

热带雨林博罗霍果多糖的单糖组成分析

林海丹¹, Ka-Hing Wong², 焦红¹, 黄文健², 奚星林¹, 梁公壁³, 黄健豪³

(1. 广东检验检疫局食品实验室, 广东广州 510623) (2. 香港理工大学, 香港 999077)

(3. 东方食品有限公司, Quevedo-Ecuador 128)

摘要: 研究了博罗霍果多糖的不同提取条件和对其中含量及单糖的组成进行测定。方法1的提取条件为样品经乙醇溶液除去单糖和寡糖, 脱脂、水提醇沉法提取多糖, 用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 酸水解后用 HPLC-ELSD 法测定多糖组成。方法2的提取条件为样品经冷冻干燥, 乙醇溶液除去单糖和寡糖后, 用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 酸水解后用气相色谱衍生法测定多糖组成。方法1提取得多糖含量为 6.2%, 其单糖组成为半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖。方法2提取得多糖含量为 11.2%, 其单糖组成为半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖, 糖醛酸含量为 0.24%。博罗霍多糖是以中性糖为主且含少量糖醛酸的杂多糖。

关键词: 博罗霍; 多糖; 单糖组成

文章编号: 1673-9078(2010)11-1264-1266

Monosaccharide Composition of Polysaccharides of Borojo from Tropical Rain Forest

LIN Hai-dan¹, Ka-Hing Wong², JIAO Hong¹, HUANG Wen-jian², XI Xing-lin¹

LIANG Kung-pi³, HUANG Chien-hao³

(1. Food Lab of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technology Center, Guangzhou 510623, China) (2. The Hong Kong Polytechnic University, Department of Applied Biology and Chemical Technology 999077, HK) (3. Oriental Industria Alimenticia O.I.Cia.Ltda, Quevedo-Ecuador 128)

Abstract: The polysaccharide content and the monosaccharide composition in Borojo sample with difference extraction methods were researched. In method 1, the Borojo sample was extracted with ethanol to remove monosaccharides and oligosaccharides and defatted followed by a water extraction and ethanol precipitation. The content of polysaccharides was determined using Phenol-sulfuric acid method and the composition of the polysaccharides in Borojo after acid hydrolysis was analyzed by HPLC-ELSD. In method 2, the Borojo sample was freeze-dried and extracted with ethanol to remove monosaccharides and oligosaccharides. Then the content of polysaccharides was also determined using Phenol-sulfuric acid method and the composition of the polysaccharides in Borojo after acid hydrolysis was analyzed by GC derivatization method. With method 1, the content of the polysaccharide in Borojo sample was determined as 6.2% and the main components of the polysaccharide were found as galactose, arabinose and rhamnose monosaccharide. By using method 2, the content of the polysaccharide was 11.2% and its main components showed to be the galactose, arabinose, mannose and glucose monosaccharide. The content of uronic acid was 0.24% in Borojo sample. It was concluded that Borojo polysaccharide was a kind of complex polysaccharide, composed of most of neutral sugar and small amount of uronic acid.

Key word: borojo; polysaccharide; monosaccharide composition

博罗霍 (Borojo) 是生长在南美洲热带雨林的的水果, 唯一适应厄瓜多尔气候, 茜草科林果属, 有 *Borojoa patinoi* Cuatrec 和 *Borojoa sorbilis* Cuatrec 两个品种, *Borojoa sorbilis* Cuatrec 在当地人中有食用

收稿日期: 2010-08-31

作者简介: 林海丹, 高级工程师, 研究方向: 食品化学检验

通讯作者: 焦红, 研究员, 研究方向: 食品化妆品安全卫生与营养功效检验及实验室质量控制

[1]. Borojo 成分复杂, 成熟后粘性强, 直接食用口感十分酸涩, 深加工难度很大。医学和科学界还未对 Borojo 的全成分以及有效的营养活性因子进行系统研究[2]。本研究已对来自厄瓜多尔东方食品集团提供的新鲜成熟博罗霍果样品若干, 进行了全营养素成份分析 (另文报道), 总糖含量较高。为了解博罗霍果中糖类的具体组成以及多糖以及糖醛酸的含量, 我们进一步对博罗霍果多糖的提取, 纯化, 含量和单糖的

组成进行了分析,旨在为博罗霍果的利用开发提供科学依据,填补国内外博罗霍多糖分析研究空白。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱系统,配有 LC-10A 泵,自动进样器,Altech 3300 蒸发光散射检测器(Grace 公司)及 Empower 色谱工作站(美国 WATERS 公司)。色谱柱: Grace prevail carbohydrate ES(250×4.6 mm, 5 μm);柱温: 35 °C;流动相: 乙腈-水(75+25), 1.0 mL/min;蒸发光散射检测器,氮气流量: 2.5 L/min;气体温度 90 °C。

标准糖对照: 木糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖(SIGMA)

具有氢火焰离子化检测器的气相色谱仪(HP 6890, 美国)。毛细管柱: ALTECH DB-225(15 m×0.25 mm, 0.25 μm 膜);程序升温(起始温度为 170 °C, 2 °C/min 升温至 220 °C, 220 °C 保持 10 min);进样口和检测器温度为 170 °C;载气为氦气;氢火焰离子化检测器。

标准糖对照: 岩藻糖、鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡萄糖胺和氨基半乳糖(SIGMA)。

主要试剂: 乙腈(HPLC 级)、乙醇、丙酮、无水乙醚、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、果糖、葡萄糖醛酸、阿洛糖(FLUKA)、1-辛醇(SIGMA)。

1.2 博罗霍多糖提取

植物多糖通常在水中呈胶体,在乙醇溶液中析出。提取植物多糖时多利用该特性进行纯化。样品经 80%乙醇水溶液提取除去单糖和寡糖和其它醇溶性杂质^[3],用丙酮-石油醚提取除去类脂物和其它脂溶性物质。再用热水提取醇沉净化。

本实验在博罗霍果多糖特性未见报道的情况下,尚不明确博罗霍果多糖的热水溶性,因此采用以下两种方法提取。

方法一(热水提取乙醇沉淀法):博罗霍样品经 80%乙醇水溶液,超声波提取,30 min/次,提取两次,弃乙醇水溶液,得滤渣经丙酮-石油醚(1+1)超声波提取,30 min/次,提取两次,弃去丙酮-石油醚,得滤渣,挥干溶剂后经 80~90 °C 水,超声波提取,30 min/次,提取两次→合并热水提取液→减压浓缩→加入无水乙醇至乙醇比例约为 85%→析出絮状物→4000 r/min,离心 10 min→得絮状沉淀→沉淀分别以乙醇、

丙酮、无水乙醚各少许洗涤→挥干溶剂→得灰白色样品粉末,即为粗多糖,计算产率。

方法二(直接提取法):博罗霍样品,冻干机干燥→博罗霍脱水样品→按 1:10=样品:85%乙醇→加入 85%乙醇溶液→60 °C, 30 min/次,提取两次,倾去 85%乙醇提取液→得到残渣,50 °C,过夜挥干 80%乙醇→得粗多糖,计算产率。

1.3 博罗霍多糖含量测定

苯酚-硫酸法^[4]是利用多糖在硫酸的作用下先水解成单糖,并迅速脱水生成糖醛酸衍生物,然后与苯酚生成橙黄色化合物,在 490 nm 处有特征吸收,其吸收值与糖的浓度成线性关系,通过用紫外可见分光光度计测定吸收值来计算多糖含量。

采用苯酚-硫酸法测定样品溶液中多糖的含量。精密称取适量的粗多糖样品,加水溶解得样品溶液。取粗多糖样品水溶液 1 mL,加 1 mL 5%苯酚溶液,5 mL 硫酸,混匀,放置 10 min,40 °C 水浴加热 15 min,冷却后,于 490 nm 测定吸光度。以葡萄糖为对照品,同样操作,得葡萄糖浓度-吸光度的线性关系图,由回归方程计算出供试样液的多糖含量。

1.4 多糖中单糖组成的分析

本实验中热水提取乙醇沉淀法和直接提取法得到的粗多糖分别采用方法一和方法二测定单糖组成。

方法一:取 2 g 粗多糖样品,加 20% H₂SO₄ 20 mL,100 °C 水浴加热 3 h,放置过夜,以碳酸钡调节 pH 值至中性,10000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.20 μm 滤膜过滤后高效液相色谱蒸发光散射检测器分析多糖的单糖组成。

方法二:取 15 mg 粗多糖样品,加 0.7 mL 12 M H₂SO₄,不间断地搅拌下 35 °C 水浴加热 1 h,加 3.5 mL 水稀释至 H₂SO₄ 最终浓度为 2 M,100 °C 水浴加热 1 h,水解物冷至室温备用。取 3 mL 水解物于试管中,加入内标 1 mL 阿洛糖溶液(1 mg/mL),加入 12 M 氨水溶液调节 pH 值至碱性。5 μL 的 1-辛醇和新鲜配制的 200 mg/mL 硼氢化钠氨水溶液(2 M) 0.2 mL,在 40 °C 下,还原水解物 30 min,加入 0.4 mL 冰醋酸,涡旋混匀。取 0.2 mL 上述混合水溶液于另一支试管中,加入 0.3 mL 1-甲基咪唑作为催化剂和 2.0 mL 冰醋酸进行乙酰化反应,混匀,室温放置 10 min,加入 5 mL 水,涡旋混匀,冷至室温,加入 1.0 mL 二氯甲烷,涡旋混匀,静置 10 min,分层后,弃去上层,下层以 1.0 mL 水提取两次,弃去水相,下层加入无水硫酸钠除水后于 -20 °C 贮存供气相色谱分析。

1.5 多糖中糖醛酸的测定

糖醛酸含量按 AOAC 45.4.11 比色法测定。取 0.3 mL 的酸水解物(1.4 方法二),加入 0.3 mL 的氯化钠硼酸水溶液(2 g 氯化钠、3 g 硼酸,水定容至 100 mL),混匀,加入 5 mL 18M H₂SO₄,混匀,70 °C 保持 40 min,冷至室温,加入 0.2 mL 0.1% 3,5-二甲基苯酚冰醋酸溶液,混匀,室温放置 10 min。于 450 nm 测定吸光度(差减 400 nm 处的吸光度,以校正己糖的干扰)同时以 2 M H₂SO₄ 作为空白、以葡萄糖醛酸为对照,同样操作,得葡萄糖醛酸浓度-吸光度的线性关系图,由回归方程计算出供试样液的糖醛酸含量。

2 结果与讨论

2.1 多糖的含量

采用方法一和方法二提取博罗霍果多糖,都采用硫酸-苯酚法测定其多糖的含量,结果比较见表 1。

表 1 不同方法提取博罗霍果多糖的结果

Table 1 Polysaccharide content in Borojo sample extracted with difference methods

提取方法	粗多糖产率 /出膏率(%)	粗多糖中多 糖含量/%	果实中多糖 含量/%
热水提取	7	89	6.2
乙醇沉淀法			
直接提取法	22	55	11.2

从表 1 结果可见,热水提取乙醇沉淀法得粗多糖的产率(出膏率)较低,但纯度高,粗多糖纯度达 89%。直接提取法的出糖率高,但其纯度低,粗多糖纯度为 55%。从表 1 结果比较还可得到,博罗霍果用直接提取法比水提醇沉法(热水溶性多糖)得到的多糖含量高,可见博罗霍果中多糖除了有热水溶性多糖还含有热水不溶性多糖。

2.2 多糖的单糖组成

表 2 不同方法测定的多糖中单糖组成的分析结果

Table 2 Monosaccharide composition of polysaccharide in Borojo sample extracted with difference methods

方法	半乳糖	阿拉伯糖	鼠李糖	甘露糖	葡萄糖
热水提取乙醇沉淀-液相光谱蒸发光散射法	+	+	+	-	-
直接提取-气相色谱法	+	+	-	+	+

注: +: 检出; -: 未检出。

用热水提取乙醇沉淀法提取的多糖采用液相色谱蒸发光散射法(方法一)测定单糖的组成,以及用

直接提取法提取的粗多糖,经酸水解,再衍生化反应,得到的糖醇乙酯衍生物采用气相色谱法(方法二)测定单糖组成的结果见表 2。

从表 2 可见,两种方法都检出半乳糖、阿拉伯糖。直接提取法还检出有甘露糖和葡萄糖。可以推论博罗霍果中热水溶性多糖主要由半乳糖、阿拉伯糖组成。热水不溶性多糖主要由甘露糖和葡萄糖组成,比如构成植物细胞的骨架结构纤维素。由不同方法得出博罗霍果多糖组成的结论不完全一致,可能是我们使用了不同的提取和纯化方法,造成得到的不同种类的博罗霍多糖,也可能是两种检测方法的灵敏度和选择性不同使然。液相色谱法灵敏度和分离度较差,可能是检测不出低含量糖类的主要原因。

2.3 糖醛酸的含量

直接提取法测试的粗多糖中糖醛酸含量为 1.11%,整个博罗霍果中糖醛酸含量为 0.24%。实验表明博罗霍多糖是一种以中性糖为主,且含有少量糖醛酸的杂多糖。

3 结论

本研究利用苯酚-硫酸法检测博罗霍果中水提醇沉和冷冻干燥直接提取法中的多糖,得出博罗霍果中总多糖含量为 11.2%,水溶性多糖含量为 6.2%。利用水提醇沉-液相色谱法和冷冻干燥直接提取-气相色谱法分别检测博罗霍果中多糖的单糖组成,得出博罗霍果中水溶性多糖的单糖组成为半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖;总多糖的单糖组成为半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖。博罗霍果中糖醛酸含量为 0.24%。实验结果表明,博罗霍果中多糖含量较高。本实验对进一步开发研究博罗霍多糖产品具有一定意义。

参考文献

- [1] LH Mosquera, G Moraga, N Martínez-Navarrete. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojo (Borojoa patinoi Cuatrec.) powder [J]. Journal of Food Engineering, 2010,97: 72-78
- [2] Polyphenolic Content of Borojo, Center For Advanced Food Technology Rutgers University, 2008
- [3] 付学鹏,杨晓杰,蒲公英多糖的提取及含量测定[J].现代食品科技,2007,23(5):37-39
- [4] 刘安军,钟玥如,朱振元,等.古尼虫草多糖提取分离初步分析[J].现代食品科技,2008,24(1):28-31