

超声辅助提取大枣多糖及柱前衍生高效液相分析

姚瑞祺^a, 刘海英^b, 牛鹏飞^a, 仇农学^a

(陕西师范大学 a 食品工程系, b 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

[摘要] 为了探讨大枣多糖的超声波辅助提取最佳工艺条件及其单糖组成,研究了超声波频率、液料比、提取时间和提取温度对大枣多糖提取率的影响,以正交试验优化了超声波辅助提取的工艺条件;并采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行柱前衍生,反向高效液相色谱法(HPLC)紫外检测了单糖组分。结果表明,超声辅助提取大枣多糖的最佳工艺条件为:超声波频率 28 kHz、料液比 1 g : 10 mL、提取时间 2.5 h、提取温度 70 ℃,在此条件下提取率可达 7.51%;提取的大枣多糖包括 L-鼠李糖、D-果糖、葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖等 5 种单糖,D-甘露糖未检出。提示本试验确定的大枣多糖最佳工艺条件可行;PMP 柱前衍生 HPLC 分析实现了糖类物质的良好分离,可作为大枣多糖结构分析的新方法。

[关键词] 大枣多糖;超声波提取;PMP;高效液相色谱

[中图分类号] TS245; O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0162-05

Ultrasonic-assisted extraction of jujube polysaccharide and analysis in HPLC after derivatization

YAO Rui-qi^a, LIU Hai-ying^b, NIU Peng-fei^a, QIU Nong-xue^a

(a Department of Food Engineering, b College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: In order to research the optimal ultrasonic-assisted extraction condition of jujube polysaccharide and its monosaccharide composition, the paper studies four factors of the jujube polysaccharide yield, including the ultrasonic frequency, proportion of raw material and water, extraction time and extraction temperature. Through orthogonal test, the best extraction condition is determined. After derivatization of saccharides by PMP, the monosaccharide composition of jujube polysaccharide is analyzed by HPLC using UV detection. The result shows the best extraction condition is 28 kHz for ultrasonic frequency, 1 g : 10 mL for proportion of raw material and water, 2.5 h for extraction time, 70 ℃ for extraction temperature, under which polysaccharide yield can reach 7.51%. Its monosaccharide composition consists of L-rhamnose, D-fructose, glucose, D-galactose, and L-arabia, while D-mannose is not detected. So the extraction condition of jujube polysaccharide is feasible; derivatization of saccharides by PMP can segregate saccharides very well, so it can be a new method to analyze the texture of jujube polysaccharide.

Key words: jujube polysaccharide; ultrasonic-assisted extraction; PMP; HPLC

大枣是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物枣树(*Ziziphus Jujuba* Mill)的果实,具有养肝护肝、养血补气、抗过敏、抗疲劳、抗癌养颜及防治心血管疾

病的作用^[1],《中华人民共和国药典》将其列为常用中药品种,属药食同源植物产品。大枣多糖是由多种单糖聚合而成的高分子聚合物,是大枣中补气生

* [收稿日期] 2006-11-14

[基金项目] 姚瑞祺(1983—),男,陕西吴堡人,在读硕士,主要从事食品质量过程控制研究。

[作者简介] 仇农学(1945—),男,陕西富平人,教授,博士生导师,主要从事食品分离技术研究。

血的主要活性成分。有研究表明,大枣多糖具有明显的抗补体活性和促进淋巴细胞增殖的功能,对提高机体免疫力具有重要作用,对免疫器官的萎缩也具有很好的拮抗作用^[2-3],可广泛应用于医药、保健品及功能食品,尤其是作为绿色生物医药产品,具有广阔的市场前景和应用价值^[4]。

大枣多糖的提取多采用传统的热热水浸提法,但该方法耗时长、提取率低。超声波辅助提取是一种有效的新型提取方法,其空化作用可破坏植物细胞壁和细胞膜结构,有助于细胞内容物的渗出^[5],从而提高多糖提取率。多糖的单糖组成测定是控制多糖质量标准 and 提供多糖结构基本信息的最重要环节。示差折光检测高效液相色谱(HPLC)法检测植物多糖已屡见报道^[6-7],而较少有人涉及更高灵敏度的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生紫外检测法。PMP 能与还原性糖在温和条件下反应,不需要酸催化,也不会产生脱唾液酸基,产物无立体异构体,且在 250 nm 波长处有强吸收^[8],可弥补糖类物质在紫外光区无吸收的缺陷。

本研究探讨了不同频率的超声波对大枣多糖提取率的影响,通过正交试验确定了超声波辅助提取大枣多糖的最佳工艺条件;并采用 PMP 进行柱前衍生,紫外检测 HPLC 法分析了大枣多糖中单糖的组分及比例,以探索大枣多糖结构分析的新方法。

1 材料与方 法

1.1 原料与试剂

大枣,产自陕西清涧县。

单糖对照品:葡萄糖由天津市泰兴试剂厂生产,L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-半乳糖、D-果糖、D-甘露糖由国药集团化学试剂有限公司生产。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)由国药集团化学试剂有限公司生产,乙腈和甲醇为色谱纯(Fisher),苯酚、浓硫酸、活性炭、三氯甲烷、正丁醇、浓盐酸、NaOH、石油醚、无水乙醇、磷酸二氢钾均为分析纯,水为二次蒸馏水。

1.2 仪器与设备

DIONEX P680 型高效液相色谱系统包括 P680A 高压泵、UVD 170U 紫外检测器和 DIONEX Chromeleon 工作站,C₁₈柱(200 mm×4.6 mm)由大连科瑞公司出品,KQ-250DB 型、KQ-200KDE 型和 KQ-200VDE 型三频数控超声波清洗器为昆山市超声仪器有限公司产品,SHB-III 型循环水式多用真空泵为郑州长城科工贸有限公司产品,RE-52AA 型旋

转蒸发器为上海亚荣生化仪器厂产品,LXJ-II 型离心沉淀机为上海医用分析仪器厂产品,FB-10T 型过滤瓶为 Automatic Science(TIAN JIN) instrument. Co. LTD 产品,JA1203 型电子天平由上海精科天平厂生产,WFJ2000 型可见分光光度计为尤尼卡(上海)仪器有限公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程 大枣→清洗→去核→干燥→粉碎→超声浸提→过滤→浓缩→醇沉→脱脂→Sevage 法去蛋白→脱色→过滤→有机溶剂干燥→精制多糖→水解→PMP 衍生→HPLC 分析。

1.3.2 多糖提取 (1)标准曲线制作。精密吸取葡萄糖供试液 0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 和 1.2 mL,分别置于 10 mL 比色管中,以水补至 2.0 mL,然后加入 50 mg/L 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL 混匀,40 ℃ 水浴 30 min,取出放置 10 min,以加入葡萄糖供试液 0.0 mL 组为试剂空白,于波长 490 nm 处测定吸光度,以吸光度 *A* 为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标绘制标准曲线。

(2)换算因子的测定。准确称取干燥至恒重的精制大枣多糖 20.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,定容,得精制多糖样品水溶液,质量浓度为 0.20 mg/mL。准确吸取该多糖溶液 1.0 mL,以水补至 2.0 mL,加入 50 mg/L 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL 混匀,40 ℃ 水浴 30 min,室温放置 10 min,490 nm 处测定吸光度,由标准曲线所得的回归方程计算溶液中的葡萄糖含量 *C*,按下式计算换算因子(*f*),即:

$$f = m / (C \cdot D) \quad (1)$$

式中:*m* 为称取的精制多糖质量(mg),*C* 为称取的多糖中葡萄糖的含量(mg),*D* 为多糖的稀释倍数(此处 *D* 为 2×100=200)。

(3)多糖含量的测定。准确吸取大枣多糖提取液 2 mL,加入 50 mg/L 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL 混匀,40 ℃ 水浴 30 min,取出放置 10 min,490 nm 处测定吸光度,由标准曲线所得的回归方程计算提取液中的葡萄糖含量 *C*,按下式计算大枣多糖的含量:

$$\text{多糖含量}/\% = CDf/m \times 100\% \quad (2)$$

式中:*C* 为大枣多糖中的葡萄糖含量(mg),*D* 为多糖的稀释倍数,*f* 为换算因子,*m* 为称取的大枣粉质量(mg)。

(4)超声辅助提取正交试验设计。以提取温度、

料液比、提取时间、超声波频率为正交试验的因素,设计4因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,探讨提取温度、料液比、提取时间、超声波频率对大枣多糖提取率的

影响,确定最佳提取条件。正交试验设计的因素及其水平见表1。

表1 大枣多糖超声辅助提取正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test in the ultrasonic-assisted extraction of Jujube polysaccharide

水平 Level	因素 Factor			
	提取温度/℃ Extraction temperature	料液比/(g:mL) Proportion of raw material and water	提取时间/h Extraction time	超声波频率/kHz Ultrasonic frequency
	A	B	C	D
I	50	1:8	1.5	28
II	60	1:10	2.0	40
III	70	1:12	2.5	60

(5)无超声辅助提取大枣多糖。在相同温度、料液比、时间但无超声辅助的条件下提取大枣多糖,以比较超声辅助提取与无超声辅助提取对大枣多糖提取率的影响。

1.3.3 柱前衍生高效液相分析 (1)多糖水解。准确称取精制大枣多糖 20.0 mg,加 2 mol/L H_2SO_4 于安瓿中,封管后于 110 ℃烘箱中水解 8 h,得水解样品液。冷却至室温,NaOH 液中中和至 pH=7,0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液用于 PMP 衍生化。

(2)混合糖标准溶液的配制。分别配制 2 mmol/L 的 6 种标准单糖溶液,再各取相同体积的 6 种单糖溶液混合摇匀,即为混合糖标准溶液。

(3)柱前衍生^[9-11]。PMP 使用前用色谱纯甲醇重结晶 2 次。取各种标准单糖溶液、混合糖标准溶液及大枣多糖水解液各 100 μL 于不同的试管中,依次加入 50 μL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液和 0.3 mol/L NaOH 溶液,混匀,70 ℃水浴反应 30 min,取出冷却 10 min,用 50 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和,加入 1 mL 氯仿萃取,充分振荡离心,用细针头吸弃下层,重复 3 次。合并上层水相,加 100 μL 水稀释,混匀,以备液相分析。

(4)色谱条件。采用 DIONEX P680 色谱系统和大连科瑞 C_{18} 柱(200 mm×4.6 mm),检测波长 250 nm,柱温为室温,流速 1.0 mL/min;流动相为乙腈+0.05 mol/L 磷酸缓冲液(KH_2PO_4 -NaOH, pH6.9);梯度模式:时间梯度为 0→10→30 min,相应浓度梯度为体积分数 0→18%→30%的乙腈;进样体积 20 μL 。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线制作

试验测得的葡萄糖标准曲线如图 1 所示。由图 1 可见,葡萄糖含量(C)为 10.8~64.8 $\mu g/mL$,与吸光度(A)呈良好的线性关系,回归方程为: $A =$

$$0.014 1C + 0.004 5, R^2 = 0.999 4.$$

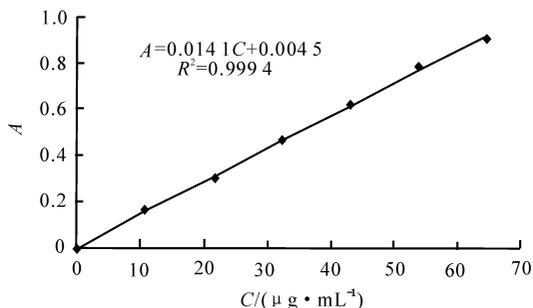


图1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curves of glucose

2.2 换算因子的确定

根据公式(1)计算得到: $f = 4.505$ 。

2.3 大枣多糖超声辅助提取正交试验结果

由正交试验和极差分析可知,影响大枣多糖提取率的因素依次是液料比>超声频率>时间>温度。通过正交试验所获得的优化提取工艺条件为:料液比=1 g:10 mL,超声波频率 28 kHz,提取时间 2.5 h,提取温度 70 ℃,此条件下大枣多糖得率可达 7.51%。在与该优化条件相同的提取温度、料液比、提取时间但无超声辅助的条件下,大枣多糖提取率为 5.05%,超声波辅助提取较无超声波辅助的提取率提高了 48.7%。

2.4 混合标准单糖衍生液与大枣多糖水解后衍生液的 HPLC 分析

本试验对混合标准单糖的衍生液进行了分离,分析结果见图 2。对混合标准单糖衍生液色谱分离图与单个标准单糖衍生液色谱分离图进行对照分析可知,图 2 中 1~7 依次为 PMP、D-甘露糖、L-鼠李糖、葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖和 L-阿拉伯糖。从图 2 可以得出,6 种单糖全部达到了基线分离,分离效果良好,PMP 出现的峰并没有影响单糖的分离。

大枣多糖水解后的衍生液色谱分离图如图 3 所示。对照图 2 和图 3 可知,大枣多糖用 H_2SO_4 水解

后,其单糖组成包括 L-鼠李糖、D-果糖、葡萄糖、D-半乳糖和 L-阿拉伯糖等 5 种单糖,D-甘露糖未检出。由峰面积归一化计算可知,L-鼠李糖、D-果糖、

葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖 5 种单糖的物质的量之比为 3.49 : 86.36 : 1.32 : 5.24 : 3.58。

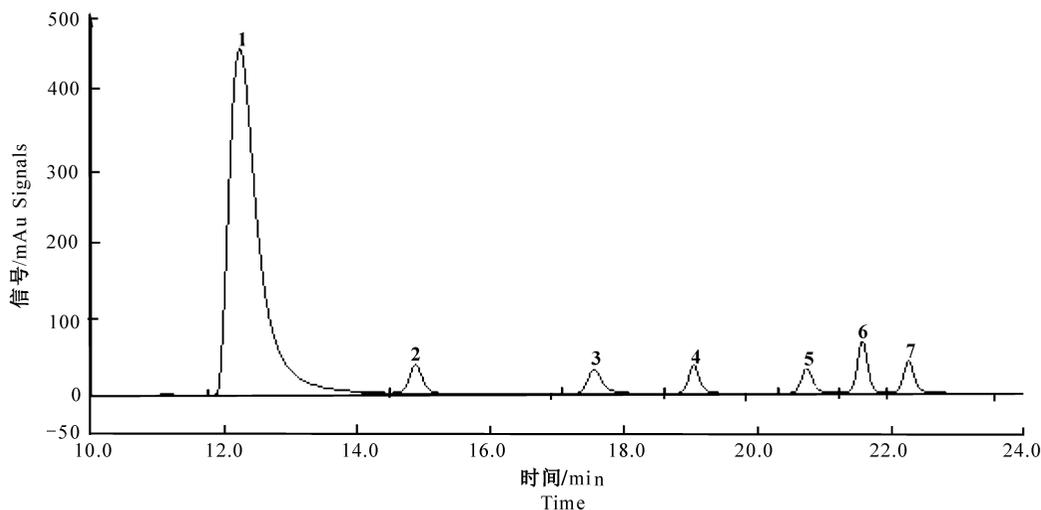


图 2 混合标准单糖衍生液的色谱分离图

1. PMP; 2. D-甘露糖; 3. L-鼠李糖; 4. 葡萄糖; 5. D-果糖; 6. D-半乳糖; 7. L-阿拉伯糖

Fig. 2 HPLC separation of the PMP derivatives of standard monosaccharide

1. PMP; 2. D-mannose; 3. L-rhamnose; 4. Glucose; 5. D-fructose; 6. D-galactose; 7. L-arabia

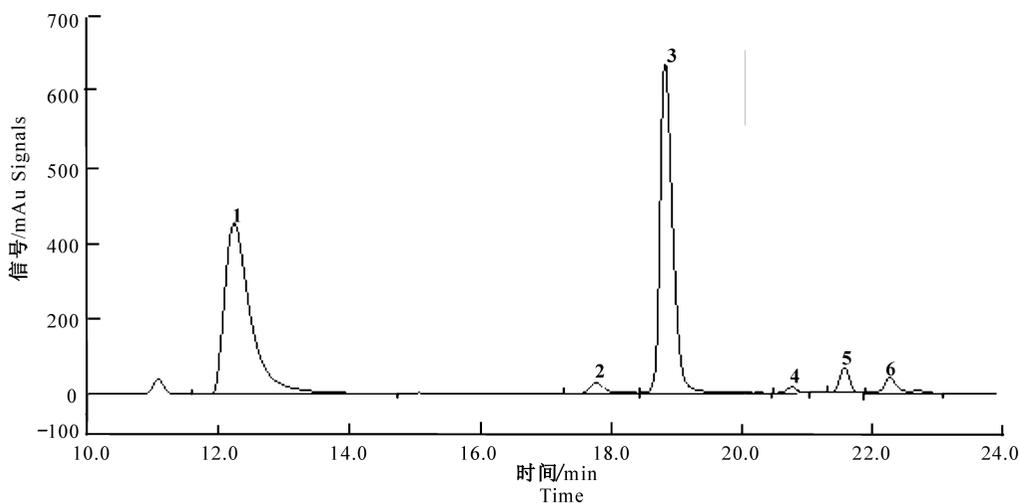


图 3 大枣多糖水解后的衍生液色谱分离图

1. PMP; 2. L-鼠李糖; 3. 葡萄糖; 4. D-果糖; 5. D-半乳糖; 6. L-阿拉伯糖

Fig. 3 HPLC separation of the PMP derivatives of hydrolysates of Jujube polysaccharide

1. PMP; 2. L-rhamnose; 3. Glucose; 4. D-fructose; 5. D-galactose; 6. L-arabia

3 结论

1) 超声波辅助提取大枣多糖的最佳工艺条件为料液比 1 g : 10 mL, 超声波频率 28 kHz, 提取时间 2.5 h, 提取温度 70 °C, 大枣多糖提取率可达 7.51%。在与该优化条件相同的提取温度、料液比、提取时间但无超声辅助的条件下, 大枣多糖提取率为 5.05%, 超声波辅助提取较无超声辅助的提取

率提高了 48.7%。

2) 大枣多糖用 H₂SO₄ 水解后, HPLC 法检测其单糖组成包括 L-鼠李糖、D-果糖、葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖等 5 种单糖; 由峰面积归一化计算确定, 这 5 种单糖的的物质的量之比为 3.49 : 86.36 : 1.32 : 5.24 : 3.58。

3) 多糖水解样品的制备, 通常要经历复杂的干燥过程方可进行下一步的衍生化。本样品制备方法

省略干燥过程,而将多糖水解液直接用 NaOH 中和(约中性),中和溶液直接可进行 PMP 衍生化。该制备方法的特点是:简化工艺、避免干燥损失;该多糖水解样品制备过程对多糖的组成测定无影响。

4)理论上讲,单糖 PMP 衍生化方法应将衍生化后的溶液用氯仿萃取,萃取后的水层溶液进行干燥,其目的是挥弃 PMP 残留衍生化试剂,纯化单糖衍生物样品,减少杂质对 HPLC 分离效果的影响。本试验结果表明,在本色谱分离条件下,PMP 溶剂峰出峰时间明显超前于单糖衍生物峰,所以单糖 PMP 衍生物的干燥过程对分析结果无影响,故本试验省去此干燥过程,以简化试验操作步骤。

[参考文献]

[1] 王爱蓉. 红枣的营养与药用价值[J]. 科技情报开发与经济, 2005,15(23):143-144.
[2] 韩兵兵,李鹏飞,赵国燕,等. 超声强化提取大枣多糖的研究[J]. 科技研究,2005(3):53-55.
[3] 苗明三. 大枣多糖对小鼠气血双虚模型胸腺及脾脏组织的影响[J]. 中国临床康复,2004,8(27):5894-5895.

[4] 李宏燕,樊君. 大枣多糖的水提醇沉工艺研究[J]. 宁夏工程技术,2005,4(3):265-267.
[5] 高娟娟,梁安慧,阳敏,等. 超声波对杏鲍菇多糖提取率影响试验[J]. 食用菌,2005(6):49-50.
[6] 林勤保,高大维,于淑娟,等. 大枣多糖单糖组成的高效液相色谱法研究[J]. 郑州粮食学院学报,1998,19(3):57-82.
[7] 汤丽芬,吴珏琦,陈红英,等. 高效液相色谱法测定食品中五种糖的含量[J]. 华南预防医学,2002,28(3):40-41.
[8] 徐瑾,张凌怡,张庆合,等. 单糖的柱前衍生化高效液相色谱及胶束电动毛细管色谱分析的对比研究[J]. 色谱,2003,21(4):363-366.
[9] 马定远,陈君,李萍,等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖组成[J]. 分析化学研究简报,2002,30(6):702-705.
[10] James J P, Jeffrey J G. Oligosaccharide characterization and quantitation using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 248(1):63-75.
[11] Fu H J, Huang X D, Jin W H, et al. The separation of biomolecules using capillary electrochromatography[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(1):96-100.

(上接第 161 页)

[10] Soral-Smietana M, Fornal L, Fornal J, et al. Characteristics of buckwheat grain starch and the effect of hydrothermal processing upon its chemical composition, properties and structure [J]. Starch, 1984, 36: 153-158.
[11] Acquistucci R, Fornal J. Italian buckwheat starch physicochemical and functional characterization and *in vitro* digestibility[J]. Starch, 1997, 49: 281-287.
[12] Li W, Lin R, Corke H. Physicochemical properties of common and tartary buckwheat starch[J]. Cereal Chemistry, 1997, 74: 79-82.
[13] Lorenz K, Dilsaver W, Collins F. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) starch physical-chemical properties and functional characteristics[J]. Starch, 1982, 34: 217-220.
[14] Qian J, Rayas-Duarte P, Grant L. Partial characterization of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) starch [J]. Cereal Chemistry, 1998, 75: 365-373.
[15] Takanori K, Naoaki I, Sachiko I, et al. A preliminary study on structural change on degradation of starch granules in tartary

buckwheat[J]. Fagopyrum, 1999, 16: 85-87.
[16] Zheng G H, Sosulski F W, Tyler R T. Wet-milling, composition and functional properties of starch and protein isolated from Buckwheat groats [J]. Food Research International, 1998, 30(7): 493-502.
[17] Jingan Z, Michanel A M, Whister R L. Cavities in porous corn starch provide a large storage space[J]. Cereal Chemistry, 1996, 76: 379-380.
[18] 姚卫蓉,姚惠源. 多孔淀粉的研究 II: 淀粉开孔后的物性变化[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(1): 17-21.
[19] Laech H W, Schoch T J. Structure of the starch granule II: Action on various amylase on structures[J]. Starch, 1986, 38: 141-155.
[20] Francoc M L, Ciacco C F, Tavares D Q. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack II: Study of the granular structure of starch[J]. Starch, 1988, 40: 29-32.