

王国霞, 牛祎琳, 牛富婷, 等. 不同提取方法对密银花多糖理化性质及抗氧化活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(24): 196–203. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010248

WANG Guoxia, NIU Yilin, NIU Futing, et al. Effects of Different Extraction Methods on Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Lonicerae japonicae* Flos[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(24): 196–203. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010248

· 工艺技术 ·

不同提取方法对密银花多糖理化性质 及抗氧化活性的影响

王国霞*, 牛祎琳, 牛富婷, 程莹莹
(郑州师范学院生命科学学院, 河南郑州 450044)

摘要: 本文以密银花为原料, 比较热水浸提法 (Hot Water Extraction, HWE)、酶解法 (Enzyme Extraction, EE)、超声波辅助法 (Ultrasonic-assisted Extraction, UE) 和超声波辅助酶法 (Ultrasonic- Enzyme Extraction, UEE) 对密银花多糖理化性质及抗氧化活性的影响。结果表明: 四种方法提取的密银花多糖得率从高到低依次为 UE-LJP (7.74%)、EE-LJP (4.35%)、UEE-LJP (3.38%)、HWE-LJP (2.13%)。不同提取方法所得的密银花多糖中均含有糖醛酸, 密银花多糖是一种酸性多糖。超声波辅助提取密银花多糖中蛋白质含量最低 (0.16%)、持水性及水合特性最强; 酶法提取的密银花多糖中总糖含量较高 (38.68%)。抗氧化活性表明, 四种密银花多糖均具有较强的抗氧化活性。其中, HWE-LJP、UE-LJP 和 EE-LJP 具有较强的 DPPH 自由基清除能力, 半抑制浓度分别为 0.067、0.104、0.093 mg/mL, 在羟基自由基方面, UEE-LJP 表现出较强的清除能力, 半抑制浓度为 0.390 mg/mL。因此, 不同提取方法对密银花多糖的理化性质和抗氧化活性具有显著的影响, UE 法和 EE 法可作为提取密银花多糖最适宜的方法, 本文为开发功能性食品和抗氧化等功能药物原料的研发提供参考。

关键词: 密银花, 多糖, 提取方法, 抗氧化, 热水浸提法, 酶解法, 超声波辅助法

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)24-0196-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010248



本文网刊:

Effects of Different Extraction Methods on Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Lonicerae japonicae* Flos

WANG Guoxia*, NIU Yilin, NIU Futing, CHENG Yingying

(School of Life Sciences, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: In this paper, honeysuckle was used as raw material to compare the effects of hot water extraction (HWE), enzyme extraction (EE), ultrasonic-assisted extraction (UE) and ultrasonic-enzyme extraction (UEE) on the physicochemical properties and antioxidant activity of honeysuckle polysaccharides. The results showed that the yield of polysaccharide extracted by the four methods from high to low was UE-LJP (7.74%), EE-LJP (4.35%), UEE-LJP (3.38%) and HWE-LJP (2.13%). The polysaccharides obtained by different extraction methods all contain uronic acid, and the polysaccharide was an acidic polysaccharide. The ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide from *Lonicerae japonicae* Flos had the lowest protein content (0.16%), the strongest water holding capacity and hydration characteristics. The total sugar content of polysaccharide extracted by enzymatic method was higher (38.68%). The antioxidant activity showed that the four polysaccharides had strong antioxidant activity. Among them, HWE-LJP, UE-LJP and EE-LJP had strong DPPH free radical scavenging ability, and the half inhibitory concentration was 0.067, 0.104 and 0.093 mg/mL, respectively. In terms of hydroxyl radicals, UEE-LJP showed strong scavenging ability, and the half inhibitory

收稿日期: 2024-01-23

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (24B550024)。

作者简介/通信作者*: 王国霞 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 功能性食品开发利用, E-mail: wxia191919@163.com。

concentration was 0.390 mg/mL. Therefore, different extraction methods had significant effects on the physical and chemical properties and antioxidant activity of *Lonicerae japonicae* Flos polysaccharides. UE method and EE method could be used as the most suitable methods for extracting *Lonicerae japonicae* Flos polysaccharides. This paper would provide reference for the development of functional food and antioxidant and other functional drug raw materials.

Key words: *Lonicera japonica*; polysaccharide; extraction method; antioxidation; hot water extraction; enzyme extraction; ultrasonic-assisted extraction

金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)为忍冬科忍冬属干燥花蕾或带初开的花^[1],河南密县所产金银花为道地药材,品质最佳,称为“密银花”,药效为全国金银花之首,属于药食同源植物。相关研究表明,密银花含有有机酸、挥发油、黄酮类物质、三萜皂苷类、环烯醚萜苷类、多糖及微量元素等活性成分^[2-3],这些活性成分使得金银花具有抗氧化^[4]、降血糖^[5]和消炎^[6-7]等作用。

金银花多糖(*Lonicera japonica* Thunb. Polysaccharide, LJP)作为一种天然植物多糖,副作用小、结构复杂,多糖生物活性受其结构的影响,多糖化学结构与其提取方式紧密相关。目前常用于密银花多糖的提取方法有热水浸提法、单酶法、复合酶法、超声波提取法、超声波辅助提取、微波辅助提取等。热水浸提法的工作原理是利用多糖溶于水而不溶于有机溶剂,该方法成本低,设备要求简单,但多糖得率较低^[8];酶法提取主要是利用酶的专一性,通过酶解反应使细胞壁破裂释放多糖^[9];超声波辅助提取主要利用空化作用或高机械波破裂细胞壁来提高多糖的得率,该方法作为一种新型提取方法具有效率高,对活性物质危害小等优势^[10]。白冰瑶等^[11]比较不同提取方法对恰玛古多糖生物活性的影响,发现超声波辅助提取的多糖生物活性要高于其他方法。

不同的植物多糖因其自身理化性质的不同,生物活性具有明显差异,最适合的提取方法也具有明显差别。因此,本研究分析比较了不同提取方法(热水浸提法、超声波提取法、复合酶法和超声辅助复合酶法)对密银花多糖含量、化学组成、理化性质(持水性、持油性、溶解度)和抗氧化活性的影响,以期筛选出最佳提取技术和密银花的进一步开发利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

密银花 新密巩密关村金银花专业种植合作社;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 分析纯,购买于东京化成工业株式会社;2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、果胶酶(40 μg/mg)、纤维素酶(3 μg/mg)、考马斯亮蓝 G-250、牛血清蛋白、三氯乙酸 分析纯,购买于北京索莱宝科技有限公司;无水乙醇、苯酚、浓硫酸、磷酸 分析纯,购买于天津市科密欧化学试剂有限公司;葡萄糖标准品 分析纯,购买于天津市凯通化学试剂有限公司;四硼酸钠 分析纯,购买于天津市永大化学试剂有限公司;

间羟联苯 分析纯,购买于上海源叶生物科技有限公司;氢氧化钠 分析纯,购买于天津市富宇精细化工有限公司。

DZF-6055 鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;SB25-12DT 超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司;N-1300S-WB 旋转蒸发仪 东京理化器械株式会社;FW100 粉碎机 上海书培实验设备有限公司;L420-A 台式低速自动平衡离心机 湖南湘仪仪器有限公司;Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度计 安捷伦科技有限公司;JA2003N 电子天平 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 密银花预处理 将新鲜干净的密银花置于 45 ℃ 恒温干燥箱中烘干后粉碎,过 120 目筛,备用。

1.2.2 密银花多糖提取方法

1.2.2.1 热水浸提法(WE) 参考刘宇等^[12]的方法并稍作修改。称取 10.000 g 样品于烧杯中,加入 300 mL 蒸馏水后置于 70 ℃ 水浴锅中浸提 2 h,室温下离心(4000 r/min, 25 min),弃沉淀,用 TCA 法除蛋白,减压浓缩一定体积后加入 4 倍体积的无水乙醇,静置过夜,离心,弃去上清液,保留沉淀,放入恒温干燥箱中烘干至恒重即为密银花粗多糖 WE-LJP。

1.2.2.2 超声波提取法(UE) 参考吕欣等^[13]的方法并稍作修改。称取 10.000 g 样品于烧杯中,加入 500 mL 蒸馏水,置于 50 ℃ 超声波清洗机中处理 1 h,离心,弃沉淀,用 TCA 法除蛋白,溶液减压浓缩后加入 4 倍体积无水乙醇静置过夜,离心(4000 r/min, 25 min),弃去上清液,保留沉淀,置于烘箱中烘干至恒重即为密银花粗多糖 UE-LJP。

1.2.2.3 复合酶法(EE) 称取 10.000 g 样品于烧杯中,加入 300 mL 蒸馏水后置于 70 ℃ 水浴锅中浸提 2 h,加入 2% 果胶酶和纤维素酶,50 ℃ 酶解 1 h,灭酶,离心,弃沉淀,用 TCA 法除蛋白,溶液减压浓缩后加入 4 倍体积无水乙醇静置过夜,离心(4000 r/min, 25 min),弃去上清液,保留沉淀,置于烘箱中烘干至恒重即为密银花粗多糖 EE-LJP。

1.2.2.4 超声辅助复合酶法(UEE) 称取 10.000 g 样品于烧杯中,加入 500 mL 蒸馏水后置于 50 ℃ 超声波清洗机中处理 1 h,加入 2% 果胶酶和纤维素酶,50 ℃ 酶解 1 h,灭酶,离心,弃沉淀,用 TCA 法除蛋白,溶液减压浓缩后加入 4 倍体积无水乙醇静置过夜,离心(4000 r/min, 25 min),弃去上清液,保留沉

淀,置于烘箱中烘干至恒重即为密银花粗多糖 UEE-LJP。

密银花多糖得率 Y 采用以下公式进行计算:

$$Y(\%) = \frac{Y_{\text{多糖}}}{Y_{\text{密银花}}} \times 100$$

式中: $Y_{\text{多糖}}$ 为密银花多糖的质量(g); $Y_{\text{密银花}}$ 为密银花粉末的质量(g)。

1.2.3 多糖化学组成的测定

1.2.3.1 总糖含量测定 密银花多糖中测定总糖含量采用苯酚硫酸法^[14]。将 5% 苯酚溶液 1.0 mL、浓硫酸溶液 5 mL 先后加入到葡萄糖标准溶液溶液中,加入对应的蒸馏水后混合均匀,静置 40 min 后在波长 490 nm 处测定其吸光度值,蒸馏水作为空白对照。以葡萄糖浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y),绘制葡萄糖标准曲线。吸取 1.0 mL 0.1 mg/mL 四个样品溶液于离心管中,按上述操作进行,将其测定的吸光度值代入葡萄糖标准曲线方程 $y=6.7014x+0.2139$, $R^2=0.9933$ 中,即可计算多糖的质量浓度,代入公式即可计算出金银花多糖中的总糖含量。

$$\text{总糖含量}(\%) = \frac{C \times V}{W} \times 100$$

式中: C , 多糖浓度(mg/mL); V , 多糖溶液体积(mL); W , 密银花质量(mg)。

1.2.3.2 蛋白质含量测定 密银花多糖中蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[15]。吸取一定量 0.1 mg/mL 牛血清蛋白标准溶液与蒸馏水混合,加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液,混合均匀,静置 5 min,在波长 595 nm 处测定其吸光度值,蒸馏水作为空白对照。以牛血清蛋白质量浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y),绘制牛血清蛋白标准曲线。吸取 1.0 mL 0.1 mg/mL 四个样品溶液于离心管中,按上述操作进行,将其测定的吸光度值代入牛血清蛋白标准曲线方程 $y=2.2239x+0.2532$, $R^2=0.9916$ 中,即可计算多糖样品中蛋白质含量。

1.2.3.3 糖醛酸含量测定 密银花多糖中糖醛酸含量测定采用间羟联苯法。吸取一定量 0.1 mg/mL 葡萄糖醛酸标准溶液和蒸馏水,冰水浴冷却后加入 3 mL 四硼酸钠-硫酸溶液,沸水浴加热 5 min 后再次冰水浴至室温后,加入 0.05 mL 间羟联苯混合均匀后,在波长 520 nm 处测定其吸光度值,蒸馏水作为空白对照。以葡萄糖醛酸质量浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y),绘制葡萄糖醛酸标准曲线。吸取 1.0 mL 0.1 mg/mL 四个样品溶液于离心管中,按上述操作进行,将其测定的吸光度值代入葡萄糖醛酸标准曲线方程 $y=3.4616x+0.0464$, $R^2=0.9993$ 中,即可计算多糖样品中糖醛酸含量。

1.2.4 多糖理化性质的测定

1.2.4.1 持水性/持油性测定 参考 KTARI 等^[16]的方法并作稍微修改。称取 0.1 g 四个样品于离心管

中,分别加入 10 mL 蒸馏水或植物油,漩涡振荡后静置 1 h,离心(4000 r/min, 10 min),弃去上清液,称取沉淀重量。持水性/持油性按以下公式进行计算。

$$\text{持水性/持油性(g/g)} = \frac{\text{沉淀物的重量} - \text{样品的重量}}{\text{样品的重量}}$$

1.2.4.2 多糖水合特性测定 采用文献^[17]的方法并作稍加修改。称取 0.1 g 四种金银花多糖(M_0)于离心管中,分别加入 10 mL 蒸馏水,振荡均匀后静置 2 h,4000 r/min 离心 20 min,记录沉淀质量 M_1 ,并将上清液倒入已称重的铝盒中烘干至恒重(M_2)。吸水性指数(WAI)、溶解度(S)和膨胀力(SP)分别按以下公式进行计算。

$$\text{吸水性指数(WAI)} = \frac{M_1}{M_0} \times 100$$

$$S(\%) = \frac{M_2}{M_0} \times 100$$

$$SP(g/g) = \frac{M_1}{M_0 \times (100 - S)}$$

1.2.5 多糖体外抗氧化活性测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率测定 参考 ZHAO 等^[18]的方法并作稍微修改。吸取 3 mL 不同质量浓度的四种多糖样品溶液(0.125~2.0 mg/mL)与 3 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液置于离心管中,充分混合均匀后,室温下避光反应 0.5 h,在波长 517 nm 处测定其吸光度值,DPPH 自由基清除率按下式计算:

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

A_1 : 多糖样品+DPPH 溶液; A_2 : 多糖样品+无水乙醇溶液; A_0 : 蒸馏水+DPPH 溶液。

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除率测定 参考黄明浩等^[19]及 DESEO 等^[20]的方法并作稍微修改。取 1.0 mL 7.4 mmol/L ABTS 储备液和 1.0 mL 2.6 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 储备液,混合均匀后,室温下避光静置 12 h,用 pH7.4 磷酸盐缓冲液稀释混合液吸光度值为 0.70 ± 0.02 ,此溶液为 ABTS⁺自由基工作液。取 0.4 mL 不同质量浓度的四种样品溶液(0.125~2.0 mg/mL)与 4 mL ABTS⁺自由基工作液,混合均匀后在室温下避光反应 6 min,734 nm 处测定吸光度值,ABTS⁺自由基清除率按下式计算:

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为对照样品吸光度值; A_1 为多糖样品吸光度值。

1.2.5.3 羟基自由基清除率测定 参考 CHAI 等^[21]的方法并作稍微修改。吸取 1.0 mL 不同质量浓度的四种样品溶液(0.125~2.0 mg/mL)于离心管中,加入 1.0 mL 硫酸亚铁溶液和 1.0 mL 水杨酸(9 mmol/L),再加入 0.5 mL 0.1% 过氧化氢溶液,混合均匀后于

37 ℃ 水浴锅中加热 0.5 h, 510 nm 处测定吸光度值。OH 自由基清除能力按下式计算:

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

式中, A_1 : 1 mL 多糖样品+0.5 mL 过氧化氢溶液+1 mL 硫酸亚铁溶液+1.0 mL 水杨酸; A_2 : 1 mL 多糖样品+0.5 mL 过氧化氢溶液+1 mL 硫酸亚铁溶液+1.0 mL 水; A_0 : 1 mL 水+0.5 mL 过氧化氢溶液+1 mL 硫酸亚铁溶液+1.0 mL 水杨酸。

1.2.5.4 还原能力测定 参考 XIAO 等^[22] 的方法并稍作修改。吸取 0.2 mL 不同质量浓度的四种样品溶液(0.125~2.0 mg/mL)于离心管中, 加入 1.0 mL 磷酸缓冲溶液(pH=6.6, 0.2 mol/L)和 1.0 mL 1% 铁氰化钾溶液混合, 50 ℃ 水浴 20 min 后加入 1.0 mL 10% 三氯乙酸, 离心, 取上清液 1.0 mL。再加入 0.2 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 摇匀后静置 10 min, 在 700 nm 处测定其吸光度值。

$$\text{总还原力}(\%) = (A - A_0) \times 100$$

1.3 数据处理

所有数据均采用 SPSS 25.0 进行分析, 数据以平均值±标准差(SD)表示, 采用 Duncan 检验计算 95% 置信区间, 并认为其值($P < 0.05$)具有统计学意义, 图表主要由 Excel 2016 和 Origin 2021 绘制, 使用 Graphpad Prism 9.5.0 计算 IC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 密银花多糖得率

四种方法(热水提取法、超声波法、复合酶法及超声波协同酶法)提取得到的密银花多糖得率分别为 2.13%±0.08%、7.74%±0.06%、4.35%±0.07%、3.38%±0.08%。由图 1 可知, HWE 的得率显著低于其他几种提取方法($P < 0.05$), HWE 虽然提取条件比较温和, 但其耗时较长, 得率较低。UE 提取法提取的密银花多糖得率最高, 可能是因为超声波的空化作用加

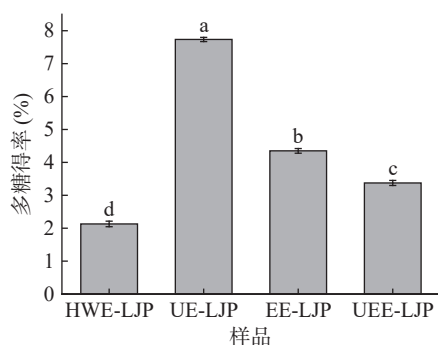


图 1 不同提取方法对密银花多糖得率的影响

Fig.1 Effects of different extraction methods on the yield of polysaccharide from LJP

注: 图中不同字母说明具有显著性差异($P < 0.05$); HWE-LJP: 热水提取密银花多糖; UE-LJP: 超声波提取密银花多糖; EE-LJP: 酶提取密银花多糖; UEE-LJP: 超声波-酶协同提取密银花多糖; 图 2~图 7 同。

速多糖的溶解和释放^[23-24]。果胶酶和纤维素酶在一定条件下可以使植物细胞壁中的果胶和纤维素发生解聚, 进而破坏其细胞壁和细胞膜结构, 使其多糖产生分离, 得率提高^[25-26]。因此, 新型提取方法相较于 HWE 法显著($P < 0.05$)提高了多糖的得率, 该结果与马婷等^[27] 所报道的研究结果一致, 说明不同提取方法对多糖的得率具有显著影响。

2.2 密银花多糖中总糖含量

如图 2 所示, 不同提取方法得到的密银花多糖中总糖含量呈现显著性差异($P < 0.05$), 四种方法(热水提取法、超声波法、复合酶法及超声波协同酶法)提取得到的密银花多糖总糖含量分别为 37.18%±0.39%、31.16%±0.02%、38.68%±0.23%、24.99%±0.66%。EE 法提取的密银花多糖中总糖含量最高, UEE 法提取的密银花多糖中总糖含量最低, UE 法提取的密银花多糖中总糖含量高于 UEE 法, 该结果与 JIANG 等^[28] 在研究不同提取方法对无花果多糖中总糖含量的结果一致, 说明单独酶法或超声波法提取多糖可增加总糖的含量, 协同法提取多糖会对总糖含量产生消极影响。

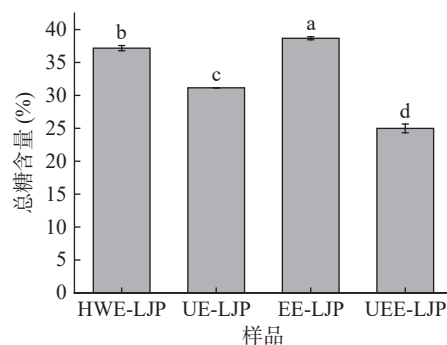


图 2 不同提取方法对密银花多糖中总糖含量的影响

Fig.2 Effects of different extraction methods on the total sugar content in LJP

2.3 密银花多糖中蛋白质含量

TCA 法一般无法完全除去多糖中的蛋白质, 因此, 无论用何种方法提取多糖均会造成蛋白质的残留, 不同提取方法对多糖中蛋白质含量的影响也不相同, 如图 3 所示, 不同提取方法提取的密银花多糖中

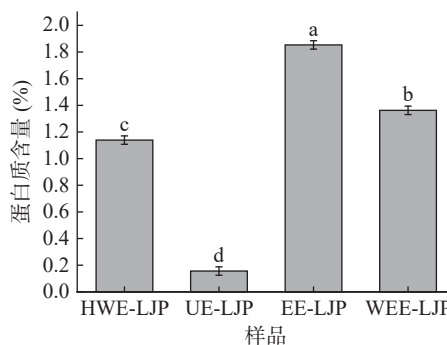


图 3 不同提取方法对密银花多糖中蛋白质含量的影响

Fig.3 Effects of different extraction methods on protein content in LJP

蛋白质含量呈现显著性差异($P<0.05$), 超声波协助法提取的多糖中蛋白质含量最低, 酶法提取的密银花多糖中蛋白质含量较高。

2.4 密银花多糖中糖醛酸含量

如图 4 所示, 不同提取方法提取的多糖中均有葡萄糖醛酸的存在, 说明该多糖属于一种酸性糖, 超声波协助法提取的密银花多糖中糖醛酸含量最高(4.20%), 热水提取法提取的密银花多糖中糖醛酸含量最低(3.94%), 两者相比仅相差 6.60%, 且 4 种方法提取的多糖中糖醛酸含量不具有显著性差异($P>0.05$)。

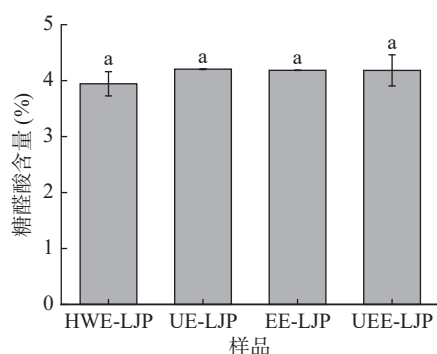


图 4 不同提取方法对密银花多糖中糖醛酸含量的影响

Fig.4 Effects of different extraction methods on the content of uronic acid in LJP

2.5 密银花多糖持水性和持油性

持水性可以用来表征多糖与水的结合程度, 也可以反映多糖凝胶结构的致密程度; 持油性可以用来表征多糖分子量和黏度, 持油性越好, 说明其分子量和黏度越大。不同提取方法下密银花多糖的持水性和持油性如图 5 所示。UE 法提取的密银花多糖持水性较好, 可达到 27.22 g/g; HWE 法提取的密银花多糖持油性最好, 可达到 25.62 g/g。4 种方法提取的密银花多糖持油性不具有显著性差异($P>0.05$), UE 法提取的密银花多糖持油性较差, 说明其黏度较低; EE 法提取的密银花多糖持水性和持油性与 UEE 法相比不具有显著性差异($P>0.05$)。UE 法提取的密银花多糖持水性显著($P<0.05$)高于 HWE 法、EE 法

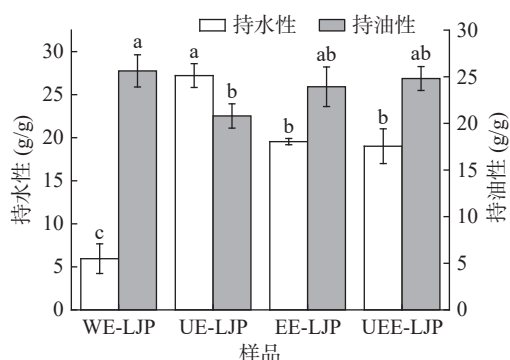


图 5 不同提取方法对密银花多糖持水性和持油性的影响

Fig.5 Effects of different extraction methods on water and oil holding capacity of LJP

提取和 UEE 法提取, 可能是由于超声波的机械作用或空化作用对植物细胞壁产生破坏, 进而对多糖的链接方式也产生不同程度的破坏, 使多糖凝胶网络结构变得更加紧密, 说明超声波处理可以改善多糖与水的结合程度。热水提取法与超声波提取法相比, 密银花多糖的持水性和持油性均呈现显著性差异($P<0.05$), 热水提取法提取的密银花多糖持水性较差, 可能是由于在提取过程中, 多糖已经锁住了大量的水分子导致的。

2.6 密银花多糖水合特性

不同提取方法对密银花多糖水合特性的影响如图 6 所示。吸水性指数可以表示样品的亲水性, 主要反映样品的持水能力; 多糖的溶解度可以表征分子量大小, 通常而言溶解度越高其分子量越小。如图 6A 所示, 超声波辅助提取的密银花多糖溶解度较大, 不同提取方法提取的密银花多糖溶解度不具有显著性差异($P>0.05$), UE 法提取的密银花多糖溶解度较大, 说明其分子量较小; HWE 法提取的密银花多糖溶解度较小, 说明其分子量较大, 此结果与持油性结

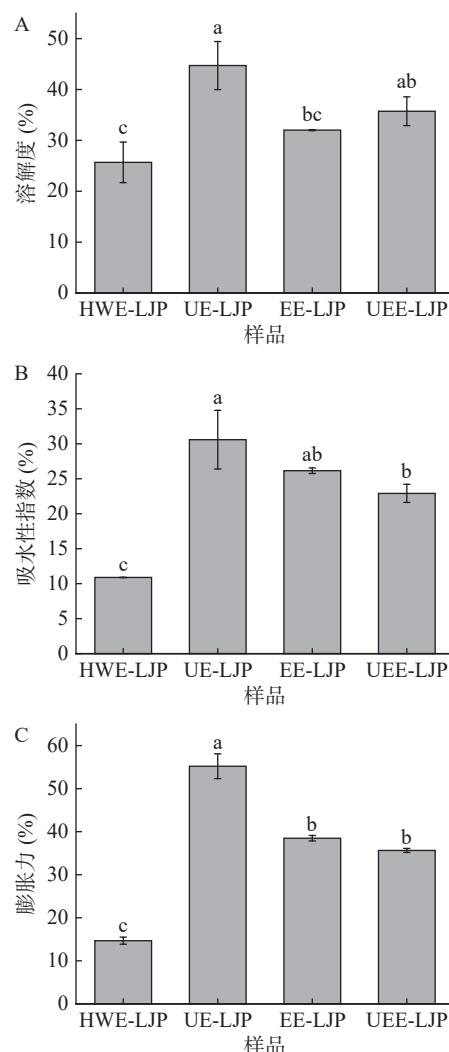


图 6 不同提取方法对密银花多糖水合特性的影响

Fig.6 Effects of different extraction methods on the hydration characteristics of LJP

果一致。如图 6B、图 6C 所示, HWE 法提取的密银花多糖吸水性指数和膨胀力较小, 说明其持水能力较弱, 此结果与持水性结果一致。HWE 法提取的密银花多糖与 UE 法提取的密银花多糖相比, 水合特性之间呈现显著性差异($P<0.05$); EE 法提取的密银花多糖水合特性与 UEE 法提取的密银花多糖水合特性相比不具有显著性差异($P>0.05$), 说明酶存在的前提下, 超声波协同提取不会改变多糖的水合特性。

2.7 密银花多糖的抗氧化性

四种提取方法制备的密银花多糖抗氧化活性如图 7 所示。随着浓度的不断升高, 其 DPPH 自由基

清除率在不断增强, DPPH 自由基清除率与密银花多糖浓度呈正相关(图 7A)。当多糖浓度低于 0.5 mg/mL 时, 酶法提取的密银花多糖 DPPH 自由基清除率较强; 当多糖浓度高于 0.5 mg/mL 时, 超声波辅助法提取的密银花多糖 DPPH 自由基清除率较强, 其中, HWE-LJP 的 DPPH 自由基清除能力最强, IC_{50} 值为 0.067 mg/mL。密银花多糖 ABTS⁺自由基清除能力如图 7B 所示, 低浓度时四种多糖表现出较低的清除率, 随着浓度的升高, HWE-LJP、EE-LJP 和 UEE-LJP 清除能力在逐渐升高。对比三种密银花多糖的 IC_{50} 值发现, 酶法提取的密银花多糖的 ABTS⁺自由基清除能力最强, 其 IC_{50} 值为 0.679 mg/mL。羟自由基能够氧化机体内大分子物质, 不同提取方法的密银花多糖对羟基自由基清除能力和总还原能力的强弱如图 7C、图 7D 所示, 随着浓度的不断升高, 羟基自由基清除能力和总还原能力在逐渐上升, 且在一定范围内浓度与抗氧化性呈现一种量效关系。各个样品之间的·OH 清除率具有显著性差异($P<0.05$), 总还原能力在高浓度下具有显著性($P<0.05$)。

梁金月等^[29] 研究报道超声波辅助乙醇-硫酸铵双水相萃取法提取的金银花多糖对 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 为 1.403 mg/mL, 此活性低于密银花多糖的抗氧化性。刘宇^[30] 曾在文献中报道金银花提取物具有一定的氧化自由基吸收能力和自由基清除能力, 且对羟基自由基和超氧阴离子自由基清除能力为 969.1 U/g 和 625.0 U/g。ZHANG 等^[31] 将金银花水溶性多糖分离为中性组分和酸性组分, 发现所有组分金银花多糖均对 DPPH 自由基和羟基自由基产生较好的清除能力并与浓度呈现依赖性。

不同的提取方法会影响金银花多糖的单糖组成, 单糖组成会对金银花多糖的结构产生影响, 其结构又影响金银花多糖的抗氧化活性。因此, 不同提取方法提取的密银花多糖的抗氧化活性差距较大, 通过表 1 可以看出, 不同提取方法制备的密银花多糖的 IC_{50} 值不同, 表现出不同的自由基清除能力。HWE-LJP、UE-LJP 和 EE-LJP 具有较强的 DPPH 自由基清除能力, IC_{50} 值分别为 0.067、0.104、0.093 mg/mL, 在羟基自由基方面, UEE-LJP 表现出较强的清除能力, IC_{50} 值为 0.390 mg/mL。以上结果可以表明, 不同方法提取的密银花多糖表现出不同的抗氧化活性, 因此, 原料的产地、种类、提取方法、单糖组成及结构都可能对多糖的抗氧化活性产生影响。

表 1 密银花多糖的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} value of LJP

提取方法	HWE-LJP	UE-LJP	EE-LJP	UEE-LJP
DPPH自由基	0.067	0.104	0.093	1.113
ABTS ⁺ 自由基	1.069	0.904	0.679	1.045
羟基自由基	0.429	0.663	0.385	0.390
总还原能力	18.11	2.911	2.699	17.96

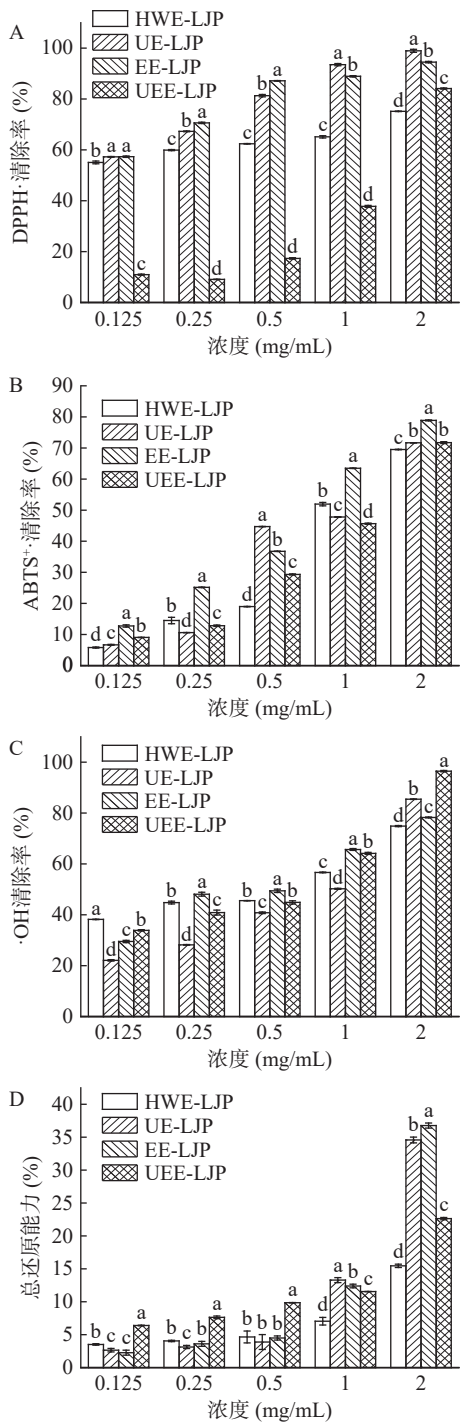


图 7 密银花多糖的抗氧化活性

Fig.7 Antioxidant activity of LJP

3 结论

本文以密银花为研究对象,通过热水提取、超声波辅助提取、酶法提取及超声波辅助酶法提取密银花多糖,对其不同提取方法得到的密银花多糖得率、化学组成、理化性质进行分析,对体外自由基清除能力进行评价。结果表明,超声波提取法多糖得率最高(7.74%),热水提取法多糖得率最低(2.13%);超声波辅助法提取的密银花多糖蛋白质含量最低、持水性及水合特性最强;酶法提取的密银花多糖中总糖含量较高(38.68%),四种提取方法提取的密银花多糖均为酸性多糖。抗氧化实验结果表明,密银花多糖具有较强的 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺自由基清除能力、羟基自由基清除能力和总还原能力,其 IC₅₀ 分别为 0.067~1.163、0.679~1.069、0.385~0.663 和 2.699~18.110 mg/mL。综上所述,不同提取方法对多糖的理化性质和抗氧化活性具有显著的影响,综合考虑分析发现超声波辅助提取法和酶法可以作为提取密银花多糖最适宜的方法,本文仅对密银花多糖的理化性质和抗氧化活性进行研究,接下来可从密银花多糖的提取工艺优化、分离纯化、结构表征等方面进一步的探索,这也将对密银花多糖在食品和药品原料研发方面产生重要作用。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] YUKE L, WEN L, CHAOMEI F, et al. *Lonicerae japonicae* flos and *Lonicerae* flos: A systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 2019, 19(1): 1-61.
- [2] 关秀锋, 王锐, 李晓龙, 等. 金银花的化学成分与药理作用研究新进展[J]. *化学工程师*, 2020, 34(4): 59-62. [GUAN Xiufeng, WANG Rui, LI Xiaolong, et al. New progress in the study of chemical constituents and pharmacological effects of *Lonicera japonicae* Flos[J]. *Chemical Engineer*, 2020, 34(4): 59-62.]
- [3] 吴娇, 王聪, 于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 225-234. [WU Jiao, WANG Cong, YU Haichuan. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of honeysuckle[J]. *Chinese Journal of Experimental Prescriptions*, 2019, 25(4): 225-234.]
- [4] ZHOU X N, HE G, MA J M, et al. Protective effect of a novel polysaccharide from *Lonicera japonica* on cardiomyocytes of mice injured by hydrogen peroxide[J]. *BioMed Research International*, 2020(2020): 5279193.
- [5] YANG Q X, WANG Q L, DENG W W, et al. Anti-hyperuricemic and anti-gouty arthritis activities of polysaccharide purified from *Lonicera japonica* in model rats[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 801-809.
- [6] WANG Y, SUN M Y, JIN H Y, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on immunity and the gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 701566.
- [7] SHENGCHANG T, ZHIYAO R, ZERUI Y, et al. Effects of different molecular weight polysaccharides from *Dendrobium officinale* Kimura Migo on human colorectal cancer and transcriptome analysis of differentially expressed genes[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 704486.
- [8] LÜ Q Q, CAO J J, LIU R, et al. Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from wheat bran[J]. *Food Chemistry*, 2021, 341(Pt 1): 128218.
- [9] 景永帅, 马云凤, 李明松, 等. 植物多糖结构解析方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(3): 411-421. [JING Yongshuai, MA Yunfeng, LI Mingsong, et al. Research progress on structural analysis methods of plant polysaccharides[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(3): 411-421.]
- [10] XU T R, ZHANG H M, WANG S G, et al. A review on the advances in the extraction methods and structure elucidation of *Poria cocos* polysaccharide and its pharmacological activities and drug carrier applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 217: 536-551.
- [11] 白冰瑶, 付超, 张春兰, 等. 不同提取方法对恰玛古多糖生物活性的比较[J]. *食品科技*, 2022, 47(3): 214-223. [BAI Bingyao, FU Chao, ZHANG Chunlan, et al. Comparison of different extraction methods on the biological activity of Chamagu polysaccharide[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(3): 214-223.]
- [12] 刘宇, 戴沅霖, 马越, 等. 金银花粗多糖提取工艺优化及其抗氧化活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(7): 188-196. [LIU Yu, DAI Yuanlin, MA Yue, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity evaluation of crude polysaccharide from honeysuckle[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(7): 188-196.]
- [13] 吕欣, 谭春玲, 麦名娜, 等. 超声辅助酶法提取金银花多糖的工艺优化[J]. *湖南农业科学*, 2021(4): 90-95. [LÜ Xin, TAN Chunling, MAI Mingna, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of honeysuckle polysaccharide[J]. *Hunan Agricultural Science*, 2021(4): 90-95.]
- [14] SCIENCE C O F, ENGINEERING N A, F UNIVERSITY Y, CHINA, et al. An alkali-extracted polysaccharide from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao: Structural characterizations and antioxidant activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 607-615.
- [15] KOLSI R B A, SALAH H B, JARDAK N, et al. Sulphated polysaccharide isolated from *Sargassum vulgare*: Characterization and hypolipidemic effects[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 170: 148-159.
- [16] KTARI N, FEKI A, TRABELSI I, et al. Structure, functional and antioxidant properties in Tunisian beef sausage of a novel polysaccharide from *Trigonella foenum-graecum* seeds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 98: 169-181.
- [17] OKONKWO V C, KWOFIE E M, MBA O I, et al. Impact of thermo-sonication on quality indices of starch-based sauces[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 73: 105473.
- [18] Structural characterization and antioxidant activity of oligosaccharides from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. *International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions*, 2020, 150: 737-745.
- [19] 黄明浩, 黄泰奇, 邓丽娟. 响应面法优化白英粗多糖提取工艺及其体外抗氧化活性的分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(22): 219-225. [HUANG Minghao, HUANG Taiqi, DENG Lijuan. Re-

sponse surface method was used to optimize the extraction process of crude polysaccharide from *Solanum lyratum* and its antioxidant activity *in vitro*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(22): 219–225.]

[20] DESEO M A, ELKINS A, ROCHFORD S, et al. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract[J]. *Food Chemistry*, 2020, 314: 126180.

[21] CHAI Y Y, KAN L B, ZHAO M. Enzymatic extraction optimization, anti-HBV and antioxidant activities of polysaccharides from *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai[J]. *International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions*, 2019, 134: 588–594.

[22] XIAO Y, XING G L, RUI X, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 10: 210–222.

[23] ABUDUWAILI A, ROZI P, MUTAILIFU P, et al. Effects of different extraction techniques on physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 83: 189–197.

[24] SOROURIAN R, KHAJEHRAHIMI A E, TADAYONI M, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Typha domingensis*: Structural characterization and functional properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 758–768.

[25] 方嘉沁, 郑青松, 文雨欣, 等. 不同提取方法的莲子心多糖结构与理化性质比较[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(1): 92–103.

[FANG Jiaqin, ZHENG Qingsong, WEN Yuxin, et al. Comparison of structure and physicochemical properties of polysaccharides from lotus plumule by different extraction methods[J]. *Modern*

Food Science and Technology, 2023, 39(1): 92–103.]

[26] CHI Y Z, LI Y P, ZHANG G L, et al. Effect of extraction techniques on properties of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their applicability in iron chelation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 181: 616–623.

[27] 马婷, 曲航, 杨海龙. 提取方法对羊栖菜多糖理化性质及体外生物活性的影响[J]. *食品安全质量检查学报*, 2023, 14(15): 259–268. [MA Ting, QU Hang, YANG Hailong. Effects of extraction methods on physicochemical properties and *in vitro* biological activity of *Sargassum fusiforme* polysaccharides[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2023, 14(15): 259–268.]

[28] JIANG X Y, WANG C W, ZHANG J, et al. Effects of different extraction methods on physicochemical characteristics and bioactivities of fig (*Ficus carica* L.) leaves polysaccharides[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2023, 16(12). doi:10.1016/j.arabjc.2023.105319.

[29] 梁金月, 周洪鑫, 张雨晴, 等. 金银花多酚和多糖同步提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2024(3): 1–10.

[LIANG Jinyue, ZHOU Hongxin, ZHANG Yuqing, et al. Optimization of simultaneous extraction process of polyphenols and polysaccharides from *Lonicera japonica* and its antioxidant activity [J]. *China Food Additives*, 2024(3): 1–10.]

[30] 刘宇. 金银花多糖分离纯化、结构表征及抗炎活性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2023. [LIU Yu. Purification, structural characterization and anti-inflammatory activity of honeysuckle polysaccharide[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2023.]

[31] ZHANG T, LIU H P, BAI X Y, et al. Fractionation and antioxidant activities of the water-soluble polysaccharides from *Lonicera japonica* Thunb[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 1058–1066.