

杜梨叶片多糖的超声-微波协同萃取法提取

赵玉卉¹, 赵小亮²

(1.甘肃省科学院生物研究所, 兰州 730000; 2.塔里木大学新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300)

摘要: 采用超声-微波协同萃取法和常规水浴提取杜梨叶片多糖, 并用蒽酮-硫酸比色法测定多糖含量。结果表明, 超声-微波协同萃取法提取杜梨叶片多糖效果更好, 两种方法提取多糖的含量分别是21.52%和10.41%; 葡萄糖浓度在25.15~100.6 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率为100.38%, RSD为1.46%($n=5$)。超声-微波协同萃取法可作为杜梨叶片多糖提取的首选方法, 蒽酮-硫酸比色法测定多糖含量的方法准确, 重复性好。

关键词: 杜梨叶片; 多糖; 超声-微波协同萃取

中图分类号: Q 946.3; TS 201.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2008)08-0131-03

Ultrasonic- microwave synergistic extraction polysaccharide from *Pyrus betulaefolia* bge. leaf

ZHAO Yu- hui¹, ZHAO Xiao- liang²

(1.Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000; 2.Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Tarim University, Alar 843300)

Abstract: Ultrasonic- microwave synergistic and water bath were employed to extract the polysaccharide from *Pyrus betulaefolia* bge. leaf and anthrone- sulphuric acid colorimetry was used to determine its content. There exist remarkably differences between the two methods, ultrasonic - microwave synergistic extraction is the optimal method. The polysaccharide content of the two methods is 20.52% and 10.41% respectively. The linear range was 25.15~100.6 $\mu\text{g/mL}$ for glucose. The average recovery rates 100.38%(RSD 1.46%, $n=5$). The ultrasonic- microwave synergistic extraction may take the first choice method. The method of anthrone- sulphuric

收稿日期: 2007- 11- 13 * 通讯作者

基金项目: 新疆维吾尔自治区高等学校科学研究计划项目(XJEDU2005G07); 塔里木大学校长青年基金项目(TDZKQN06003)。

作者简介: 赵玉卉(1982—), 女, 甘肃民勤人, 助理工程师, 主要研究方向为食用菌遗传育种。

- Drivatives Application to A Phytosterol- Enriched Food[J]. Journal of Chromatography A,2004,1040:239- 250
- [9] Zhang X, Cambrah A, Miesch M, et al. Separation of 5 and 7- Phytosterols by Adsorption Chromatography and Semi- preparative Reversed Phase High- Performance Liquid Chromatography for Quantitative Analysis of Phytosterols in Food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54:1193- 1202
- [10] Emanuel B H, West O, Gram N J, et al. Isolation of stigmasterol[P]. US patent:2520143,1950
- [11] Chuang Y M, Ju Y H, Widjaja A. Separation of Campesterol and - Stosterol from a Sterol Mixture[J]. Separation Science and Technology,2006,41(13):3027- 3038
- [12] 许文林,黄一波,钱俊红,等.结晶法分离精制混合植物甾醇中 - 谷甾醇和豆甾醇[J].过程工程学报,2003,1(3):73- 77

acid colorimetry determine the polysaccharide content was stable and accurate.

Key words: the leaf of *Pyrus betulaefolia* Bge; polysaccharide; ultrasonic- microwave synergistic extraction

杜梨(*Pyrus betulaefolia* Bge.)属蔷薇科(Rosaceae)梨属(*Pyrus* L.)乔木,在微酸性和碱性土壤中生长良好,尤其能耐盐碱,在瘠薄和干燥土壤中也能生长。其种子发芽率高,能抗病虫害,是防护林及沙荒地造林的珍贵树种。杜梨药用称棠梨,主治功用为敛肺涩肠、止咳止痢,常用于治疗久咳、久泻、久痢等^[1]。《救荒本草》记载杜梨叶微苦,嫩叶炸熟,水洗淘净,用油、盐调拌可以食用,也可蒸晒后代茶饮^[2]。关于杜梨的研究主要集中在种子萌发与幼苗生长、幼苗根系生长状况,作为砧木嫁接梨树,杜梨叶片氨基酸及矿质元素含量测定等方面^[3-6],对于杜梨叶片多糖提取方法及含量测定方面的研究未见相关报道。

多糖通常采用热水浸提,但分子质量较大的多糖和酸性多糖在热水中溶解度较小,而采用碱水提取效率较高,可根据所选材料的不同选择合适的提取方法。另外多糖在植物体含量低,在多糖提取方面,采用合适的提取方法,不仅可以节省实验成本,更重要的是可以提高多糖提取率,研究多糖的提取方法对于整个多糖的研究至关重要。本实验采用超声-微波协同萃取和常规水浴提取杜梨叶片多糖,并用蒽酮-硫酸比色法测定多糖的含量,为杜梨资源的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料、仪器及药品

1.1 实验材料

实验用杜梨叶片于2006年4月采自新疆塔里木盆地,经鉴定为蔷薇科植物杜梨(*Pyrus betulaefolia* Bge.)的叶片,自然风干,粉碎后过40目筛备用。

1.2 实验仪器与试剂

SartoriusBS210S电子天平:北京塞多利斯天平有限公司;T6-紫外可见分光光度计:北京普析通用有限公司;DZF-6021型真空干燥箱:上海精宏实验仪器设备有限公司;CW-2000型超声-微波协同萃取仪:上海新拓微波溶样测试有限公司;RE52-99型旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂;1-15K型高速冷冻离心机:德国Sigma公司;HH-S型恒温水浴锅:江苏省金坛市医疗仪器厂;索氏提取器;其他常规玻璃仪器。

葡萄糖、蒽酮、石油醚、95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚、浓硫酸等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取与精制

2.1.1 常规水浴提取 称取过40目筛杜梨叶片干燥粉末一定量,置于索氏提取器中,加入石油醚回流提取8h,残渣室温挥干溶剂。取此干粉10g3份,分别加入蒸馏水100mL,在80℃水浴中提取30min,滤过,滤渣采用同法再提取一次,合并2次滤液及洗涤液,定容至200mL容量瓶中。所得提取液,一部分作为供试样品,用于含量测定,其余减压浓缩到约50mL,冷却后搅拌下加入4倍体积的95%乙醇,静置过夜,离心收集沉淀,沉淀经无水乙醇、丙酮及乙醚多次洗涤,60℃真空干燥,得精制杜梨叶片多糖。

2.1.2 超声-微波协同萃取法提取 按照2.1.1项下方法处理杜梨叶片,称取处理过的材料10g3份,加入蒸馏水100mL,用超声-微波协同萃取法提取,超声功率50W、频率40kHz,微波频率2450MHz,温度80℃。提取2次,所得提取液,一部分作为供试样品,用于含量测定,其余照2.1.1项下方法操作,得精制杜梨叶片多糖。

2.2 多糖含量的测定

2.2.1 蒽酮-硫酸溶液的配制 精密称取0.3007g蒽酮,缓慢加入浓硫酸完全溶解后转移至100mL棕色容量瓶中定容,得3.007mg/mL蒽酮-硫酸溶液,现配现用。

2.2.2 最大吸收波长的选择 精密吸取一定浓度的样品溶液1mL加入具塞试管,加入4.00mL蒽酮-硫酸溶液,摇匀后迅速浸于冰水浴中冷却,后浸于沸水浴中,盖上塞,自水浴重新煮沸起,准确煮沸7min后立即取出,用自来水冷却10min后于520~720nm波长范围内测定吸光度^[7],确定了其最大吸收波长为620nm。

2.2.3 标准曲线的制备 精密称取105干燥至恒质量的葡萄糖对照品100.6mg,置100mL容量瓶中,加蒸馏水溶解,定容,得1.006mg/mL葡萄糖标准溶液。分别移取2.50、5.00、7.50、10.00mL的标准溶液置于100mL容量瓶中定容。量取1mL系列标准溶液于具塞试管中,以1mL蒸馏水作空白,分别加入4mL蒽酮-硫酸溶液,立即摇匀,置于冰水浴中,冷却后一起置于沸水浴,盖上塞,自再次沸腾加热7min,之后在流水中放置10min冷至室温后,于620nm处测定吸光值^[7],以葡萄糖浓度(C)对其吸光度(A)作回归处理,得回归方程: $A=0.006C+0.0054$, $r=0.9996(n=4)$ 。葡萄糖浓度在25.15~100.60μg/mL范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.4 显色时间的考察 取 1.006 mg/mL 葡萄糖标准溶液及样品溶液按标准曲线制备项下的方法测定其吸光度,每隔 20 min 测定 1 次^[9],结果表明,标准溶液及样品溶液显色时间一致,且在 2 h 内稳定。

2.2.5 换算因子的测定 精密称取干燥恒质量的杜梨叶片多糖精制品 13.2 mg、23.4 mg 两份,置于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解定容,摇匀。精密量取 1 mL,照标准曲线的制备项下的方法操作,测定在 620 nm 处的吸光度,根据线性回归曲线方程求出质量浓度,代入下式计算换算因子^[5],求得 f 分别为 0.5200、0.5243,取其平均值 0.5222。

$$f=W/(C \cdot D)$$

式中: W 为多糖质量, mg;

C 为多糖质量浓度, mg/mL;

D 为多糖稀释因素。

2.2.6 回收率实验 精密称取处理过的杜梨叶片粉末 10 g,加入适量杜梨叶片多糖精制品及 100 mL 蒸馏水,80 ℃ 下采用超声-微波协同萃取提取 2 次,每次 30 min,合并提取液、滤液及洗涤液,定容到 200 mL,从中量取 1 mL 照 2.2.3 项下方法操作,显色,测定,计算回收率。结果平均回收率为 100.38%,RSD 为 1.46%(n=5)。

2.2.7 多糖含量的测定 精密量取 2.1 项下多糖提取液各 1 mL,照 2.2.3 项下方法操作,显色,测定。按下式计算多糖含量,多糖的质量分数见表 1。

表 1 多糖质量分数

提取方法	提取测定次数/%			平均值/%	RSD/%
	1	2	3		
超声-微波协同萃取	21.36	21.61	21.59	21.52	0.6456
常规水浴提取	10.36	10.45	10.42	10.41	0.4402

$$\text{多糖含量}(\%)=C \cdot D \cdot f / W \times 100$$

式中: C 为多糖质量浓度, mg/mL;

D 为多糖稀释因素;

f 为换算因子;

W 为样品质量, mg。

从表 1 可以看出,两种提取方法中以超声-微波协同萃取效果更好,是常规水浴提取率的 2 倍,但两种方法提取下多糖的含量均高于 10%,可见杜梨叶片多糖含量丰富。因此,选择不同的实验方法对于多糖的提取影响较大,在实验条件允许的情况下,可优先选择超声-微波协同萃取法作为多糖的提取方法。

3 讨论

传统提取多糖多采用热水浸提,也有用超声波、微波等现代技术辅助提取。本研究比较了常规水浴与超声-微波协同萃取法提取,结果表明两种方法存在

一定的差异。超声-微波协同萃取将超声振动和开放式微波两种作用方式相结合,充分利用超声振动的空化作用以及微波的高能作用,使样品介质内各点受到的作用一致,降低目标物与样品基体的结合力,加速目标物从固相进入溶剂的过程,克服了常规超声波和微波萃取的不足,实现了低温常压环境下对固体样品进行快速、高效、可靠的预处理,是近年来发展起来的新的中草药有效成分提取方法。白红进等^[9]比较了超声波、微波、恒温水浴和超声-微波协同萃取法提取黑果枸杞多糖,结果表明超声-微波协同萃取法具有节省提取时间、提高提取效率等优点,在 4 种方法中具有明显的优势。

植物多糖具有非常重要与特殊的生理活性,如免疫调节功能,降血糖、降血脂、抗炎、抗疲劳、清除自由基、抗衰老功能,抗慢性肝炎作用,增强骨髓造血机能、抗辐射、对肝肾等主要脏器的保护作用等,参与生命细胞的各种活动。本实验结果表明,杜梨叶片多糖含量高,加之杜梨叶片含有丰富的人体必需氨基酸及矿质元素,并且民间有以其作为饮品的习惯。因此,杜梨叶片有望用于食品、药品及保健品的开发。

参考文献:

- [1] 刘孟军.中国野生果树[M].北京:中国农业出版社,1999:216-217
- [2] 李时珍.本草纲目(校实本·下册)[M].北京:人民卫生出版社,2003:1766-1767
- [3] 程奇,吴翠云,阿依买木.不同处理对梨种子休眠与萌发的影响[J].塔里木大学学报,2005,17(1):28-30.
- [4] 刘润进,袁玉清,祝军.杜梨幼苗根系生长状况观察[J].莱阳农学院学报,1998,15(3):180-183
- [5] 李银芳,黄子蔚,王东.起苗时间对杜梨生长的影响[J].干旱区研究,2003,21(4):300-302
- [6] 赵小亮,邓芳,王金磊,等.杜梨叶片中氨基酸及矿质元素含量的测定[J].塔里木大学学报,2007,19(2):61-63
- [7] 张惟杰.糖复合物生化研究技术(第二版)[M].浙江:浙江大学出版社,2003:12-13
- [8] 陈木森,洪艳平,上官新晨.青钱柳多糖的提取及含量测定[J].西北农业学报,2007,16(3):192-195
- [9] 白红进,汪河滨,褚志强,等.不同方法提取黑果枸杞多糖的研究[J].食品工业科技,2007,28(3):145-146

食品科技

Http://www.e-foodtech.net

E-mail: shipinkj@vip.163.com