

## 银杏叶中硒与多糖的季节分布

邓桂春, 孙静怡, 吕改芳, 鞠政楠, 叶琳琳

辽宁大学化学学院, 辽宁 沈阳 110036

**摘要** 银杏叶中总硒和各种溶解形态硒含量随着季节而变化, 实验研究了不同采摘期银杏叶中总硒及不同溶解态硒含量分布。7月、9月和霜降之后采摘的银杏叶总硒的含量分别为 1.873, 2.136, 0.815 mg · kg<sup>-1</sup>, 硒的形态以水溶态硒为主。银杏叶粗多糖含量分布依次为 9月 > 7月 > 11月。7月份采集的银杏叶中得到粗多糖为棕褐色固体粉末, 粗多糖质量为 25.64 g · kg<sup>-1</sup>的, 纯度为 20.20%; 9月粗多糖为淡黄色固体粉末, 质量为 31.60 g · kg<sup>-1</sup>, 纯度 8.68%; 11月份粗多糖为乳白色固体粉末, 质量为 83.57 g · kg<sup>-1</sup>, 纯度为 17.60%。三个季节的固体粉末经过脱蛋白后的紫外光谱在 260 和 280 nm 处均无吸收峰, 红外光谱进一步证明得到的固体粉末为银杏叶多糖。同时, 采用 ICP-MS 测定了银杏多糖和不同采摘期银杏叶中微量元素含量, 证明微量元素含量也是随着季节发生变化。

**关键词** 硒; 多糖; 银杏叶; 光谱分析

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)02-0543-04

## 引言

现存最古老的中生代子遗植物之一的银杏树, 素有“活化石”之称, 银杏叶作为中草药在民间使用, 最早见于 14 世纪的《日用本草》<sup>[1]</sup>。我国是银杏树的故乡, 银杏资源占全世界的 70%。硒是人体必需的微量元素<sup>[2]</sup>, 缺硒会导致多种疾病发生。研究证明, 有机硒的生物医药功能大于无机硒, 而且毒性比无机硒要小。硒在植物中主要以无机硒和有机硒的形式存在。由于其赋存状态、结构、性质的差异, 造成硒的不同形态在不同溶剂中的溶解度不同<sup>[3, 4]</sup>, 根据这一原理, 研究了不同采摘期银杏叶中微量硒的形态分布。许多研究表明多糖不但能治疗癌症, 又能治疗多种免疫缺失疾病, 还能诱导干扰素的产生<sup>[5, 6]</sup>, 因此, 从植物中提取和纯化多糖备受关注<sup>[7]</sup>。我们采用水煮醇沉的工艺, 对不同季节采摘的银杏叶进行了多糖分离提取和测定, 并对银杏叶中硒的形态分布规律进行研究, 为提高银杏叶的利用率提供帮助。

## 1 实验部分

### 1.1 实验仪器与试剂

722 型光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂); LB801-2 型超级恒温水浴(南京实验仪器厂); Cary Eclipse 荧光分光

光度计(Varian, 美国); GZX-9140MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 聚四氟乙烯消解罐。

0.1% 2,3-二氨基萘溶液: 称取 100 mg 2,3-二氨基萘(DAN, ACROS ORGANICS, 美国)于一带盖三角瓶中, 加入 100 mL 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸, 振摇约 15 min, 使其全部溶解; 100 μg · mL<sup>-1</sup> 硒(IV)标准储备液: 准确称取 100.0 mg 高纯硒粉, 溶于少量硝酸中, 加 2 mL 过氯酸, 置沸水浴中加热 3.5 h, 冷却后加入 8.4 mL 盐酸, 再置沸水浴中加热 2 min, 用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸准确稀释至 1 000 mL, 使用时用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸稀释至 0.1 μg · mL<sup>-1</sup> 硒(IV)工作溶液; 200 μg · mL<sup>-1</sup> 葡萄糖标准溶液: 准确称取 105 °C 下干燥至恒重的葡萄糖 20.00 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。本实验用水均为二次蒸馏水, 试剂除说明外均为分析纯。银杏叶处理: 将不同季节采摘于辽宁大学崇山校区园内的银杏叶, 用自来水和去离子水依次清洗干净, 在 70~80 °C 下于烘箱中烘干、粉碎、研磨, 制成 40~60 目的粉末, 备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 分子荧光测定硒

准确移取一系列硒的标准工作溶液置于 60 mL 分液漏斗加水至 30 mL, 再分别加入 5.0 mL 1% 的 EDTA 溶液, 1.0 mL 的 10% 盐酸羟胺溶液, 加入甲酚红指示剂, 用 6 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸调节溶液的颜色由桃红色变为淡黄色, 此时溶液

收稿日期: 2010-05-10, 修订日期: 2010-08-20

基金项目: 辽宁省创新团队项目基金项目(2008T064)资助

作者简介: 邓桂春, 女, 1952 年生, 辽宁大学化学学院教授 e-mail: dgclnu@163.com

的 pH 值在 1.5~2.0 之间, 以下步骤在暗室中进行: 加入 3.0 mL DAN 试剂, 混匀, 室温反应 2 h, 加入 4.0 mL 环己烷萃取, 振摇 5 min, 待分层后弃去水层, 有机相转入比色皿中, 在激发波长为 378 nm, 发射波长为 520 nm 处测定生成的 4,5-苯并苯硒脑的荧光强度, 同时做试剂空白。工作曲线的回归方程为:  $\Delta I = 458.00x + 8.456$ ; 相关系数  $r = 0.999$ 。图 1 为生成的 4,5-苯并苯硒脑的激发光谱 *a* 和发射光谱 *b*。

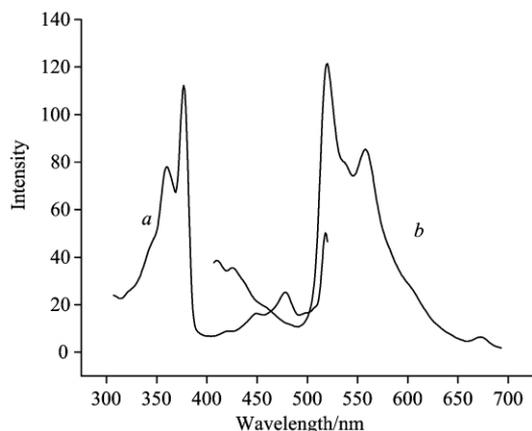


Fig 1 Fluorescence spectrum of selenium

*a*: Emission; *b*: Excitation

### 1.2.2 分光光度法测定含糖量

准确移取一系列葡萄糖标准溶液, 分别置于 10 mL 带塞比色管中, 先用亚沸水定容为 2.0 mL, 再分别加入 1.0 mL 5% 苯酚溶液, 摇匀, 迅速加入 5.0 mL 浓硫酸, 振摇, 静止 5 min, 置沸水浴 15 min, 取出再置冷水浴 30 min, 在波长 490 nm 处, 以试剂空白为参比, 用 1 cm 比色皿, 测定吸光度 *A*。工作曲线的回归方程:  $y = 0.0062x + 0.001$ ; 相关系数  $r = 0.999$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 银杏叶中硒含量的时间分布

分别准确称取一定量不同季节采摘的银杏叶粉, 加入 6 mL 的浓硝酸于聚四氟乙烯消解罐中, 静置过夜后, 次日在烘箱中 120 °C, 消解 4 h 后, 冷却消解液, 转移至 50 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸定容, 分别移取一定量消解液, 按照 1.2.1 的实验方法测定硒含量, 结果表明: 银杏叶中总硒量随着采摘季节的变化而不同, 硒含量分布为: 9 月 (2.136 mg · kg<sup>-1</sup>) > 7 月 (1.873 mg · kg<sup>-1</sup>) > 11 月 (0.815 mg · kg<sup>-1</sup>), 说明 7 月份到 9 月份的银杏叶片中随着植物的成熟是硒的积累过程, 而 9 月到霜降之后微量元素硒开始逐渐排出植物体外, 使其含量降低。

### 2.2 银杏叶中硒的形态分布

由于硒的含量低, 本文采用分步浸提方法, 提取银杏叶中硒的不同溶解态。准确称取一定量银杏叶粉末, 分别向其中加入分别蒸馏水 (80 °C 水浴)、0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液、0.1 mol · L<sup>-1</sup> 醋酸溶液、0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液、0.1

mol · L<sup>-1</sup> 氯化镁溶液、0.01 mol · L<sup>-1</sup> EDTA 溶液各 20 mL, 室温浸取 24 h, 日间每隔 1 h 搅拌一次。浸提结束后将样品溶液抽滤, 两次洗涤, 合并浸取液, 在 60 °C 水浴中浓缩至近干, 冷却后向其中加入浓硝酸, 消解后按照实验方法测定硒的含量, 结果见表 1。

Table 1 Distribution of Se(IV) speciation with different in different time to total Se (μg · kg<sup>-1</sup>)

Date	Water	HCl	HAc	NaOH	MgCl <sub>2</sub>	EDTA
July	104.6	79.62	111.2	88.73	39.03	61.58
September	147.7	48.05	68.34	85.70	70.60	242.0
November	136.3	84.17	128.2	59.30	75.11	325.4

硒含量随着采摘季节不同各形态含量不同, 11 月份的 EDTA 溶液浸取的络合态硒量高于其他溶解态。各个溶解态硒之和高于总量, 这是因为水溶液浸取时, 导致水溶态也或多或少地进入不同形态中。

### 2.3 银杏叶主要微量元素分析

银杏叶中常见微量元素含量采用 ICP-MS 外标法测定, 实验用 Agilent 公司 7500c 型 ICP-MS 仪器, 配有 Babington 型雾化器和自动进样器。将选定的环境标准样品储备液稀释成浓度为: 10, 50, 500 μg · L<sup>-1</sup> 的工作溶液, 绘制标准工作曲线。根据各个元素的回归方程求得样品中各元素含量见表 2。

Table 2 Distribution of element content in different time ginkgo leaf (mg · kg<sup>-1</sup>)

Elements	July	September	November
Mg	9.920 × 10 <sup>3</sup>	1.273 × 10 <sup>4</sup>	1.336 × 10 <sup>4</sup>
Ca	2.941 × 10 <sup>4</sup>	4.540 × 10 <sup>4</sup>	5.453 × 10 <sup>4</sup>
Mn	7.086 × 10 <sup>1</sup>	6.516 × 10 <sup>1</sup>	5.426 × 10 <sup>1</sup>
Fe	2.372 × 10 <sup>3</sup>	2.410 × 10 <sup>3</sup>	2.909 × 10 <sup>3</sup>
Cu	2.398 × 10 <sup>1</sup>	1.688 × 10 <sup>1</sup>	2.114 × 10 <sup>1</sup>
Zn	4.038 × 10 <sup>1</sup>	5.298 × 10 <sup>1</sup>	4.039 × 10 <sup>1</sup>
Cr	6.358 × 10 <sup>1</sup>	7.605 × 10 <sup>1</sup>	6.574 × 10 <sup>1</sup>
Mo	2.740 × 10 <sup>0</sup>	1.851 × 10 <sup>0</sup>	2.736 × 10 <sup>0</sup>

ICP-MS 测定结果表明, 不同时期银杏叶中钙、镁、铁均较高, 其他元素含量很少, 钴和镍未检出。

### 2.4 银杏叶粗多糖的提取

准确称取一定量不同时期的银杏叶样品, 加入物料比为 1:30 的水, 在 80 °C 水浴中, 水煮 3 h, 两次浸煮, 抽滤, 洗涤残渣, 收集水煮液, 于 60 °C 水浴中浓缩至 10 mL。然后加入三倍体积的 85% 的乙醇, 醇沉 24 h。将沉淀用 85%, 95% 和无水乙醇分别反复洗涤。最后用少量乙醚洗涤, 干燥, 得到银杏叶粗多糖产品。将不同时期银杏叶的水煮醇沉提取物进行 Molish 反应, 结果均产生紫色, 反应呈阳性, 证明该水煮醇沉提取物中均含有多糖。称量得到的固体产物质量, 计算粗多糖含量, 结果表明, 银杏叶中粗多糖含量依次为 11 月份 > 9 月份 > 7 月份, 分别为 83.57 g · kg<sup>-1</sup> > 31.60 g · kg<sup>-1</sup> > 25.64 g · kg<sup>-1</sup>。

### 2.5 不同时期粗多糖中多糖含量的分布

准确称取三个不同时期的银杏叶得到的粗多糖产品,用亚沸水溶解于 100 mL 容量瓶中,从其中移取 0.5 mL 置入 10 mL 具塞比色管中,按照 1.2.2 的实验方法进行测定,结果表明,季节不同多糖的含量也不相同,粗多糖的纯度分别为:7 月份 20.2%,9 月份 8.68%,11 月份 17.6%。

### 2.6 粗多糖的纯化

在热水浸取多糖时,蛋白也会被同时浸出,而且在溶液中所占的比例较大,如果不将蛋白除去,对于多糖的测定以及后续的多糖的进一步纯化都会带来很大的干扰。本实验采用 Sevage 方法除去多糖中的蛋白。将银杏叶浓缩液用亚沸水定容后,转移至碘量瓶中,向其中加入按多糖溶液体积为 1/5 的 Sevage 试剂(氯仿:正丁醇=4:1),磁力搅拌 30 min,然后置于离心管中静置 10 min,离心 10 min(2 500 r·min<sup>-1</sup>),重复上述实验,直到有机相无游离的蛋白为止。加入 Sevage 后的多糖溶液,震荡后为乳白色的溶液,离心后在有机层处产生白色的游离蛋白,随着脱蛋白次数的增加,溶液颜色逐渐变浅。用紫外光谱检验脱蛋白前后溶液的吸收峰变化,紫外光谱显示,脱蛋白前在 260 和 280 nm 处均有吸收峰存在,脱蛋白后此两峰峰消失了,说明多糖中的蛋白基本上被除去,然而随着脱蛋白次数增加,多糖的损失也在增大。

对脱蛋白后的银杏叶多糖,采用 KBr 压片法,得到红外光谱图。从不同季节提取的银杏叶多糖的红外谱图可也看出,主要出峰位置及出峰形状基本相同。主要出峰位置在 3 400~3 500 cm<sup>-1</sup>(O—H 的伸缩振动),1 200~1 400 cm<sup>-1</sup>(变角振动),1 600~1 700 cm<sup>-1</sup>(羧基吸收峰),都证明含有糖醛酸;在 1 000~1 100 cm<sup>-1</sup>吸收表明单糖为吡喃型构型,进一步证明了所提取出来的固体粉末为银杏叶多糖。

### 2.7 银杏叶多糖中的微量元素

准确称取不同时期的银杏叶多糖粉末于聚四氟乙烯消解罐中,加入 5.0 mL 的浓硝酸,静置一夜,次日在 120 °C 中烘箱中加热 4 h,采用 ICP-MS 测定不同时期银杏叶多糖中九种微量元素含量。与银杏叶中元素含量相比,7 月份多糖中

Mg, Ca, Cr, Mn, Fe, Mo 含量降低, Cu 和 Zn 含量增加;9 月份 Mn, Fe, Cr, Cu 和 Zn 含量增加;11 月份 Mg, Mn, Fe, Cr 和 Zn 含量增加,各季节均未检出钼。

## 3 结 论

### (1) 银杏叶中硒含量随着季节变化

银杏叶中总硒含量分别为:9 月>7 月>11 月份,根据植物生态学原理,在植物生长期,上升液把矿物质带入茎中并逐渐积累。同时随着植物的生长,相当数量的矿物质又会通过泌盐作用和植物的花,茎,叶等的脱落离开植物本身。多年生的木本植物有规律的积累和丢失矿物质,为矿物质在植物体内的循环提供了一个有效的途径。因此,我们认为 7 月到 9 月的银杏叶片中元素硒是一个矿物质积累的过程,而随着植物的成熟,从 9 月到霜降之后这段时间,元素硒开始逐渐地排出植物体外,使这个季节硒的含量下降,银杏叶中其他微量元素含量也随着季节发生了变化。

### (2) 硒的不同溶解形态随着季节发生变化

各季节溶解态硒的含量分别为:7 月的银杏叶,醋酸溶解态>水溶态>碱溶态>盐酸溶解态>EDTA 络合态>MgCl<sub>2</sub> 交换态,9 月的银杏叶:水溶态>碱溶态>MgCl<sub>2</sub> 交换态>醋酸溶解态>盐酸溶解态>EDTA 络合态,11 月的银杏叶:水溶态>醋酸溶解态>盐酸溶解态>MgCl<sub>2</sub> 交换态>碱溶态>EDTA 络合态,数据表明,水浸提银杏叶是一种很好的自然补硒方法。

### (3) 银杏叶多糖随着季节发生变化

在银杏叶生长的过程中需要从光合作用中得到养分以保持其生长,随着植物的生长,光合作用所积累的养分逐渐增加,从 7 月到霜降之后这段时间内,银杏叶粗多糖的含量逐步增加,而在银杏叶成熟和生长发育的过程中,所需要的营养物质的形式也会发生相互转化,影响着各个时期的多糖量,多糖含量依次为 7 月份>9 月份>11 月份。

感谢辽宁省教育厅高等学校创新团队项目基金资助。

## References

- [1] HOU Tuan-zhang(侯团章). Chinese Herbal Medicine Extracts(中草药提取物). Beijing: China Medical Science Press(北京:中国医药科技出版社), 2004. 7.
- [2] YAN Fu-cheng(闫福成). Chinese Traditional and Herbal Drug(中草药), 2006,37(7): 1122.
- [3] DENG Gui-chun, HOU Song-mei, TIE Mei, et al(邓桂春, 侯松岫, 铁梅, 等). Journal of Analysis Science(分析科学学报), 2006, 22(1): 21.
- [4] Sors T G, Ellis D R, Salt D E. Photosynthesis, 2005, 86: 373.
- [5] Huang Cheng, Chen Qunli, Sun Jiangtao, et al. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(23): 173.
- [6] Van der, Kamp J W. Food Sic., 2004, (10): 421.
- [7] JIANG Zhi-guo, DU Qi-zhen, SHENG Li-yi(蒋志国, 杜琪珍, 盛利毅). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2009, 37(3): 412.

## Study on Selenium and Polysaccharide Distribution in Different Time Ginkgo Leaf

DENG Gui-chun, SUN Jing-yi, LÜ Gai-fang, JU Zheng-nan, YE Lin-lin  
College of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, China

**Abstract** Selenium and selenium speciation in ginkgo leaf is different in different vegetal period. Each kind of dissolved selenium varies with the seasons. The total selenium content in ginkgo leaf picked in different season was studied and the various dissolved selenium content distribution was discussed. The selenium content in July, September and after the first frost is respectively 1.875, 2.136 and 0.815  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . The selenium exists in ginkgo leaf primarily as a water-soluble speciation. According to the experiment, the thick polysaccharide content in the ginkgo leaf is in the order: July < September < November. The thick polysaccharide in July is the sepia solid powder 25.64  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  and purity is 20.20%; In September the condition is the faint yellow solid powder 31.60  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  and purity is 8.68%; In November is in turn the cream color solid powder 83.57  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , and purity is 17.60%. Their deproteinised solution have no absorption peaks at 260 and 280 nm by UV-Vis, which further demonstrates that the solid powder is exactly the thick polysaccharide by IR. Determination of trace element content in the ginkgo leaf and the thick polysaccharide was carried out by ICP-MS, and the trace element content also changes along with the seasons.

**Keywords** Selenium; Polysaccharide; Ginkgo leaf; Spectral analysis

(Received May 10, 2010; accepted Aug. 20, 2010)