

王 燕,牛瑞明,李志会. 裸燕麦中 β -葡聚糖含量测定方法的比较[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):300-302.

裸燕麦中 β -葡聚糖含量测定方法的比较

王 燕,牛瑞明,李志会
(河北北方学院农林科技学院,河北张家口 075000)

摘要: β -葡聚糖对人体具有重要的生理功能,能够降低人体的血清胆固醇和血糖水平。裸燕麦的种子中富含 β -葡聚糖,而 β -葡聚糖含量的准确测定是 β -葡聚糖研究开发的主要难点之一,虽然对其含量测定方法的研究较多,但目前我国还没有测定 β -葡聚糖的标准方法。常用的 β -葡聚糖含量测定方法有刚果红法、标准酶法、改进酶法等,为了筛选出最佳测定 β -葡聚糖含量的方法,以中等肥力条件下种植的裸燕麦花早 2 号为研究材料,对刚果红法、改进酶法的精密度和准确性进行比较分析。在几种常用方法中,改进酶法的准确性较高,成本偏高;刚果红法较准确,但操作简单,成本低。

关键词:裸燕麦; β -葡聚糖;刚果红法;改进酶法

中图分类号: TS210.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0300-03

β -葡聚糖是禾谷类植物胚乳细胞壁中的一种非淀粉多糖,其基本结构是由 D-葡萄糖以 $\beta 1-4$ 和 $\beta 1-3$ 糖苷键连接而成的线性大分子,其含量在燕麦和大麦中较高^[1]。近年来的研究表明, β -葡聚糖对人体具有有益的生理功能,能够降低人体的血清胆固醇和血糖水平;由于能够活化巨噬细胞、嗜中性白血球等,因此 β -葡聚糖能够提高白细胞素、细胞分裂素和特殊抗体的含量,从而全面刺激机体的免疫系统,使得机体有更多的准备去抵抗微生物引起的疾病; β -葡聚糖还能使受伤机体的淋巴细胞产生细胞因子的能力迅速恢复正常,从而有效调节机体的免疫机能;此外,大量试验表明, β -葡聚糖可以促进体内抗体的产生,从而提高体液的免疫能力。以上所述的葡聚糖活化细胞会激发宿主的非专一性防御机制,因此将其应用在肿瘤、感染病和创伤的治疗方面深受瞩目^[2]。经过特殊步骤的萃取,不含内毒素的 $\beta-1,3$ -葡聚糖已被美国 FDA 认定为一种安全的物质,可以添加在一般食品中。此外,葡聚糖还具有清除游离基、抗辐射、溶解胆固醇、预防高脂血症的作用,也能够抵抗滤过性病毒、真菌、细菌等引起的感染,因此被广泛用于医药、食品、化妆品等行业。

β -葡聚糖含量的准确测定是 β -葡聚糖研究开发的主要难点之一,虽然目前对其含量测定方法的研究较多,但我国还没有关于测定 β -葡聚糖的标准方法。目前常用的测定方法有刚果红法^[3-4]、国际标准酶法^[5]、改进酶法^[6-8]等。近年来,一种较国际标准酶法更准确的方法,即 GEM 法 (glucan enzymatic method) 正在受到国外学者的广泛关注和认可^[9]。综合考虑精确度、成本两方面的因素,本研究采用刚果红法和改进酶法对裸燕麦 (*Avena sativa* L.) 材料进行测定比较,以期找到理想的 β -葡聚糖测定方法。

1 材料与方法

收稿日期:2013-02-28
基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201003053)。
作者简介:王 燕(1982—),女,河北邯郸人,博士,讲师,从事种子萌发期抗旱及资源品质研究。E-mail:pubaohua@126.com。

1.1 试验材料
选取花早 2 号裸燕麦的种子,60℃烘干 4 h,备用。

1.2 试验方法
刚果红法:主要参考张娟等的相关操作^[3]。在标准曲线的绘制过程中,先取 6 组试管,除 0 号设 1 支外,其余均设 3 支平行管,按表 1 将浓度为 0.1 mg/mL 的标准 β -葡聚糖溶液进行稀释。在稀释后的各管中分别加入 4.0 mL 刚果红溶液,摇匀,在 20℃条件下作用 10 min,用 1.0 cm 的比色杯于 550 nm 波长下测定各组的吸光度,以 0 号管中的反应液作为空白对照进行调零。以 β -葡聚糖含量为横坐标、 $D_{550\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线。

表 1 标准 β -葡聚糖溶液的稀释			
试管号	标准 β -葡聚糖溶液 (mL)	蒸馏水 (mL)	稀释后各管中标准 β -葡聚糖含量 ($\mu\text{g/mL}$)
0	0	2.0	0
1	0.2	1.8	10
2	0.4	1.6	20
3	0.6	1.4	30
4	0.8	1.2	40
5	1.0	1.0	50

样品的测定过程:称取 200.0 mg 烘干的样品,研碎后放入 25 mL 具塞刻度试管内,用 0.4 mL 50% 乙醇润湿,再加入 10.0 mL 水溶液混匀;在 25℃下放置 16 h 后将上述溶液充分转移至 50 mL 容量瓶中,用水稀释、定容;以 4 000 r/min 的速度离心 20 min 并收集上清液;吸取 0.1 mL β -葡聚糖样品溶液,依次加入 1.9 mL 蒸馏水、4.0 mL 刚果红溶液,于 20℃下反应 10 min,同时将 2.0 mL 蒸馏水加入 4.0 mL 刚果红溶液中,作为空白对照,测定溶液的吸光度,根据标准曲线即可计算样品中的 β -葡聚糖的含量。相应的公式如下:

样品中 β -葡聚糖含量 = $A/2 \times 100\%$,
式中: A 为根据标准曲线计算得到的反应液中 β -葡聚糖含量。

改进酶法:纤维酶的纯化、葡萄糖氧化酶/过氧化酶 (GOPOD) 试剂的配制主要参考邓万和等的相应操作^[6,8]。在

标准曲线的绘制过程中,先在 5 支空试管中取 1 支试管,加入 0.4 mL 水作为空白对照,再在其他 4 支试管内分别加入 0.4 mL 浓度为 100、200、300、400 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖标准液;分别向上述各试管内加入 0.2 mL 乙酸钠缓冲液、0.4 mL 琥珀酸钠缓冲液;再向上述各试管内加入 5 mL GOPOD 显色液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 40 min,取出并放置于暗处,10 min 后在 510 nm 处测定吸光度。以 β -葡聚糖含量为横坐标、吸光度 $D_{510\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线。

样品的测定过程:称取 200.0 mg 烘干的样品,研碎后放入 25 mL 具塞刻度试管内,用 0.4 mL 50% 乙醇润湿后加入 10.0 mL 水溶液,混匀;在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 16 h 后转移至 50 mL 容量瓶中,定容;在离心机上以高于 4 000 r/min 的速度离心,取上清液;取 3 支 10 mL 的具塞刻度试管,在 1 号、2 号试管内分别加入 0.4 mL 样品液,再在 1 号试管加入 0.2 mL 纤维素酶液(作样品分析),在 2 号试管内加入 0.2 mL 醋酸钠缓冲液(作为酶空白对照),3 号试管则作为样品的空白对照,在其中分别加入 0.4 mL 水、0.2 mL 纤维素酶液;在所有的试管内加入 0.4 mL 琥珀酸钠缓冲液(pH 值 5.0),盖上塞子、摇匀后置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 3 h;在所有试管内加入 5 mL GOPOD 显色液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 40 min 后取出并放置于暗处,10 min 后于 510 nm 处测定吸光度。样品中 β -葡聚糖含量的测定公式如下:

样品中 β -葡聚糖含量 = $C \times 50 \times 2.5 \times 100 \times 0.9 / (200 \times 1000) \times 100\% = C \times 9 / 160 \times 100\%$ 。

式中: C 为测定的样品吸光度对应的葡聚糖值减去空白对照、酶空白对照对应的葡聚糖值的差值;200 为样品重量,mg;0.9 为葡萄糖转化为葡萄糖苷的转换因子(162/180)。

1.3 β -葡聚糖定量方法准确性的评价

1.3.1 精密度试验 刚果红法:在试管中加入 1.0 mL β -葡聚糖标准溶液,用去离子水补足至 2.0 mL;再加入 4 mL 刚果红溶液,摇匀,使其在一定条件下充分反应后测定吸光度。重复 5 次,计算其相对标准差 RSD 。

改进酶法:取 0.4 mL 浓度为 0.1 mg/mL 的 β -葡聚糖溶液,依次加入 0.2 mL 纤维素酶液、0.4 mL 琥珀酸钠缓冲液(pH 值 5.0),盖上塞子并摇匀后置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 3 h;然后加入 5 mL GOPOD 显色液,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 40 min;取出并放置于暗处,10 min 后在 510 nm 处测定吸光度。重复 5 次,计算其相对标准差 RSD 。

1.3.2 准确性试验 刚果红法:分别在 6 个试管中加入 1 mL 样品液,再分别准确加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL β -葡聚糖标准溶液,然后分别用去离子水补足至 2.0 mL,再分别加入 4 mL 刚果红溶液,摇匀。在一定条件下充分反应后测定吸光度,计算相对标准差 RSD ,并按以下公式计算加样回收率:

加样回收率 = $\frac{\text{经测定并计算的标准品加入量}}{\beta\text{-葡聚糖标准品的实际加入量}} \times 100\%$ 。

改进酶法:取 1 支具塞试管,加入 2 mL 样品液,再依次精确加入 1 mL 纤维素酶、2 mL 琥珀酸钠缓冲液(pH 值 5.0),盖上塞子并摇匀后置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 3 h;在 5 支试管中分别加入 0.6 mL 上述处理液,再分别精确加入 0.4 mL 浓度为 0、100、200、300、400 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖标准液,再在所有试

管内分别加入 5 mL GOPOD 显色液;在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 40 min,取出并放置于暗处,10 min 后于 510 nm 处测定吸光度。计算相对标准差 RSD ,并按以下公式计算加样回收率:

加样回收率 = $\frac{\text{经测定并计算的工作标准液加入量}}{\text{葡萄糖工作标准液的实际加入量}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 刚果红法

2.1.1 标准曲线的绘制 β -葡聚糖标准溶液的吸光度见表 2。可以计算出此标准曲线的回归方程为: $y = 0.002\ 2x + 0.006\ 3 (r^2 = 0.987\ 50)$,回归效果显著。

表 2 β -葡聚糖标准液的吸光度	
β -葡聚糖含量($\mu\text{g/mL}$)	$D_{550\text{ nm}}$
0	0
10	0.035
20	0.052
30	0.071
40	0.090
50	0.115

2.1.2 精密度及准确性的评价 刚果红法的精密度试验结果见表 3。对 1.0 mL β -葡聚糖标准溶液进行重复性试验,对该测定方法的精密度进行检测。试验结果表明,刚果红法的检测重复性好,精密度较高(RSD 为 5.291%)。

表 3 刚果红法的精密度试验		
重复	$D_{550\text{ nm}}$	β -葡聚糖含量的计算值($\mu\text{g/mL}$)
1	0.128	110.636
2	0.115	98.818
3	0.114	97.909
4	0.124	107.000
5	0.123	106.091
平均值	0.121	104.091
$RSD(\%)$	5.387	5.291

刚果红法的准确性试验结果见表 4。通过加样回收率试验检测该测定方法的准确度,结果表明其测定准确度较高(平均加样回收率为 99.89%),完全能够满足一般测定的需要。

表 4 刚果红法的准确性试验				
标准 β -葡聚糖含量($\mu\text{g/mL}$)	$D_{550\text{ nm}}$	计算得 β -葡聚糖量($\mu\text{g/mL}$)	回收率($\%$)	$RSD(\%)$
0	0.028	19.727	0	
10	0.051	40.636	104.55	
20	0.070	57.909	95.45	
30	0.095	80.636	101.52	
40	0.115	98.818	98.86	
50	0.137	118.818	99.09	
平均值			99.89	3.387

2.2 改进酶法

2.2.1 标准曲线的绘制 根据表 5 数据绘制葡萄糖标准曲

线,此标准曲线的回归方程为: $y = 0.0006x + 0.0018 (r^2 = 0.9970)$,回归效果显著。

表 5 葡萄糖标准液的吸光度

葡萄糖含量(μg/mL)	$D_{510\text{ nm}}$
0	0
40	0.027
80	0.050
120	0.069
160	0.095

2.2.2 准确性评价 改进酶法的精密度试验结果见表 6。通过对同一样品的重复性试验,对改进酶法的精密度进行检测。试验结果表明,改进酶法的检测重复性好,精密度较刚果红法低(RSD 为 $5.045\% < 5.291\%$)。

表 6 改进酶法的精密度试验

重复	$D_{510\text{ nm}}$	β -葡聚糖含量的计算值(μg/mL)
1	0.0240	37.000
2	0.0230	35.333
3	0.0240	37.000
4	0.0260	40.333
5	0.0250	38.667
平均值	0.0244	37.667
RSD	4.672%	5.045%

改进酶法的准确性试验结果见表 7。通过加样回收率试验检测该测定方法的准确度,结果表明,改进酶法的测定准确度较刚果红法高(平均加样回收率为 99.97%),完全能够满足一般测定的需要。

表 7 改进酶法的准确性试验

标准 β -葡聚糖含量(μg/mL)	$D_{510\text{ nm}}$	计算得 β -葡聚糖量(μg/mL)	回收率(%)	RSD (%)
0	0.058	94.222	99.97	
40	0.082	133.667	98.61	
80	0.106	173.667	99.31	
120	0.132	217.000	102.32	
160	0.154	253.667	99.65	
平均			99.97	1.624

3 结论与讨论

改进酶法的精密度比刚果红法要低(RSD 为 $5.045\% <$

5.291%),改进酶法的准确度(加样回收率)比刚果红法要高(改进酶法的回收率平均值为 99.97% ,大于刚果红法的 99.89%)。在本研究中,刚果红法测定的结果偏低,可能是由于供试样品中 β -葡聚糖分子被其他分子包裹,而使其未能充分溶解,使得显色不足。但刚果红法所需仪器简单,检测快速便捷,适用于批量多、批次长期、连续测定的工业生产的需要,且成本较低,极易操作。虽然与标准酶法相比,改进酶法缩短了测定的时间、减少了试剂的用量、降低了成本,但是与刚果红法相比,测定时间、价格成本仍然较高,仅适用于对少量材料的准确测定,对于工业生产中的测定来说,成本仍然较高。GEM 方法对国际标准法进行了改进,样品先用氢氧化物碱性处理,再用 $\text{exo-1-3-}\beta\text{-D-glucanase}$ (外切型葡聚糖酶)和 $\beta\text{-glucosidase}$ (β -葡萄糖苷酶)2 种酶特异地把 β -葡聚糖转化成葡萄糖,再对葡萄糖进行定量测定,由于该法成本仍然较高,对于工业生产依旧难以大规模施行,因此在要求准确度较高且材料较少时可以选择改进酶法或 GEM 法,在大规模工业生产测定 β -葡聚糖含量时可以采用刚果红法。

参考文献:

[1]李进. 燕麦的营养价值与保健功效[J]. 新疆农业科技,1993(5):38-39.

[2]姚新生. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:99-121.

[3]张娟,杜先锋,饶砚琴. 刚果红法测定燕麦中 β -葡聚糖含量的研究[J]. 安徽农业大学学报,2007,34(1):23-26.

[4]李永仙,尹象胜,顾国贤,等. 刚果红法测定麦汁和啤酒中的 β -葡聚糖[J]. 无锡轻工大学学报,1997,16(1):8-13.

[5]连喜军,鲁晓翔,蔡保松,等. 国际标准酶法测定 β -葡聚糖含量的研究[J]. 粮油食品科技,2006,14(6):27-29.

[6]邓万和. 燕麦中 β -葡聚糖的含量分析及其性质研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.

[7]郑殿升,吕耀昌,田长叶,等. 中国裸燕麦 β -葡聚糖含量的鉴定研究[J]. 植物遗传资源学报,2006,7(1):54-58.

[8]李贞. 燕麦籽粒 β -葡聚糖积累规律的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2007.

[9]Danielson M E, Dauth R, Elmasry N A, et al. Enzymatic method to measure β -1,3- β -1,6-glucan content in extracts and formulated products (GEM assay)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(19):10305-10308.