

# 超声-微波协同萃取法提取杜梨果实多糖

赵小亮<sup>1</sup>, 白红进<sup>1</sup>, 吴翠云<sup>2</sup>, 王彦芹<sup>1</sup>, 王星军<sup>2</sup>, 李雨潇<sup>2</sup>

(1. 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, 新疆 阿拉尔 843300;

2. 塔里木大学植物科技学院, 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要:**目的 提取杜梨果实多糖,并测定其含量。方法 采用超声-微波协同萃取法和常规水浴提取杜梨果实多糖,并用蒽酮-硫酸比色法测定多糖含量。结果 超声波-微波协同萃取法比较常规水浴法提取杜梨果实多糖效果更好,两种方法提取多糖的含量分别是 13.91% 和 12.74%;葡萄糖浓度在 25.15~100.6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系,平均回收率为 100.5%, $RSD$  1.59% ( $n=5$ )。结论 超声-微波协同萃取法可作为杜梨果实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:**杜梨果实; 多糖; 超声-微波协同萃取; 含量测定

中图分类号:Q946.3 文献标识码:A 文章编号:1008-0805(2007)09-2151-02

## Study on Ultrasonic - Microwave Synergistic Extraction of Polysaccharide from *Pyrus Betulaefolia bunge* Fruit

ZHAO Xiao-liang<sup>1</sup>, BAI Hong-jin<sup>1</sup>, WU Cui-yun<sup>2</sup>, WANG Yan-qin<sup>1</sup>, WANG Xing-jun<sup>2</sup>, LI Yu-xiao<sup>2</sup>

(1. Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar 843300, China; 2. College of Plant Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China)

**Abstract; Objective** To extract the polysaccharide from the fruits of *Pyrus betulaefolia* Bunge, and to determine its content. **Methods** Ultrasonic - microwave synergistic and water bath were employed to extract the polysaccharide and anthrone - sulphuric acid colorimetry was used to determine its content. **Results** There existed remarkably differences between the two methods; ultrasonic - microwave synergistic extraction was the optimal method. The polysaccharide contents of the two methods were 13.91% and 12.74% respectively. The linear range was 25.15 ~ 100.6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for glucose. The average recovery rates 100.5% ( $RSD$  1.59%,  $n=5$ ). **Conclusion** The ultrasonic - microwave synergistic extraction may take the first choice method. The method of anthrone-sulphuric acid colorimetry for determination of the polysaccharide content is stable and accurate.

**Key words:** The fruits of *Pyrus betulaefolia* Bunge; Polysaccharide; Ultrasonic-microwave synergistic extraction; Content determination

杜梨 *Pyrus betulaefolia* Bunge 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,是防护林及荒漠地造林的珍贵树种。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<sup>[1]</sup>。《本草纲目》记载棠梨(即杜梨)“味酸、甘、涩、寒;无毒。烧熟食用,可治泄泻痢疾<sup>[2]</sup>”。根据文献检索,目前杜梨主要作为砧木、园林树种以及重要的木材来源广泛分布在我国北部、东北部和中部各省(区),以黄河流域分布较多<sup>[1]</sup>。

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、作为砧木嫁接梨树等方面的研究,对于杜梨果实多糖的提取及含量测定方面的研究未见相关报道。本实验采用超声-微波协同萃取和常规水浴提取杜梨果实多糖,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 器材

1.1 实验材料 实验用杜梨于 2005-11 采自新疆塔里木盆地,经

鉴定为蔷薇科植物杜梨 *Pyrus betulaefolia* Bunge 的果实,自然风干,去除种子及果柄,粉碎后过 40 目筛备用。

1.2 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 型旋转蒸发器(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。

所用试剂葡萄糖,蒽酮,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 目筛杜梨果实干燥粉末一一定量,置于索氏提取器中,加入 95% 乙醇回流提取,去除色素及脂溶性物质,残渣室温挥干溶剂。取此干粉 10 g,3 份,加入蒸馏水 100 ml,在 80℃ 水浴中提取 30 min,滤过,滤渣采用同法再提取一次,合并两次滤液及洗涤液,定容至 200 ml 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 50 ml,冷却后搅拌下加入 4 倍体积的 95% 乙醇,静置过夜,4 000 r/min 条件下离心 20 min,收集沉淀,沉淀经无水乙醇、丙酮及乙醚多次洗涤,后在 60℃ 真空干燥箱中干燥,得精制杜梨果实多糖。

2.1.2 超声-微波协同萃取法提取 按照 2.1.1 项下方法处理杜梨果实,称取处理过的材料 10 g,3 份,加入蒸馏水 100 ml,用超声-微波协同萃取法提取,超声功率 50 W,频率 40 kHz,微波频

收稿日期:2006-10-31; 修订日期:2007-05-17

基金项目:新疆维吾尔自治区高等学校科学研究计划项目(No. XJEDU2005G07);

塔里木大学校长青年基金资助项目(No. TDZKQN06003)

作者简介:赵小亮(1982-),男(汉族),甘肃灵台人,现任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助教,学士学位,主要从事资源植物化学研究工作。

率 2 450 MHz, 温度 80℃。提取两次, 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, 得精制杜梨果实多糖。

2.2 多糖含量的测定

2.2.1 萘酚-硫酸溶液的配制 精密称取 0.3007 g 萘酚, 缓慢加入浓硫酸完全溶解后转移至 100 ml 棕色容量瓶中定容, 得 3.007 mg · ml<sup>-1</sup> 萘酚-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 1 ml 加入具塞试管, 加入 4.00 ml 萘酚-硫酸溶液, 摇匀后迅速浸入冰水浴中冷却, 后浸入沸水浴中, 盖上塞, 自水浴重新煮沸起, 准确煮沸 7 min 后立即取出, 用自来水冷却 10 min 后于 520 ~ 720 nm 波长范围内测定吸光度<sup>[3]</sup>, 确定了其最大吸收波长为 620 nm。

2.2.3 标准曲线的制备 精密称取 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 100.6 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 加蒸馏水溶解, 定容, 得 1.006 mg · ml<sup>-1</sup> 葡萄糖标准溶液。分别移取 2.50, 5.00, 7.50, 10.00 ml 的标准溶液置于 100 ml 容量瓶中定容。量取 1 ml 系列标准溶液于具塞试管中, 以 1 ml 蒸馏水作空白, 分别加入 4 ml 萘酚-硫酸溶液, 立即摇匀, 置于冰水中, 冷却后一起置于沸水, 盖上塞, 自再次煮沸加热 7 min, 之后在流水放置 10 min 冷至室温后, 于 620 nm 处测定吸光度值<sup>[4]</sup>, 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 ~ 100.6 μg · ml<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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, 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 精密称取干燥恒重的杜梨果实多糖精制品 13.2, 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<sup>[5]</sup>, 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<sup>-1</sup>),  $D$  为多糖稀释因素。

2.2.6 回收率试验 精密称取处理过的杜梨果实粉末 10g, 加入适量杜梨果实多糖精制品及 100 ml 蒸馏水, 80℃ 下采用超声波-微波协同萃取提取两次, 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 100.5%,  $RSD$  为 1.59% ( $n = 5$ )。

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 多糖质量分数与方差分析结果

提取方法	提取测定次数 (%)			平均值 (%)	RSD (%)	差异显著性	
	1	2	3			$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
超声-微波协同萃取	14.05	13.94	13.74	13.91	1.13	a	A
常规水浴提取	12.87	12.77	12.59	12.74	1.11	b	B

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

式中  $C$  为多糖质量浓度 (mg · ml<sup>-1</sup>),  $D$  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, 高出常规水浴提取的 1.17%, 但两种方法提取下多糖的含量均高于 10%, 可见杜梨果实多糖含量丰富。同时从方差分析结果可以看出两种提取方法之间存在明显的差异, 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

萘酚-硫酸比色法是测定多糖、单糖含量的常用方法之一, 色氨酸含量较高的蛋白质对显色反应有一定的干扰。本实验先用乙醇回流提取, 除去其中的单糖、双糖、低聚糖、生物碱、氨基酸及醇溶性蛋白质等成分, 而后采用水提取其中的可溶性多糖<sup>[6]</sup>。糖类遇浓硫酸脱水生成糠醛或其衍生物, 可与萘酚试剂缩合产生颜色物质, 反应后溶液呈蓝绿色, 显色与多糖含量呈线性关系<sup>[4]</sup>。本研究表明此法简便, 供试样在 2 h 内显色稳定, 重显性好。

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。罗锋等<sup>[7]</sup>比较了超声波、微波、恒温水浴和超声-微波协同萃取法提取甘草黄酮, 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。

通过杜梨果实多糖的含量测定, 结果表明杜梨果实多糖含量丰富, 这与塔里木盆地日照时间长, 昼夜温差大, 有利于糖类等化合物的积累有很重要的关系。杜梨结果率高, 分布面积广泛, 耐旱、耐碱, 容易存活, 口感独特, 多糖的生理活性近年来受到人们的关注, 因此, 杜梨果实对食品、药品、保健品等行业具有很好的应用和开发前景。

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.  
 [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.  
 [3] 威雁飞. 灵芝中灵芝多糖的含量测定研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 852.  
 [4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 12.  
 [5] 付焱, 郭毅, 张婧群, 等. 欧亚旋覆花中多糖的苯酚-硫酸法测定[J]. 中草药, 2006, 37(4): 544.  
 [6] 傅博强, 谢明勇, 聂少平, 等. 茶叶中多糖含量的测定[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 69.  
 [7] 罗锋, 汪河滨, 杨玲, 等. 超声-微波协同萃取法提取甘草黄酮的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 127.