

灵武长枣多糖含量测定的研究

杨 军¹, 章英才¹, 苏伟东², 杨淑娟¹

(1. 宁夏大学 生命科学学院 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏红枣工程技术研究中心 宁夏 灵武 750400)

摘 要: 灵武长枣样品经脱脂, 脱小分子糖后, 用蒸馏水沸水浴浸提、醇沉、洗涤得灵武长枣多糖, 含量测定采用苯酚-硫酸比色法, 用精制多糖测得其多糖对葡萄糖的换算因子。建立了一种简便、准确测定灵武长枣多糖含量的方法。结果表明: 该方法测定简便可行, 重现性较好, 平均回收率为 97.11%, 所测全红灵武长枣样品中多糖含量为 13.30%。

关键词: 灵武长枣; 多糖; 苯酚-硫酸比色法; 含量测定

中图分类号: S 665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0035-03

灵武长枣(*Zizyphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao)果实长圆柱形略扁, 果肉白绿色, 质地细脆, 汁液多, 味甜微酸, 品质上等。在灵武已有 1 400 多年的栽培历史, 是宁夏具有地方特色的优良鲜枣品种。长枣果实中富含多种矿物质、维生素、酚类和糖类^[1]。自 20 世纪以来的研究表明, 多糖在生物体中不仅是作为能量资源和构成材料, 更重要的是它参与生命现象中细胞的各种活动, 具有多种多样的生物学功能。对枣多糖(LPS)的研究发现, 其不但能消除人体内的氧自由基, 还具有抗衰老、抗补体活性和促进淋巴细胞增殖的作用^[2]。

目前学者们对灵武长枣的研究主要集中于产业化生产和保鲜方面, 而关于长枣多糖的研究报道较少。该研究采用超声波辅助热水提取, 制得灵武长枣多糖样品溶液, 采用苯酚-硫酸法显色反应测定其多糖含量, 为减少误差进一步采用精制灵武长枣多糖测得其对葡萄糖的换算因子, 稳定性和回收率, 为灵武长枣多糖的后续分离纯化以及生物活性研究奠定了基础, 同时也为进一步开发研究和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灵武长枣于 2010 年 9 月 29 日采自宁夏灵武市果业公司农场。挑选大小均匀、无腐烂和无机械伤的枣果, 按果实表面着色面积分为 0% (绿色面积/总面积=1)、25% (绿色面积/总面积 \approx 1/4)、50% (绿色面积/总面积 \approx 1/2)、75% (绿色面积/总面积 \approx 3/4)和

100% (全红果), 分别装入微孔保鲜袋中, 每袋 500 g, 扎紧袋口, 带回实验室经破碎后备用。

1.2 试验仪器

T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); 电子天平(德国 Sartorius 公司); 植物粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司); DHG-9140A 电热鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 超声仪(广州科威有限公司); 水浴锅(北京长源实验设备厂)。苯酚、浓硫酸、无水乙醇、丙酮、石油醚(60~90℃)、氯仿、正丁醇等均为分析纯。

2 结果与分析

2.1 多糖的提取与精制

取过 40 目筛的灵武长枣果实 25 g, 置于烧杯中超声 15 min 后, 80℃索氏提取 1 h 脱脂。过滤, 滤渣加入 80%乙醇 90℃回流提取 1 h。取滤渣, 80%乙醇洗涤 3 次, 挥干溶剂, 加蒸馏水 100 mL 沸水浴提取 2 次, 每次 1.5 h。离心, 取上清液, 滤渣再加蒸馏水 100 mL 沸水浴再提 1 次, 合并上清液, 真空浓缩, 浓缩液与等体积的 Sevag 试剂混合, 搅拌、静置、分出氯仿层, 除去蛋白质。此过程反复多次, 直至多糖溶液在 280 nm 处无紫外吸收。水层采用斐林试剂去除可溶性的还原糖, 加入 1%活性碳脱色^[3], 抽滤, 滤液中缓慢加入 95%乙醇, 使乙醇浓度达 75%, 放置 4℃冰箱中过夜, 离心, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤, 冷冻真空干燥至恒重, 即得精制长枣果多糖^[4]。

2.2 标准曲线的制作

2.2.1 标准系列溶液的配制 精密称定 105℃干燥至恒重的无水葡萄糖 100 mg, 定容于 1 000 L 容量瓶中, 摇匀, 配制成浓度为 100 μ g/mL 的标准葡萄糖溶液备用^[5]。

2.2.2 苯酚溶液的配制 5%苯酚试剂的配制: 取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g 和 NaHCO₃ 0.05 g, 蒸馏, 收集 172~182℃馏分, 称取 5 g, 加水 100 mL 溶解, 置棕色瓶内放冰箱备用^[7]。

第一作者简介: 杨军(1984-), 男, 硕士, 现主要从事植物学研究工作。E-mail: ayngjun@163.com。

责任作者: 章英才(1967-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事植物学教学和科研工作。E-mail: yingcaizh@163.com。

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ1014)。

收稿日期: 2011-04-20

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取上述溶液各 2 mL 置密封试管中, 各加入苯酚液 1.0 mL 摇匀, 迅速垂直滴加浓硫酸各 7.5 mL 摇匀, 放置 5 min 后, 置沸水浴中加热 15 min, 取出冷却至室温; 另以蒸馏水 1 mL 各加苯酚液和浓硫酸, 操作同上, 作为空白对照。用 T6 新世纪型紫外可见分光光度计于 490 nm 波长处比色, 测定吸光度^[6,8], 得回归方程: $Y = 0.1138x + 0.1068$ ($R^2 = 0.998$)。

2.3 换算因子的计算

精密称取干燥至恒重的多糖 10 mg, 加水适量溶解, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为贮备液。精密吸取多糖贮备液 1 mL, 加入蒸馏水 1 mL, 按标准曲线操作, 自加苯酚试剂 1.0 mL 起, 测定吸光度, 从回归方程中求出供试液中葡萄糖质量浓度(C), 按以下公式 $f = W/CD$, 计算换算因子, W 为多糖质量(mg), C 为多糖液中葡萄糖质量浓度(mg/L), D 为多糖溶液稀释因子, f 为换算因子^[8]。测得 $f = 2.85$ ($n = 4$)。

2.4 稳定性试验

精密移取灵武长枣多糖待测液 2.0 mL, 按测定标

表 1 灵武长枣果实多糖含量的测定结果

| 果实成熟度 | 0%果实 | 25%果实 | 50%果实 | 75%果实 | 100%果实 |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| 多糖含量/% | 5.45±0.0251E | 5.71±0.0259D | 7.26±0.0904C | 8.23±0.0379B | 13.30±0.0328A |

注: 数据采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据为平均值±标准差。不同大写字母表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

2.6 加样回收率

精密移取已知含量的粗多糖样品溶液 0.5 mL 5 份, 分别置于 5 个试管中, 分别加入葡萄糖标准系列溶液 0.0、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 按照测定标准曲线的方法测定其吸光度^[9]。测定平均加样回收率为 97.11%, 表明该方法的准确度良好, 因此该方法适于对灵武长枣多糖的测定。

3 讨论与结论

多糖的测定方法很多, 该试验通过水浸提法, 提取长枣多糖, 用苯酚-硫酸法测其含量。多糖在浓硫酸作用下, 水解成单糖, 并迅速生成糖醛衍生物, 与苯酚反应生成橙色溶液, 此溶液在适当波长处(490 nm)有吸收, 在一定浓度范围内, 溶液颜色深浅和吸光度符合朗伯-比耳定律。该试验中所作的标准曲线线性好, 通过回收率试验可知, 该方法不仅准确率较高, 重复性较好, 而且简便灵敏、颜色稳定, 在今后应用苯酚-硫酸法测定灵武长枣多糖含量时, 具有一定的参考价值。测定多糖含量应注意加入苯酚试液和硫酸后要充分混匀, 振摇时间和放置时间均要严格控制, 同时试验中还发现, 浓硫酸的加入方式对试验的结果影响较大, 采取移液管悬空垂直加入浓硫酸并立即摇匀的方式, 否则会影响测定结果。该法所用显色剂亦需临时现配, 注意避光保存, 并且保存时间不宜太长。多糖的单糖组成比较复杂, 而不同单糖的标准曲线的斜率不同, 所以用葡萄糖作标准曲线会引起系统误差。该试验采用精制灵武长枣多糖计算换算因子, 从而避免了用葡萄糖

标准曲线的方法每隔 30 min 测定 1 次吸光度, 连续 4 h 考察其稳定性, 试验结果其 $RSD = 0.62\%$, 表明样品在 2 h 内显色稳定。

2.5 灵武长枣多糖含量的测定

分别取各样品灵武长枣鲜果实 60℃烘干。粉碎后过 40 目筛得果肉粉备用; 分别精密称取各样品 0.2 g 置于烧杯中超声 30 min, 加入石油醚 150 mL (60 ~ 90℃), 80℃回流提取 1 h 脱脂。过滤, 滤渣挥干溶剂后, 加入 80%乙醇, 80℃回流提取 2 次, 每次 1 h, 去滤渣, 挥干溶剂, 滤渣加蒸馏水 100 mL 沸水浴提取 2 次, 每次 1.5 h, 定容 500 mL 备用。按照标准曲线的绘制方法, 测定吸光值 A (平行测定 3 次), 根据标准曲线查出显色液中葡萄糖含量^[8]。多糖含量 $A(\%) = (CD/f/W) \times 100$, C 为供试液葡萄糖浓度, D 为供试液稀释因素, f 为换算因子, W 为供试品的重量^[9] (表 1)。结果表明, 灵武长枣果实中多糖含量随着果实的成熟而不断升高, 并且在果实成熟的中后期, 多糖含量升高的趋势达极显著水平, 全红果实中多糖的平均含量为 13.30%。

作标准而引起的系统误差。

灵武长枣果实中多糖含量随着果实的成熟而不断升高, 并且在果实成熟后期, 多糖含量升高趋势极显著水平。与彭艳芳和赵智慧^[11-12]等人对金丝小枣、冬枣、圆铃枣、圆铃小枣、怀柔大脆和月光 6 个枣果多糖含量的动态研究结果一致。枣果实发育前期, 多糖含量较低, 并且在大部分时期多糖含量增长缓慢, 果实近成熟期多糖含量呈上升直线趋势。该试验中测定灵武长枣果实多糖平均含量为 13.30%, 略低于梁惠花^[13]等对大枣多糖含量的研究结果, 这可能是因为不同品种的枣果多糖含量存在差异。

参考文献

- [1] 喻菊芳, 朱连成, 魏卫东, 等. 宁夏(灵武)长枣考证[J]. 宁夏农林科技, 2004(5): 31-32.
- [2] 初敏, 齐锡祥, 朱飞等. 多糖研究概述[J]. 中药研究与信息, 2003(4): 18-20.
- [3] 程迪, 于洁, 董丽. 河南产牡丹皮中多糖含量的测定[J]. 安徽农业科学, 2008(2): 518-528.
- [4] 谭晓虹, 王治宝, 李如章. 北五味子多糖的提取和含量测定[J]. 时珍国医国药, 2007(6): 1463-1464.
- [5] 陈敏青, 于荣敏. 西洋参冠瘿组织培养条件优化及其对多糖含量的影响[J]. 中药材, 2009(9): 1339-1342.
- [6] 刘娟, 徐倩, 姜博. 龙牙楸木中多糖含量的测定[J]. 黑龙江医药科学, 2009(4): 27-28.
- [7] 陈战国, 周利燕, 李鹏程. 苯酚-硫酸法测定太白泡沙参总多糖的含量[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2009(4): 48-51.
- [8] 罗毅, 潘细贵, 刘刚, 等. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J]. 中国中医药信息杂志, 2005(1): 45-46.
- [9] 黎晶晶, 徐格非. 苯酚-硫酸法测定灵芝多糖含量的研究[J]. 杭州化工, 2008(1): 23-26.

水杨酸对 NaCl 胁迫下黄瓜种子活力及抗盐性的影响

段辉国^{1,2}, 胡蓉¹, 黎勇^{1,2}, 付伟丽¹, 黄作喜^{1,2}, 谢玉华¹

(1. 内江师范学院 生命科学院, 四川 内江 641112; 2. 特色农业资源研究与利用四川省高等学校重点实验室, 四川 内江 641112)

摘要:以黄瓜种子为试材, 采用 SA 进行浸种处理, 研究 SA 对缓解黄瓜种子盐害的效应。结果表明: 不同浓度 SA 浸种能在一定程度上提高黄瓜种子抗盐能力, 其发芽率、发芽势和发芽指数均较对照组高, 而种子 MDA 含量和外渗液电导率均低于对照组。其中 0.50 mmol/L SA 处理的种子的发芽率、发芽势和发芽指数最高; 而 0.75 mmol/L SA 处理对种子 MDA 含量和外渗液电导率的降低效果最佳。适当浓度外源 SA 能够提高 NaCl 胁迫下黄瓜种子的活力, 保护细胞膜的完整性, 从而提高种子的抗盐性。

关键词: 水杨酸; 黄瓜; 抗盐性; 种子活力

中图分类号: S 642.204⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0037-03

我国温室、大棚设施蔬菜栽培面积日益扩大, 但由于设施内部的土壤缺少雨水的淋洗, 且温度、湿度、通气状况和水肥管理等均与露地栽培有较大差别, 加之设施长期处于高集约化、高复种指数、高肥料施用量的生产状态下, 导致设施土壤次生盐渍化的程度越来越高, 蔬菜的生长发育受到抑制, 进一步影响到蔬菜的品质和产量, 同时, 还影响着设施土壤的持续利用^[1]。水杨酸(Salicylic acid, SA)是一种简单的酚类化合物^[2]。很多研究表明, SA 是植物抗病反应的信号分子和诱导植物

对非生物逆境反应的抗逆信号分子, 能提高植物对生物、非生物逆境的抗性, 延缓植物衰老, 如诱导植物系统抗病性, 提高植物的抗盐性、抗旱性、抗冷性、抗热性等^[3-4]。黄瓜是温室、大棚蔬菜大面积栽培的主要蔬菜种类之一, 由于设施内土壤次生盐渍化程度不断加重, 给黄瓜周年生产造成巨大损失^[5]。现以黄瓜种子为试材, 采用 SA 进行浸种处理, 研究 SA 对缓解黄瓜种子盐害的效应, 为探讨外源 SA 对提高黄瓜抗盐性及将 SA 应用于农业生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)种子购于四川省内江市种子市场。

1.2 试验方法

选取饱满色泽一致的黄瓜种子, 用 1% NaClO 消

第一作者简介: 段辉国(1964), 男, 四川资中人, 硕士, 教授, 现主要从事植物逆境生理生化与生长调节物质作用机理的研究工作。E-mail: duanhuigu06@163.com。

基金项目: 四川省教育厅资助项目(09ZA054); 内江师范学院生态学重点建设学科资助项目(内师科学[2007]24号)。

收稿日期: 2011-04-19

[10] 高丽君, 王汉忠, 崔建华, 等. 苯酚-硫酸法测定白首乌中多糖含量[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004(2): 295-297.

[11] 彭艳芳, 李洁, 赵仁邦, 等. 金丝小枣和冬枣果实发育过程中低聚糖和多糖含量的动态研究[J]. 果树学报, 2008(6): 846-850.

[12] 赵智慧. 枣水溶性多糖的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.

[13] 梁慧花, 刘晓河. 大枣多糖的含量测定[J]. 张家口医学院学报, 1999(1): 19-21.

Isolation and Assaying of Polysaccharide in *Zizyphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao

YANG Jun¹, SU Wei-dong², YANG Shu-juan¹, ZHANG Ying-cai¹

(1. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Ningxia Jujube Engineering Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: With ungrease treatment and oligo-saccharide, and extract by boiling water-bath, ethanol precipitation, deprivate protein, and determinated its content by phenol-sulfuric acid method. This experiment established a simple, accurate determination method of polysaccharide form *Zizyphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao. The results showed that it was a simple, feasible method to determinate polysaccharide content, the recovery was 97.11%, the polysaccharide in *Zizyphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao was 13.30%.

Key words: *Zizyphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao; polysaccharide; phenol-sulfuric acid colorimetry; determination