布渣叶标准汤剂牡荆苷的含量范围为 1.63~4.68 mg/g,异牡荆苷的含量范围为 2.16~4.25 mg/g,水仙苷的含量范围为 7.86~14.18 mg/g。现代药理研究证明布渣叶水提物具有解热退黄、镇痛及促消化等作用^[10-12]。

植物多糖的提取方法主要有:热水浸提法^[13]、微波提取法^[14]、酶解法^[15]、超声波辅助提取法^[16]等。超声辅助热水提取法是目前使用最为广泛的提取方法,该法具有使用性广泛、提取时间短、运行简单易操作、成本低等优点^[17]。张双奇等^[18]采用超声辅助热水法提取天麻多糖,天麻多糖的含量可达 32.83 mg/g,远高于采用回流醇沉法提取的 25.04 mg/g^[19]。金蓉等^[20]研究发现超声辅助提取法显著提高了铁皮石斛水溶性多糖得率,并使提取时间从 2 h 缩短至 3 min,同时超声辅助热水提取(95~100 ℃)可进一步提高多糖提取率。Chen 等^[21]采用超声波辅助提取法提取山楂多糖其多糖得率 $7.47\% \pm 0.05\%$,明显高于同时采用沸水抽提法提取得到的山楂多糖得率 $5.88\% \pm 0.19\%$ 。

目前,布渣叶化学成分研究主要集中在黄酮类和生物碱类,关于布渣叶中多糖成分的研究还未见报道。布渣叶作为多种凉茶类保健食品的主要原料,其主要功能性质是否与其多糖成分有关需要进一步探究。因此,本文对布渣叶中多糖成分进行提取,采用超声辅助热水法优化布渣叶多糖的提取工艺,同时对布渣叶多糖的生物活性展开研究,探讨了布渣叶多糖

的抗氧化、胰脂肪酶抑制活性、抗菌活性,为布渣叶多糖在食品、药品等领域进一步的开发和应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干燥布渣叶 广州南北行中药饮片有限公司; 95% 乙醇、浓硫酸 西陇科学股份有限公司; 苯酚、葡萄糖、维生素 C(V_C)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、过硫酸钾、水杨酸、硫酸亚铁、过氧化氢、三羟甲基氨基甲烷、无水氯化钙、对硝基苯基丁酸酯(p-NPB)、二甲基亚砜、辛伐他汀、胰脂肪酶粉、葡萄糖标准品、5% 苯酚溶液 上海麦克林生化科技有限公司; 蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉、氯化钠 杭州滨和微生物试剂有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) 均来源于佛山市中医院检验科。

060ST 超声波清洗机 深圳市华策科技有限公司; JJ224BC 电子天平 常熟市双杰测试仪器; CSH-ZY-00174 多功能酶标仪 广州步前生物科技有限公司; RE-2000A 旋转蒸发仪 郑州特尔仪器设备厂家; BBS-SDC 双人单面垂直净化工作台 广州沃霖实验室设备有限公司; BKQ-B10011 高压蒸汽灭菌锅 厦门致微仪器有限公司; PH-070A 恒温培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 101-3AB 烘箱 常州市荣华干燥设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 布渣叶多糖的提取工艺 称取 10 g 粉碎好的布渣叶,与一定体积的蒸馏水分别依次置于 500 mL 的锥形瓶中,在设定好的超声功率、超声温度、料液比和超声时间下提取布渣叶多糖,提取完成后立即进行减压抽滤,滤液室温冷却,在 10000 r/min 条件下离心 1 min,采用 Sevag 法除去蛋白质,将除去蛋白质后的布渣叶提取液在 4 ℃ 条件下用 95% 的乙醇进行醇沉,最后冷冻干燥得布渣叶多糖。

1.2.2 单因素实验 按照 1.2.1 的方法,固定料液比为 1:30(g/mL),超声时间为 25 min,超声温度为

65 ℃, 设置不同的超声功率(135、180、225、270、和 315 W), 考察对多糖得率的影响; 固定料液比为 1:30(g/mL), 超声时间为 25 min, 超声功率为 315 W, 设置不同的超声温度(35、55、65、70 和 80 ℃), 考察对多糖得率的影响; 固定超声温度为 65 ℃, 超声功率为 315 W, 超声时间为 25 min, 选择不同的料液比(1:10、1:20、1:30、1:40 和 1:50 g/mL), 考察对多糖得率的影响; 固定料液比为 1:30(g/mL), 超声温度为 65 ℃, 超声功率为 315 W, 设置不同的超声时间(5、15、25、35 和 45 min), 考察对多糖得率的影响^[22-23]。

1.2.3 正交试验优化 以单因素实验结果为依据, 选取具有显著影响的四个因素为自变量, 布渣叶多糖得率为因变量, 设计四因素三水平正交试验, 如表 1 所示。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experimental factor levels

水平	因素			
	A 超声功率 (W)	B 超声温度 (℃)	C 料液比 (g/mL)	D 超声时间 (min)
1	225	55	1:20	25
2	270	65	1:30	35
3	315	70	1:40	45

1.2.4 布渣叶多糖的测定

1.2.4.1 多糖标准曲线的绘制 采用本实验室相同的标曲测定方法^[24]。具体方法如下: 称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 10 mg 定容至 100 mL 的容量瓶中, 配成 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别精密移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 上述配制好的溶液于试管中, 补加蒸馏水至 1 mL, 依次加入 5% 苯酚 1 mL, 98% 浓硫酸 5 mL, 摇匀, 于 37 ℃ 水浴静置 30 min, 在 488 nm 测定吸光度, 可得回归曲线方程为 $Y=0.0094X+0.0928$, $R^2=0.993$ 。式中 Y 为吸光度, X 为葡萄糖溶液浓度(mg/mL)。

1.2.4.2 布渣叶多糖的含量测定 采用苯酚-硫酸法^[25]进行布渣叶多糖含量测定。用移液枪吸取布渣叶多糖溶液 200 μ L 放置于西林瓶, 加入 5% 苯酚溶液 200 μ L, 摇匀后快速加入 98% 浓硫酸 1 mL, 摇匀, 静置 5 min, 在 37 ℃ 的水浴上加热 30 min, 室温冷却, 在 488 nm 波长下测定吸光度。根据公式(1)计算布渣叶多糖得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{c \times V \times n}{m} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: c 为多糖提取液质量浓度(g/mL); V 为多糖提取液总体积(mL); n 为稀释倍数; m 为布渣叶取样量(g)。

1.2.5 布渣叶多糖体外抗氧化活性研究

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率测定 取不同浓度(1.000000、0.500000、0.250000、0.125000、0.062500、

0.031250、0.015625 mg/mL) 的布渣叶多糖溶液以及 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液加入到 96 孔板中, 作为实验组, 轻轻摇匀, 室温避光反应 30 min, 在 517 nm 下测定吸光值; V_C 作为阳性对照^[26]; 无水乙醇代替 DPPH 溶液作为阴性对照组; 空白对照组为 DPPH 溶液加无水乙醇; 根据公式(2)可以计算布渣叶多糖和 V_C 对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: A_1 为样品溶液加 DPPH 所测得的吸光值; A_2 为样品溶液加无水乙醇所测得的吸光值; A_0 为只加无水乙醇和 DPPH 所测得的吸光度值。

1.2.5.2 ABTS⁺ 自由基清除试验 将 50 μ L 不同浓度(1.000000、0.500000、0.250000、0.125000、0.062500、0.031250、0.015625 mg/mL) 的布渣叶多糖供试液、4.95 mmol/L $K_2S_2O_8$ 和 7 mmol/L ABTS 混合液 150 μ L 置于 96 孔板中, 作为实验组, 轻轻摇匀, 室温避光反应 30 min, 在 734 nm 下测定吸光值; V_C 作为阳性对照^[27]; 阴性对照组用无水乙醇代替 $K_2S_2O_8$ 和 ABTS 混合液; 空白对照组为 $K_2S_2O_8$ 和 ABTS 混合液 150 μ L 与 50 μ L 的无水乙醇; 根据公式(3)可以计算布渣叶多糖和 V_C 对 ABTS⁺ 自由基的清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: B_1 为样品溶液加 $K_2S_2O_8$ 和 ABTS 混合液所测得的吸光值; B_2 为样品溶液加无水乙醇所测得的吸光值; B_0 为只加无水乙醇、 $K_2S_2O_8$ 和 ABTS 混合液所测得的吸光度值。

1.2.5.3 OH 自由基清除试验 将不同浓度(1.000000、0.500000、0.250000、0.125000、0.062500、0.031250、0.015625 mg/mL) 布渣叶多糖溶液、水杨酸醇溶液(9 mmol/L)、 $FeSO_4$ 溶液(9 mmol/L)、 H_2O_2 溶液(8.8 mmol/L)各 50 μ L 加入到 96 孔板中, 作为实验组, 轻轻摇匀, 在阴凉处避光放置反应 30 min, 在 510 nm 下测定吸光值; V_C 作为阳性对照^[28]; 阴性对照组用无水乙醇代替水杨酸醇溶液; 空白对照组为 $FeSO_4$ 、无水乙醇、水杨酸醇溶液以及 H_2O_2 ; 根据公式(4)可以计算布渣叶多糖和 V_C 对 OH 自由基的清除率。

$$\text{OH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{C_1 - C_2}{C_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: C_1 为样品溶液加入 $FeSO_4$ 溶液、水杨酸醇溶液、 H_2O_2 所测得的吸光度; C_2 为样品溶液加入 $FeSO_4$ 溶液、 H_2O_2 、无水乙醇混合后测得的吸光度; C_0 为除不加入样品溶液, 另外四种溶液均加入所得的吸光度。

1.2.6 布渣叶脂肪酶抑制实验研究 本实验使用对

硝基苯基丁酸脂作为底物溶液,参照文献[29]并稍做调整。按表2进行反应;将20 μL不同浓度(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)的布渣叶多糖供试液、Tris-HCl缓冲液和胰脂肪酶储备液置于96孔板中,于37℃恒温箱中预热15 min,随后将0.01 mol/L底物溶液点入孔板中,再放回恒温箱中反应15 min,用酶标仪测其吸光度,波长为405 nm。根据公式(5)可以计算各样品对胰脂肪酶的抑制率。

$$\text{酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{B-b}{A-a}\right) \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中:A为对照实验组的吸光度;a为对照空白组的吸光度;B为样品实验组的吸光度;b为样品空白组的吸光度。

表2 胰脂肪酶活性测定反应体系

Table 2 Reaction system for determination of pancreatic lipase activity

组别	Tris-HCl(μL)	布渣叶多糖(μL)	酶(μL)	p-NPB(μL)
B	40	20	60	80
b	100	20	0	80
A	40	20(DMSO)	60	80
a	100	20(DMSO)	0	80

1.2.7 布渣叶多糖抑菌活性的测定 采用微量肉汤稀释法[30]测定布渣叶多糖对供试菌的最小抑菌浓度(MIC)。将*E. coli*、*K. pneumoniae*、*S. aureus*、*P. aeruginosa*、*A. baumannii*在牛肉膏蛋白胨培养基接种后,于37℃恒温培养箱中培养24 h,制备 1.5×10^5 cfu/mL的菌悬液和200 mg/mL布渣叶多糖溶液,在96孔板中进行样品接种。1~11每孔均加入100 μL的营养肉汤,第12孔加入200 μL的营养肉汤;第1孔加入200 mg/mL布渣叶多糖溶液100 μL倍比稀释至第10孔;1~11孔均加入菌悬液100 μL;37℃条件下孵育16 h~18 h。在酶标仪600 nm处测吸光度,并确定MIC。

1.3 数据处理

实验结果均为三次平行实验,数据表示为Mean(平均值)±SD(标准差)。并采用Microsoft Office Excel 2019、Graph Pad Prism 8软件进行实验数据的处理、分析及绘图。并采用SPSS 23.0进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声功率对布渣叶多糖得率的影响 由图1可知,超声功率在135~270 W范围内多糖得率随功率的升高而增大,到270 W时达到最大值为 $2.29\% \pm 0.14\%$,之后得率逐渐降低。这与姚欣等[24]研究发现鸡蛋花多糖得率随超声功率的变化趋势相同。可能是由于超声波功率增大同时,其空化效应也会相应加强,细胞因内压加大而易于破裂,有利于多糖溶出[31]。当超声波功率超过270 W时,多糖的溶出处于饱和

状态,持续加大超声波功率会使多糖结构受损,故多糖得率降低。因此超声功率选择最佳条件中的225、270、315 W三个参数进行正交试验。

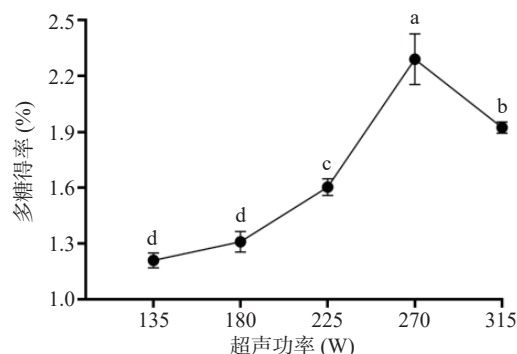


图1 超声功率对布渣叶多糖得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on the yield of *Microcos* polysaccharide

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);图2~图4同。

2.1.2 超声温度对布渣叶多糖得率的影响 由图2所示,超声温度在35~65℃范围内多糖得率随温度的升高而增大,在65℃时达到了最大值为 $1.94\% \pm 0.01\%$,其原因可能是提高温度可以使分子运动加强,溶剂对植物组织细胞的渗透能力也不断增强,有效成分更容易析出,故布渣叶多糖得率增大[32]。当超声温度超过65℃时,其多糖得率逐渐降低,这可能是温度过高破坏多糖的结构引起多糖的降解。因此,选择55、65、75℃进行正交试验。

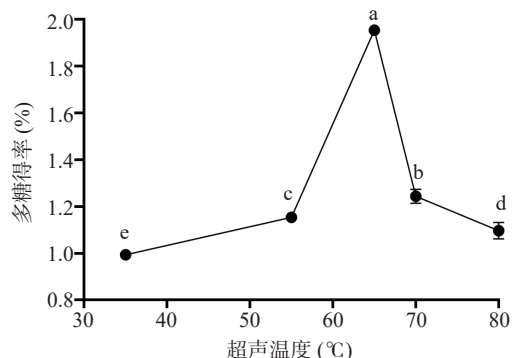


图2 超声温度对布渣叶多糖得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic temperature on the yield of *Microcos* polysaccharide

2.1.3 料液比对布渣叶多糖得率的影响 由图3所示,随着料液比的增大,多糖得率也相应提高,当比例达到1:30(g/mL)时,达到最大值为 $1.89\% \pm 0.10\%$,其原因可能是,布渣叶多糖与溶液的接触面积随着提取液量的增加而扩大,有利于溶质多糖的溶出[33]。当继续增大料液比时其多糖得率下降,这可能是此时的溶液中多糖浓度与布渣叶细胞组织中的多糖浓度相当,细胞组织内外的多糖浓度差消失,此时多糖的溶出趋于平衡,多糖的提取量几乎保持不变。因此选择1:20、1:30、1:40(g/mL)进行正交试验。

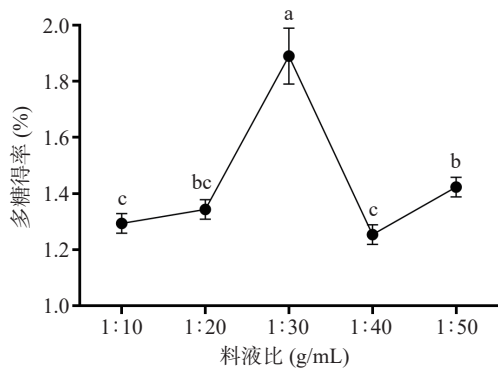


图 3 料液比对布渣叶多糖得率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the yield of *Microcos* polysaccharide

2.1.4 超声时间对布渣叶多糖得率的影响 如图 4 所示,在 5~35 min 内,多糖得率随时间的延长而增加,当超声时间增加到 35 min 时,达到了最大值 $2.44\%\pm0.04\%$ 。其原因可能是随着超声时间的延长,超声波的空化作用增强,细胞壁损伤增加,从而加快多糖从细胞壁中扩散^[34]。继续增加超声时间,多糖得率有所下降,主要原因可能是可溶性多糖长时间暴露在高浓度的溶液中,其多糖的化学结构和生物活性会被破坏。因此,选择 25、35、45 min 进行正交试验。

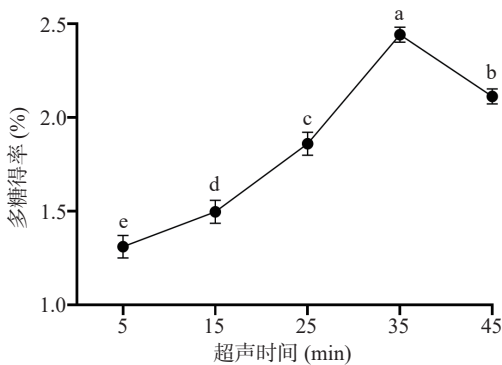


图 4 超声时间对布渣叶多糖得率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic time on the yield of *Microcos* polysaccharide

2.2 正交试验结果

在超声功率、超声温度、料液比、超声时间的单因素实验基础上,设计以布渣叶多糖得率为指标的正交试验,可得到最佳的提取工艺参数。

表 3 中的 R 值可知影响布渣叶多糖得率的因素顺序为 D(超声时间)>A(超声功率)>B(超声温度)>C(料液比),又由 k 值可知其最佳的提取工艺为 $A_1B_2C_1D_2$,即超声功率为 225 W,超声温度为 65 ℃,料液比为 1:20(g/mL),超声时间为 35 min。表 4 的方差分析结果表明各因素不同水平间均具有显著性差异,即超声功率,超声温度,料液比,超声时间均为影响布渣叶多糖得率的关键性因素。

2.3 验证实验

由于该组合未出现在实验中,为了评价最佳提

表 3 正交试验结果分析

Table 3 Analysis of orthogonal experiment results

实验号	A超声功率	B超声温度	C料液比	D超声时间	多糖得率(%)
1	1	1	1	1	2.77±0.24
2	1	2	2	2	3.28±0.15
3	1	3	3	3	2.01±0.05
4	2	1	2	3	1.66±0.21
5	2	2	3	1	2.53±0.13
6	2	3	1	2	2.97±0.19
7	3	1	3	2	2.65±0.04
8	3	2	1	3	1.88±0.12
9	3	3	2	1	1.44±0.24
K1	8.06	7.12	7.62	6.45	
K2	7.26	7.69	6.38	8.90	
K3	5.97	6.42	7.19	5.55	
k1	2.69	2.37	2.54	2.15	
k2	2.42	2.56	2.15	2.97	
k3	1.99	2.14	2.40	1.85	
R	0.70	0.42	0.39	1.12	
因素主次	D>A>B>C				
最佳工艺	$A_1B_2C_1D_2$				

表 4 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance table

方差来源	III类平方和	自由度	均方	F	P
A超声功率	2.198	2	1.099	39.050	*
B超声温度	0.807	2	0.403	14.334	*
C料液比	0.793	2	0.396	14.086	*
D超声时间	5.768	2	2.884	102.473	*
误差	0.507	18	0.028		
总计	159.745	27			
修正后总计	10.072	26			
$R^2=0.950$ (调整后 $R^2=0.927$)					

注: *表示差异性显著, $P<0.05$ 。

取工艺的稳定性,按照前文的提取方法重复进行三次实验,布渣叶多糖的得率分别为 3.92%、3.47%、3.88%,平均得率为 $3.76\%\pm0.25\%$,其大于表 4 最佳值($3.28\%\pm0.15\%$),相对偏差(RSD)值为 6.6%,该提取工艺适用于布渣叶多糖的提取。王敏等^[35]采用与本实验相同的方法提取蒙药漏芦花多糖并优化提取工艺参数,最佳提取工艺条件下漏芦花多糖得率为 1.13%,布渣叶多糖的得率相对较高。

2.4 布渣叶多糖体外抗氧化活性测定

2.4.1 布渣叶多糖对 DPPH 自由基的清除作用 根据图 5 可知,布渣叶多糖对 DPPH 自由基清除率和质量浓度呈一定的量效关系,在 0.016~0.250 mg/mL 范围内随着质量浓度的增加清除作用显著($P<0.05$)增强,质量浓度大于 0.250 mg/mL 后,清除作用呈现缓慢增强趋势。当质量浓度达到试验设置最大浓度 1 mg/mL 时,布渣叶多糖的清除率可达 $94.53\%\pm1.34\%$ 。布渣叶多糖对 DPPH 自由基半数清除浓度为 0.1430 mg/mL。在 0.500~1.000 mg/mL 范围内布渣叶多糖对 DPPH 自由基的清除率与 V_C 接近,布渣叶多糖与文献^[36]报道的猴头菇多糖对 DPPH 自由

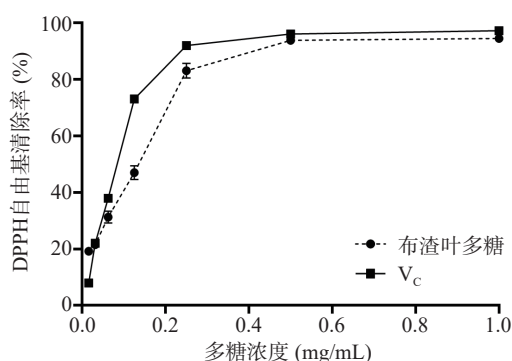
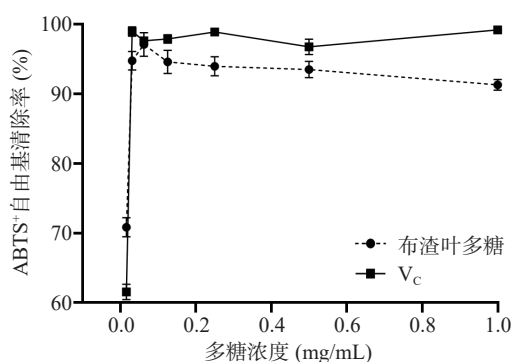


图5 布渣叶多糖对DPPH自由基清除率的影响

Fig.5 Effect of *Microcos* polysaccharide on DPPH free radical scavenging rated

基的清除效果相当。

2.4.2 布渣叶多糖对 ABTS⁺ 自由基的清除作用 据图6可知,布渣叶多糖在0.016~0.063 mg/mL范围内随着质量浓度的增加对ABTS⁺自由基的清除作用呈现急剧增强趋势。当浓度高于0.031 mg/mL时清除率均大于90%,当浓度为0.063 mg/mL时出现最大清除率97.13%±1.70%。布渣叶多糖和V_c对ABTS⁺自由基的半数清除浓度均为0.016 mg/mL,说明布渣叶多糖对ABTS⁺自由基具有较强的清除作用,与Gu等^[37]报道的欧洲慈姑多糖清除效果相近。

图6 布渣叶多糖对ABTS⁺自由基清除率的影响Fig.6 Effect of *Microcos* polysaccharide on ABTS⁺ free radical scavenging rate

2.4.3 布渣叶多糖对 OH 自由基的清除作用 根据图7可知,在设置的实验浓度范围内,当布渣叶多糖

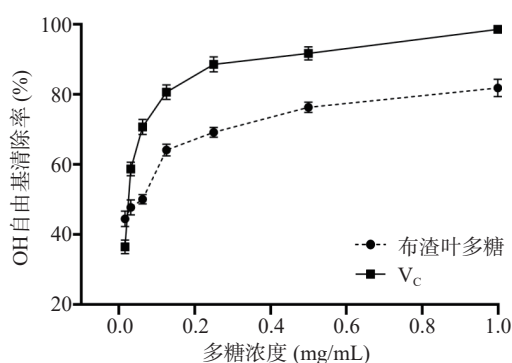


图7 布渣叶多糖对OH自由基清除率的影响

Fig.7 Effect of *Microcos* polysaccharide on OH free radical scavenging rated

浓度大于0.125 mg/mL时,布渣叶多糖对OH自由基的清除作用呈浓度依赖型,随着浓度的升高清除率逐渐增强。在质量浓度达到1 mg/mL时,布渣叶多糖的清除率为81.93%±2.47%,布渣叶多糖对OH自由基的半数清除浓度为0.145 mg/mL。实验结果表明布渣叶多糖具有一定的OH自由基清除能力,但清除效果弱于V_c。上述可知,布渣叶多糖对DPPH、ABTS、OH自由基均具有清除效果,其与文献[38]报道的甘草多糖具有相似的抗氧化能力。

2.5 布渣叶多糖对胰脂肪酶的抑制活性

为考察布渣叶多糖是否具有体外的降脂活性,本文对布渣叶多糖抑制胰脂肪酶活性进行了测试。根据图8可知,布渣叶多糖与辛伐他汀的胰脂肪酶抑制曲线在0~1 mg/mL时趋势大致相同。当多糖浓度为1 mg/mL时,布渣叶多糖抑制率为33.98%±2.31%,高于文献[39]报道的裙带菜多糖^[39]在同一质量浓度下的胰脂肪酶抑制率31.9%。当浓度大于1 mg/mL后,布渣叶多糖抑制活性并没有随浓度增加而增加,而是基本保持平稳。布渣叶多糖在质量浓度达到试验设置最大浓度时5 mg/mL,抑制率为36.22%±1.76%。实验结果表明布渣叶多糖具有一定的胰脂肪酶抑制活性,但抑制能力较辛伐他汀弱。

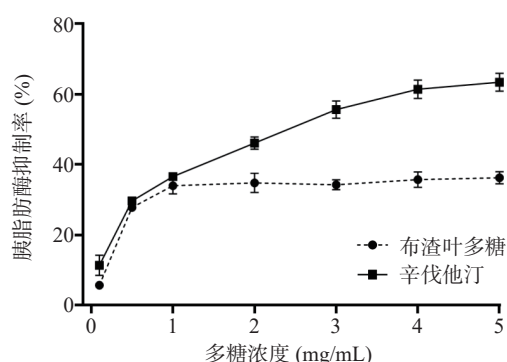


图8 布渣叶多糖与辛伐他汀对胰脂肪酶抑制率

Fig.8 Inhibition rate of polysaccharides and simvastatin on pancreatic lipase

2.6 布渣叶多糖体外抗菌活性评价

如表5所示,布渣叶多糖对铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的MIC分别为50和200 mg/mL,对大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的MIC均为100 mg/mL,对金黄色葡萄球菌的MIC大于200 mg/mL。结果表明布渣叶多糖对铜绿假单胞菌抑制效果最好,对金黄

表5 布渣叶多糖对各供试菌的MIC比较

Table 5 Comparison of MIC of polysaccharides to various strains

菌种	MIC(mg/mL)
<i>E. coli</i>	100
<i>P. aeruginosa</i>	50
<i>S. aureus</i>	>200
<i>K. pneumoniae</i>	100
<i>A. baumannii</i>	200

色葡萄球菌不敏感。陈远菲等^[40]通过体外抑菌实验结果发现,甘蔗叶多糖浓度为 0.14 mg/mL 时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈直径分别是 9.27 和 12.41 mm,甘蔗叶多糖对金黄色葡萄球菌的抑制效果优于大肠杆菌。Nguyen 等^[41]采用微量肉汤稀释法测定台湾银线兰多糖提取物的抗菌能力, MIC 结果显示台湾银线兰多糖提取物对金黄色葡萄球菌 (MIC=2.5 mg/mL)、大肠杆菌 (MIC=2.5 mg/mL)、和铜绿假单胞菌 (MIC=1.25 mg/mL) 均具有抑制作用,对铜绿假单胞菌抑制效果最好。

3 结论

本文采用超声辅助热水法提取布渣叶多糖,在单因素实验基础上结合正交试验对提取工艺参数进行优化,得出布渣叶多糖最佳提取工艺条件,该工艺提取参数可靠,重现性好,适合布渣叶多糖的提取。通过对布渣叶多糖进行 3 种自由基清除实验评价布渣叶多糖的抗氧化能力,在 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除实验中,布渣叶多糖的自由基清除率与 V_C 相近,OH 自由基的清除率低于阳性药,但仍旧有较强的清除效果。三种抗氧化实验结果均表明,布渣叶多糖具有较强的抗氧化功效,是理想的天然抗氧化剂原料,可进一步用于食品、药品的开发。在胰脂肪酶抑制实验中,在浓度为 0~1 mg/mL 范围内,布渣叶多糖与辛伐他汀的胰脂肪酶抑制率曲线趋势大致相同,说明布渣叶多糖有一定的脂肪酶抑制能力,但抑制能力稍弱。布渣叶多糖对大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌具有一定的抑菌效果,其中对铜绿假单胞菌的抑制作用最强,对金黄色葡萄球菌不敏感。

本次实验研究主要集中在布渣叶多糖提取工艺、体外活性评价方面,为布渣叶多糖在食品、药品等领域的开发和应用提供了科学依据。此后还需要对布渣叶多糖进行分离纯化和结构鉴定,同时布渣叶多糖的抗氧化、胰脂肪酶抑制及抗菌活性的作用机制还有待进一步探究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 95. [National Pharmacopoeia Commission, Chinese Pharmacopoeia[M]. Part1. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 95.]
- [2] 严翠, 庞晓妍, 范卫锋, 等. 基于网络药理学和分子对接探究布渣叶改善消化不良的作用机制[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(6): 1335-1343. [YAN C, PANG X Y, FAN W F, et al. Mechanism of leaves of *Microcos paniculata* improving of dyspepsia based on network pharmacology and molecular docking[J]. Drugs & Clinic, 2023, 38(6): 1335-1343.]
- [3] 杨琳. 仙草爽凉茶的研制[J]. 饮料工业, 1999(6): 29-32. [YANG L. The production of cool tea from immortal grass[J]. Beverage Industry, 1999(6): 29-32.]
- [4] WANG J, ZHOU B, HU X, et al. Deciphering the formulation secret underlying Chinese Huo-clearing herbal drink[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 654699.
- [5] BAI Y, JIA Q, SU W, et al. Integration of molecular network-

ing and fingerprint analysis for studying constituents in *Microctis Folium*[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e235533.

[6] ZHANG G, ZHANG N, XU L, et al. A new piperidine alkaloid from the leaves of *Microcos paniculata* L[J]. *Natural Product Research*, 2017, 31(2): 169-174.

[7] 孙冬梅, 汪梦霞. 布渣叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 世界中医药, 2015, 10(1): 143-147. [SUN D M, WANG M X, Advances on chemical constituents and pharmacological effects of *Microcos paniculata*[J]. *World Chinese Medicine*, 2015, 10(1): 143-147.]

[8] 肖观林, 江洁怡, 李素梅, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的布渣叶化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 138-148. [XIAO G L, JIANG J Y, LI S M, et al. Analysis of chemical constituents in *Microctis Folium* by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(3): 138-148.]

[9] 李振雨, 何民友, 刘晓霞, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和多成分定量的布渣叶饮片和标准汤剂量值传递研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(9): 1505-1517. [LI Z Y, HE M Y, LIU X X, et al. Study on the quantity value transfer of microctis folium decoction pieces and standard decoction based on UPLC fingerprint and multi-component quantification[J]. *Natural Product Research and Development*, 2023, 35(9): 1505-1517.]

[10] 曾聪彦, 钟希文, 高玉桥, 等. 布渣叶水提物对小鼠及大鼠胃肠功能的影响[J]. 今日药学, 2009, 19(8): 11-12. [ZENG C Y, ZHONG X W, GAO Y Q, et al. Effects of water extracted on *Microcos paniculata* on gastrointestinal function in mice and rats[J]. *Pharmacy Today*, 2009, 19(8): 11-12.]

[11] 曾聪彦, 梅全喜, 高玉桥, 等. 布渣叶水提物解热退黄作用的实验研究[J]. 中国药房, 2010, 21(11): 973-974. [ZENG C Y, MEI Q X, GAO Y Q, et al. Experimental study of antipyretic and jaundice-relieving effect of water extract of *Microcos paniculata*[J]. *China Pharmacy*, 2010, 21(11): 973-974.]

[12] 曾聪彦, 梅全喜, 高玉桥, 等. 布渣叶水提物镇痛药效学的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1757-1758. [ZENG C Y, MEI Q X, GAO Y Q, et al. Experimental study on the pharmacodynamics in analgesic of water-extract of *Microcos paniculata*[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 27(8): 1757-1758.]

[13] CHENG Y, XUE F, YANG Y. Hot water extraction of antioxidants from tea leaves-optimization of brewing conditions for preparing antioxidant-rich tea drinks[J]. *Molecules*, 2023, 28(7): 3030.

[14] BAGADE S, PATIL M. Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: A Review[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2021, 51(2): 138-149.

[15] REN Z, LIU W, SONG X, et al. Antioxidant and anti-inflammation of enzymatic-hydrolysis residue polysaccharides by *Lentinula edodes*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120(Pt A): 811-822.

[16] WANG Y, XIONG X, HUANG G. Ultrasound-assisted extraction and analysis of maidenhairtree polysaccharides[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 95: 106395.

[17] CHEN Y, ZHANG J, LI Q, et al. Response surface methodology for optimizing the ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Acanthopanax giraldii*[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 66(8): 785-793.

[18] 张双奇, 刘琳, 何念武, 等. 超声辅助提取陕产天麻多糖的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国农学通报, 2021, 37(9): 131-136. [ZHANG S Q, LIU L, HE N W, et al. *Gastrodia elata*

- polysaccharide from Shanxi by ultrasound-assisted hot water extraction process optimization and antioxidant activity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(9): 131–136.]
- [19] 黄先敏, 凌敏, 杨正贤, 等. 不同产地天麻多糖含量测定分析[J]. *现代农业科技*, 2017(6): 259–263. [HUANG X M, LING M, YANG Z X, et al. Determination and analysis of polysaccharide content of *Gastrodia elata* from different producing areas[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017(6): 259–263.]
- [20] 金蓉, 谢文华, 陈杰标, 等. 超声辅助热水提取对铁皮石斛水溶性多糖得率和结构的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2019, 45(2): 196–204. [JIN R, XIE W H, CHEN J B, et al. Effects of ultrasonic-assisted hot water extraction on the yield and structure of water soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2019, 45(2): 196–204.]
- [21] CHEN X, ZHANG H, DU W, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Crataegus pinnatifida* Bunge[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 1011–1019.
- [22] 孙宁云, 姚欣, 张英慧, 等. 鸡蛋花多糖提取工艺优化及生物活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(3): 180–187. [SUN N Y, YAO X, ZHANG Y H, et al. [Optimization of extraction process of polysaccharides from *Plumeria rubra* L. cv. *Acutifolia* and evaluation of biological activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(3): 180–187.]
- [23] 钱燕芳, 石晨莹, 陈贵堂. 桑葚多糖超声提取、脱色工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(16): 201–210. [QIAN Y F, SHI C Y, CHEN G T. Optimization of ultrasound-assisted extraction and decolorization process of polysaccharides from *Mori fructus* and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(16): 201–210.]
- [24] 姚欣, 孙宁云, 陈鑫, 等. 山竹壳多糖提取工艺优化及其生物活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(15): 101–108. [YAO X, SUN N Y, CHEN X, et al. Optimization of the extraction of mangosteen (*Garcinia mangostana*) pericarp polysaccharides and determination of their biological activities[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(15): 101–108.]
- [25] 宋英, 周小初, 宋崎, 等. 党参中多糖的含量测定方法研究[J]. *中国药业*, 2008, 17(23): 9–10. [SONG Y, ZHOU X C, SONG Q, et al. Study on content determination of polysaccharidein from *Radix Codonopsis*[J]. *China Pharmaceuticals*, 2008, 17(23): 9–10.]
- [26] SHEN S G, JIA S R, WU Y K, et al. Effect of culture conditions on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Nostoc flagelliforme*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 198: 426–433.
- [27] TANG Q, HUANG G. Preparation and antioxidant activities of cuaurbit polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 362–365.
- [28] 王迦琦, 许梦然, 高婧文, 等. 北虫草多糖提取工艺优化及其细胞氧化损伤保护作用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 141–147. [WANG J Q, XU M R, GAO J W, et al. Optimization of extraction process of *Cordyceps militaris* polysaccharide and its protective effect on cellular oxidative damage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(13): 141–147.]
- [29] 裴文清, 吕沪楠, 王靖宇, 等. 木瓜皮多酚和黄酮提取工艺优化及酪氨酸酶与胰脂肪酶抑制活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1): 188–195. [PEI W Q, LÜ L N, WANG J Y, et al. Optimization of extraction of polyphenols and flavonoids from *Papaya* peel and its anti-tyrosinase and anti-pancreatic lipase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(1): 188–195.]
- [30] 曲词, 任丹丹, 任先见, 等. 海黍子多酚提取工艺的优化及抑菌活性研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(11): 169–172. [QU C, REN D D, REN X J, et al. Study on extraction process of polyphenols from *Sargassum kjellmanianum* and anti-microbial activities[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(11): 169–172.]
- [31] 常庆, 吴少雄, 王琦, 等. 超声波辅助提取、纯化滇橄榄多糖的工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(6): 1755–1763. [CHANG Q, WU S X, WANG Q, et al. Study on process of ultrasonic assisted extraction and purification of polysaccharides from *Phyllanthus emblica* Linn.[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(6): 1755–1763.]
- [32] 李晨伟, 李国强, 范丽霞, 等. 木棉花多糖提取工艺优化[J]. *湖南农业科学*, 2023(3): 77–80. [LI C W, LI G Q, FAN L X, et al. Extraction process optimization of *Bombax ceiba* polysaccharides[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2023(3): 77–80.]
- [33] 徐瑾钰, 彭小伟, 阚欢, 等. 滇皂角米多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(14): 112–118. [XU J Y, PENG X W, KAN H, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharide from the seed of *Gleditsia japonica*[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(14): 112–118.]
- [34] 苗晶国, 董嘉木, 刘树民, 等. 黑皮鸡枞菌多糖超声辅助提取条件优化及抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(12): 109–116. [MIAO J N, DONG J M, LIU S M, et al. Ultrasonic-assisted extraction condition optimization and antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella raphanipes*[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(12): 109–116.]
- [35] 王敏, 于株燕, 钮松召, 等. 蒙药漏芦花多糖提取工艺及其抗氧化抗菌活性研究[J]. *化学研究与应用*, 2019, 31(3): 464–469. [WANG M, YU S Y, NIU S Z, et al. Study on optimization of extraction technology, antioxidant and antibacterial activity of polysaccharide from Mongolian medicine *Rhaponticum uniflorum* [J]. *Chemical Research and Application*, 2019, 31(3): 464–469.]
- [36] TU J Q, LIU H P, WEN Y H, et al. A novel polysaccharide from *Hericium erinaceus*: Preparation, structural characteristics, thermal stabilities, and antioxidant activities in vitro[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(9): e13871.
- [37] GU J, ZHANG H, WEN C, et al. Purification, characterization, antioxidant and immunological activity of polysaccharide from *Sagittaria sagittifolia* L[J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109345.
- [38] ZHOU H, DAI C, CUI X, et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of *Glycyrrhiza uralensis* polysaccharide in Lohmann Brown chickens[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 959449.
- [39] 唐茹萌, 焦文雅, 桑亚新, 等. 裙带菜多糖体外和体内降血脂活性[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 142–149. [TANG R M, JIAO W Y, SANG Y X, et al. In vitro and in vivo hypolipidemic effect of *Undaria pinnatifida* polysaccharide[J]. *Food Science*, 2022, 43(1): 142–149.]
- [40] 陈远菲, 严德林, 莫雪婷, 等. 甘蔗叶多糖提取工艺优化及生物活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(19): 155–165. [CHEN Y F, YAN D L, MO X T, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from sugarcane leaves and characterization of biological activities[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(19): 155–165.]
- [41] NGUYEN T P, PHAN H N, DO T D, et al. Polysaccharide and ethanol extracts of *Anoectochilus formosanus* Hayata: Antioxidant, wound-healing, antibacterial, and cytotoxic activities[J]. *Heliyon*, 2023, 9(3): e13559.