

沙田柚皮水溶性多糖的提取和测定

刘国聪^{1,2}, 曾楚杰¹, 刘力恒¹, 梁晓线¹

(1. 玉林师范学院化生系, 广西 玉林 537000 2. 中南大学材料科学与工程学院, 湖南 长沙 410083)

摘要: 柚皮细颗粒样品经石油醚回流脱脂、热水提取, 以葡萄糖为参照品, 利用分光光度法测定沙田柚皮中水溶性多糖的含量。葡萄糖浓度在 15.0~100.0 μg/ml 范围内与吸光度有良好的线性关系, 回归方程为: $A=0.00755X+0.07475$ ($r=0.9992$), 测出柚皮中水溶性多糖含量是 7.28%, 精密度为 0.82% ($n=3$); 对照实验的回收率为 $99.00\% \pm 1.15\%$, 精密度为 0.59% ($n=5$)。此法操作简便, 结果稳定可靠, 是柚皮及其果肉中水溶性多糖含量测定的有效方法。

关键词: 柚子; 水溶性多糖; 提取; 测定

Extraction and Determination of Water-soluble Polysaccharides from Peels of Grapefruit Planted in Sand-soil

LIU Guo-cong^{1,2}, ZENG Chu-jie¹, LIU Li-heng¹, LIANG Xiao-xian¹

(1. Department of Chemistry and Biology, Yulin Normal University, Yulin 537000, China

2. College of Material Science and Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: Water-soluble polysaccharides in grapefruit peels were extracted with hot water and deposited with ethanol after removal of its impurities by refluxing with petroleum ether. Glucose was used as reference in the preparation of calibration curve. The content of water-soluble polysaccharides determined by spectrophotometry was 7.28% with 0.82% RSD ($n=3$). Good linearity ranged from 15.0 μg/ml to 100.0 μg/ml. The linear regression equation was as follows: $A=0.00755X+0.07475$ ($r=0.9992$). Percent recovery of glucose from control experiment was $99.00\% \pm 1.15\%$ with 0.59% of RSD ($n=5$). This method was proved to be simple, reliable and steady with reproducibility and convenient in operation. It can be used for the determination of polysaccharides in peels and pulp of grapefruit.

Key words grapefruit; water-soluble polysaccharides; extraction; determination

中图分类号: 0657.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)11-0223-04

沙田柚浑身是宝, 除含有多种人体健康必需的营养成分外, 还含有多种活性成分, 如柚皮甙、多糖、柠檬苦素、酚酸、香精油等^[1-3]。目前, 对沙田柚的研究多针对其精油、生物黄酮的提取及其抗氧化性能的研究^[4-6], 而国内外有关沙田柚皮多糖的提取和测定的研究鲜见报道。多糖是以天然产物形式存在的, 大多数是以氢键等方式与其他多糖或物质聚合在一起, 它对肿瘤、肝炎、心血管、抗衰老等方面有独特的生物活性, 且细胞毒性极低^[7-8], 对沙田柚多糖的提取和性能研究颇具价值。本实验将柚皮细颗粒样品经石油醚回流脱脂后采用热水浸泡法提取沙田柚皮中的多糖, 用浓硫酸催化水解成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物而与苯酚缩合成黄色化合物, 利用分光光度法进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

市售广西容县沙田柚, 皮洗净切成黄豆粒大小, 在 40℃ 烘箱中烘干备用。

0.6000mg/ml 葡萄糖标准液(去离子水溶解 100 干燥至恒重的标样配制); 5.0% 苯酚溶液(苯酚加 Zn 粉和 NaHCO₃, 重蒸后用去离子水配制); 无水乙醇、石油醚、丙酮、甲醇、木瓜蛋白酶、浓硫酸、氯仿等均为分析纯; 实验用水为去离子水。

数显恒温水浴锅 江苏省金坛市医疗仪器厂; 2100-型可见光分光光度计 上海龙尼柯仪器有限公司; 80-2 型低速台式离心机 江苏省金坛市医疗仪器厂; BS110S 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

收稿日期: 2006-08-25

基金项目: 广西教育厅项目(2005GX05075); 玉林师范学院科研项目(2006YJYB51)

作者简介: 刘国聪(1969-), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事天然产物活性成分药用研究。

1.2 柚皮多糖的提取

取适量沙田柚皮细颗粒, 置于圆底烧瓶中, 加入石油醚, 40℃回流浸提2h, 以脱去表面脂肪, 抽滤并挥干滤渣溶剂。然后分别取定量滤渣, 以水作为溶剂, 采用不同的温度、料液比、提取时间对滤渣进行多糖的提取实验。合并滤液, 浓缩至原滤液体积的1/4, 加入体积相当于溶液体积3倍的95%乙醇, 多糖呈絮状沉淀析出, 静置24h后, 离心分离(3000~6000r/min)20min左右。用适量无水乙醇、丙酮洗涤沉淀多次, 40℃烘箱内烘干, 即得沙田柚皮粗多糖。

1.3 粗多糖的提纯

提取后的粗多糖中含有蛋白质、色素等杂质, 利用木瓜蛋白酶法除蛋白、色素并对多糖组分进行分级, 以得到多糖精品。将木瓜蛋白酶按蛋白酶:多糖=1:20加入多糖溶液中, 于70℃在恒温磁力搅拌器中保温5h, 加入多糖溶液体积1/5体积的氯仿, 再加入氯仿体积1/5的正丁醇, 混合后, 剧烈振荡20~30min, 分去水层和溶剂层交界处的变性蛋白质, 重复3次。浓缩、醇沉、洗涤、干燥得脱蛋白的多糖。

1.4 多糖的测定

准确移取0.6000mg/ml的葡萄糖标准溶液1.5、2.5、3.5、4.5、5.5ml, 分别转移到50ml容量瓶中定容、摇匀得系列对照品溶液。准确移取上述溶液2.0ml, 置于10ml具塞试管中, 加入4.0%苯酚溶液1.0ml、浓硫酸4.0ml摇匀, 沸水浴保温15min后放入冷水中冷却。以试剂空白为参比, 选用5mm比色皿在最大吸收波长490nm处测定其吸光度, 得标准曲线。量取纯化后的定量样品, 加4.0ml无水乙醇, 离心分离, 取沉淀, 加蒸馏水溶解后转移至50ml容量瓶中定容。准确移取2.0ml于10ml具塞试管中后按上述方法操作, 并根据标准曲线计算总糖含量。

2 结果与分析

2.1 最佳波长的选择

分别吸取一定量的葡萄糖标准溶液和样品溶液, 按照1.4方法操作, 进行波长扫描实验。结果发现: 波长在490nm附近吸收最大, 故选择490nm为吸光度测定波长(见图1所示)。

2.2 标准曲线的制作

根据上述选定的最佳实验条件绘制标准曲线(如图2)。总糖量(x)在15~100.0μg/ml范围内与吸光度(A)呈良好的线性关系。用最小二乘法进行回归, 得标准曲线方程为: $A=0.00755x+0.07475$, 线性相关系数 $R=0.9992$ 。

2.3 提取工艺条件优化

2.3.1 时间对多糖提取率的影响

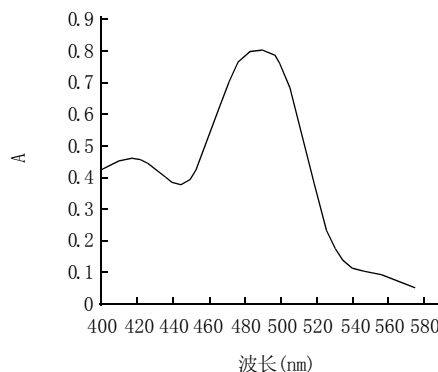


图1 标准溶液显色后的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of standard solution

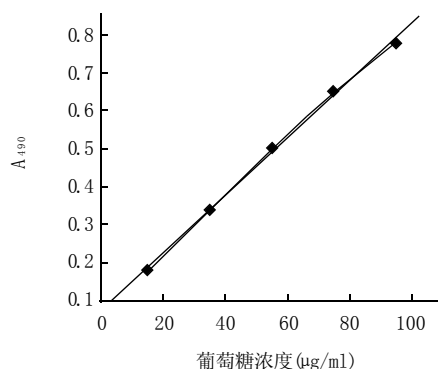


图2 葡萄糖标准曲线

Fig.2 Standard curve of glucose

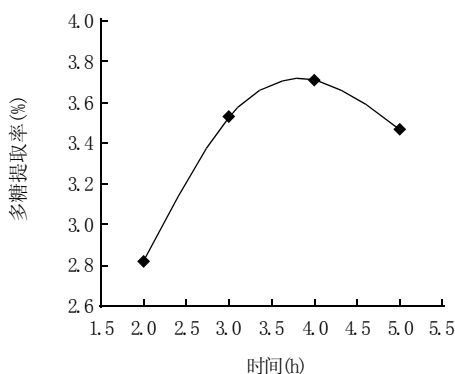


图3 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.3 Polysaccharides yield affected by extraction time

由图3可知, 提取时间为3、4h时多糖的浸出率显著高于提取2h, 这可能是由于在一定时间内提取的时间越长, 多糖溶解于热水中就更充分。在3h到4h之间, 多糖的浸出率差异不大。而在5h时多糖提取率反而下降, 这可能是加热时间过长导致多糖发生部分水解。故最佳提取时间为3h。

2.3.2 温度对多糖提取率的影响

图4表明: 随着温度的增加, 多糖提取率也增加。这一现象可能是由于温度升高使溶解度增大所造成的。

提取温度在 90℃ 和 100℃ 之间, 多糖的提取率基本相同, 而在 70、80、90℃ 时多糖的提取率之间差别较大。虽然温度越高, 多糖的提取率越高, 但高温长时间热水浸泡回流提取会对多糖的结构和生理活性有一定的影响, 因此宜选择 90℃ 来提取多糖。

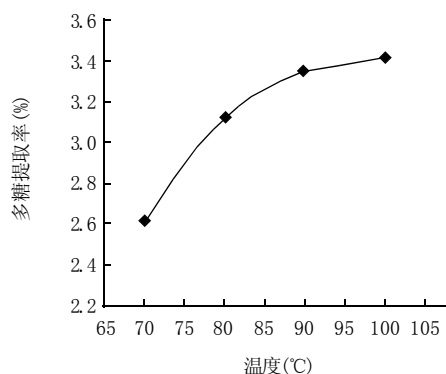


图4 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.4 Polysaccharides yield affected by extraction temperature

2.3.3 料液比对多糖提取率的影响

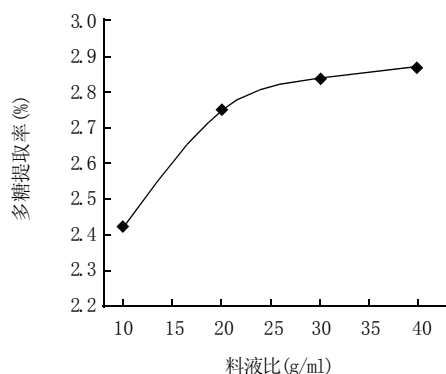


图5 料液比对多糖提取率的影响

Fig.5 Polysaccharides yield affected by ratio of material weight to solvent volume

由图5分析可知, 料液比为 1:10 时的多糖提取率与 1:20、1:30、1:40 之间差别较大, 即随着料液比的增加, 多糖提取率也增加。而料液比为 1:20、1:30、1:40 之间差别不大, 且料液比达 1:30 时的多糖提取率增加不明显, 料液比为 1:30 与 1:40 时, 两者的数值基本持平。这种现象的产生是由于在相同溶解度状态下, 随着溶剂量的增加, 溶质的溶解量也增加, 但在此溶解度下, 当多糖已基本全部溶解, 此时溶剂中溶质的量已基本恒定, 再增加溶剂的量也不会使溶剂中溶质的量增加。由于提取液在后续工序中需经浓缩, 若初期加水量过大会使后续工序能耗增加, 效率降低, 因此宜选取料液比为 1:20。

2.4 稳定性实验

用一定量的葡萄糖标准液按照实验方法测定吸光度, 周期是 30min/次, 连续 3h 考察其稳定性, 结果见表 1。实验结果说明: 显色反应结束冷却至室温 (高于 20℃) 时, 吸光度在 3h 内保持稳定, 其 RSD 为 0.59%。

表1 稳定性实验结果
Table 1 Results of stability test

时间(min)	0	30	60	90	120	150	180	RSD (%)
吸光度	0.501	0.512	0.511	0.513	0.509	0.514	0.511	0.59

2.5 标准对照品的回收率和精密度

平行配制 5 个葡萄糖标准样品。按照前述方法测定其吸光度, 计算回收率和精密度见表 2。回收率为 99.00% ± 1.15%, 相对标准偏差(RSD)是 0.594%。

表2 对照品的回收率和精密度
Table 2 Recovery and RSD of glucose in check test

编号	加入量 X ₂ (μg/ml)	吸光度 A	测出量 X ₁ (μg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	20.125	0.226	19.98	99.28	99.30	0.594
2	35.256	0.343	35.30	100.15		
3	50.585	0.456	50.48	99.79		
4	70.850	0.607	70.45	99.44		
5	80.96	0.687	79.22	97.85		

2.6 多糖含量测定

分别称取不同质量的干燥柚皮细颗粒和果肉, 按照上述优化条件操作提取和纯化, 再按 1.4 步骤进行测定, 并依据标准曲线计算出水溶性多糖含量, 结果见表 3。三次测定的结果说明: 柚皮多糖的平均产率是 7.28%, 相对平均偏差是 0.82%; 柚肉多糖的平均产率却高达 21.24%, 相对平均偏差为 0.56%。

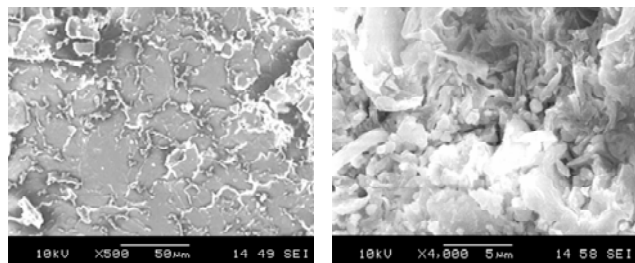
表3 柚皮和柚肉中多糖含量测定结果
Table 3 Determination results of polysaccharides in grapefruit peel and pulp

编号	样品量 (g)	吸光度	检出量 X (μg/ml)	多糖产率 (%)	平均产率 (%)	RSD (%)
柚皮	1 25	0.213	18.25	7.28	7.28	0.82
	2 50	0.343	35.48	7.31		
	3 100	0.471	52.49	7.25		
柚肉	4 10	0.337	34.68	21.23	21.24	0.56
	5 20	0.589	68.12	21.30		
	6 30	0.827	99.57	21.19		

2.7 柚皮提取前后的微观表征

在总多糖提取过程中, 对提取前后的柚皮细胞组织结构变化进行了微观表征和分析。图 6(A) 是未经处理的柚皮组织结构的 SEM, 而图 6(B) 是经 3h 回流提取后的柚皮组织结构的 SEM。图中显示未处理过的样品组织细胞呈密闭状态, 表面比较粗糙但有一定的排布规则。而

回流提取 3h 后的样品组织细胞已呈完全扩张状态促使有效成分快速溶出。由于温度和溶剂作用而使组织细胞发生剧烈形变,许多细胞壁已经完全破碎并已无法辨认,有效成分已经完全析出。



A. 未处理过的样品

B. 回流提取3h后的样品

图6 样品的SEM
Fig.6 SEM of specimen

3 结 论

3.1 经过石油醚 40℃回流浸提 2h 脱脂,以热水浸泡回流、抽滤、浓缩、95% 乙醇洗涤得呈絮状沉淀状多糖,静置、离心分离、分别用无水乙醇、丙酮洗涤沉淀多次、烘干即得柚皮粗多糖。其最佳工艺条件是:90℃下热水对料液比为 1:20 的样品浸泡回流 3h。

3.2 对粗多糖进行除蛋白、色素处理后,以葡萄糖为对照品,利用苯酚-硫酸法的原理采取分光光度法测定总多糖含量。实验结果表明:糖含量在 15~100.0 μg/ml 范围内与吸光度(A)呈良好的线性关系,其标准曲线方程为: $A=0.00755x+0.07475$,线性相关系数 $R=0.9992$ 。

3.3 柚皮多糖的平均产率是 7.28%,相对平均偏差是

0.82%;柚肉多糖的平均产率却高达 21.24%,相对平均偏差为 0.56%。

3.4 柚皮细胞组织的微观表征说明经过石油醚脱脂-热水浸泡回流 3h 有助于细胞壁破碎并有利于多糖等活性成分溶出完全。实验所得工艺为沙田柚及其皮的广泛药用提供了参考。

参考文献:

- [1] QIN C G, HUANG K X, XU H B. Isolation and characterization of a novel polysaccharides from the mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Carbohydrate Polymer, 2002, 49: 367-371.
- [2] OOSTERVELD A, HARMSSEN J S, VORAGEN A G J, et al. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted coffee arabica bean[J]. Carbohydrate Polymer, 2003, 53: 285-296.
- [3] YAMAGUCHI F, OTA Y, HATANAKA C. Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean okara and enzymatic analysis of their structures[J]. Carbohydrate Polymer, 1996, 30: 265-273.
- [4] HROMADKOU Z, EBRINGEROVA A, VALACHOVIC P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2002(9): 37-44.
- [5] DZYGIEL P, WIECZOREK P. Extraction of amino acids with emulsion liquid membranes using industrial surfactants and lecithin as stabilizers[J]. Journal of Membrane Science, 2000, 172: 223-232.
- [6] QIN C G, ZHOU J, ZHAO W, et al. Effects of the loach polysaccharide on removal of reactive oxygen species and protection of DNA chains[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2001, 33: 215-218.
- [7] HO C Y, LO T W C, LEUNG K N. The immunostimulating activities of antitumor polysaccharide from KI capsular (polysaccharide) antigen isolated from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Immunopharmacology, 2000, 46: 1-13.
- [8] LU R, YOSHIDA T, NAKASHIMA H. Specific biological activities of Chinese iacquer polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymer, 2000, 43: 47-54.



德国科学家发现:细菌也能够感应地球磁场

我们知道一些动物会利用地球磁场来导航,从而不至于迷路,然而德国科学家近日发现了一种细菌也能感应地球磁场,而且这种细菌在磁场中的身体行动方向就像是一个罗盘针。

德国麦斯宾克海洋微生物学院的研究人员目前还不清楚这种细菌的身体方向为何会被磁场控制,但研究人员使用先进的分子-基因和成像处理技术确定了一种能创建磁小体链的蛋白质。

据悉,这种可感应地球磁场的细菌生活在海洋环境下的淤泥中,分布很广泛。研究人员称,这种细菌在细胞内部会形成磁小体,而一种蛋白质负责按骨骼架构将磁小体连成一个链状,细菌就使用它们来分辨地球磁场的南极和北极,并引导自己有效地找到最理想的生长条件。

磁小体是由细小的晶状磁铁矿物质形成的颗粒,大小只有 50 纳米。如果细胞要建造磁小体,它不仅需要从周边环境获取大量的铁,从而制造特别的铁氧化物,而且形成的晶状体有特定的数量、形状和尺寸,主要是为了有效地感应磁场。另外,要取得完美的感应效果,细胞内部的磁小体还要排成一条线状的链,以增加磁场感应能力。

德国研究人员称,可能是因为这种链状细构,磁小体才会像一个罗盘针一样行动,但目前他们还不清楚这种磁小体链是如何形成的。