

藜蒿叶多糖提取工艺优化及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性和抗氧化活性评价

邹伟^{1,2}, 丁翘^{1,2,3*}, 陶雪茹²,

韩敏², 朱思莹², 王思颖², 袁涛², 涂宗财^{1,2,3}

¹江西师范大学 国家淡水鱼加工技术研发专业中心; ²江西师范大学 生命科学学院, 南昌 330022; ³南昌大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌 330027

摘要: 采用热水浸提法提取藜蒿叶多糖 (polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz leaf, ASLP), 通过单因素试验探究提取温度、提取时间、提取次数、料液比 4 个因素对藜蒿叶粗多糖得率的影响; 在此基础上, 采用响应面法优化提取工艺。同时测定 ASLP 糖含量、糖醛酸、分子量分布、单糖组成、 α -葡萄糖苷酶抑制活性和抗氧化活性。结果表明, 藜蒿叶粗多糖的最佳提取工艺为: 提取温度 95 °C、提取时间 3 h、提取次数为 3 次、料液比为 1 : 30 (g/mL), 在此条件下藜蒿叶粗多糖得率为 17.23% \pm 0.26%。理化性质结果发现 ASLP 糖醛酸含量为 31.70% \pm 0.73%, 高于中性糖含量 (26.20% \pm 1.56%), 分子量分布结果表明 ASLP 为分布较广的非均一多糖。单糖组成结果显示半乳糖醛酸比例最高, 为 38.76%, 其次是半乳糖 (22.88%) 和鼠李糖 (10.92%)。此外, ASLP 对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.120 8、0.016 01、1.364 mg/mL, 表明其具有良好的体外降血糖和抗氧化活性。

关键词: 藜蒿叶多糖; 工艺优化; 响应面法; α -葡萄糖苷酶; 抗氧化活性

中图分类号: Q539

文献标识码: A

Optimization of extraction process of polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz leaf and evaluation on its α -glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity

ZOU Wei^{1,2}, DING Qiao^{1,2,3*}, TAO Xue-ru²,

HAN Min², ZHU Si-ying², WANG Si-ying², YUAN Tao², TU Zong-cai^{1,2,3}

¹National R&D Center for Freshwater Fish Processing, Jiangxi Normal University; ²College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; ³State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330027, China

Abstract: The polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz leaf (ASLP) were extracted by hot water extraction method. The effects of extraction temperature, extraction time, extraction times and solid-liquid ratio on the yield of crude ASLP were studied by single factor experiment, and the extraction process was optimized by

response surface method based on the results of single factor experiment. Meanwhile, the amounts of neutral sugar and uronic acid, molecular weight distribution, monosaccharide composition, α -glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of ASLP were determined. The results showed that the optimum extraction process of crude ASLP was as follows: extraction temperature 95 °C, extraction time 3 h, extraction times 3, solid-liquid ratio 1 : 30 (g/mL). The yield of crude ASLP was 17.23% \pm 0.26% by the optimum extraction process. The results of physical and chemical properties study showed that the content of uronic acid of ASLP was 31.70% \pm 0.73%, which was higher than the content of neutral sugar (26.20% \pm 1.56%). The molecular weight determination indicated that ASLP was a widely distributed heterogeneous polysaccharide. It was found from the monosaccharide composition study that galacturonic acid had the highest proportion (which was 38.76%) in ASLP, followed by galactose (22.88%) and rhamnose (10.92%). Furthermore, IC₅₀ of ASLP on DPPH and ABTS⁺ free radicals and α -glucosidase were 0.120 8, 0.016 01 and 1.364 mg/mL, respectively, indicating that ASLP has good hypoglycemic and antioxidant activity *in vitro*.

Key words: polysaccharide from *Artemisia selengensis* Turcz leaf ; optimization of extraction process; response surface method; α -glucosidase; antioxidant activity

藜蒿 (*Artemisia selengensis* Turcz) 属桔梗目菊科, 学名狭叶艾, 又名芦蒿、水蒿、青艾等, 为多年生草本植物, 植株具清香气味。藜蒿具有极高的营养价值, 具有一定的保健功效^[1]; 研究表明, 藜蒿的食用可以降低血糖, 有效预防 2 型糖尿病的发生^[2], 同时藜蒿提取物在抗氧化^[3]、抗炎^[4]、降血糖^[5]和免疫调节^[6]等方面都表现出较好的生物活性。鉴于藜蒿提取物的多种功效作用, 为更明确发挥功效作用的活性物质及其作用机理, 不少研究者从藜蒿提取物中分离不同活性物质, 并对其结构特征、功能活性进行探讨和研究。Wang 等^[7,8]在前期研究中优化了超声辅助提取藜蒿多糖的工艺, 并进一步分离纯化出两个具有良好抗氧化和抗肿瘤活性的多糖组分, 而后在此基础上进行结构探究及体内活性研究, 发现藜蒿多糖可显著预防丙二醛水平升高的同时能增加抗氧化酶活性, 表明超声提取的藜蒿多糖具有良好的抗氧化、抗癌和免疫刺激活性。Mao^[9]通过正交试验优化纤维素酶提取藜蒿多糖的工艺, 得出最佳工艺条件为: pH = 6.0, 酶解温度 50 °C、酶解时间 2 h、纤维素酶用量 1.5%。

现有关于藜蒿多糖的研究报道有限。日常生活中, 藜蒿嫩茎常被制作成美味菜肴, 而藜蒿叶经常被视为不可用的部分被丢弃, 造成一定程度上的资源浪费和环境污染。因此, 本研究选择藜蒿叶为原料, 采用传统的热热水浸提法通过单因素试验和响应面优化得到藜蒿叶粗多糖的最佳提取工艺, 再对优化提取得到的藜蒿叶粗多糖进行脱蛋白处理之后, 对其组成和理化性质进行测定。基于此进一步探究藜蒿叶多糖 (polysaccharide from *Artemisia selengensis*

Turcz leaf, ASLP) 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性和抗氧化活性。期望通过本研究为 ASLP 提取的工业化提取提供工艺参数参考, 进一步丰富藜蒿多糖的研究内容, 为在食品、保健品及药物开发中的应用提供新的思路和依据, 为相关领域提供新的理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

藜蒿: 呈长卵状、伞形或扁球形, 高 0.5~1.5 cm, 宽 0.5~1 cm, 顶端略突起, 基部有花茎; 购于江西长胜市场, 经江西师范大学生命科学学院邹峥嵘教授鉴定为菊科蒿属植物藜蒿 (*Artemisia selengensis* Turcz)。

浓硫酸、苯酚(均为分析纯, 西陇科学股份有限公司); 考马斯亮蓝(批号: 416B0315)、阿卡波糖(批号: 127K031)、葡萄糖(批号: 24240607006)、半乳糖醛酸(批号: 34230818001)、牛血清蛋白(批号: 102BA054)、 α -葡萄糖苷酶(批号: 2230601002)、谷胱甘肽(批号: 1024V052)(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 透析袋(批号: JS251082, 上海源叶科技有限公司); 葡聚糖标准品(色谱纯, 上海 Aladdin 生化科技股份有限公司); 单糖标准品(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 有限公司)。

ICS-5000 离子色谱仪(美国赛默飞有限公司); e2695 高效液相色谱仪(美国沃特世有限公司); TG16A-WS 高速台式离心机(上海聚亮光学仪器有限公司); Synergy H1 酶标分析(美国 Bio Tek 公司); FDU-211 0 冷冻干燥机、OSB-210 0 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 藜蒿叶粗多糖提取

干燥的藜蒿叶于粉碎机中粉碎并过 100 目筛, 按 1:20 (g/mL) 的料液比用 80%乙醇浸泡过夜后, 通过三层纱布过滤收集得到藜蒿叶渣, 挥发去除乙醇后用纯水配制成一定的料液比, 在一定的温度下提取相应的时间, 将浸提液离心(4 000 r/min, 10 min)取上清液, 沉淀重复提取一定的次数; 收集上清液在旋转蒸发仪中浓缩到一定体积后加入 4 倍体积的无水乙醇, 在 4 °C 下静置 12 h 后离心(4 000 r/min, 10 min)取沉淀, 沉淀挥发去除乙醇后用纯水复溶, 随即冷冻干燥得到藜蒿叶粗多糖, 按公式(1)计算得率(R_1)。

$$R_1 = \frac{M}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R_1 表示藜蒿叶粗多糖得率, %; M 表示藜蒿叶粗多糖的质量, g; m 表示称取的藜蒿叶粉的质量, g。

1.2.2 单因素试验

以藜蒿叶粗多糖得率为指标, 选定提取时间 3 h, 料液比 1:30 (g/mL), 提取 3 次, 提取温度 90 °C, 依次考察提取温度 (60、70、80、90、100 °C), 提取时间 (1、2、3、4、5 h), 料液比 (1:10、1:20、1:30、1:40、1:50, g/mL), 提取次数 (1、2、3、4、5 次) 对藜蒿叶粗多糖得率的影响。

1.2.3 响应面法优化藜蒿叶粗多糖提取

在单因素设计试验的基础上, 运用 Design Expert 12.0 对提取温度、提取时间、料液比以及提取次数进行了四因素三水平响应面优化试验。以藜蒿叶粗多糖得率为响应值进行优化, 试验设计因素及水平如表 1。

表 1 响应面试验设计因素与水平

Table 1 Experimental design factors and levels of response surface

水平 Level	因素 Factor			
	A: 温度	B: 时间	C: 次数	D: 料液比
	Temperature (°C)	Time (h)	Times	Solid-liquid ratio (g/mL)
-1	80	2	2	1:20
0	90	3	3	1:30
1	100	4	4	1:40

1.2.4 藜蒿叶粗多糖的精制

参考 Chen 等^[10]方法, 采用 Sevage 法对通过优化后工艺提取得到的藜蒿叶粗多糖进行脱蛋白处理, 采用 8 000~12 000 Da 截流量透析袋纯水透析 72 h, 间隔 4 h 更换透析液, 随后减压浓缩、冻干得到 ASLP。

1.2.5 ASLP 的组成分析和理化性质测定

采用国标法^[11]测定总糖含量, 采用考马斯亮蓝法^[12], 以牛血清蛋白为标准品测定蛋白含量; 采用国标法^[13,14]测定水分和灰分含量; 参考 Zhuang 等^[15]的方法, 测定总酚、总黄酮含量。参考 Zhao 等^[16]方法, 测定中性糖、糖醛酸含量以及相对分子质量分布和单糖组成。

1.2.6 ASLP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

参考 Xie 等^[5]的方法测定 ASLP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1.2.7 ASLP 的体外抗氧化活性

参考 Zhao 等^[6]的方法测定 ASLP 的 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除能力。

1.3 数据处理

所有实验均重复三次, 结果表示为平均值 \pm 标准差。采用 SPSS 20.0 软件进行 t 检验,

$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义，在 Design Expert 12.0 和 Prism 9.0 软件上进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 藜蒿叶粗多糖提取单因素试验结果

2.1.1 提取温度对藜蒿叶粗多糖得率的影响

不同提取温度对藜蒿叶粗多糖得率的影响结果见图 1。随温度升高，藜蒿叶粗多糖的得率呈现上升趋势，但 70~90 °C 下温度的变化对藜蒿叶粗多糖的得率的影响较小；当温度达到 100 °C 时，得率达到最大 ($17.42\% \pm 0.33\%$)。分析原因可能是，在较低温度时藜蒿叶中非多糖物质如黄酮类化合物、生物碱、蛋白质等同时也被溶出，干预多糖的溶出，从而影响了多糖的提取率；而随着温度的升高，这类物质发生热降解或热变性，而多糖在溶液中的溶解度随之提高，从而有利于多糖的溶出^[17]。因此，响应面试验的提取温度选择 80、90、100 °C。

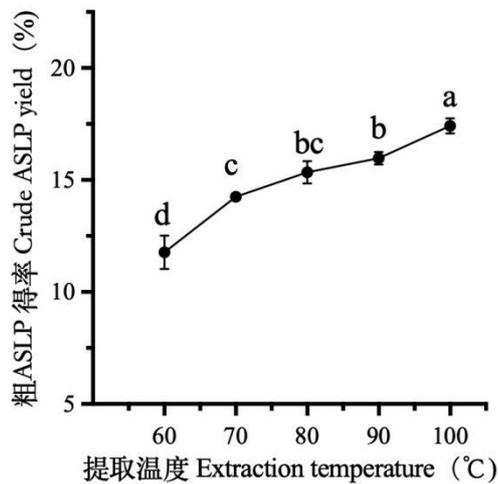


图 1 提取温度对藜蒿叶粗多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on yield of crude ASLP

注：图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below.

2.1.2 提取时间对藜蒿叶粗多糖得率的影响

不同提取时间对藜蒿叶粗多糖得率的影响结果见图 2。随时间的增加，得率呈增加趋势，当提取时间为 4 h 时得率达到最大 ($17.23\% \pm 0.37\%$)，而后随着提取时间的进一步延长导致得率有下降倾向，可能是随加热时间的延长多糖被降解^[18]，导致多糖得率下降。同时结合各提取时间下多糖得率数据的显著性分析及能耗最优化，响应面试验选择的提取时间为 2、3、4 h。

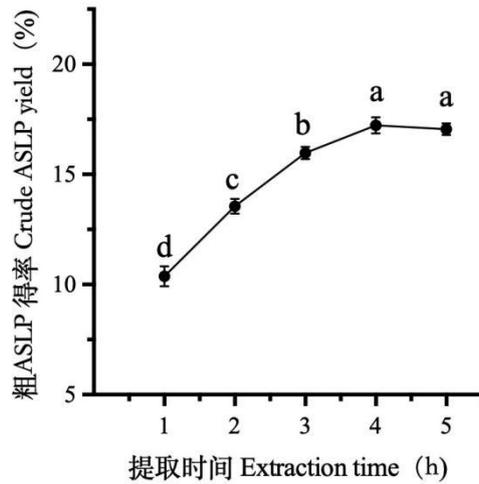


图2 提取时间对藜蒿叶粗多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on yield of crude ASLP

2.1.3 料液比对藜蒿叶粗多糖得率的影响

不同料液比对藜蒿叶粗多糖得率的影响结果见图3。得率随着料液比的增大呈先上升后下降的变化，在料液比为1:30 (g/mL) 时，得率达到最大 (15.97% ± 0.17%)。适量的提取剂有利于多糖从组织当中溶出，当提取剂超过一定范围之后，提取液中多糖的浓度变小，且很难保证在随后的分离过程中多糖的完全分离，从而可能导致多糖的损失并降低得率^[17]。因此响应面的料液比设为中间范围的1:20、1:30、1:40 (g/mL)。

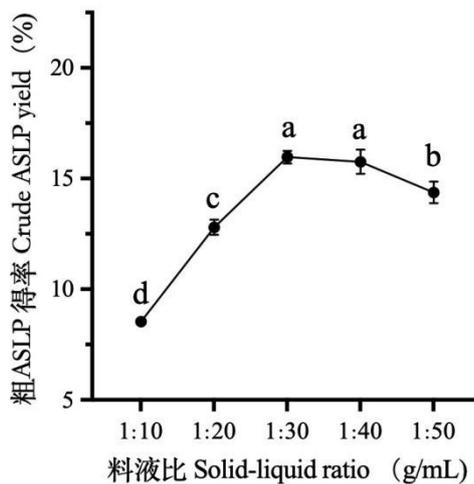


图3 料液比对藜蒿叶粗多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on the yield of crude ASLP

2.1.4 提取次数对藜蒿叶粗多糖得率的影响

提取次数对藜蒿叶粗多糖得率的影响结果见图4。在1次的提取次数时得率 (4.52% ±

0.28%) 并不高, 当提取次数增加到 3 次时得率最高 ($15.97\% \pm 0.29\%$), 继续增加提取次数得率呈现下降的趋势, 考虑到后续的提取液浓缩工作量以及节省能耗, 将响应面的提取次数设为 2、3、4 次。

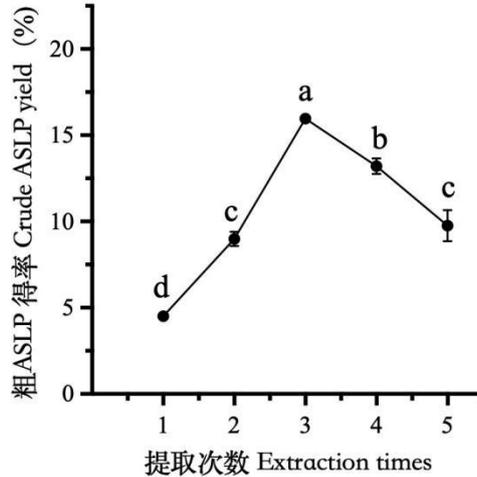


图 4 提取次数对藜蒿叶粗多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of extraction times on yield of crude ASLP

2.2 响应面试验优化藜蒿叶粗多糖提取工艺结果

2.2.1 响应面试验设计及结果

使用 Box-Behnken 模型对提取温度、提取时间、提取次数和提取料液比影响藜蒿叶多糖提取得率结果的因素进行分析, 结果如表 2 所示。在四因素三水平的组合试验中, 当提取温度为 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 3 h、提取次数为 3 次、料液比为 1 : 30 (g/mL) 时, 提取率达到最高 16.95%。进一步采用 Design Expert 12.0 软件对试验数据进行二次多项拟合回归, 所得模型: $Y = -259.975 + 3.98417A + 22.95667B + 4.88750C + 3.20758D - 0.17175AB + 0.14725AC - 0.014075AD + 0.5475BC + 0.02925BD - 0.092CD - 0.0188A^2 - 1.62B^2 - 2.72625C^2 - 0.027762D^2$ 。从表 3 回归模型的显著性检验及方差分析可以看出, 该回归模型的 $P < 0.0001$, 表明所建立的响应面模型为极显著水平, 试验实际值和理论值偏差较小, 得到的回归模型能够很好地预测响应值, 失拟项 $P = 0.056 > 0.05$, 不显著, 说明未知因素对试验结果干扰较小。模型决定系数 $R^2 = 0.9848$, 调整决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9697$ 表明此模型拟合程度良好^[19]。本试验模型的 *Adeq Precision* 为 26.9542, 该值用以测定试验中的信噪比, 比值大于 4 即为理想; 因此, 认为该拟合模型指导本次优化试验的结果可信。因素 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 等对响应值的影响差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 4 种因素 (提取温度、提取时间、提取次数、料液比) 对响应值的影响并非简单的线性关系; 而在另一方面, AB 、 AC 、 AD 、 BC 、 CD 等两两因素交互下

对响应值的影响差异也具有统计学意义 ($P < 0.05$)，其表明提取温度与提取时间、提取温度与提取次数、提取温度与料液比、提取时间与提取次数、提取次数与料液比这些因素交互作用差异显著、交互作用下对响应值的影响大，但 BD 即提取时间与料液比交互下对响应值的影响不具有统计学意义，说明这两个因素交互下对响应值的影响微小。根据置信度 F 值大小探究了藜蒿叶多糖提取中各因素对提取率的影响程度，结果表明各因素对提取率影响的程度依次为 A 、 D 、 C 、 B ，即温度对藜蒿叶粗多糖得率影响最大，随后依次是料液比、提取次数和时间。

表 2 响应面试验及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface

编号 No.	A	B	C	D	藜蒿叶粗多糖得率 Yield of crude ASLP (%)
1	0	-1	0	-1	11.70
2	0	0	0	0	16.95
3	1	1	0	0	12.77
4	1	0	0	-1	13.37
5	0	0	1	-1	11.65
6	1	0	0	1	12.30
7	-1	0	-1	0	11.42
8	0	-1	0	1	12.21
9	-1	0	0	-1	8.58
10	-1	0	1	0	10.41
11	1	-1	0	0	15.98
12	0	0	-1	-1	8.60
13	0	0	0	0	16.58
14	0	0	1	1	12.18
15	-1	1	0	0	14.08
16	0	1	1	0	13.66
17	1	0	1	0	15.52

18	0	0	0	0	16.61
19	0	1	-1	0	11.72
20	0	-1	1	0	11.50
21	0	0	-1	1	12.81
22	0	0	0	0	16.40
23	-1	-1	0	0	10.42
24	0	0	0	0	16.66
25	-1	0	0	1	13.14
26	0	-1	-1	0	11.75
27	0	1	0	1	13.30
28	0	1	0	-1	11.62
29	1	0	-1	0	10.64

表 3 回归模型的显著性检验及方差分析

Table 3 Significance test and variance analysis of regression models

来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square			Significant
模型	153.98	14	11	64.96	< 0.000 1	**
Model						
<i>A</i>	13.08	1	13.08	77.28	< 0.000 1	**
<i>B</i>	1.07	1	1.07	6.34	0.024 6	*
<i>C</i>	5.31	1	5.31	31.35	<0.000 1	**
<i>D</i>	9.05	1	9.05	53.44	<0.000 1	**
<i>AB</i>	11.80	1	11.80	69.69	<0.000 1	**
<i>AC</i>	8.67	1	8.67	51.23	<0.000 1	**
<i>AD</i>	7.92	1	7.92	46.81	<0.000 1	**
<i>BC</i>	1.20	1	1.20	7.08	0.018 6	*
<i>BD</i>	0.342 2	1	0.342 2	2.02	0.177 0	-
<i>CD</i>	3.39	1	3.39	20.00	0.000 5	**
<i>A</i> ²	22.93	1	22.93	135.42	<0.000 1	**

B^2	17.02	1	17.02	100.55	<0.000 1	**
C^2	48.21	1	48.21	284.77	<0.000 1	**
D^2	50.00	1	50.00	295.31	<0.000 1	**
残差 Residual	2.37	14	0.169 3	-	-	-
失拟项 Lack of fit	2.21	10	0.221 2	5.58	0.056 0	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	0.158 6	4	0.039 7	-	-	-
总误差 Cor total	156.35	28	-	-	-	-

注： $R^2 = 98.48\%$ ， $R_{Adj}^2 = 96.97\%$ 。*差异显著 ($P < 0.05$)；**差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: $R^2 = 98.48\%$, $R_{Adj}^2 = 96.97\%$. *Significant difference ($P < 0.05$); **Very significant difference ($P < 0.01$).

2.2.2 各因素响应面分析

采用 Design Expert 12.0 程序对响应面试验的结果作曲面图，同时分析各因素之间的交互作用。响应面图中曲面越弯曲表明研究因素对结果影响越大，等高线的形状呈椭圆形表明研究因素之间的交互作用影响显著，呈圆形则说明交互作用影响不显著^[19]。由图 5 可知，各因素间的交互作用下其等高线均呈椭圆弯曲，说明各因素间的交互有影响，比较椭圆的曲率半径，可以发现图 5E 的椭圆曲率半径最小，图 5A 的椭圆曲率半径最大，即提取温度与提取时间之间的交互影响最强，而提取时间和料液比之间的交互影响最弱；同时，从各因素之间交互的响应曲面也能得出相同发现，如图 5E 所示，提取时间和料液比的交互参数变动所形成的响应曲面较平缓，说明这两者的交互对提取率的影响较小，而图 5A、图 5B、图 5C、图 5D 和图 5F 所示交互因素参数变化时其响应曲面较陡，其中提取温度和提取时间两个因素下的响应曲面最为陡峭，说明这两个因素组合对提取率的影响最大，这也与上述方差分析 F 值检验所得结果一致。

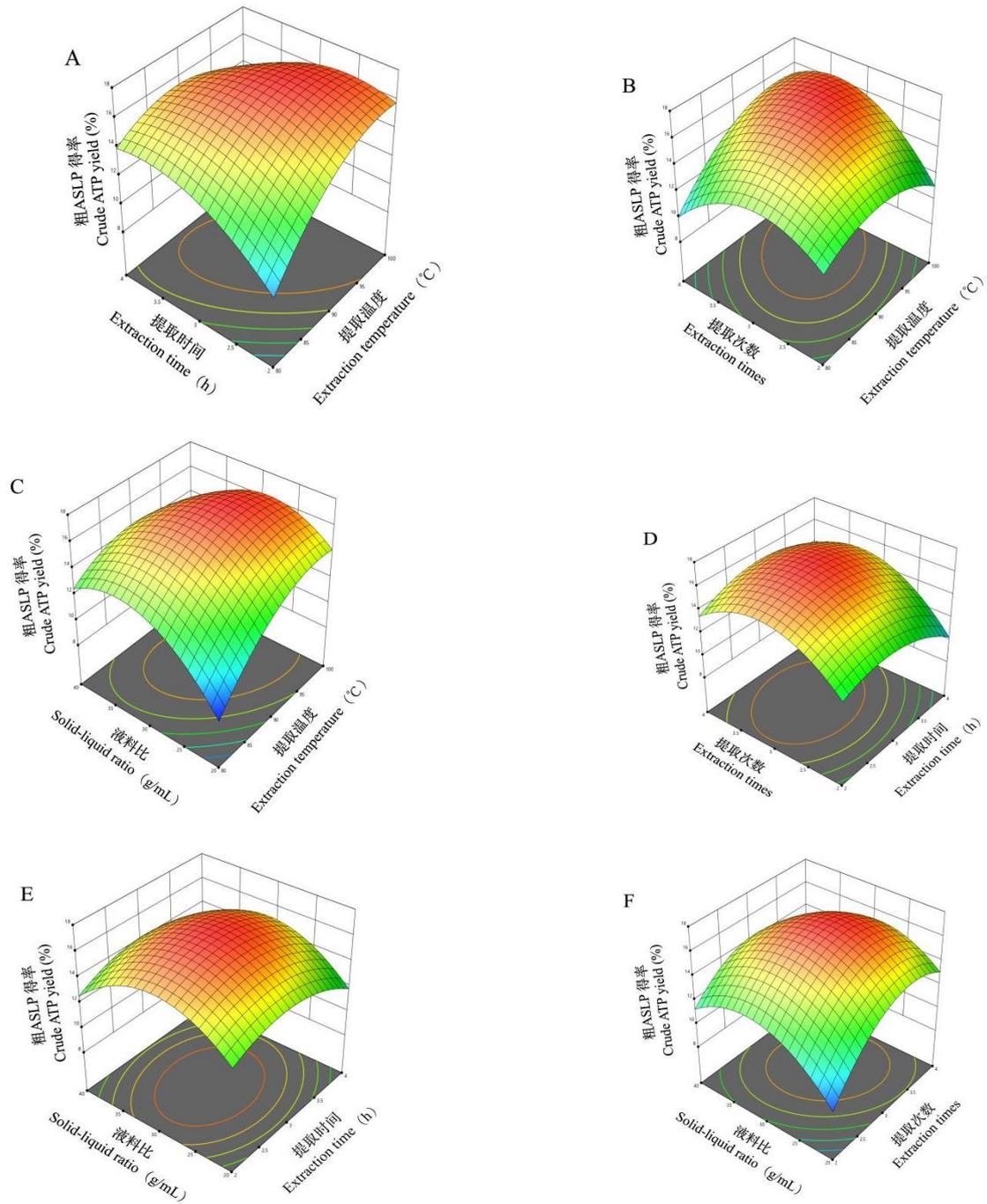


图 5 各因素交互作用对藜蒿叶粗多糖得率的影响

Fig. 5 Effects of interaction of various factors on the yield of crude ASLP

2.2.3 最佳提取工艺验证

Design Expert 12.0 软件给出的藜蒿叶粗多糖最优提取条件为提取温度 93.912 °C、提取时间 2.923 h、提取次数 3.217 次、料液比 1 : 30.178 (g/mL)，预测的得率为 16.91%。根据实际操作可行性，调整提取温度 95 °C、提取时间 3 h、提取次数为 3 次、料液比为 1 : 30(g/mL)，在此条件下重复验证 3 次，藜蒿叶粗多糖预测得率置信区间为 16.06%~17.32%，而实际验证

试验结果为 $17.23\% \pm 0.26\%$ 与预测值差异较小；同时对优化后条件与响应面中的各组条件进行工艺比较,综合藜蒿叶粗多糖得率、提取中所需能耗与提取工艺可操作性和可控性等因素,确认优化后的条件为最佳工艺。说明本试验建立的二次多项回归方程能够有效反映各因素对藜蒿叶粗多糖得率的影响,同时也证明了用响应面法优化藜蒿叶提取工艺是可行的,得到的藜蒿叶粗多糖得率回归方程模型是可信的。

2.3 ASLP 组成成分

参照“1.2.5”中所提到的方法分析了 ASLP 的组成,其结果如表 4 所示,ASLP 中的总糖含量占 $62.71\% \pm 2.29\%$,尽管对热水浸提得到的 ASLP 进行了脱蛋白处理,结果发现 ASLP 还含有一定量的蛋白质 ($3.58\% \pm 0.78\%$),推测该部分蛋白质可能与 ASLP 结合了。此外,还发现热水浸提得到的 ASLP 还含有一定量的多酚 ($12.34\% \pm 0.28\%$) 和微量的黄酮 ($0.02\% \pm 0.001\%$)。ASLP 中的灰分含量为 $8.74\% \pm 0.18\%$,这可能是藜蒿叶中含有较多的矿物质所导致。

表 4 ASLP 的组成成分

Table 4 The components of ASLP

指标 Index	含量 Content (%)
总糖 Total sugar	62.71 ± 1.29
蛋白质 Protein	3.58 ± 0.78
黄酮 Flavone	0.02 ± 0.001
多酚 Polyphenol	12.34 ± 0.28
水分 Hydration	7.67 ± 0.01
灰分 Ash	8.74 ± 0.18

2.4 ASLP 理化性质

2.4.1 ASLP 的糖含量和分子量分布

ASLP 的糖类组成如表 5 所示,糖醛酸含量高于中性糖含量,可见通过热水浸提法提取得到的 ASLP 可能是酸性多糖。利用高效凝胶液相色谱法测定 ASLP 的相对分子质量,由 ASLP 的色谱图(图 6)结合不同分子量大小的葡聚糖以及葡萄糖等标准品的保留时间可看出 ASLP 的峰并不单一,具有 3 个峰,保留时间分别在 6.131、16.807、17.759 min,根据标准品分子量大小的对数与出峰时间绘制标准曲线为 $Y=-1.5165X+21.856+21.856$, $R^2=0.9996$;可以判断 ASLP 分子量分布在 0.43~19 741 kDa 的范围,其中 1 号峰为 6 743~19 741 kDa, 2

号峰为 0.76~128 kDa, 3 号峰为 0.43 kDa 左右。在葡萄糖的保留时间 (18.414 min) 之后也存在着一个响应峰和倒峰, 结合葡萄糖的保留时间以及标准品的和空白样品的色谱图进行分析, 判断其并非是多糖的响应峰而是溶剂所导致。凝胶色谱图表明 ASLP 为非均一多糖, 分子量分布范围较广, 有待进一步进行分离纯化得到均一组分。

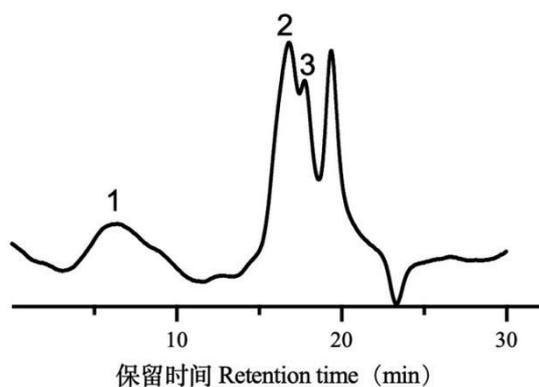


图 6 ASLP 的凝胶色谱图

Fig. 6 Gel permeation chromatograph of ASLP

表 5 ASLP 的糖类组成

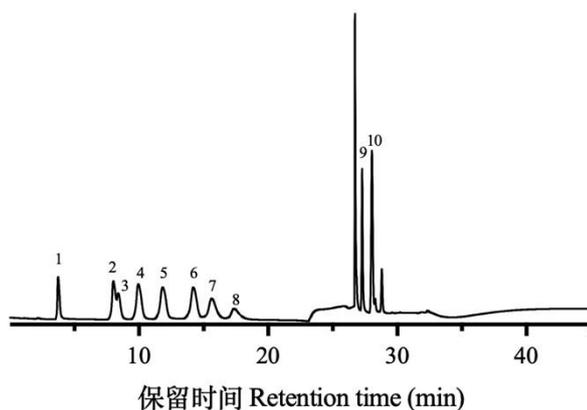
Table 5 Carbohydrate composition of ASLP

组成 Composition	含量 Content (%)
中性糖 Neutral sugar	26.20 ± 1.56
糖醛酸 Uronic acid	31.70 ± 0.73
岩藻糖 Fucose	1.11 ± 0.03
鼠李糖 Rhamnose	10.92 ± 0.51
阿拉伯糖 Arabinose	5.77 ± 0.25
半乳糖 Galactose	22.88 ± 0.83
葡萄糖 Glucose	7.57 ± 0.78
木糖 Xylose	5.19 ± 0.18
甘露糖 Mannose	5.86 ± 0.01
半乳糖醛 Galacturonic acid	38.76 ± 1.35
葡萄糖醛酸 Glucuronic acid	1.93 ± 0.30

2.4.2 ASLP 单糖组成

以单糖标准品做对照,采用离子色谱法测定 ASLP 的单糖组成结果见图 7。可看出 ASLP 是由半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖组成,其摩尔比为 38.76 : 22.88 : 10.92 : 7.57 : 5.86 : 5.19 : 5.77 : 1.93 : 1.11。半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖是 ASLP 中主要单糖,半乳糖醛酸比例最高为 38.76%,其次是半乳糖为 22.88%和鼠李糖为 10.92%。

A



B

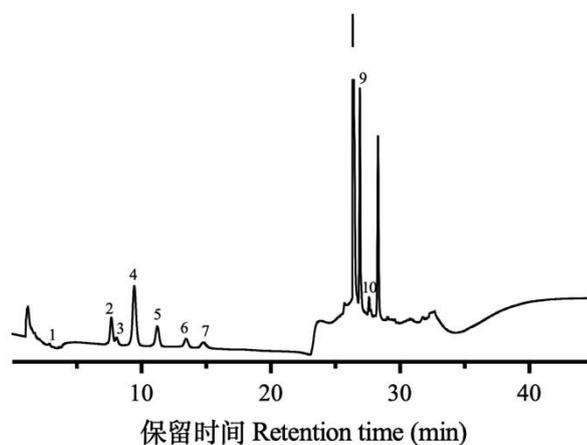


图 7 单糖标准品 (A) 与 ASLP (B) 的离子色谱图

Fig.7 Ion chromatogram of monosaccharide standard and ASLP

注: 1.岩藻糖; 2.鼠李糖; 3.阿拉伯糖; 4.半乳糖; 5.葡萄糖; 6.木糖; 7.甘露糖; 8.果糖; 9.半乳糖醛酸; 10.葡萄糖醛酸。

Note: 1. Fucose; 2. Rhamnose; 3. Arabinose; 4. Galactose; 5. Glucose; 6. Xylose; 7. Mannose; 8. Fructose; 9. Galacturonic acid; 10. Glucuronic acid.

2.5 α -葡萄糖苷酶抑制活性

α -葡萄糖苷酶是一种在生物体内参与碳水化合物的消化的酶,可引起血糖含量的升高;抑制 α -葡萄糖苷酶活性的意义在于能够减缓葡萄糖的吸收速度,从而控制血糖水平的上升,

因此可以通过 ASLP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性评价其降血糖活性^[5]。在 1~5 mg/mL 的实验浓度范围内，随着 ASLP 浓度的增加，其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率呈上升趋势；ASLP 的 IC₅₀ 值为 1.364 mg/mL，尽管活性较低于阿卡波糖 (IC₅₀=0.304 5 mg/mL)，但 ASLP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最大可达 84.16%±6.53% (5 mg/mL)，说明 ASLP 具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 (见图 8)。

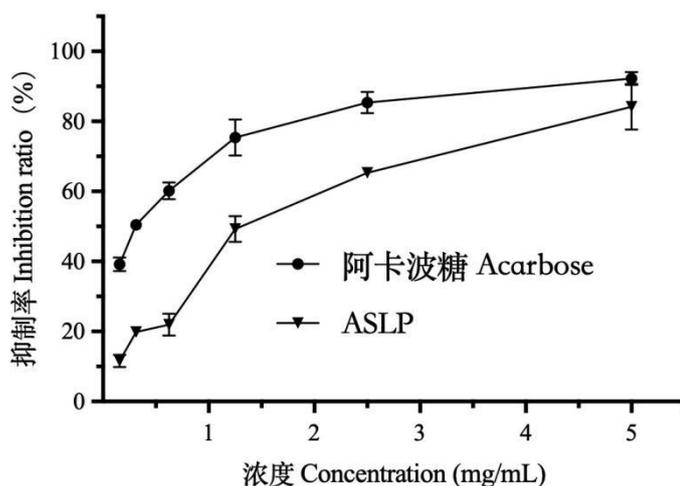


图 8 ASLP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

Fig. 8 Inhibition activity of ASLP on α -glucosidase

2.6 ASLP 的体外抗氧化活性

多糖的抗氧化活性受到蛋白质含量、多酚含量、糖醛酸含量、单糖组成和分子量等多方面的影响^[20]。如图 9 所示，在 0.01~1.25 mg/mL 和 0.00 5~0.5 mg/mL 的浓度范围内，ASLP 的 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺ 自由基清除率均随着浓度的增加不断增大，呈现明显的剂量效应关系。ASLP 浓度越高，其抗氧化能力越强；在浓度为 1.25 mg/mL 的时候 DPPH 自由基清除率达到最大 (94.60%±8.00%)，在浓度为 0.5 mg/mL 时 ABTS⁺ 自由基清除率达到最大，为 99.93%±0.03%。此外，发现 ASLP 对 DPPH 自由基的清除率甚至超过了同浓度下的谷胱甘肽，具有良好的抗氧化活性。DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 值分别是 0.120 8、0.016 01 mg/mL。这可能与多糖的分子量、活性基团数量、 β 残基和糖苷键有关，还可能与单糖组成相关。另有文献报道，多糖的抗氧化性与其糖醛酸含量呈正相关性^[21]，这也与表 4 中糖醛酸含量居多的结果相吻合。此外，ASLP 中的多酚可能也与其表现出的抗氧化活性有关。

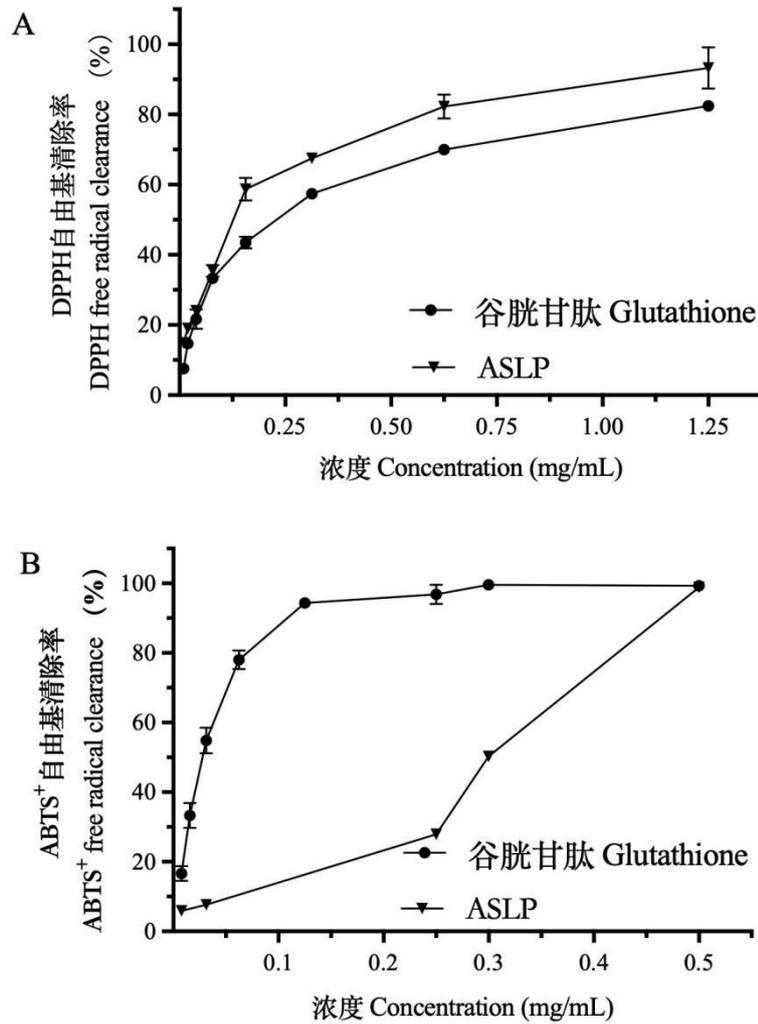


图 9 ASLP 的自由基清除率

Fig. 9 Free radical clearance of ASLP

3 结论

本研究采用响应面法优化得到的热水浸提法提取藜蒿叶粗多糖工艺为：提取温度 95 °C、提取时间 3 h、提取次数为 3 次、料液比为 1 : 30 (g/mL)，该工艺下藜蒿叶粗多糖得率为 17.23% ± 0.26%。对提取的藜蒿叶粗多糖进行脱蛋白处理后制备 ASLP 的糖醛酸含量高于中性糖含量，且其单糖组成中半乳糖醛酸比例最高，说明提取得到的 ASLP 可能为酸性多糖；从 ASLP 的分子量测定结果来看，其分子量分布范围较广，为非均一性多糖，有待进一步纯化。此外，ASLP 对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基清除率和 α -葡萄糖苷酶抑制活性的 IC₅₀ 值分别为 0.120 8、0.016 01、1.364 mg/mL，说明 ASLP 具有良好的抗氧化活性和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。可进一步分离纯化得到均一组分的 ASLP，对其进行精细结构鉴定，如糖苷键连接方式、糖苷键连接顺序、溶液构象等，探讨 ASLP 发挥生物活性的作用及其机制。

参考文献

- 1 Zeng QT,Yuan T.Secondary metabolites of endophyte *Paraconiothyrium* sp. YLHJ01 from *Artemisia selengensis*[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:781-786.
- 2 Huang XR,He CF.Advances on the chemical components and bioactive of *Artemisia selengensis* Turcz[J].Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源),2020,39:42-49.
- 3 Xiang L,Huang Y,Li R,et al.*Artemisia selengensis* Turcz leaves extract ameliorates hyperuricemia in mice by inhibiting hepatic xanthine oxidase activity,modulating renal uric acid transporters,and improving metabolic disorders[J].Food Biosci,2023,56:102639.
- 4 Kim AR,Ko HJ,Chowdhury MA,et al.Chemical constituents on the aerial parts of *Artemisia selengensis* and their IL-6 inhibitory activity[J].Arch Pharmacol Res,2015,38:1059-1065.
- 5 Xie X,Tu ZC,Wang H,et al.Antioxidant and enzyme inhibitory activities of extracts from various parts of wild and cultivated *Artemisia selengensis* Turcz[J].J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报),2020,20:58-65.
- 6 Fu M,Niu YY,Hu X,et al.Study on the components of *Artemisia selengensis* Turcz and its development and utilization[J].J Anhui Agric Sci(安徽农业科学),2008,36(07):2803-2804.
- 7 Wang J,Lu HD,Muhammad U,et al.Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Artemisia selengensis* Turcz and its antioxidant and anticancer activities[J].J Food Sci Technol,2016,53:1025-1034.
- 8 Wang J,Han JZ,Lu ZX,et al.Preliminary structure,antioxidant and immunostimulatory activities of a polysaccharide fraction from *Artemisia selengensis* Turcz[J].Int J Biol Macromol,2020,143:842-849.
- 9 Mao YW.Study on extraction technology and antioxidant activity of flavonoids and polysaccharides from *Artemisia selengensis* Turcz[D].Nanchang:Nanchang University(南昌大学),2012.
- 10 Chen Y,Xie M,Li W,et al.An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from Lingzhi(*Ganoderma atrum*)[J].Food Sci Biotechnol,2012,21:191-198.
- 11 National Health and Family Planning Commission.Determination of total saccharide in edible mushroom(食用菌中总糖含量的测定):GB/T 15672-2009[S].Beijing:Standards Press of China,2009.
- 12 Zhang YQ,Li DW,Zhi XL.Optimization of extraction of flavonoid and protein from tartary buckwheat[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:293-299.
- 13 National Health and Family Planning Commission.Food safety national standard moisture determination in food:GB 5009.3-2016(食品安全国家标准 食品中水分的测定)[S].Beijing:Standards Press of China,2016.
- 14 National Health and Family Planning Commission.National standard for food safety determination of ash in food:GB 5009.4-2016(食品安全国家标准食品中灰分的测定)[S].Beijing:Standards Press of China,2016.

- 15 Zhuang YB ,Lin MD,Zhan JH,et al.Antioxidant and inhibitory effect on nitrosation of extracts from *Pyrosia lingua*(Thunb.) Farwell[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:681-688.
- 16 Zhao JL,Zhang M,Zhou HL.Microwave-assisted extraction,purification,partial characterization,and bioactivity of polysaccharides from *Panax ginseng*[J].Molecules,2019,24:1605.
- 17 Song J,Dong QS,Hang S,et al.Optimization of ultrasonic extraction of *Lycium barbarum* polysaccharides using response surface methodology[J].J Food Eng,2020,16:63-65.
- 18 Li Q,Zeng J,Gong P,et al.Effect of steaming process on the structural characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* rhizomes[J].Glycoconjugate J,2021,38:561-572.
- 19 Yuan S,Xu CY,Xia J,et al.Extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* by fermentation with response surface methodology[J].Food Sci Nutr,2020,8:6660-6669.
- 20 Duan XY.Study on extraction purification and physiological activity of water-soluble polysaccharide from *Peonies*[D].Luoyang:Henan University of Science and Technology(河南科技大学),2022.
- 21 Yang RP,Chen RZ,Wang CX,et al.Ultrahigh pressure extraction,physicochemical characteristics and antioxidant activity of polysaccharide from red dragon fruit peel[J].J Molecular Sci(分子科学学报),2022,38:265-276.

收稿日期: 2024-04-11 接受日期:

基金项目:国家自然科学基金地区项目(32260596);江西省自然科学基金青年基金项目(20232BAB215063);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ210320);南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室开放基金资助(SKLF-KF-202204)

*通信作者 Tel: 15870026873; E-mail: qiaoding0604@163.com