DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2023.09.005

紫苏叶多糖分离纯化及体外抗氧化活性

牛新茹,朱彤彤,高志杰,韩春月,刘二伟,韩立峰,付志飞*
(天津中医药大学 组分中药国家重点实验室,天津 301617)

摘　要:通过水提醇沉法得到紫苏叶粗多糖(*Perilla frutescens* leaf polysaccharides,PFP),并用 DEAE-52 纤维素层析法对其进行分离纯化,获得 4 个多糖组分 PFP-1、PFP-2、PFP-3 和 PFP-4。PFP-1 为中性低聚糖,但总糖含量较低;PFP-2 重均分子量为 4.7 kDa,峰位分子量为 2.2 kDa,主要组成单糖为半乳糖醛酸;PFP-3 主要由两种分子量段的多糖组成,主要峰位分子量为 5.2 kDa 和 40.0 kDa,为杂多糖,所含单糖种类较多,主要含半乳糖醛酸和半乳糖;PFP-4 分子量较小,主要组成单糖为半乳糖和阿拉伯糖。体外抗氧化活性试验表明,PFP 的 DPPH 自由基清除能力、$ABTS^+$自由基清除活性和 Fe^{3+}还原能力较强,具有良好的抗氧化活性,其中组分 PFP-3 和 PFP-4 抗氧化活性与 PFP 接近,是其发挥抗氧化作用的关键组分。

关键词:紫苏叶;多糖;分离纯化;理化性质;抗氧化活性

Separation and Purification of *Perilla frutescens* Polysaccharides and Their Antioxidant Activities *in vitro*

NIU Xin-ru, ZHU Tong-tong, GAO Zhi-jie, HAN Chun-yue, LIU Er-wei, HAN Li-feng, FU Zhi-fei*
(State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Abstract: *Perilla frutescens* polysaccharides (PFP) were obtained by water extraction and alcohol precipitation. Then they were isolated and purified by DEAE-52 cellulose chromatography, and a total of four polysaccharide components PFP-1, PFP-2, PFP-3 and PFP-4 were obtained. PFP-1 was a neutral oligosaccharide, but the total sugar content was lower. PFP-2 had a molecular weight of 4.7 kDa while the peak molecular weight was 2.2 kDa, and the main monosaccharide was galacturonic acid. PFP-3 was mainly composed of two molecular weight segments of polysaccharides, with the main peak molecular weights of 5.2 kDa and 40.0 kDa, and was a heteropolysaccharide, containing many kinds of monosaccharides, mainly galacturonic acid and galactose. PFP-4 had a low molecular weight, and its main monosaccharide components were galactose and arabinose. In vitro antioxidant activity test showed that PFP had strong DPPH radical scavenging activity, $ABTS^+$ radical scavenging activity and Fe^{3+} reduction ability, and had good antioxidant activities. The antioxidant activities of components PFP-3 and PFP-4 were close to those of PFP, and they were the key components to play its antioxidant role.

Key words: *Perilla frutescens* leaf; polysaccharides; isolation and purification; physicochemical properties; antioxidant activities

引文格式:
牛新茹,朱彤彤,高志杰,等. 紫苏叶多糖分离纯化及体外抗氧化活性[J].食品研究与开发,2023, 44(9):30-35.
NIU Xinru, ZHU Tongtong, GAO Zhijie, et al. Separation and Purification of *Perilla frutescens* Polysaccharides and Their Antioxidant Activities *in vitro*[J]. Food Research and Development,2023,44(9):30-35.

基金项目:国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202009)
作者简介:牛新茹(1998—),女(汉),硕士,研究方向:中药多糖。
* 通信作者:付志飞(1986—),女(汉),助理研究员,博士,研究方向:中药多糖。

紫苏叶为唇形科一年生植物紫苏[*Perilla frutescens*(L.)Britt.]的干燥叶，被列为药食两用的中药，具有解表散寒，行气和胃的功效，可用于治疗风寒感冒、咳嗽呕恶、妊娠呕吐、鱼蟹中毒[1]。紫苏叶中含有挥发油类[2]、萜类[3]、酚酸类[4]、黄酮类[5]、多糖[6]等化学成分，具有解热镇静[7]、抗炎[8]、抗过敏[9]、降血糖[10]、降血脂[11]、抑菌[12]、抗氧化[13]、促进记忆[14]等功效。

多糖具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、增强免疫等功效[15-17]。目前关于紫苏叶多糖的提取方法[18-19]以及粗多糖的生物活性的研究较少[20-24]，关于紫苏叶多糖结构分析及抗氧化活性的研究鲜少报道。本部分旨在研究紫苏叶粗多糖及各组分的体外抗氧化活性，以期为紫苏叶多糖开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫苏叶：河北新京源药业有限公司；DEAE-52纤维素、抗坏血酸：北京索莱宝科技有限公司；葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖单糖标品：美国Sigma-Aldrich公司；普鲁兰标准品（分子量为180、6 100、22 000、47 100、194 000、337 000 Da）：美国Agilent公司；Bradford蛋白浓度测定试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒-2，2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵[2,2′-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)，ABTS]法、总抗氧化能力检测试剂盒-铁离子还原抗氧化能力测定（ferric reducing antioxidant potential assay，FRAP）法：碧云天生物科技有限公司；1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl，DPPH）（色谱纯）：阿拉丁试剂有限公司；甲醇（分析纯）、乙腈（色谱纯）：天津康科德科技有限公司；95%乙醇、二氯甲烷、硫酸钠、磷酸二氢钾（均为分析纯）：国药集团化学试剂有限公司；硫酸、盐酸（均为分析纯）：天津江天化工技术有限公司。

1.2 仪器与设备

NVC-2200旋转蒸发仪：日本东京理化器械株式会社；5427R高速离心机：德国Eppendorf公司；MX-S涡旋混合器：美国SCILOGEX公司；KQ-800DE数控超声波清洗器：昆山市超声仪器有限公司；L530离心机：湘仪离心机仪器有限公司；Cary 60 UV-Vis紫外分光光度计、Agilent HPLC 1260高效液相色谱仪：美国Agilent公司；Infinite M200酶标仪：瑞士TECAN公司。

1.3 方法

1.3.1 紫苏叶多糖的提取

紫苏叶冷冻干燥后粉碎，称取40 g紫苏叶粉末，加入15倍体积80%乙醇，80 ℃乙醇提取2 h，过滤，药渣挥干乙醇后，加入20倍蒸馏水100 ℃回流提取2 h，提取两次，合并两次滤液，提取液立即离心（25 ℃，4 000 r/min，10 min），浓缩至一定体积，加入95%乙醇至乙醇终浓度为80%，4 ℃静置24 h，沉淀用无水乙醇洗涤3次，挥干乙醇，得紫苏叶粗多糖（*Perilla frutescens* leaf polysaccharides，PFP）。

1.3.2 PFP的分离纯化

称取PFP 800 mg，用4 mL超纯水溶解，离心取上清液，经DEAE-52纤维柱层析（2.5 cm×30 cm），依次用H_2O和0.3、0.5、1.0 mol/L NaCl作为流动相洗脱，流速5 mL/min，每管收集15 mL，每个梯度洗脱3个柱体积，洗脱液经硫酸苯酚法检测，并绘制洗脱曲线，收集主要的峰，浓缩、透析、除盐（1 000 Da的透析袋），多糖溶液浓缩、冷冻干燥后得到4个组分，分别为PFP-1、PFP-2、PFP-3和PFP-4。

1.3.3 紫苏叶多糖的理化性质

1.3.3.1 总糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法检测PFP、PFP-1、PFP-2、PFP-3和PFP-4的总糖含量，以甘露糖（mannose，Man）、鼠李糖（rhamnose，Rha）、半乳糖醛酸（galacturonic acid，GalA）、葡萄糖（glucuronic acid，GlcA）、半乳糖（galacturonic，Gal）、阿拉伯糖（arabinose，Ara）和葡萄糖醛酸（glucuronic acid，GlcA）（摩尔比：1∶2∶5∶5∶4∶2∶1）混合多糖为标准品，配制一系列浓度的混和标准品溶液，各取1 mL，先后加入0.5 mL 6%苯酚溶液和2.5 mL浓硫酸，混匀，100 ℃水浴加热15 min，冷却后于490 nm处测定吸光度[21]，以多糖浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。将PFP、PFP-2和PFP-3配成浓度为125 μg/mL的水溶液，PFP-1和PFP-4配成500 μg/mL的水溶液，各取1 mL，其余方法同混和标准品溶液，检测在490 nm下的吸光度并根据标准曲线计算总糖含量。

1.3.3.2 糖醛酸含量的测定

采用硫酸咔唑法，以半乳糖醛酸为标准品测定PFP、PFP-1、PFP-2、PFP-3和PFP-4的糖醛酸含量[22]分别取浓度为200、150、100、50、25、12.5、6.25 μg/mL半乳糖醛酸标准品0.5 mL于试管中，加入3 mL四硼酸钠-硫酸溶液、0.1 mL咔唑溶液，混匀，100 ℃水浴加热15 min，冷却，于530 nm处测吸光度（每个浓度平行3次）。以蒸馏水代替对照品做空白对照。以横坐标为半乳糖醛酸浓度，纵坐标为吸光度，绘制标准曲线。将PFP、PFP-1和PFP-4配成浓度为500 μg/mL的水溶液，PFP-2和PFP-3配成62.5 μg/mL的水溶液，各取0.5 mL，测定方法同上，每个样品平行3次，根据标准曲线计算糖醛酸含量。

1.3.3.3 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法，以牛血清蛋白溶液为标准品，

测定 PFP、PFP-1、PFP-2、PFP-3 和 PFP-4 的蛋白质含量。将标准品稀释成不同浓度，取 5 μL 不同浓度蛋白标准品及样品加到 96 孔板中。各孔中加入 250 μL G250 染色液，在 595 nm 处测定吸光度，绘制标准曲线。将样品配制成不同浓度的多糖溶液，通过测定吸光度并根据标准曲线计算蛋白质含量。

1.3.3.4 分子量测定

采用高效液相凝胶渗透色谱法测定紫苏叶多糖的分子量。色谱条件：TSKgel GMPWXL 凝胶色谱柱（7.8 mm×30 cm，13 μm）；示差检测器；流动相为 0.5 mol/L Na_2SO_4 溶液；流速 0.5 mL/min；柱温为 30 ℃；进样量 10 μL；多糖样品和已知分子量的系列普鲁兰标准品；质量浓度为 5.0 mg/mL。运用 GPC 分析软件以标准品分子量的对数（lg Mw）对保留时间（Tr）作图，绘制标准曲线，根据标准曲线计算样品 Mw。

1.3.3.5 单糖组成分析

采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one，PMP）柱前衍生化高效液相色谱检测分析单糖组成[23]。称取 1.0 mg 多糖样品于安瓿瓶中，加入 2 mol/L 的三氟乙酸（trifluoroacetic acid，TFA）200 μL，封管，100 ℃下降解 5 h 加入 200 μL 甲醇，35 ℃下氮气吹干，反复至除去 TFA。样品加入 100 μL 水转移到 1.5 mL 离心管中，加入 100 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液和 120 μL 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液，混匀，70 ℃衍生化反应 90 min，冷却，加入 100 μL 0.3 mol/L HCl 中和，氯仿萃取，涡旋 30 s 后，离心，弃去下层，重复萃取 3 次，上层水相过 0.22 μm 微孔滤膜，进行高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）分析。

将各单糖标准品[甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和岩藻糖（fucose，Fuc）]以等摩尔混合成混标溶液，并稀释成系列浓度，取 100 μL 混标溶液按照样品衍生化步骤进行衍生。

HPLC 分析方法：ZORBAX Eclipse C-18 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm），流动相为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液-乙腈（83∶17，体积比），流速为 1.0 mL/min，进样量为 10 μL，检测波长为 245 nm。以对照品浓度为横坐标（x），峰面积为纵坐标（y），绘制标准曲线，计算样品中各单糖的组成比例。

1.3.4 紫苏叶多糖抗氧化活性测定

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力测定

根据文献[24]的方法稍作修改，依次配制浓度为 0.03、0.06、0.12、0.25、1.00、3.00、5.00 mg/mL 的紫苏叶多糖样品溶液。将 50 μL 不同浓度的不同样品溶液与 150 μL 现用现配的 0.10 mol/L 的 DPPH-50%甲醇溶液混合于 96 孔板中，避光反应 30 min，于 517 nm 下测量吸光度。抗坏血酸作为阳性对照，试验平行 3 次。按照公式（1）计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\%=[1-(A_1-A_2)/(A_3-A_4)]\times100 \quad (1)$$

式中：A_1 为样品和 DPPH 的吸光度；A_2 为样品和 DPPH 溶剂（50%甲醇）的吸光度；A_3 为样品溶剂（蒸馏水）和 DPPH 的吸光度；A_4 为样品溶剂（蒸馏水）和 DPPH 溶剂（50%甲醇）的吸光度。

1.3.4.2 $ABTS^+$自由基清除活性测定

根据文献[25]的方法稍作修改，依次配制浓度为 0.25、0.50、1.00、3.00、5.00、7.00 mg/mL 的紫苏叶多糖样品溶液。将 300 μL ABTS 储备液与 300 μL 2.45 mmol/L 过硫酸钾混匀，于黑暗中室温 25 ℃下反应 16 h，用磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline，PBS）稀释至 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.05，制得 ABTS 工作液。取 10 μL 不同浓度的样品溶液加入 200 μL ABTS 溶液中，于 96 孔板中避光反应 2 min~6 min，于 734 nm 处测吸光度，按照公式（2）计算 $ABTS^+$自由基清除率。抗坏血酸作为阳性对照，试验平行 3 次。

$$ABTS^+\text{自由基清除率}/\%=(A_1-A_2)/A_1\times100 \quad (2)$$

式中：A_1 为蒸馏水的吸光度；A_2 为样品的吸光度。

1.3.4.3 铁离子还原能力测定

根据文献[26]的方法稍作修改，分别配制 0.5、1.0、3.0、5.0、7.0 mg/mL 的紫苏叶多糖样品溶液。将 750 μL 2，3，5-三苯基-2h-四唑氯化物（2，3，5-triphenyl-2h-tetrazolium，chloride，TPTZ）溶液与 750 μL TPTZ 稀释液充分混合，加入 750 μL 检测缓冲液，混合均匀，得到铁离子还原能力（ferric reducing ability of plasma，FRAP）检测工作液，37 ℃孵育待用。配制 100 mmol/L 的 $FeSO_4$ 标准品溶液，并依次稀释至不同浓度。将 40 μL 不同浓度的样品及标准品溶液与 180 μL FRAP 工作液混合于 96 孔板中，在 37 ℃下反应 5 min，于 593 nm 处检测吸光度。

1.4 数据处理

试验数据采用 Excel 2019，Graphpad Prism 9 及 Origin 2018 进行统计分析及作图。

2 结果与分析

2.1 PFP 分离纯化

通过水提取乙醇沉淀法得到的紫苏叶多糖 PFP，提取率为 13%。利用 DEAE-52 纤维素柱层析法进行分离纯化，依次用 H_2O 和 0.3、0.5、1.0 mol/L NaCl 洗脱，得到洗脱曲线见图 1。

由图 1 可知，紫苏叶粗多糖经过分离纯化后主要得到 4 个主要组分 PFP-1、PFP-2、PFP-3 和 PFP-4，浓缩、透析除盐后冷冻干燥，得到紫苏叶多糖粉末，PFP-1 为黄色粉末，产率为 9.93%，PFP-2 为白色粉末，产率为 7.16%，PFP-3 为淡黄色粉末，产率为 1.43%，PFP-4 为深棕色粉末，产率为 2.54%。

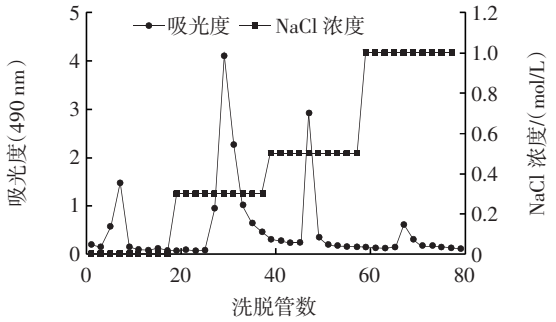

图 1 PFP 梯度洗脱曲线

Fig.1 Gradient elution curves of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

2.2 紫苏叶多糖理化性质

对 PFP 及 DEAE-52 洗脱组分进行总糖含量、糖醛酸含量和蛋白质含量检测，结果如表 1 所示。

表 1 紫苏叶多糖理化性质

Table 1 Physicochemical properties of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

样品	总糖含量/%	糖醛酸含量/%	蛋白质含量/%
PFP	56.18±2.00	48.19±0.18	3.00±0.43
PFP-1	11.06±0.40	-	0.14±0.02
PFP-2	99.68±0.01	74.55±4.89	0.34±0.10
PFP-3	95.29±0.74	30.01±1.05	1.32±0.16
PFP-4	31.79±0.17	1.15±0.22	1.11±0.21

注：-表示未检测到。

由表 1 可知，PFP、PFP-1、PFP-2、PFP-3 和 PFP-4 总糖含量分别为 56.18%、11.06%、99.68%、95.29%、31.79%，其中 0.3 mol/L 和 0.5mol/L 的 NaCl 洗脱组分总糖含量较高，且富含糖醛酸；PFP 及各组分蛋白质含量均在 5%以下，蛋白质含量较低，表示各多糖组分可不进行脱蛋白处理。

2.3 相对分子质量测定

采用高效液相凝胶渗透色谱法测定 PFP 及各组分多糖的分子量，结果如图 2 所示。

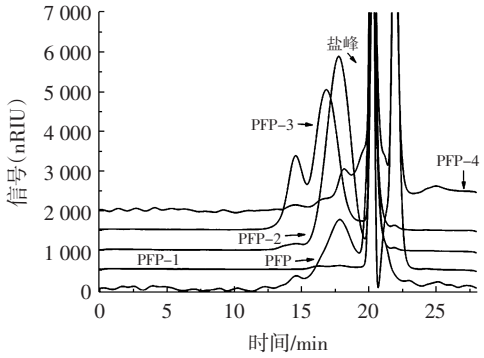

图 2 紫苏叶多糖分子量测定图谱

Fig.2 Determination of molecular weight of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

由图 2 可知，以系列已知分子量的普鲁兰为标准品，以相对分子质量的对数(lgMw，y)对保留时间(Tr，x)作图，得标准曲线方程 y=-0.390 6x+10.294，R^2 = 0.995 4。PFP 分子量分布广泛，在 495.6 Da~246.7 kDa，其中主要峰位分子量为 21.0 kDa；PFP-1 总糖含量较低，可能含有低聚糖、小分子化合物或无机盐等；PFP-2 分子量分布范围为 397.6 Da~181.9 kDa，峰位分子量为 2.2 kDa，重均分子量为 4.7 kDa，分散系数为 2.47；PFP-3 主要由两分子量段的多糖组成，分子量跨度范围为 598.0 Da~225.0 kDa，峰位分子量为 5.2 kDa 和40.0 kDa；PFP-4 分子量较小，分布为 837.3 Da~3 737.3 Da，主要峰位分子量为 1 589.8 Da。

2.4 单糖组成分析

样品色谱图与单糖混合标准品谱图对比，确定 PFP 及各组分单糖组成。标准品各单糖组分的标准曲线方程、相关系数及线性范围如表 2 所示。

表 2 各单糖组分的标准曲线方程、相关系数及线性范围

Table 2 Standard curve equation, correlation coefficient and linear range of monosaccharide components

单糖	标准曲线方程	相关系数	线性范围/(μg/mL)
Man	y=2 889.5x+44.063	0.999 6	7.04~450.39
Rha	y=2 704.1x-6.179 3	1.000 0	6.41~820.80
GlcA	y=2 637.6x-6.604 2	0.999 9	7.58~121.34
GalA	y=2 518.7x+5.375 5	0.999 9	7.58~970.70
Glc	y=2 560.2x-13.688	1.000 0	7.04~450.40
Gal	y=2 766.1x-7.749 2	0.999 9	7.04~900.80
Ara	y=3 000x-20.219	1.000 0	5.86~750.65
Fuc	y=2 759.5x-2.495 7	1.000 0	6.41~51.30

由表 2 可知，得到各单糖标准曲线相关系数均大于 0.999 5，表明测得试验数据线性良好，可用于紫苏叶多糖样品的测量。

PFP 及各组分单糖组成见表 3。

表 3 紫苏叶多糖的单糖组成

Table 3 Monosaccharide composition of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

样品	单糖组成/%							
	Man	Rha	GlcA	GalA	Glc	Gal	Ara	Fuc
PFP	4.6	6.2	2.7	32.0	15.4	25.5	12.8	0.7
PFP-1	6.3	0.0	0.0	0.0	51.3	32.1	10.3	0.0
PFP-2	1.7	7.2	1.2	65.9	0.8	11.3	10.7	1.1
PFP-3	5.8	15.7	2.9	33.1	2.3	24.7	14.5	0.9
PFP-4	4.8	5.7	5.6	8.3	14.4	34.9	23.8	2.5

注：以上数据为摩尔百分数。

由表 3 可知，PFP 主要由半乳糖醛酸、半乳糖、葡萄糖和阿拉伯糖组成，半乳糖醛酸含量最高，此外还有少量的甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸和岩藻糖。PFP-1 为中性多糖，不含糖醛酸，主要单糖及其比例分别为葡萄糖∶半乳糖= 51.3∶32.1；PFP-2 为单糖组成主要为半乳糖醛酸的酸性多糖；PFP-3 所含单糖种类较多，主要含半乳糖醛酸和半乳糖；PFP-4 主要单糖及其比例分别为半乳糖∶阿拉伯糖∶葡萄糖=34.9∶23.8∶14.4。

2.5 紫苏叶多糖的抗氧化活性测定结果

2.5.1 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基含有单电子，其醇溶液呈紫色，在 517 nm 处有强吸收。紫苏叶多糖 DPPH 自由基清除能力测定结果见图 3。

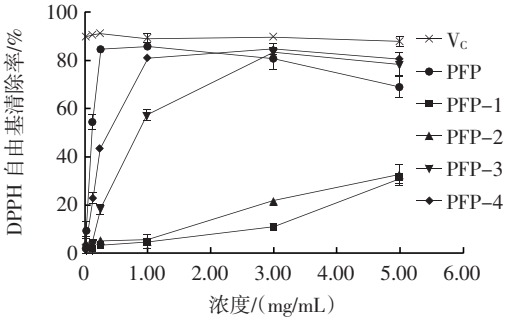

图 3 紫苏叶多糖 DPPH 自由基清除能力测定

Fig.3 Determination of DPPH scavenging ability of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

由图 3 可知，当浓度小于 1.00 mg/mL 时，PFP 的 DPPH 自由基清除率随浓度的增加而增大，但当浓度继续增大时，DPPH 自由基清除率有降低的趋势，分析可能与 PFP 浓度增大，在 DPPH 甲醇溶液中发生醇沉，导致吸光度降低有关；PFP 在较低浓度 0.25 mg/mL 时清除率达到 84.69%，与抗坏血酸（vitamin C，V_C）相当，提示 PFP 可能具有良好的抗氧化能力。DEAE-52 柱洗脱各组分多糖 DPPH 自由基清除率在一定浓度范围内，均随多糖浓度的增加而增大。中性多糖 PFP-1 和富含半乳糖醛酸PFP-2 的 DPPH 自由基清除率较低，在浓度为 5.00 mg/mL时，清除率分别为 30.84%和32.54%；而 PFP-3 和 PFP-4 的 DPPH 自由基清除能力较强，在浓度为 3.00 mg/mL 时，清除率分别为 83.17%与84.80%，与 PFP 相近。

2.5.2 $ABTS^+$自由基清除活性测定

$ABTS^+$在氧化剂作用下将被氧化成绿色的 ABTS，而当有抗氧化剂存在时，氧化过程将会被抑制，通过测定 734 nm 吸光度评价紫苏叶多糖对 $ABTS^+$自由基清除能力，其结果见图 4。

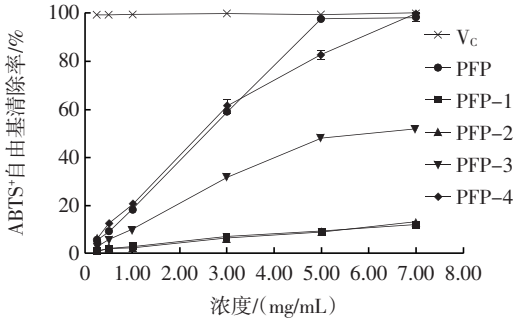

图 4 紫苏叶 $ABTS^+$自由基清除能力测定

Fig.4 Determination of $ABTS^+$ radical scavenging ability of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

由图 4 可知，在浓度为 1.00 mg/mL~7.00 mg/mL 内，PFP 及各组分的多糖 $ABTS^+$自由基清除能力均随浓度的增加而增大。PFP 在浓度为 5.00 mg/mL 时，清除率高达 98.24%，与 V_C 相当，表明紫苏叶粗多糖具有较强的 $ABTS^+$自由基清除能力。其中 PFP-4 组分多糖活性最强，PFP-3 次之，而 PFP-1 与 PFP-2 活性较弱，浓度为 7.00 mg/mL 时，清除率分别是仅有 11.95%、13.38%，趋势与 DPPH 自由基清除活性一致。

2.5.3 铁离子还原能力测定

多糖还原 Fe^{3+}-TPTZ 生成蓝色络合物 Fe^{2+}-TPTZ，通过测定其在 593 nm 下的吸光度，分析紫苏叶多糖的抗氧化活性，其结果见图 5。

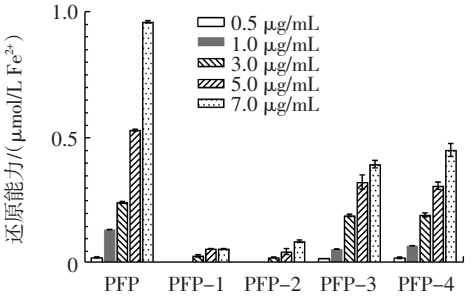

图 5 紫苏叶多糖铁离子还原能力测定

Fig.5 Determination of Fe^{3+} reduction ability of polysaccharides from *Perilla frutescens* leaf

由图 5 可知，相同浓度下，铁离子还原能力为 PFP 最佳，PFP-3 和 PFP-4 次之，PFP-1 和 PFP-2 最差，结果与 DPPH 自由基和 $ABTS^+$自由基清除活性一致。

综上，紫苏叶多糖的抗氧化能力以粗多糖最优，PFP-4 和 PFP-3 次之。多糖活性与分子量、单糖组成、空间结构等多种因素相关。紫苏叶粗多糖和 PFP-4 组分的总糖含量分别为 56.18%和 31.79%，除糖类化合物还可能含有其他化学成分，抗氧化能力可能为多种化学成分协同作用的结果。PFP-3 总糖含量较高，分子量分布范围大，且单糖种类较多，这些可能是其具有较高抗氧化能力的关键。PFP-2 组分虽然总糖含量也较高，单糖种类多样，但其分子量分布范围较窄，抗氧化活性较低。

3 结论

通过水提醇沉法得到紫苏叶粗多糖 PFP，并用 DEAE-52 纤维素层析法对其进行分离纯化，获得 4 个多糖组分 PFP-1、PFP-2、PFP-3 和 PFP-4。PFP-1 和 PFP-2 产率较高，PFP-1 总糖含量低；PFP-2 分子量分布范围为 397.6 Da 到 181.9 kDa，重均分子量为 4.7 kDa，峰位分子量为 2.2 kDa，主要组成单糖为半乳糖醛酸；PFP-3 主要由两个分子量段的多糖组成，为以半乳糖醛酸和半乳糖为主要组成单糖的杂多糖；PFP-4 分子

量较小，主要组成单糖为半乳糖和阿拉伯糖。体外抗氧化活性试验表明，PFP的DPPH自由基清除能力、$ABTS^+$自由基清除能力和Fe^{3+}还原能力较强，表示具有良好的抗氧化活性，其中组分PFP-3和PFP-4抗氧化活性与PFP接近，可能是其发挥抗氧化作用的关键组分。上述结果将为进一步研究紫苏叶多糖的构效关系和开发具有潜力的功能性食品提供参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-一部: 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
The National Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) pharmacopoeia-part I: 2020 edition[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.

[2] WEI M C, WANG C S, WEI D H, et al. Insights into the supercritical CO_2 extraction of *Perilla* oil and its theoretical solubility[J]. Processes, 2021, 9(2): 239.

[3] ZHOU P N, YIN M J, DAI S L, et al. Multi-omics analysis of the bioactive constituents biosynthesis of glandular trichome in *Perilla frutescens*[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 277.

[4] AHMED H M, TAVASZI-SAROSI S. Identification and quantification of essential oil content and composition, total polyphenols and antioxidant capacity of *Perilla frutescens* (L.) Britt[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 730-738.

[5] TAKADA-TAKATORI Y, TAKEDA Y, IMAI R, et al. Effects of 2'-3'-dihydroxy-4', 6'-dimethoxychalcone derived from green perilla on auricle thickness in chronic contact dermatitis model mice[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2019, 141(1): 17-24.

[6] LI H Z, ZHANG H J, ZHANG Z J, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides extracted from the leaves of *Perilla frutescens* [J]. Food Science and Technology, 2020, 40(1): 36-45.

[7] 何育佩, 郝二伟, 谢金玲, 等. 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3957-3968.
HE Yupei, HAO Erwei, XIE Jinling, et al. Research process on pharmacological effect and substance basis of *Perilla frutescens* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(16): 3957-3968.

[8] KANGWAN N, PINTHA K, LEKAWANVIJIT S, et al. Rosmarinic acid enriched fraction from *Perilla frutescens* leaves strongly protects indomethacin-induced gastric ulcer in rats[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 9514703.

[9] YANG H, SUN W, MA P, et al. Multiple components rapidly screened from *Perilla* leaves attenuate asthma airway inflammation by synergistic targeting on syk[J]. Journal of Inflammation Research, 2020, 13: 897-911.

[10] KIM D H, KIM S J, YU K Y, et al. Anti-hyperglycemic effects and signaling mechanism of *Perilla frutescens* sprout extract[J]. Nutrition Research and Practice, 2018, 12(1): 20.

[11] 刘学云, 于新, 何嘉敏, 等. 药食同源降血脂食品原料的研究及应用进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2019, 32(1): 65-70.
LIU Xueyun, YU Xin, HE Jiamin, et al. Research progress and application of medicine and food hypoglycemic lipid-lowering foods[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2019, 32(1): 65-70.

[12] AHMED H M, AL-ZUBAIDY A M A. Exploring natural essential oil components and antibacterial activity of solvent extracts from twelve *Perilla frutescens* L. Genotypes[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2020, 13(10): 7390-7402.

[13] WANG Z X, TU Z C, XIE X, et al. *Perilla frutescens* leaf extract and fractions: Polyphenol composition, antioxidant, enzymes (α-glucosidase, acetylcholinesterase, and tyrosinase) inhibitory, anticancer, and antidiabetic activities[J]. Foods, 2021, 10(2): 315.

[14] 王亚萍, 陈锴, 符兆英, 等. 紫苏子油对衰老小鼠记忆力和对正常小鼠镇静作用的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(7): 1544-1546.
WANG Yaping, CHEN Kai, FU Zhaoying, et al. Effects of perilla seed oil on memory and sedation in aging mice[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2016, 36(7): 1544-1546.

[15] CHEN F, HUANG G L. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 211-216.

[16] 孙广平, 袁丽, 方晓琳, 等. 紫苏叶多糖对糖尿病模型小鼠胰腺组织氧化应激及PI3K/AKT/GLUT4信号通路的影响[J]. 中国药房, 2020, 31(15): 1874-1879.
SUN Guangping, YUAN Li, FANG Xiaolin, et al. Effects of purple frutescens leaves polysaccharides on oxidative stress and PI3K/AKT/GLUT4 signaling pathway of pancreatic tissues in diabetes mellitus model mice[J]. China Pharmacy, 2020, 31(15): 1874-1879.

[17] 王文静, 刘雪梅, 张桂琴. 紫苏叶多糖通过Wnt/PCP通路对慢阻肺大鼠气道炎症反应及气道重塑的作用研究[J]. 中医药导报, 2021, 27(10): 37-41.
WANG Wenjing, LIU Xuemei, ZHANG Guiqin. Effect of *Perilla* leaf polysaccharide on airway inflammation and airway remodeling in COPD rats through Wnt/PCP pathway[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 27(10): 37-41.

[18] 张丽红, 谢三都, 沈萃. 微波技术辅助紫苏叶多糖提取工艺优化[J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 305-309.
ZHANG Lihong, XIE Sandu, SHEN Cui. Optimization of extraction technology of polysaccharide from *Perilla* leaf assisted by microwave technology[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(15): 305-309.

[19] 吕长鑫, 李萌萌, 徐晓明, 等. 响应面分析法优化纤维素酶提取紫苏多糖工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 6-10.
LU Changxin, LI Mengmeng, XU Xiaoming, et al. Optimization of enzymatic extraction conditions for crude polysaccharides from *Perilla* leaves by response surface methodology[J]. Food Science, 2013, 34(2): 6-10.

[20] 孙广平, 袁丽, 方晓琳, 等. 紫苏叶多糖改善2型糖尿病大鼠肝损伤的作用及机制研究[J]. 中药材, 2020, 43(11): 2798-2801.
SUN Guangping, YUAN Li, FANG Xiaolin, et al. Effect and mechanism of perilla leaf polysaccharide on improving liver injury in type 2 diabetic rats[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2020, 43(11): 2798-2801.

[21] ROZI P, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 97-106.

[22] YIN D F, SUN X J, LI N, et al. Structural properties and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using various methods[J]. Process Biochemistry, 2021, 111: 201-209.

[23] NIE C, ZHU P L, MA S P, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 188: 236-242.

[24] CHEN F, HUANG G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of bitter gourd polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 14-20.

[25] HUA Q Z, CHEN C B, TEL ZUR N, et al. Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 126: 117-125.

[26] ZHANG D Y, WAN Y, XU J Y, et al. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 137: 473-479.

加工编辑：刘艳美
收稿日期：2022-03-17