

桑叶多糖中糖醛酸和中性糖含量测定方法的建立

杨鸿玲, 李淑芬*, 贾冬冬

(天津大学化工学院, 绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要 目的: 建立间羟基联苯法和蒽酮硫酸法分别测定桑叶多糖中糖醛酸和中性糖的含量, 并通过校正扣除糖醛酸对中性糖测定的干扰。方法: 间羟基联苯法测定条件: 四硼酸钠-硫酸溶液的用量为 6.0 mL, 加热时间为 10 min, 间羟基联苯加入量为 100 μ L, 显色时间为 40 min, 测定波长为 525 nm。蒽酮硫酸法测定条件: 硫酸蒽酮试剂的用量为 4.0 mL, 加热时间为 10 min, 显色时间为 10 min, 测定波长为 626 nm。结果: 间羟基联苯法和蒽酮硫酸法, 分别在浓度为 $1.34 \times 10^{-2} \sim 4.77 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9998$) 与 $2.13 \times 10^{-2} \sim 8.43 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9995$) 范围内与吸光度呈良好线性关系; 两种方法的平均加样回收率为 99.5% 及 103.7%; 重复性的 RSD 分别为 3.6% 和 2.8%。此外有效地对中性糖与糖醛酸之间的影响进行了校正。结论: 该方法准确可靠, 为桑叶多糖的质量控制提供可借鉴的分析方法。

关键词: 桑叶; 多糖; 糖醛酸; 中性糖

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0301-04

A method for determination of the neutral sugars and uronic acids in mulberry leaves

YANG Hong-ling LI Shu-fen*, JIA Dong-dong

(Key Laboratory for Green Chemical Technologies of the Ministry of Education,

School of Chemical Engineering and Technology Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Objective To establish *m*-hydroxydiphenyl method and anthrone-sulfuric method for the determination of uronic acids and neutral sugars in polysaccharides of mulberry leaves respectively. The interference of the uronic acids was expected to be eliminated by calibration. **Methods** For the *m*-hydroxydiphenyl method, the optimized parameters were obtained as follows: the dosage of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$ and *m*-hydroxydiphenyl was 6.0 mL and 100 μ L, time for heating and color development were 10 min and 40 min respectively. The detection wavelength was 525 nm. For the anthrone-sulfuric method, the dosage of colorimetric reagent was 4.0 mL. Both of the heating and color development time were 10 min. The detection wavelength was 626 nm. **Results** Linearities for *m*-hydroxydiphenyl and anthrone-sulfuric methods were good in ranges of $1.34 \times 10^{-2} \sim 4.77 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9998$) and $2.13 \times 10^{-2} \sim 8.43 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9995$). The average recoveries of the two methods were 99.5% and 103.7%, and RSD of the values of repeatability were 3.6% and 2.8%, respectively. Additionally, the interference of the uronic acids could be eliminated by calibration in the determination of neutral sugars. **Conclusion** The method validation data indicated that the method is reliable and it can be used for quality control of polysaccharides in mulberry leaves and its preparations.

Key words mulberry leaves; polysaccharides; uronic acids; neutral sugars

桑叶为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的叶, 是国家卫生部公布的既是食品又是药品的药食两用植物, 具有极高的营养价值和药用价值, 其主要活性成分为多糖、生物碱、黄酮等, 陈福君^[1]与薛长勇^[2]的

报道均表明桑叶多糖具有降血糖血脂作用, 桑叶多糖在医药和保健品行业具有广阔的应用前景。

桑叶多糖是一种酸性杂多糖, 主要由糖醛酸及各种中性糖组成。文献中通常采用苯酚硫酸法或蒽

* 通讯作者 Tel: (022) 27402720 E-mail: shlf@tju.edu.cn

酮硫酸法,以某一种中性糖为标准品测定酸性杂多糖的总糖含量^[2],由于糖醛酸与中性糖在这种测定方法中的吸光系数不相同,故不能准确地反映样品中的总多糖含量。本文将间羟基联苯法与蒽酮硫酸法结合起来,建立一种能准确地反映样品中糖醛酸和中性糖含量的测定方法。

1 仪器与试剂

桑叶,产地为河南,由石家庄四药集团提供并鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L 的干燥叶片。

半乳糖醛酸(纯度为 97%)购自 Fluka 公司,间羟基联苯(纯度为 98%)购自 Sigma 公司,其余试剂均为分析纯,购自天津大学科威公司。UV-1600 紫外分光光度计。

2 桑叶多糖的提取与纯化

将桑叶依次经水煮、乙醇沉淀、离子交换层析的方法分别得到 MP1、MP2 和 MP3 3 个多糖组分。在醇沉的过程中采用无水乙醇多次洗涤沉淀,至上清液 Molish 反应显阴性为止,表明其中不含游离单糖。

3 糖醛酸的含量测定方法——间羟基联苯法

3.1 溶液的配制

3.1.1 四硼酸钠-硫酸溶液 称取四硼酸钠 1.192 g 用浓硫酸溶解,定容到 250 mL 的量瓶中。

3.1.2 间羟基联苯溶液 称取间羟基联苯 75 mg 溶于 0.5% 的 NaOH 中,定容到 50 mL 量瓶中。

3.1.3 半乳糖醛酸对照品溶液 称取半乳糖醛酸对照品(含一个结晶水) 54.6 mg 用水溶解于 50 mL 量瓶中,定容,摇匀,配成 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,再定量稀释成 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

3.2 测定条件的选择

3.2.1 最大吸收波长的选择 精密量取 1.0 mL 对照品溶液置于具塞试管中,于冰水浴中加入四硼酸钠-硫酸溶液 6.0 mL,沸水浴 10 min,加入间羟基联苯 100 μL ,摇匀,室温放置 40 min 后,以试剂空白为参比,进行全波长扫描,其最大吸收波长为 525 nm。

3.2.2 四硼酸钠-硫酸溶液用量的选择 于冰水浴中加入 5.0~7.0 mL 四硼酸钠-硫酸溶液,其余操作同上,测定吸光度,结果见图 1。

3.2.3 加热时间的选择 沸水浴时间为 1~11 min,其余操作同上,测定吸光度,结果见图 2。

3.2.4 间羟基联苯加入量的选择 加入 60~110 μL 间羟基联苯溶液,其余操作同上,测定吸光度,结果见图 3。

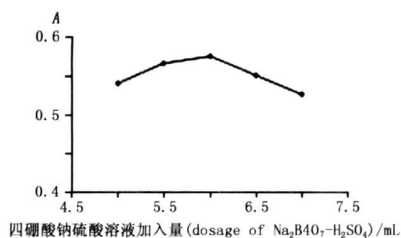


图 1 吸光度随四硼酸钠硫酸溶液加入量的变化

Fig 1 The change trend of absorbance with respect to the dosage of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$

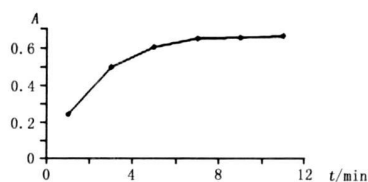


图 2 吸光度随加热时间的变化

Fig 2 The change trend of absorbance with respect to heating time

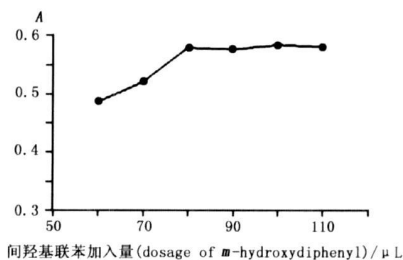


图 3 吸光度随间羟基联苯加入量的变化

Fig 3 The change trend of absorbance with respect to the dosage of *m*-hydroxydiphenyl

3.2.5 显色时间的选择 间羟基联苯法产生显色产物的稳定性,各种报道^[3]的结果不同。精密量取对照品溶液 1.0 mL 置具塞试管中,于冰水浴中加入四硼酸钠-硫酸溶液 6.0 mL,沸水浴 10 min,加入间羟基联苯 100 μL ,摇匀,连续测定其吸光度,结果见图 4。

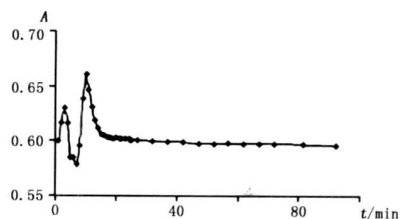


图 4 吸光度随时间的变化情况

Fig 4 The change trend of absorbance with respect to standing time after coloration

3.2.6 小结 综上所述可知,糖醛酸含量测定的条件为:测定波长为 525 nm,四硼酸钠-硫酸溶液用量为 6.0 mL,加热时间为 10 min,间羟基联苯加入

量为 100 μL , 显色时间为 40 min。

3.3 方法学评价

3.3.1 标准曲线的绘制 准确量取 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 mL 分别置 100 mL 量瓶中, 定容。分别取 1.0 mL 置 3 个具塞试管中 (1 个为空白管, 剩余 2 个为样品管) 置于冰水浴中, 加入四硼酸钠-硫酸溶液 6.0 mL, 待全部加完后, 混匀, 于沸水浴 6 min 取出冰水浴冷却后, 用微量加样枪往平行样品管中加入 $1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的间羟基联苯溶液 100 μL , 往空白管中加入 0.5% 的氢氧化钠 100 μL , 混匀后室温放置 40 min, 于 525 nm 下测定吸光度, 得标准曲线:

$$Y = 14.579X + 0.0048 \quad r = 0.9998$$

线性范围为: $1.34 \times 10^{-2} \sim 4.77 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3.2 稳定性试验 取同一对照品溶液, 按“3.3.1”中的方法操作, 显色后每隔 30 min 测定 1 次, 共测定 5 次, 吸光度的 RSD 为 0.59%。

3.3.3 精密度试验 取同一对照品溶液, 重复测定 6 次, 吸光度的 RSD 为 0.86%。

3.3.4 重复性试验 取同一批桑叶多糖, 共 5 份, 测定糖醛酸含量, 分别为 49.0%, 51.9%, 52.2%, 51.5%, 48.2%; RSD 为 3.6%。

3.3.5 回收率试验 取已知含量的桑叶多糖 5 份, 分别加入一定量的半乳糖醛酸对照品, 测定糖醛酸含量, 计算回收率分别为 98.7%, 101.5%, 98.8%, 98.9%, 99.6%; 平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.15%。

4 中性糖的含量测定方法——蒽酮硫酸法

4.1 溶液的配制

4.1.1 蒽酮试剂 取蒽酮 0.20 g 溶于 100 mL 80% 的浓硫酸中。

4.1.2 葡萄糖对照品溶液 称取 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 100.5 mg 用水溶解, 定容于 100 mL 量瓶中, 配制成 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

4.2 方法学评价

4.2.1 标准曲线的绘制^[4] 准确量取对照品溶液 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 6.0 8.0 mL 于 100 mL 量瓶中, 定容。分别取 1.0 mL 置具塞试管中, 于冰水浴中加入 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸-蒽酮试剂 4.0 mL, 各管加完后混合均匀, 一起浸于沸水浴中, 自水浴重新煮沸起, 10 min 后取出, 用自来水冷却, 室温放置 10 min, 以去离子水 1 mL 作为空白, 同法测定 626 nm 处吸光度, 以 Y 为吸光度, X 为浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 绘制标准曲线:

$$Y = 7.941X + 0.0305 \quad r = 0.9995$$

线性范围为 $2.13 \times 10^{-2} \sim 8.43 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

4.2.2 稳定性试验 取同一对照品溶液, 显色后每隔 30 min 测定 1 次, 共测定 5 次, RSD 为 0.95%。

4.3.2 精密度试验 取同一对照品溶液, 重复测定 6 次, RSD 为 1.39%。

4.3.3 重复性试验 取同一批桑叶多糖, 共 5 份, 测定中性糖含量分别为 12.50%, 13.24%, 13.06%, 13.27%, 12.63%; RSD 为 2.8%。

4.3.4 回收率试验 取已知含量的桑叶多糖 5 份, 分别加入一定量的葡萄糖对照品, 测定中性糖含量, 平均回收率为 100.3%, RSD 为 3.84%。

5 中性糖与糖醛酸含量测定间的影响及校正^[5]

按照表 1 配制不同浓度的葡萄糖和半乳糖醛酸混合溶液, 按照“3”及“4”项下方法测定其糖醛酸和葡萄糖含量, 结果见表 1。

表 1 中性糖与糖醛酸含量测定及校正结果 (mg)

Tab 1 The results for determination and correction of neutral sugars and uronic acids

编号 (No.)	理论值 (theoretical value)		测定值 (measured value)		校正值 (corrected value)
	葡萄糖 (glucose)	半乳糖醛酸 (galacturonic acid)	蒽酮硫酸法 (anthrone-sulfuric method)	间羟基联苯法 (m-hydroxydiphenyl method)	葡萄糖 (glucose)
1	0.5	9.5	1.26	9.43	0.51
2	1.0	9.0	1.75	8.85	1.03
3	2.0	8.0	2.65	8.10	2.01
4	4.0	6.0	4.53	5.97	4.05
5	6.0	4.0	6.24	3.94	5.92
6	8.0	2.0	8.63	1.93	7.96
7	9.0	1.0	9.37	1.05	9.02
8	9.5	0.5	9.80	0.52	9.60

由表 1 可以看出, 间羟基联苯法测定的结果与半乳糖醛酸的理论值基本一致, 说明采用间羟基联苯法测定半乳糖醛酸的含量基本不受葡萄糖的影响。

由蒽酮硫酸法的测定结果可知, 半乳糖醛酸对这种测定方法的响应值较小, 但浓度较大时会影响葡萄糖含量的测定。实验结果表明, 用蒽酮硫酸法测定, 溶液的吸光度 (Y) 与半乳糖醛酸浓度 (X, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 含量呈线性关系, 回归方程为:

$$Y = 7.26 \times 10^{-4} X - 1.62 \times 10^{-3} \quad r = 0.9955$$

故测定酸性杂多糖的含量, 可以先通过间羟基联苯法测定其中糖醛酸的含量, 再通过蒽酮硫酸法测定总糖的含量扣除糖醛酸所带来的影响即为中性糖的含量。表 1 的最后一列就是通过以上方法所得的校正值, 从中可以看出, 其值能准确地反应溶液中的葡萄糖含量。

6 桑叶多糖样品的测定

分别精密称取 MP1、MP2、MP3 10.0 mg 于 10 mL 量瓶中加水定容, 分别采用间羟基联苯法及蒽酮硫酸法测定其糖醛酸和中性糖含量, 并对测得的中性糖的含量值加以校正, 结果见表 2。

表 2 桑叶多糖中糖醛酸和中性糖含量测定 (%)
Tab 2 The determination of neutral sugars and uronic acids in polysaccharides of mulberry leaves

样品 (sample)	糖醛酸含量 (content of uronic acids)	中性糖含量 (content of neutral sugars)	
		测定值 (measured value)	校正值 (corrected value)
MP1	45.5	14.2	10.4
MP2	57.4	21.9	17.1
MP3	17.7	12.3	10.8

从表 - 2 可以看出, 如果以蒽酮硫酸法测定的多糖含量来控制桑叶总糖的质量, 其测定结果显然偏低, 而通过糖醛酸含量和校正后得到的中性糖含量能够较真实地反映桑叶多糖的质量。

7 结论

实验结果表明, 中性糖的存在对糖醛酸的含量测定几乎没有影响, 可以通过间羟基联苯法直接测定糖醛酸的含量; 而采用蒽酮硫酸法测定总糖含量时, 由于糖醛酸与中性糖的吸光系数不一样, 产生较大的误差。对于酸性杂多糖的含量测定, 可以先用间羟基联苯法测定其中的糖醛酸含量, 再用蒽酮硫酸法测定中性糖的吸光度, 并根据糖醛酸的蒽酮硫酸法标准曲线, 扣除糖醛酸的含量, 进而计算多糖中的中性糖含量。

参考文献

1 CHEN Fu-jun (陈福君), LU Jun (卢军), ZHANG Yong-yu (张永煜). Pharmacological studies on monos (I): defect of total polysaccharide of monos (TPM) on carbohydrate metabolism in diabetic mice [桑的药理研究 (I)——桑叶降血糖有效组分对糖尿病动物糖代谢的影响]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1996 13(1): 24

2 XUE Chang-yong (薛长勇), TENG Jun-ying (滕俊英), QU Ji-hong (邱继红). The hypoglycemic and hypolipidemic Effects of glyco-peptides complex from Mulberry Leaves (桑叶多糖-肽复合物的降血糖血脂作用). *Acta Nutrimenta Sinica* (营养学报), 2005, 27(2): 167

3 GAO Lin (高林), SHI Xi-fang (施秀芳), ZHANG Wen-bo (张文博). Quantitative determination of uronic acid in MCP (MCP 中糖醛酸的含量测定). *Chem Ind Eng* (化学工业与工程), 2005 22(6): 487

4 ZHANG Wei-jie (张维杰). Research of Bio-glycoconjugates (糖复合物生化研究技术). Hangzhou (杭州): Zhejiang University Press (浙江大学出版社), 2003 297

5 GUO Xin (郭欣), GAO Xiang-dong (高向东), YANG Xiaobing (杨晓兵). Determination of content glucuronic acid and neutral sugar of acidic polysaccharide (酸性多糖中葡萄糖醛酸和中性糖的含量测定). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2004, 25(2): 100

(本文于 2007 年 11 月 22 日收到)