

葡萄多糖的提取工艺及含量测定研究

任平国, 徐启红
(漯河职业技术学院, 河南 漯河 462000)

摘要:以市售新鲜葡萄为材料,采用不同的提取温度、料液比和提取时间进行单因素试验,并在此基础上采用三因素三水平的正交试验对提取条件进行优化。结果表明:提取温度对葡萄多糖提取率的影响最大,其次是料液比,而提取时间影响不大。葡萄多糖提取的最优工艺参数是:提取温度为90℃、料液比为1:2、提取时间为2.0 h。经苯酚-硫酸法测定,葡萄多糖含量为7.53%(以半乳糖计),加样测定平均回收率为99.9%。

关键词:葡萄多糖;提取;含量测定

中图分类号:S 663.1; TS 255.36 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2008)05-0057-03

葡萄(*Vitis*, L.)系葡萄科葡萄属植物,是世界性水果,有“水果皇后”美誉。葡萄中含有多种易于被人体吸收的物质,具有促进人体新陈代谢、软化血管、降低血压等医疗保健效果^[1],有很高的营养及保健价值。其中富含的多糖是非细胞类物质,对正常细胞无毒副作用且具有多种生物活性,能够激活免疫细胞、提高机体免疫功能,并能够抗肿瘤、抗氧化、降血脂、降血糖、促进核酸与蛋白质的生物合成等^[2],近年来已经引起人们极大的重视。为此,对葡萄多糖的提取工艺条件进行了探讨,以期为更好地利用葡萄资源提供重要的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜葡萄(购自市场,要求颗粒饱满、无腐败变质)。

1.2 试剂

半乳糖标准品(国产); CuSO₄ 溶液、K₂SO₄ 溶液、2% H₂BO₃ 溶液、混合指示剂(0.1% 甲基红乙醇溶液与 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液按 1:5 临时混合); 40% NaOH 溶液、0.05 mol/L HCl 标准溶液; 无水乙醇、石油醚、正丁醇、氯仿、浓 H₂SO₄ 均为分析纯。

1.3 设备

HJ-5 型多功能搅拌机(常州市华普达教学仪器有限公司)、DK-98-1A 电热恒温水浴锅(上海洪纪仪器设备有限公司)、721 分光光度计(上海第三分析仪器厂); LG 10-2.4A 高速离心机(北京医用离心机厂)、真空恒温干燥箱(YB-1A 天津生产)、RD-2 旋转蒸发器(宁波经济技术开发区东胜仪器科技有限公司)、电子天平。

1.4 试验方法

1.4.1 葡萄多糖的提取

定量称取新鲜葡萄去梗,清洗

后用多功能搅拌机将葡萄打成糊状,以热水作为提取剂,将多糖分离出来,然后离心(3 000 r/min, 10~15 min),重复 3 次。合并提取液,减压浓缩至适量,乙醇沉淀,沉淀物用无水乙醇洗涤数次,用蒸馏水溶解,经石油醚脱脂。将脱脂后的提取物溶于适量蒸馏水中,用 Sevage 法^[3]反复多次脱蛋白。在流水中透析 48 h,再在蒸馏水中透析 24 h。冷冻干燥得粗多糖(*Vitis* L. polysaccharide, VLP)^[4]。

1.4.2 葡萄多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法^[5]。
1.4.3 葡萄多糖提取的正交试验设计^[6] 在单因素试验的基础上,对提取温度、提取时间和料液比采用 L₉(3⁴) 进行正交试验(表 1),通过比较、分析,优选出葡萄多糖提取的最佳工艺参数。

表 1 葡萄多糖提取的正交试验因素水平

水 平	因 素		
	A(温度/℃)	B(料液比)	C(时间/h)
1	70	1:1	1.5
2	80	1:2	2
3	90	1:3	2.5

2 结果与讨论

2.1 提取温度对葡萄多糖提取率的影响

在料液比和提取时间相同的前提下,采用 5 个不同温度(50℃、60℃、70℃、80℃和 90℃)对葡萄多糖进行提取试验,试验结果见图 1。

由图 1 可知,温度对葡萄多糖提取率有显著的影响:随着温度的升高,葡萄多糖的提取率逐渐增大,90℃条件下的提取率是 50℃时提取率的近 3 倍。在 60~80℃之间曲线的斜率逐渐增大,而后曲线斜率逐渐减小,温度高于 90℃时,多糖提取率的增加量已不显著且蛋白质已溶出,增加了去蛋白的难度和工作量,另外升高温度至沸腾在长时间浸提条件下可能会影响多糖活性,所以浸提温度不宜过高。而低温浸提虽然对多糖活性影响小^[7],但是提取率比较低。因此,选取 70℃、

第一作者简介:任平国(1973-),男,河南信阳人,讲师,主要从事生理生化研究工作。E-mail: rengpingguo1234@126.com。
收稿日期:2007-12-05

80℃、90℃作为温度的三水平进行葡萄多糖提取的正交试验较为合理。

2.2 料液比对葡萄多糖提取率的影响

称取 5 份葡萄, 每份 250 g, 改变料液比为 1:1、1:

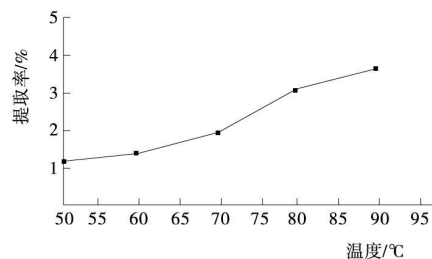


图 1 提取温度对葡萄多糖提取率的影响

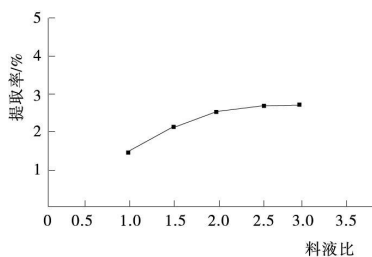


图 2 料液比对葡萄多糖提取率的影响

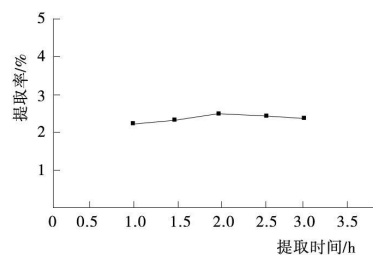


图 3 时间对葡萄多糖提取率的影响

由图 2 可以看出, 料液比对葡萄多糖提取率无显著影响。料液比在 1:1 至 1:3 之间时, 葡萄多糖提取率随料液比的增大而缓慢增大。由于料液比较大, 会增加真空浓缩的工作量, 故选择 1:1、1:2.0、1:3.0 作为料液比的三个水平进行葡萄多糖的正交试验。

2.3 提取时间对葡萄多糖提取率的影响

称取 5 份葡萄, 每份 250 g。采用 5 个不同的提取时间(分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h), 浓缩后的提取液用 6 倍 95% 的乙醇进行沉淀并浸提。重复操作 2 次, 将沉淀物干燥称量, 计算提取率, 以比较不同时间对葡萄多糖提取率的影响。结果见图 3。

由图 3 不难看出, 浸提时间对葡萄多糖提取率的影响不显著。葡萄多糖的提取率随时间的延长而有所增加, 但增长的幅度不大, 甚至在时间超过 2.0 h 后还略有下降。这是由于葡萄多糖在水溶液中溶解和扩散达到了平衡而使多糖提取率变化趋缓。考虑到提取率与节约时间及能耗的关系, 以选择 1.5、2.0、2.5 h 作为时间的三个水平进行葡萄多糖提取的正交试验比较合适。

2.4 正交试验结果与分析

根据上述单因素试验结果, 采用正交设计对葡萄多糖提取的工艺参数进行了优化。确定因素水平范围如下: 温度(A)分别为 70℃、80℃、90℃; 料液比(B)分别为 1:1、1:2、1:3; 时间(C)分别为 1.5、2.0、2.5。结果及极差分析见表 2。

由表 2 极差分析可知, 影响葡萄多糖提取率的各因素主次关系为: A(提取温度) > B(料液比) > C(提取时间), 提取温度以第三水平为最佳, 而料液比和提取时间则均以第二水平为最好, 即温度为 90℃、料液比为 1:2、时间为 2.0 h。

2.5 葡萄多糖含量的测定

以半乳糖为标准, 采用苯酚-硫酸法, 在 490 nm 处测定其吸光值($A_{490\text{nm}}$), 求得标准曲线的回归方程为: $C = 0.9726 \times A - 0.0350$ ($r = 0.9993$)。式中: C 表示半乳糖浓度, A 表示吸光度。

将醇沉后的葡萄多糖用蒸馏水溶解, 按标准曲线显

1.5、1:2、1:3, 浓缩后的提取液用 6 倍 95% 的乙醇进行沉淀并浸提。重复操作 2 次, 将沉淀物干燥称量, 计算提取率, 以比较不同料液比对葡萄多糖提取率的影响。其结果如图 2 所示。

色测定 A 值, 由回归方程计算含量。加样测定平均回收率为 99.9%, 葡萄多糖含量为 7.53% (以半乳糖计)。

表 2 葡萄多糖得率的正交试验结果及极差分析

序号	温度(A)	料液比(B)	时间(C)	葡萄多糖提取率/%
1	1(70℃)	1(1:1)	1(1.5h)	0.87
2	1	2(1:2)	2(2.0h)	2.21
3	1	3(1:3)	3(2.5h)	1.58
4	2(80℃)	1	2	1.75
5	2	2	3	2.88
6	2	3	1	2.20
7	3(90℃)	1	3	2.26
8	3	2	1	3.25
9	3	3	2	3.34
均值 K_1	1.55	1.63	2.11	
K_2	2.28	2.81	2.43	
K_3	2.95	2.37	2.24	
极差 R	1.40	1.18	0.32	

3 结论

在影响葡萄多糖提取率的三个因素(提取温度、料液比和提取时间)中, 提取温度为主要因素, 其次是料液比, 而提取时间影响不大。有研究表明, 提取次数在 3 次以下时, 提取次数的多少也会对多糖提取率产生一定的影响, 提取次数在 3 次以上时则无明显影响^[8]。研究的提取次数采用为 3 次。

根据对比分析得出葡萄多糖提取的最优工艺参数是: 提取温度为 90℃、料液比为 1:2、提取时间为 2.0 h。经苯酚-硫酸法测定, 葡萄多糖含量为 7.53% (以半乳糖计), 加样测定平均回收率为 99.9%。

参考文献

- [1] 崔德才, 徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 297-300.
- [2] 陈明. 真菌多糖抗肿瘤研究的进展[J]. 食用菌, 1993, 15(6): 41-42.
- [3] 松田和雄. 抽出液的精制<多糖的分离精制法>[M]. 日本农艺化学会出版中心, 1987: 39-45.
- [4] 王忠民. 葡萄多糖的提取及含量测定[J]. 新疆农业大学学报, 2002, 25(2): 57-58.
- [5] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553.

庆阳市果园土壤养分动态变化及施肥措施

赵爱萍

(陇东学院 农林科技学院, 甘肃 庆阳 745000)

摘 要:通过对庆阳市苹果园土壤养分状况的变化分析表明:苹果园土壤有机质、全氮、碱解氮、速效磷的含量 2006 年较 1980 年均有所增加,分别增加 2.36 g/kg、0.15 g/kg、8.3 mg/kg、2.8 mg/kg,速效钾含量 2006 年较 1980 年减少 705 mg/kg。根据土壤肥力变化提出了保持土壤养分平衡,提高土壤肥力的培肥措施。

关键词:苹果园;土壤;养分;动态变化;施肥措施

中图分类号:S 66-33;S 606+.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001—0009(2008)05—0059—03

苹果是甘肃省庆阳市的支柱产业,主要在庆阳市的宁县、庆城县、合水县和正宁县栽植,面积达 4×10^4 hm² 以上。据调查,近年来庆阳市苹果栽植面积已陆续进入盛果期,产量大幅度增加,相应地从土壤中带走的营养元素增加。为了解该市苹果园土壤养分变化状况,于 2006 年秋季采样,进行测土分析,分析结果和 1980 年第二次土壤普查结果比较,了解土壤主要养分动态变化状况,以期为苹果的持续发展和产量提高,提供指导培肥地力和合理施肥的科学依据。

1 土样采集与分析

在西峰区、镇原县、宁县、庆城县、合水县、正宁县各

县区选能够代表各县区苹果园土壤状况的代表样点 6 个,每个样点采用 5 点法用土钻取 0~20 cm 土层土壤用 4 分法取适量混合农化土样,风干磨细供养分测定。土壤类型为黑垆土和黄绵土,土壤有机质含量测定用半量凯氏法,碱解氮含量测定用碱解扩散法、速效磷含量测定用 OLSEN 法、速效钾含量测定用四苯硼钠比浊法。各县区 0~20 cm 土层土壤养分平均含量见表 1。

表 1 庆阳市苹果园土壤养分平均含量比较 g/kg

样点	样本数	有机质		全氮		碱解氮		速效磷		速效钾	
		2006	1980	2006	1980	2006	1980	2006	1980	2006	1980
西峰区	6	10.75	9.1	0.82	0.56	37.5	28.4	10.0	6.4	183.5	186.7
镇原县	6	9.78	8.7	0.72	0.66	33.2	27.8	7.5	4.9	175.3	162.8
宁县	6	10.82	9.9	0.85	0.73	38.3	28.9	8.6	7.0	179.3	202.0
庆城县	6	9.60	9.1	0.76	0.56	34.7	28.2	8.5	6.4	178.5	186.7
合水县	6	10.27	9.9	0.87	0.66	38.0	27.7	10.4	7.0	185.1	205.0
正宁县	6	10.68	10.4	0.86	0.80	39.2	29.7	11.0	7.3	179.7	181.0
平均		10.32	7.96	0.81	0.66	36.8	28.5	9.3	6.5	179.9	187.4

作者简介:赵爱萍(1972-),女,甘肃宁县人,硕士,讲师,主要研究方向为园艺植物营养与栽培。E-mail:zhaoaining72@yahoo.com.cn。
收稿日期:2007—11—07

[6] 明道绪.生物统计附试验设计[M].北京:中国农业出版社 2002

[7] 朱加进.苦菜中可溶性多糖提取工艺研究[J].农业工程学报 2002, 18(1): 138-141.

[8] 林永贤.发菜多糖的提取及性质研究[J].现代食品科技 2007, 23 (5): 34-36.

Studies on the Extraction Technique and Content Determination of *Vitis L.* Polysaccharide

REN Ping-guo, XU Qi-hong

(Luohe Vocational Technology Collegy, Henan Luohe 462000, China)

Abstract: The single factor experimentation was made in the fresh grape by adopting the different extraction temperature, solid-liquid and extraction period. The extraction conditions was optimized by orthogonal experiment. The results showed as bellow: The maximal factor influencing the extraction rates of *Vitis L.* polysaccharide was the extraction temperature, the second was the solid-liquid., the extraction period almost make no influences on extraction rates of *Vitis L.* polysaccharide. The optimal extraction technology parameters of *Vitis L.* polysaccharide is: extraction temperature was 90℃, solid-liquid was 1 :2., extraction period was 2.0 h. The method of Phenol-sulphate acid was applied to determine the content of *Vitis L.* Polysaccharide, the content of *Vitis L.* Polysaccharide was 7.53%. (Gal), the average recovery rate was 99.9%.

Key words: *Vitis L.* Poly saccharide; Extraction; Content determination