

4 种藤茶多糖的检测方法比较

黄耀宗^{1,2}, 郭清泉¹, 焦文娟², 赵甜甜², 张友胜^{2*}, 黄国滋^{3*}

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 511400) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

(3. 广东省农业科学院茶叶研究所, 广东广州 510640)

摘要: 该研究对比探讨了苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、硫酸-紫外法、二硝基水杨酸法测定藤茶中多糖含量的准确性, 利用单因素试验对 4 种方法的关键检测条件进行了优化, 并对方法学的精密度、重复性、稳定性、加标回收率进行了比较, 再用最佳实验条件检测藤茶样品中多糖的含量。结果表明, 用于藤茶多糖测定的最佳方法为苯酚-硫酸法, 其最适紫外检测波长为 485.5 nm, 以葡萄糖为标准在 0.1~0.6 mg/mL 范围内吸光度具有良好的线性关系。在 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液 (质量浓度为 0.5 mg/mL) 反应体系中, 在 500 μ L 浓硫酸、600 μ L 5wt% 苯酚溶液、60 $^{\circ}$ C 水浴温度和 20 min 水浴时间的最佳实验条件下, 测得其多糖含量为 59.43%, 其精密度最高 (RSD 0.18%), 稳定性最好 (RSD 0.30%)。最后测得藤茶中幼嫩茎叶和粗老茎叶的多糖含量为 9.87~10.47 mg/g 和 29.77~30.47 mg/g。

关键词: 藤茶; 多糖; 检测方法; 比较

文章编号: 1673-9078(2022)11-342-350

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0609

Comparison of Four Methods for the Determination of Polysaccharides in Vine Tea (*Ampelopsis grossedentata*)

HUANG Yaozong^{1,2}, GUO Qingquan¹, JIAO Wenjuan², ZHAO Tiantian², ZHANG Yousheng^{2*}, HUANG Guozi^{3*}

(1. Guangdong University of Technology, School of Chemical Engineering & Light Industry, Guangzhou 511400, China)

(2. Sericulture & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510610, China)

(3. Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The accuracy of the phenol-sulfuric acid method, the anthrone-sulfuric method, the sulfuric acid-UV method, and the dinitrosalicylic acid colorimetric method for the determination of the polysaccharides in vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) was investigated. The key detection conditions of the four methods were optimized by the single factor test. The accuracy, repeatability, stability, recovery rates of the four methods were compared with the optimal experimental conditions for the determination of polysaccharides in vine tea samples. The results showed that the phenol-sulfuric acid method was the most effective for the determination of polysaccharides in vine tea. The optimal UV detection wavelength was 485.5 nm, and the absorbance at 0.1~0.6 mg/mL with glucose as the standard had a good linear relationship. Under the optimal conditions of 500 μ L concentrated sulfuric acid, 600 μ L 5% phenol solution, 60 $^{\circ}$ C water bath temperature, and 20 min water bath time in 0.5 mL crude polysaccharide solution (concentration 0.5 mg/mL) of vine tea, the phenol-sulfuric acid method exhibited the highest precision (RSD 0.18%) and the best stability (RSD 0.30%). The results showed that the polysaccharide content of young and old stems and leaves was 9.87~10.47 and 29.77~30.47 mg/g, respectively.

引文格式:

黄耀宗, 郭清泉, 焦文娟, 等. 4 种藤茶多糖的检测方法比较[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 342-350

HUANG Yaozong, GUO Qingquan, JIAO Wenjuan, et al. Comparison of four methods for the determination of polysaccharides in vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 342-350

收稿日期: 2022-05-15

基金项目: 广东省科技计划项目 (2021B0202060001); 粤财农〔2021〕170 号; 广州市科技计划项目 (202206010079)

作者简介: 黄耀宗 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与轻工, E-mail: 1253768690@qq.com

通讯作者: 张友胜 (1965-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品加工, E-mail: youshengzhang@263.net; 共同通讯作者: 黄国滋 (1964-), 男, 研究员, 研究方向: 茶类产品加工, E-mail: hgzc67@126.com

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; polysaccharide; detection method; method comparison study

藤茶, 又称莓茶、张家界莓茶、连州白茶、长寿藤, 是一种药食同源的藤本植物, 学名为显齿蛇葡萄植物 (*Ampelopsis grossedentata*), 广泛分布于中国南部山区及平原地带。在《饮膳正要》(1330)、《草木便方》(1873)、《广西植物名录》(1971) 等历代植物志中及药用植物名录中均有记载^[1]。藤茶具有止咳、化痰、解痉消炎、预防上呼吸道感染、抗氧化和清除自由基、防止肝功能退化、预防酒精性肝损伤、增强免疫力等作用, 是一种具有营养、保健、药用功能的类茶植物^[2-5]。藤茶既含有丰富的蛋白质(11%~15%)、17种游离氨基酸、17种矿物质以及胡萝卜素(5.23 mg/100 g)、维生素 E (6.32 mg/100 g) 等多种营养成分, 又含有黄酮和多糖两大类活性成分。藤茶中的总黄酮质量分数一般为 35%~45%, 其中单体黄酮类化合物二氢杨梅素一般为 25%~35%, 在目前发现的所有植物中, 藤茶所具有的黄酮含量最高, 被誉为“黄酮之王”^[6-9]。

藤茶多糖是藤茶中另一主要活性成分。随着研究的不断深入, 逐渐发现藤茶多糖具有如免疫调节功能、降低致病菌的繁殖速度、抗感染、降血糖、降血脂等多种的生物活性功能^[10-13]。

从 2013 年藤茶被批准为新资源食品, 2015 年把“藤茶提取物”收录进化妆品原料目录中, 藤茶多糖被许多企业作为原料进行深加工研发产品。与其它植物多糖一样, 藤茶多糖不是一种单一的化学物质, 而是由各种单糖、糖醛酸和蛋白质等不同的物质聚合一起形成的复合物。罗祖友等^[14]对藤茶多糖中的两个纯化多糖组分进行了结构鉴定, 结果表明两种藤茶多糖组分均含有中性糖(57.6%和 46.2%)、糖醛酸(32.3%和 45.7%), 蛋白质(3.5%和 4.7%)。由于多糖本身不具备还原性和变旋现象, 其含量需要经过一定的处理后才能检测得出。目前比色法、滴定法、色谱法、高效毛细管电泳法等是目前较为常用的多糖含量检测方法^[15,16], 但时至今日, 许多文献报道的各种方法由于单糖留存较多, 干扰较大, 常常使结果出现较大的误差, 不同的多糖所适用的检测方法也不同, 所以尚无统一的多糖测定的国家标准方法。鉴于此, 本研究选择目前常用的苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、硫酸-紫外法和二硝基水杨酸(DNS)法等 4 种多糖常用检测方法, 通过光谱扫描, 单因素试验、方法学考察, 比较分析四种方法测定结果的准确性和稳定性, 旨在确定出最佳的藤茶多糖测定方法。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

藤茶原茶, 由湖南乾坤生物科技有限公司提供; 葡萄糖标准品, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 浓硫酸、苯酚、蒽酮、DNS (3,5-二硝基水杨酸), 天津科密欧化学试剂有限公司; 其它所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1800 型紫外分光光度计, 日本岛津有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; Milipore 超纯水净化系统, 美国 Milipore 超纯水系统。

1.3 藤茶粗多糖的提取及粗多糖溶液的制备

称取 200 g 藤茶原茶, 以 1:6 的料液比加入超纯水, 在 100 °C 水浴中提取 1 h, 过滤, 重复 2 次, 合并滤液; 将滤液置于 4 °C 冰箱中过夜, 在 4 000 r/min 条件下离心 20 min 去沉淀; 取上清液旋转浓缩至原体积的 1/2 后重复 4 °C 冰箱静置过夜, 在 4 000 r/min 条件下离心 20 min 后重新去沉淀。取上清液后加入三倍体积无水乙醇, 室温放置 24 h, 在 4 000 r/min 条件下离心 20 min, 收集沉淀, 冷冻干燥得藤茶粗多糖^[7,17]。

取 500.0 mg 上述干燥所得藤茶粗多糖加入 1 000 mL 蒸馏水中, 充分摇匀搅拌溶解, 即得浓度为 0.5 mg/mL 的藤茶粗多糖溶液。

1.4 相关标准溶液的配制

1.4.1 葡萄糖标准溶液的配制

称取 200 mg 葡萄糖标准品, 用超纯水定容至 20.0 mL, 配得 10.0 mg/mL 标准溶液, 放入 4 °C 冰箱备用。分别量取 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL 标准溶液置于 50 mL 容量瓶中用水稀释至刻度线, 摇匀, 即得浓度 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。

1.4.2 苯酚溶液的配制

准确称取 5.0 g 苯酚, 用体积分数 30% 乙醇定容于 100 mL 棕色的容量瓶中, 混匀即得 5wt% 苯酚溶液 (现配现用)。

1.4.3 蒽酮-硫酸溶液的配制

准确称取蒽酮 50.0 mg 置于 100 mL 棕色的容量瓶中, 浓硫酸定容, 混合即得 0.5 mg/mL 的蒽酮-硫酸溶液 (现用现配)。

1.4.4 DNS 试剂的配制

准确称取 DNS 3.15 g, 加入 500 mL 超纯水, 水浴至 45 °C 后逐步加入 100 mL 0.2 g/mL 的氢氧化钠溶液, 不断搅拌直至溶液清澈透明。再加入四水酒石酸钾钠 91.0 g、苯酚 2.50 g 和无水硫酸钠 2.50 g, 再加入 300 mL 超纯水, 45 °C 水浴搅拌至完全溶解, 室温冷却用超纯水定容至 1 000 mL, 混匀后贮于棕色瓶中避光保存 7 d。

1.5 四种检测方法的比较测定

1.5.1 苯酚-硫酸法

用移液枪分别吸取“1.3”项下制备的 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液和“1.4.1”项下制备的 0.5 mg/mL 的葡萄糖标准溶液于 2.0 mL 离心管中, 室温下分别加入 50 mg/mL 苯酚溶液 200~1 000 μ L 摇匀, 缓慢加入浓硫酸 300~700 μ L, 混合后加水定容至 2.0 mL, 置于 50~90 °C 下水浴显色 5~40 min, 冷水浴冷却, 在 485.5 nm 下分别测定吸光值, 以获得最佳的苯酚加入量、浓硫酸加入量、水浴温度和水浴时间等实验参数。然后通过吸取不同浓度的葡萄糖标准溶液, 按上述最佳实验参数进行操作, 在 485.5 nm 下测定吸光度, 绘制苯酚-硫酸法中使用的标准曲线, 按标准曲线最后测定藤茶粗多糖溶液吸光度并计算其多糖含量^[18]。

1.5.2 蒽酮-硫酸法

用移液枪分别吸取“1.3”项下制备的 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液和“1.4.1”项下制备的 0.5 mg/mL 的葡萄糖标准溶液于 2.0 mL 离心管中, 冰水浴中加入 1.4.3 制备的 0.5 mg/mL 蒽酮-硫酸溶液 200~600 μ L, 摇匀, 置于 60~100 °C 下水浴显色 5~40 min 后迅速置于冰水中冷却, 在 620 nm 下分别测定吸光值, 以获得最佳的蒽酮-硫酸溶液加入量、水浴温度和水浴时间等实验参数。然后通过吸取不同浓度的葡萄糖标准溶液, 按上述最佳实验参数进行操作, 在 620 nm 下测定吸光度, 绘制蒽酮-硫酸法中使用的标准曲线, 按标准曲线最后测定藤茶粗多糖溶液吸光度并计算其多糖含量^[18]。

1.5.3 硫酸-紫外法

用移液枪分别吸取“1.3”项下制备的 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液和“1.4.1”项下制备的 0.5 mg/mL 的葡萄糖标准溶液于 2.0 mL 离心管中, 快速加入浓硫酸 300~700 μ L, 置于 25~60 °C 下水浴 5~40 min, 摇匀

30 s 后放入冰水沙浴中快速冷却, 加水至 2.0 mL, 在 315 nm 下分别测定吸光值, 以获得最佳的浓硫酸加入量、水浴温度和水浴时间等实验参数。然后通过吸取不同浓度的葡萄糖标准溶液, 按上述最佳实验参数进行操作, 在 315 nm 下测定吸光度, 绘制硫酸-紫外法中使用的标准曲线, 按标准曲线最后测定藤茶粗多糖溶液吸光度并计算其多糖含量^[19]。

1.5.4 DNS 法

用移液枪分别吸取“1.3”项下制备的 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液和“1.4.1”项下制备的 0.5 mg/mL 的葡萄糖标准溶液于 2.0 mL 离心管中, 加入 DNS 溶液 220~300 μ L, 混匀, 加水至 2.0 mL, 置于 60~100 °C 下水浴显色 3~7 min 后取出, 立即用冰水浴快速冷却至室温, 摇匀后在 510 nm 下分别测定吸光值, 以获得最佳的 DNS 溶液加入量、水浴温度和水浴时间等实验参数。然后通过吸取不同浓度的葡萄糖标准溶液, 按上述最佳实验参数进行操作, 在 510 nm 下测定吸光度, 绘制标准曲线, 按标准曲线最后测定藤茶粗多糖溶液吸光度并计算其多糖含量^[20]。

1.6 方法学考察

1.6.1 精密度测定

取 0.5 mL 藤茶粗多糖样品溶液, 分别用“1.5”项四种方法的最佳参数处理后在最大吸收波长处测定吸光度, 同一样品溶液在 2 min 内连续测定 6 次吸光度, 计算结果的 RSD 值。

1.6.2 重复性测定

称取 1.0 g 藤茶粗多糖 5 份, 制备成样品溶液后分别用“1.5”项四种方法的最佳参数处理后在最大吸收波长处测定吸光度, 计算结果的 RSD 值。

1.6.3 加标回收率测定

取 5 份已知含量的藤茶多糖样品溶液, 加入一定量的葡萄糖标准溶液后分别用“1.5”项四种方法的最佳参数处理后在最大吸收波长处测定吸光度, 计算结果的 RSD 值。

1.6.4 稳定性测定

取 0.5 mL 藤茶粗多糖样品溶液, 分别用“1.3”项四种方法的最佳参数处理后在最大吸收波长处每隔 20 min 测定吸光度, 共测定 6 次 (120 min), 计算结果的 RSD 值。

1.7 不同藤茶样品中多糖含量的测定

按“1.3”项下的方法进行样品多糖的提取, 按“1.5”项下所获得最佳参数方法和步骤进行多糖含量测定。

1.8 数据处理与结果分析

所有分析测试结果均采用三次平行处理；采用 SPSS 26.0 软件包进行数据处理；采用 Origin 9 软件进行绘图处理；显著性水平取 0.05，数据表示形式为平均值±标准差。

2 结果与讨论

2.1 四种方法最适吸收波长的确定

用四种检测方法分别处理葡萄糖溶液和藤茶多糖溶液后，用紫外光谱检测 220~700 nm 波长内的吸光度。由扫描结果（图 1）可知，苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、硫酸-紫外法和 DNS 法的最适吸收波长分别为 485.5、620、315 和 510 nm。与文献报道结果相似^[18-20]。另外，从出峰波长及对称性来看，苯酚-硫酸法、（图 1a）、二硝基水杨酸（DNS）法（图 1d）可能比其它 2 种更适合测定藤茶样品中总多糖的含量。

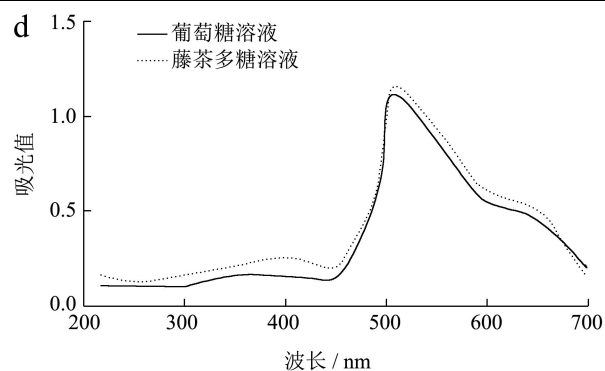
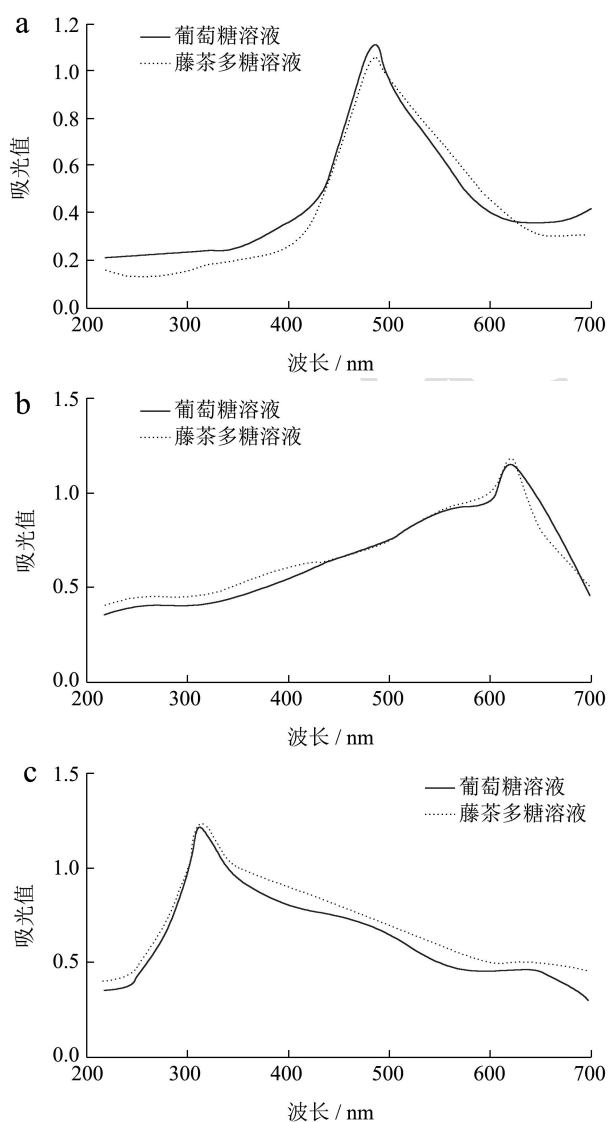


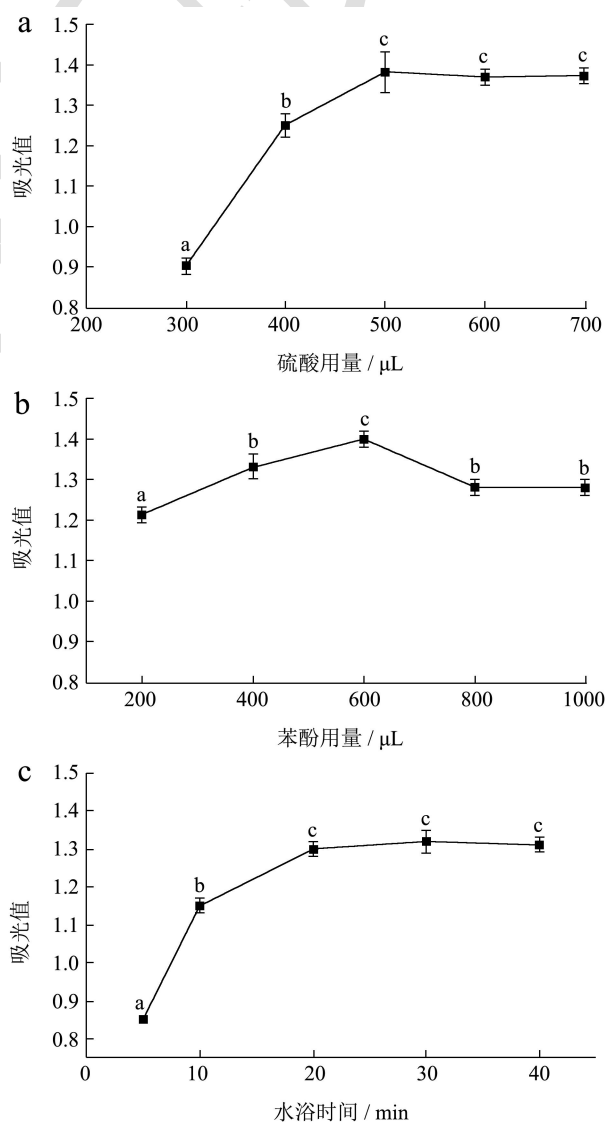
图 1 四种方法在 220~700 nm 波长处的紫外扫描图

Fig.1 The results of ultraviolet scanning of four methods at 220~700 nm

注：a 为苯酚-硫酸法；b 为蒽酮-硫酸法；c 为硫酸-紫外法；d 为 DNS 法。

2.2 四种方法最佳实验条件的确定

2.2.1 苯酚-硫酸法



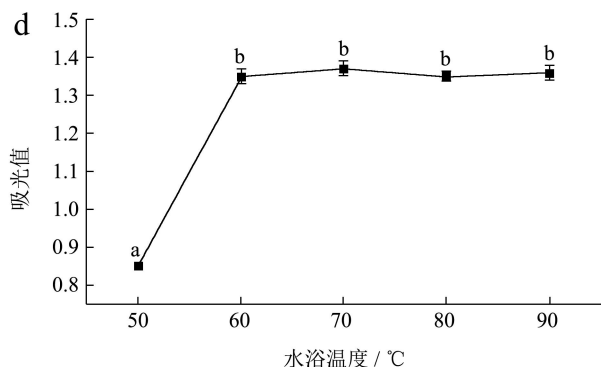


图2 苯酚-硫酸法中检测条件对吸光值的影响

Fig.2 Influence of detection conditions on absorbance value in phenol-sulfuric acid method

注: a 为硫酸用量; b 为苯酚用量; c 为水浴时间; d 为水浴温度。数据间标不同字母表示差异性显著, $p < 0.05$, 下同。

苯酚-硫酸法是多糖在硫酸的作用下生成糖醛衍生物, 然后与苯酚生成橙黄色化合物, 在 485.5 nm 处有一最大紫外吸收峰, 随着多糖含量的增加, 其颜色和吸光度也会递增。由此可见, 苯酚-硫酸法测定的多糖结果是否准确、稳定与实验过程中加入的硫酸数量、苯酚数量、生成橙黄色化合物时的反应温度和反应时间等 4 个关键因素具有密切关系^[21]。

由图2可以看出苯酚-硫酸法中4个关键检测条件的单因素实验对吸光值的影响结果。在 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液(浓度为 0.5 mg/mL)体系中, 随着浓硫酸添加量逐渐增加, 与各添加量对应的吸光值显示出增加后持平的趋势, 当浓硫酸的添加量为 500 μ L 时吸光时最大, 进一步增加时的吸光值没有发现显著的差异 ($p < 0.05$); 逐步增加 50 mg/mL 苯酚溶液的加入量, 各加入量对应的吸光值呈现先增加后缓慢减少的趋势, 在加入量为 600 μ L 时吸光值为最大, 数据之间具有显著性差异 ($p < 0.05$); 当水浴时间达到 20 min 时, 对应吸光值最大, 即使延长水浴时间, 吸光值也没有显著差异 ($p < 0.05$); 随着水浴温度变高, 与各温度对应吸光值有增加的趋势, 温度达到 60 $^{\circ}$ C 时达到最大吸光值, 之后的吸光值没有显著差异 ($p < 0.05$)。因此, 利用苯酚-硫酸法测定藤茶粗多糖含量, 综合考虑吸光值大小、实验时间和操作难易程度, 其最佳实验条件为 500 μ L 浓硫酸、600 μ L 苯酚溶液、60 $^{\circ}$ C 水浴温度和 20 min 水浴时间。

本实验结果与杨勤等^[22]用苯酚-硫酸法测定地参多糖、谢建华等^[23]用苯酚-硫酸法测定青钱柳多糖的研究相比, 反应温度和反应时间存在差异, 其原因可能在于一是反应体系内多糖种类、含量之间存在差异; 二是部分实验没有对测定的吸光值进行差异性分析, 事实上尽管数值的绝对值仍在变化, 但数值之间并没

有显著性差异。尤其就苯酚-硫酸法而言, 反应为放热反应, 反应过程中产生的热量能够保证反应的正常进行, 过高的温度不利于操作, 选择适当低温并不影响实验结果。

2.2.2 蒽酮-硫酸法

蒽酮-硫酸法其原理与苯酚-硫酸法类似, 多糖在硫酸的作用下生成糖醛衍生物(羟甲基糖醛), 再与蒽酮脱水缩合成蓝绿色化合物, 通过紫外扫描发现该物质在 620 nm 处有最大吸收峰, 其颜色的深浅和吸光值与多糖含量呈正比。由原理可知蒽酮-硫酸试剂的加入量、水浴温度和水浴时间是影响实验结果的关键条件^[24]。

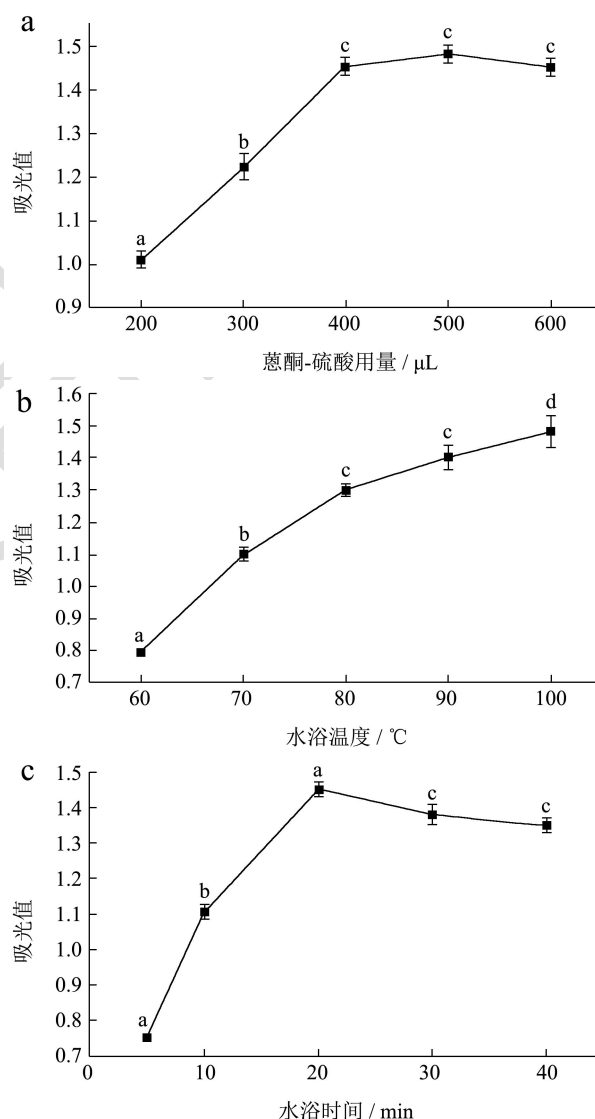


图3 蒽酮-硫酸法中检测条件对吸光值的影响

Fig.3 Influence of detection conditions on absorbance value in anthrone-sulfuric acid method

注: a 为蒽酮-硫酸用量; b 为水浴温度; c 为水浴时间。

由图3可以看出蒽酮-硫酸法中3个关键检测条件的单因素实验对吸光值的影响结果。在 0.5 mL 藤

茶粗多糖溶液(浓度为 0.5 mg/mL)体系中,逐步增加 0.5 mg/mL 的蒽酮-硫酸溶液的加入量,各加入量对应的吸光值呈现先增加后平稳的趋势,当加入量达到 400 μL 时对应的吸光值最大,增大加入量,吸光值无显著性差异 ($p < 0.05$); 在 60~100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温度范围内,各温度对应的吸光值均有显著性差异 ($p < 0.05$) 且温度越高吸光值越大,说明水浴温度对吸光值的影响很大,实验要求在沸水状态下进行;当水浴时间达到 20 min 时,吸光值最大,延长水浴时间,对应的吸光值呈缓慢下降趋势。因此,利用蒽酮-硫酸法测定藤茶粗多糖含量,综合考虑吸光值大小、实验时间和试剂用量,其最佳实验条件为 0.5 mg/mL 蒽酮-硫酸溶液 400 μL 、100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴、水浴时间 20 min。

本实验结果与张红等^[25]利用蒽酮-硫酸法测定桑叶中多糖的含量、王文洁等^[26]利用蒽酮-硫酸法测定凉粉草多糖所获得的蒽酮-硫酸用量和反应温度两个条件有所不同。其主要原因在于多糖具有多种反应体系,蒽酮-硫酸的用量取决于多糖种类及含量,所以不能一概而论;另外糖醛衍生物与蒽酮反应需要合适的温度以及合适的时间,温度高,时间可以缩短,温度低,相应反应时间要延长。

2.2.3 硫酸-紫外法

硫酸-紫外法是 2013 年 Ammar 等^[27]以简化实验步骤、缩短实验时间以及避免因苯酚-硫酸法中所使用的苯酚给人体及环境带来危害为目的而改进的一种方法。硫酸-紫外法是直接利用强酸水解多糖,利用多糖水解后所产生的糖醛或其衍生物在 315 nm 波长处具有紫外吸收的特点,通过绘制标准曲线对多糖进行定量测定。应用硫酸-紫外法测定多糖,实验过程中的浓硫酸用量和反应时的温度、时间是对结果产生影响的主要因素。

由图 4 可以看出,浓硫酸用量少于或超过 500 μL 时对吸光值产生明显影响,其原因可能在于浓硫酸用量过多时,过量的浓硫酸可能对 315 nm 波长处有紫外吸收的产物进行继续水解形成没有紫外吸收的产物;而浓硫酸用量过少时,部分多糖可能没有得到水解。在 25~60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温度范围内,温度对吸光值没有显著差异,其原因可能在于硫酸-紫外法为放热反应,实验产生的热量足够保证反应正常进行;当水浴时间达到 20 min 时,吸光值最大,延长水浴时间,对应的吸光值没有差异。因此,利用硫酸-紫外法测定藤茶多糖的最佳实验条件是 500 μL 浓硫酸、水浴温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、水浴 20 min。实验结果与辛敏等利用硫酸-紫外法测定千两茶中总多糖的条件基本一致^[28]。

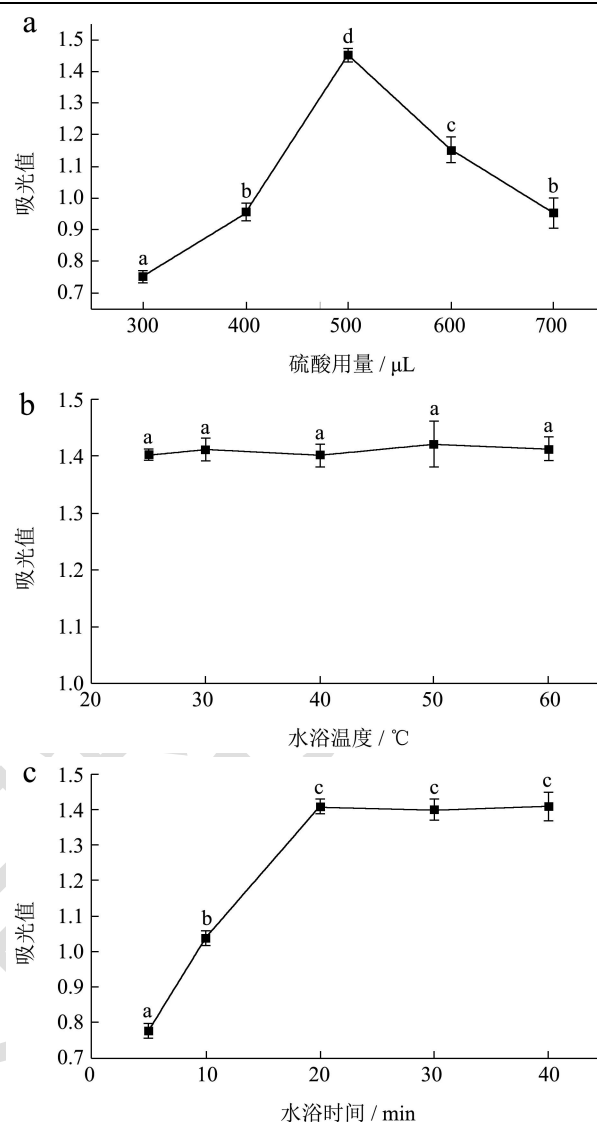


图 4 硫酸紫外法中检测条件对吸光值的影响

Fig.4 Influence of detection conditions on absorbance value in sulfuric acid UV method

注: a 为硫酸用量; b 为水浴温度; c 为水浴时间。

2.2.4 DNS 法

DNS 法是还原糖能在碱性条件下与 DNS 发生显色反应,在高温条件下呈棕红色,其颜色的深浅和吸光度与还原糖含量成正比。故 DNS 方法适合用在多糖水解产生的多种还原糖体系中。对于 DNS 法而言,DNS 用量、反应温度和反应时间是影响吸光度的主要因素。

由图 5 可以看出,随着 DNS 用量的增加,吸光值呈现增大趋势,当加入量达到 240 μL 时,吸光值达到最大;在 60~100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温度范围内,各温度对应的吸光值均有显著性差异 ($p < 0.05$),且温度越高吸光值越大,说明水浴温度对吸光值的影响很大,实验要求在沸水状态下进行;反应时间达到 5 min 时,吸光值变化呈平稳状态。因此,利用 DNS 法测定藤茶

粗多糖含量,在 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液(浓度为 0.5 mg/mL)反应体系中,选择 DNS 用量 240 μ L、水浴温度 100 $^{\circ}$ C,反应时间 5 min 时,吸光值最大。实验结果与任婧等^[20]用 DNS 法测定番茄果实总糖、欧能奉等^[28]测定当归多糖的反应温度和反应时间基本相同,但选择 DNS 最佳用量与本研究有较大差别,其主要原因在于实验过程中反应体系中多糖的种类和含量不同所致。

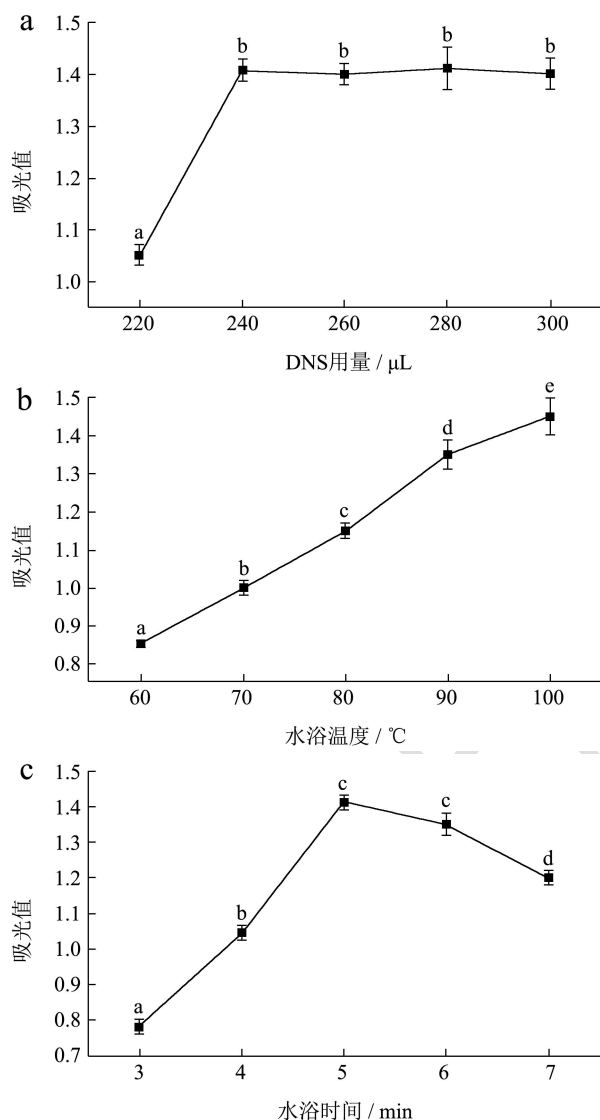


图5 DNS 法中检测条件对吸光值的影响

Fig.5 Influence of detection conditions on absorbance value in dinitrosalicylic acid method

注: a 为 DNS 用量; b 为水浴温度; c 为水浴时间。

2.3 四种方法标准曲线的比较

按照“1.5”项下所获得的最佳实验参数和步骤进行操作,以葡萄糖标准溶液系列浓度 C (mg/mL) 为横坐标,吸光度 A 值为纵坐标,绘制标准曲线,分别得到四种方法相对应的线性回归方程: 苯酚-硫酸法:

$A=1.5168C+0.0911$, $R^2=0.9989$, 线性范围为 0.1~0.6 mg/mL; 蒽酮-硫酸法: $A=1.4452C+0.1697$, $R^2=0.9984$, 线性范围为 0.1~0.6 mg/mL; 硫酸-紫外法: $A=0.7999C+0.2948$, $R^2=0.9988$, 线性范围为 0.1~0.6 mg/mL; DNS 法: $A=0.9812C-0.0217$, $R^2=0.9986$, 线性范围为 0.1~0.6 mg/mL。四种方法的相关系数 R^2 表明在相应的线性范围内,四种方法的标准曲线均线性良好。

2.4 四种测定方法的方法学考察结果

方法学分析结果如表 1 所示,四种方法精密度的 RSD 值均小于 1.5%,说明方法的精密度较好;四种方法重复性的 RSD 值均小于 2.0%,在误差允许范围内再现性良好;在 120 min 实验时间内,4 种方法的稳定性 RSD 值均小于 1.6%,说明方法测定所基于的产物是基本稳定的;四种方法的加标回收率结果显示,相互之间并没有显著性差异。

综合方法学考虑结果,就藤茶多糖而言,苯酚-硫酸法是一种最好的方法,其精密度最高(RSD 为 0.18%),稳定性最好(RSD 为 0.30%),重复性(RSD 为 1.56%)、加标回收率(RSD 为 100.41%)也处于 4 种方法的中值。其原因可能在于,苯酚-硫酸法中是分开加入试剂,试剂之间互相影响较小,加入苯酚试剂后迅速加入浓硫酸,浓硫酸与多糖生成的产物迅速与苯酚反应,浓硫酸所放出的热量足够让反应得以顺利完成,实验过程中的反应温度不应该是关键因素;此外,反应生成的最后产物也比较稳定,在一定时间内不会分解,所以稳定性和精密度比较好;由于反应比较彻底完全,所以重复性和回收率也比较高。

从样品总多糖含量测定的数据来看,DNS 测得的样品含量最高(61.65%),硫酸-紫外法测得样品含量最低(53.56%),苯酚-硫酸法(59.43%)和蒽酮-硫酸法(58.08%)居于中间,含量均具有显著性差异($p<0.05$)。其原因可能在于 DNS 法的专属性不强,显色的深浅只与多糖中还原基团的数量有关,而对还原基团的种类没有选择性,从而使得所测结果偏高^[20,27];而硫酸-紫外法是直接利用强酸处理多糖,利用处理后所产生的糖醛或其衍生物在 315 nm 处直接显色进行测定,但有可能部分多糖产物在 315 nm 处不显色,从而使得所测结果偏低^[19]。苯酚-硫酸法是利用多糖在硫酸的作用下脱水生成的糖醛衍生物与苯酚生成的橙黄色化合物,在 485.5 nm 处测定吸光值,而蒽酮-硫酸法则是利用多糖在硫酸的作用下脱水生成糖醛衍生物与蒽酮脱水缩合成蓝绿色化合物,在 620 nm 处测定吸光度。苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法能够测定可溶性糖含量,所以测得的多糖含量居于 4 种方法的中间^[18,21]。

表1 四种方法测定藤茶样品中总多糖的含量及方法学考察结果

Table 1 The comparison of methodological and results of polysaccharide in *Ampelopsis grossedentata* by four methods (% , $\bar{x}\pm SD$, $n=3$)

方法	总多糖含量	精密度 RSD	重复性 RSD	稳定性 RSD	加标回收率
苯酚-硫酸法	59.43±6.87 ^b	0.18±0.01 ^d	1.56±0.10 ^b	0.30±0.01 ^d	100.41±0.97 ^a
蒽酮-硫酸法	58.08±15.8 ^c	1.4±0.10 ^a	1.31±0.10 ^c	1.57±0.12 ^a	98.78±1.42 ^a
硫酸-紫外法	53.56±14.41 ^d	0.39±0.01 ^c	0.48±0.00 ^d	1.45±0.11 ^b	100.97±2.30 ^a
DNS 法	61.65±10.64 ^a	1.09±0.01 ^b	1.65±0.12 ^a	0.58±0.02 ^c	99.40±1.89 ^a

注：表中不同字母表示差异性显著 ($p<0.05$)；差异性分析为相关指标同一列数据之间的比较。下表同。

表2 不同样品中多糖含量 (幼嫩茎叶, mg/g)

Table 2 The polysaccharide content in different samples (young stems and leaves, mg/g)

方法	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7
苯酚-硫酸法	10.33±0.18 ^b	10.43±0.19 ^b	10.34±0.16 ^b	10.47±0.16 ^b	10.43±0.17 ^b	10.03±0.17 ^b	9.87±0.14 ^b
蒽酮-硫酸法	9.98±0.14 ^c	10.81±0.14 ^a	10.17±0.11 ^b	10.77±0.15 ^a	9.84±0.14 ^c	9.88±0.13 ^b	8.71±0.11 ^c
硫酸-紫外法	8.66±0.09 ^d	9.13±0.10 ^c	8.56±0.09 ^c	8.83±0.09 ^c	8.66±0.08 ^d	8.53±0.08 ^c	8.21±0.08 ^d
DNS 法	10.70±0.05 ^a	11.04±0.04 ^a	10.90±0.04 ^a	10.97±0.07 ^a	10.67±0.03 ^a	10.62±0.05 ^a	10.35±0.07 ^a

表3 不同样品中多糖含量 (粗老茎叶, mg/g)

Table 3 The polysaccharide content in different samples (coarse old stems and leaves, mg/g)

方法	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7
苯酚-硫酸法	30.31±1.18 ^b	30.43±1.19 ^b	30.34±1.23 ^b	30.47±1.26 ^b	30.43±1.27 ^b	30.23±1.27 ^b	29.77±1.19 ^b
蒽酮-硫酸法	30.98±1.14 ^b	30.81±1.14 ^a	30.17±1.22 ^b	30.77±1.15 ^a	29.84±1.14 ^c	29.98±1.23 ^b	28.91±1.17 ^c
硫酸-紫外法	28.36±1.19 ^c	29.11±1.35 ^c	28.56±1.09 ^c	28.83±1.19 ^c	28.76±1.38 ^d	28.43±1.18 ^c	28.31±1.28 ^d
DNS 法	33.71±1.15 ^a	31.14±1.14 ^a	30.91±1.04 ^a	30.97±1.07 ^a	30.97±1.14 ^a	30.32±1.15 ^a	30.35±1.05 ^a

2.5 四种方法对不同样品多糖含量的测定

用苯酚硫酸法、蒽酮硫酸法、硫酸-紫外法、DNS 法分别对来自相同季节、不同地点的 7 批样品中的多糖含量进行了统一检测。由表 2 和表 3 可以看出, DNS 法检测的多糖含量最高, 硫酸-紫外法检测的多糖含量最低, 7 个样品中总多糖含量幼嫩茎叶为 9.87~10.47 mg/g、粗老茎叶为 29.77~30.47 mg/g。从统计学来看, 4 种方法检测的结果基本均存在显著性差异 ($p<0.05$)。样品测定的多糖含量结果趋势与 4 种方法的方法学考察时的结果趋势一致。

3 结论

本研究以葡萄糖为对照品, 选用苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、硫酸-紫外法和 DNS 法对藤茶中的多糖含量进行比较测定, 四种测定方法相的最大紫外吸收波长分别为 485.5、620、315 和 510 nm, 此时样品多糖与标准品的峰形基本一致, 对称性较好。四种方法的单因素试验结果表明, 在 0.5 mL 藤茶粗多糖溶液 (浓度为 0.5 mg/mL) 反应体系中, 苯酚-硫酸法的最佳实验条件为 500 μ L 浓硫酸、600 μ L 苯酚溶液、60 $^{\circ}$ C 水浴温度和 20 min 水浴时间, 蒽酮-硫酸法的最佳实验条件为 0.5 mg/mL 蒽酮-硫酸溶液 400 μ L、100 $^{\circ}$ C 水

浴、水浴时间 20 min, 硫酸-紫外法的最佳实验条件为 500 μ L 浓硫酸、水浴温度 25 $^{\circ}$ C、水浴时间 20 min, DNS 法的最佳实验条件为 DNS 用量 240 μ L、水浴温度 100 $^{\circ}$ C, 水浴时间 5 min, 此时吸光值最大, 实验所用试剂和实验时间最少。四种方法的方法学分析结果表明, 四种方法均可用于藤茶多糖含量的测定。其精密度的 RSD 值均小于 1.5%, 方法的精密度较好; 实验重复性的 RSD 值均小于 2.0%, 在误差允许范围内, 四种方法均有良好的重现性; 在 120 min 实验时间内, 4 种方法的稳定性 RSD 值均小于 1.6%, 说明方法测定所基于的产物是基本稳定, 使用时只要严格控制测定时间方法是稳定的; 加标回收率结果显示, 四种方法之间数据没有显著性差异。但就藤茶多糖而言, 苯酚-硫酸法是最好的方法, 其精密度最高 (RSD 为 0.18%), 稳定性最好 (RSD 为 0.30%), 重复性 (RSD 为 1.56%)、加标回收率 (RSD 为 100.41%) 和最终测得的多糖含量数值也处于 4 种方法的中值。利用 4 种方法对藤茶幼嫩茎叶干燥样品进行测量, 7 个样品中总多糖含量幼嫩茎叶为 9.87~10.47 mg/g、粗老茎叶为 29.77~30.47 mg/g。

参考文献

[1] 冉京燕, 方建国, 谢雪佳, 等. 藤茶的本草资源学研究概况[J].

- 中草药,2016,47(20):3728-3735
- [2] DAI Qing, YU Jianping, Yu Lina, et al. Effects of dihydromyricetin extracted from *Ampelopsis grossedentata* on visceral organ indexes and intestinal digestive enzyme activities of chickens [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2016, 8(3): 159-164
- [3] ZHANG Qili, ZHAO Yanfang, ZHANG Meiyang, et al. Recent advances in research on vine tea, a potential and functional herbal tea with dihydromyricetin and myricetin as major bioactive compounds [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 11: 555-563
- [4] KE Zhen, ZHU Hua, ZHONG Shian, et al. Study on extraction and separation of dihydromyricetin from vine tea [J]. *Agricultural Biotechnology*, 2020, 9(1): 73-79
- [5] Xiao Zheng, Hao Xiao, Zhi Zeng, et al. Composition and serum antioxidation of the main flavonoids from fermented vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. *Journal of Functional Food*, 2014, 9: 290-294
- [6] 张友胜, 宁正祥, 杨伟丽. 藤茶学[M]. 广州: 广东科技出版社, 2003
- [7] 张友胜, 刘军, 王文茂. 张家界莓茶[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2020
- [8] LIU Chunyu, SUN Yangyang, WANG Siquang, et al. Dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* and its derivatives: structural characterization and anti-hepatocellular carcinoma activity [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1258: 1-9
- [9] Renata C V Carneiro, YE Liyun, Naerin Baek, et al. Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): A review of chemical composition, functional properties, and potential food applications [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 76: 1-12
- [10] 潘欣妍, 佟长青, 赵菲, 等. 显齿蛇葡萄多糖的提取及鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(23): 148-150
- [11] LIU Chunyu, SUN Yangyang, JIA Yunqin, et al. Effect of steam explosion pretreatment on the structure and bioactivity of *Ampelopsis grossedentata* polysaccharides [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 185: 194-205
- [12] JIN Liang, LI Xiaobai, TIAN Danqing, et al. Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China [J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 87: 198-209
- [13] Ruyi Ma, Rongrong Zhou, Runna Tong, et al. At-line hyphenation of high-speed countercurrent chromatography with Sephadex LH-20 column chromatography for bioassay-guided separation of antioxidants from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1040: 112-117
- [14] 罗祖友, 程超, 李伟, 等. 藤茶水溶性多糖的分离纯化及性质的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 151-154
- [15] DENG Yong, CHEN Lingxiao, ZHU Baojie, et al. A quantitative method for polysaccharides based on endo-enzymatic released specific oligosaccharides: A case of *Lentinus edodes* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 205: 15-22
- [16] 张钱钱. 植物多糖分析方法的研究进展[J]. *临床医药文献杂志*, 2018, 5(14): 197-198
- [17] 陈业, 罗祖友, 向东山. 藤茶黄酮类化合物的提取分离与定量方法研究进展[J]. *湖北民族学院学报(自然科学版)*, 2008, 26(3): 277-281
- [18] 张洁媛, 张丽, 宁恩创. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定苦瓜多糖的比较[J]. *现代食品*, 2018, 22: 80-85
- [19] 辛敏, 刘轩, 詹欣, 等. 硫酸-紫外法与苯酚-硫酸法测定千两茶中总多糖的比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3): 62-65
- [20] 任婧, 李景富, 张佳, 等. 基于 3,5-二硝基水杨酸比色法建立一种快速测定总糖含量的方法[J]. *黑龙江科学*, 2017, 8(10): 66-69
- [21] 王文洁, 唐炜, 俞玲娜, 等. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定凉粉草多糖的比较[J]. *现代科技*, 2017, 42(9): 274-279
- [22] 杨勤, 谷文超, 周浓, 等. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(1): 343-345
- [23] 谢建华, 谢明勇, 聂少平, 等. 苯酚-硫酸法测定青钱柳中多糖含量[J]. *食品工业*, 2010, 4: 93-95
- [24] 王宏军, 邓旭明. 蒽酮-硫酸比色法检测多糖条件的优化[J]. *中国饲料*, 2014, 11(4): 39-41
- [25] 张红, 王鹏, 李翠清. 响应面分析优化蒽酮-硫酸法测定桑叶中多糖的含量[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 62-65
- [26] 王文洁, 唐炜, 俞玲娜, 等. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定凉粉草多糖的比较[J]. *现代科技*, 2017, 42(9): 274-279
- [27] Ammar A Albalasmeh, Asmeret Asefaw Berhe, Teamrat AGhezzehei. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 97: 253
- [28] 欧能奉, 丘亮日, 温颖婉. 3,5-二硝基水杨酸法测定当归多糖的研究[J]. *中国处方药*, 2017, 15(7): 34-36