

苯酚-硫酸比色法测定毛竹叶多糖的研究

周跃斌¹, 王伟^{2,4}, 周向荣^{1,3}

(1. 湖南农业大学产业处, 湖南 长沙 410128) (2. 湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128) (3. 湖南省标准化研究院, 湖南 长沙 410128) (4. 湖南省三利进出口有限公司, 湖南 长沙 410000)

摘要: 对苯酚—硫酸比色法测定毛竹叶中的多糖含量进行了研究。结果表明此法灵敏度高, 重复性好, 多糖最佳检测波长为 490 nm, 在浓度 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性相关系数 $R^2=0.9993$, 重现性标准差为 0.0055, 回收率 99.22%。

关键词: 毛竹叶; 多糖; 苯酚-硫酸比色法

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0180-04

Determination of Polysaccharides in *Phyllostachys pubescens* Leaves by Phenol-vitriolic Colorimetry

ZHOU Yue-bin¹, WANG Wei^{2,4}, ZHOU Xiang-rong^{1,3}

(1. Product Agent, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China) (2. Research Center for Natural Products, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China) (3. Sanny Imp. & Exp. Corp. Ltd., Changsha 410128, China) (4. Hunan provincial sanny Imp. & Exp. Corp. Ltd. Changsha 410000, China)

Abstract: The content of total polysaccharides in *Phyllostachys pubescens* leaves by phenol-vitriolic colorimetry were studied. Results showed that this method was credible and reproducible and the linear concentration range was within 20~100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9993$) at the best detection wavelength of 490 nm, recurrence standard deviation was 0.0055 and the rate of recycle was 99.22%.

Key words: *Phyllostachys pubescens* leaves; polysaccharide; phenol-vitriolic colorimetry

我国竹林资源丰富, 与竹子的整株利用相比, 竹叶大部分作为一种加工废弃物处理, 其资源长期未得到充分的利用, 造成资源的严重浪费。随着科技的进步, 人们对竹叶生理功能认识的深入, 从竹叶中提取生物活性物质已成为扩大竹叶资源利用途径、开发新型植物来源保健食品及药品的一个热点^[1,2], 其开发前景非常广阔。现在, 我国对竹叶成分分析、加工、开发利用研究已取得了令人瞩目的成就。但目前的文献中, 对竹叶抽提物的抗氧化、抑菌及药理作用报道较多, 而对于确定提取条件、检测方法等涉及生产的问题报道较少^[3]。

竹叶中含有非常丰富的多糖类物质。竹叶多糖是一种具有多种生理功能和开发价值的植物活性多糖, 临床试验和动物试验均证明竹叶多糖有抗癌、提高免疫、降血脂和降血清胆固醇以及抗氧化作用, 对人体

有独特的保健功效^[4]。

毛竹 (*Phyllostachys pubescens*) 是我国南方最主要的经济竹种之一, 占我国竹林总面积的 64.1%^[5], 目前国内对毛竹叶的研究已取得可喜的成果^[5-7], 但其多糖的检测研究还较少。本文对苯酚—硫酸比色法测定毛竹叶多糖进行了研究, 旨在为我国毛竹叶多糖资源的开发提供一种简单可靠的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试验样品为 3~5 年毛竹叶, 2006 年 12 月采自湖南益阳, 经洗净低温烘干后粉碎, 取 60 目产品于磨口瓶中。

1.2 化学试剂

葡萄糖 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 苯酚 (分析纯, 武汉江北化学试剂有限公司), 浓硫酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 试验仪器

UV-2550 型紫外分光光度计 (Shimadzu), 754 型分光光度计 (上海精密化学仪器有限公司), 涡流混匀

收稿日期: 2007-10-23

项目基金: 湖南省科技厅项目 (B-138)

作者简介: 周跃斌 (1963-), 男, 湖南桃江县人, 副教授, 研究方向为天然产物研究与开发

通讯作者: 周向荣

器, 4504 MP 微量电子天平(瑞士 Startorius, 0.00001)。

1.4 试验方法

1.4.1 供试溶液配制

准确称取毛竹叶磨碎样(60目)2.0g, 加100mL蒸馏水预浸1h, 在80℃条件下提取3次, 每次60min, 提取液减压浓缩至10mL, 加4倍于浓缩液体积的95%乙醇沉淀, 静置过夜, 离心取沉淀, 沉淀定容到100mL备用。

1.4.2 苯酚试剂的配制

准确称取12.5g苯酚, 置于250mL棕色容量瓶中, 蒸馏水定容至刻度, 置冰箱中备用。

1.4.3 多糖检测波长的确定

取对照溶液和供试溶液, 分别经苯酚-硫酸试剂显色后, 用UV-2501紫外可见分光光度计在400~600nm波长范围内作全波长扫描, 确定最佳吸收波长。

1.4.4 苯酚用量的确定

分别准确吸取7份标准液1mL于7支20mL试管中, 再在7支试管中分别加入1.0mL、1.4mL、1.8mL、2.0mL、2.2mL、2.4mL、2.6mL苯酚溶液, 加蒸馏水定容至3.6mL, 摇匀, 沿管壁迅速加入7mL浓硫酸, 静置30min, 涡流混匀, 冷水浴冷却后, 在490nm处测定吸光值A, 确定较适苯酚用量。

1.4.5 浓硫酸用量的确定

分别准确吸取7份标准液1mL于20mL试管中, 再分别加入5%苯酚溶液2.0mL, 摇匀, 沿管壁迅速加入4.0mL、5.0mL、5.5mL、6.0mL、6.5mL、7.0mL、8.0mL、9.0mL浓硫酸, 加蒸馏水定容至同刻度, 静置30min, 涡流混匀。冷水浴冷却后, 在490nm处测定吸光值A, 确定较适浓硫酸用量。

1.4.6 稳定性试验

分别准确吸取7份标准液1mL于20mL试管中, 再分别加入5%苯酚溶液2.0mL, 摇匀, 沿管壁迅速加入浓硫酸7.0mL, 分别静置5.0min、10.0min、15.0min、20.0min、25min、30.0min、40.0min, 涡流混匀。冷水浴冷却后, 在490nm处测定吸光值A。选择显色稳定的时间测定吸光度。

1.4.7 标准曲线制作

分别准确吸取0.1mg/mL葡萄糖标准液1mL、2mL、3mL、4mL、5mL于5个50mL容量瓶中, 加水定容至刻度后, 各吸取1mL于20mL试管中, 以1mL蒸馏水为对照, 按前面选定的较优测定参数进行硫酸-苯酚法检测。

1.4.8 重现性试验

准确吸取5份标准应用液1mL, 按以上条件进行

苯酚-硫酸法检测, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.4.9 回收率试验

准确吸取3份供试溶液1mL, 按选定的条件进行硫酸-苯酚法检测, 由标准曲线计算多糖浓度, 取其平均值。准确吸取0.5mL上述BPS液5份, 分别加入一定体积的葡萄糖标准液, 按已确定的条件进行硫酸-苯酚法检测, 计算多糖含量, 并按下面公式计算加样回收率。

$$\text{加标回收率} = \frac{\text{混合后测得多糖含量} - \text{样品中多糖含量}}{\text{葡萄糖标准样加入量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 多糖最佳检测波长的确定

由图1可知, 标准溶液和样品溶液经硫酸-苯酚法显色后, 在400~600nm波长范围内扫描, 二者均在490nm处有最大吸收, 且谱图基本一致, 可选择490nm为多糖检测波长。

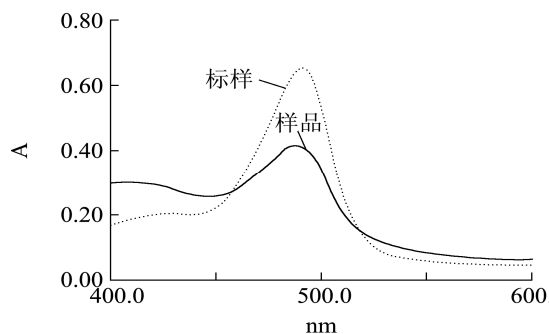


图1 紫外扫描结果图

Fig.1 Spectrum photo of the acted sample and standard solution

2.2 苯酚用量

从图2可以看出, 在保证浓硫酸过量的条件下, 苯酚用量在1.0mL~2.0mL范围内, 吸光值与苯酚用量呈正相关, 且有一定的线性关系; 苯酚用量达到2.0mL时, 吸光值出现最大值, 之后, 随着苯酚用量的增加, 吸光值反而下降。因此, 采用2.0mL的苯酚用量来测定多糖含量响应较好。

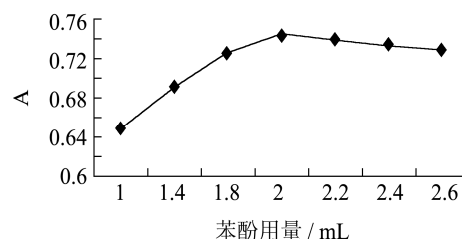


图2 吸光值随苯酚用量变化曲线

Fig.2 Curve of absorption changed by phenol level

2.3 浓硫酸用量

在苯酚用量为 2.0 mL 时,随着浓硫酸体积的增加吸光值相应增加,在 7.0 mL 时出现最大值,之后随着酸继续增加吸光值有所下降,但下降幅度较小(图 3),因此,选择浓硫酸 7.0 mL 进行下一步试验。

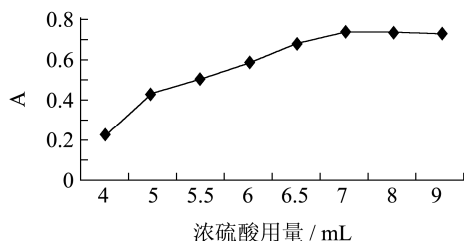


图 3 吸光值随浓硫酸用量变化曲线

Fig.3 Curve of absorption changed by sulfuric acid level

2.4 加酸后稳定性

试验结果表明,随着放置时间的延长,吸光值逐渐增大,放置 30 min 后这种变化趋于稳定(见图 4),因此,将反应时间定为 30 min 较为适宜。

2.5 标准曲线的制作

综合以上分析,得出苯酚-硫酸法测定毛竹竹叶多糖的最佳条件为:苯酚 2.0 mL,浓硫酸 7.0 mL,加酸后放置 30 min,于 490 nm 波长处测定吸光值。按照表 1 制作标准曲线。通过对数据进行线性回归,得到多糖测定过程中,浓度—吸光值的回归方程: $Y=7.2757 \cdot X+0.0005$ (式中:Y 为吸光度, X 为多糖

浓度 (mg/mL), 相关系数 $R^2=0.9993$, 表明方程的拟合度好。

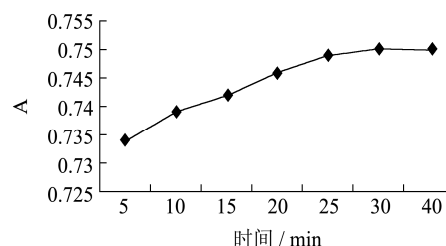


图 4 吸光值随时间变化曲线

Fig.4 Curve of absorption changed by time

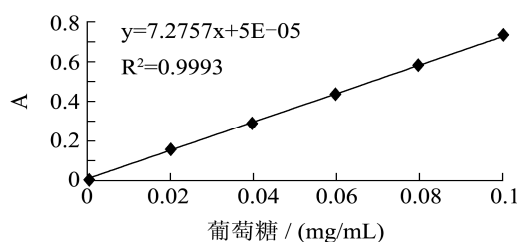


图 5 葡萄糖标准曲线

Fig.5 Standard curve of monosaccharide

2.6 重现性试验

为考察上述测定方法是否可靠,设计重现性试验,用苯酚-硫酸法进行毛竹竹叶多糖的含量分析,如表 2 所示,结果标准差和变异系数均较小,试验重复性好,所得试验结果可靠。

表 2 重现性试验结果

Table 2 Result of reproducibility experiment test

序号	1	2	3	4	5	平均值	标准差 S	变异系数/%
吸光值	0.737	0.740	0.744	0.739	0.742	0.740	0.0055	0.740

2.7 加标回收率试验

通过加标回收率的计算,可考察试验方法的准确度。以葡萄糖标准品为对照,硫酸-苯酚法进行竹叶多

糖的含量分析,加标回收率为 99.22%,变异系数为 1.35%(表 3),所以本方法的准确度较高。

表 3 加标回收率计算结果

Table 3 Result of recovery experiment

序号	样品中多糖质量/mg	葡萄糖标准品加入量/mg	测定值	回收率/%	平均回收率/%:99.22 标准差:1.3363 变异系数/%:1.35
1	0.04595	0.01	0.05579	98.40	
2	0.04595	0.02	0.06579	99.20	
3	0.04595	0.03	0.07562	98.90	
4	0.04595	0.04	0.08573	99.45	
5	0.04595	0.05	0.09605	100.20	

3 讨论

3.1 提取方法、溶剂对结果的影响

苯酚-硫酸法检测多糖的原理是利用多糖类化合物在浓硫酸的作用下首先水解成单糖,然后再脱水形

成具有呋喃环结构的糠醛衍生物,糠醛衍生物可以和许多芳胺、酚类以及具有活性次甲基的化合物缩合生成有色的化合物,从而用来检测多糖的含量^[8]。对于竹亚科的植物来说,一般其含有的多糖为分子量不大的水溶性多糖,酸浸提法和碱浸提法很容易使部分多

糖发生水解,从而破坏多糖的活性结构,所以竹叶多糖用水反复浸提比较合适^[9]。

3.2 浓硫酸对检测结果的影响

本方法中多糖的水解是利用在浓硫酸的作用下产生一种瞬时高温、强酸的环境,从而使多糖迅速水解,因此在加浓硫酸的过程中必须使酸迅速滴下,激烈撞击液面产生瞬时高温,从而利于多糖的水解完全,硫酸滴加过慢,则不能提供多糖快速水解的高温条件,将导致多糖水解不完全,从而给试验结果造成误差。

3.3 苯酚对检测结果的影响

苯酚暴露在空气中容易氧化,形成红色化合物,同时,苯酚的熔点低,在室温下就开始融化,因此,在测定过程中将苯酚配成一定的浓度,而不用纯的苯酚溶液进行测定,且测定过程中动作要迅速,以免由于苯酚变质,而影响测定结果。

3.4 反应时间对检测结果的影响

通常在形成糠醛的反应中五碳醛糖和甲基五碳醛糖较六碳醛糖容易,生成物也较稳定;六碳酮糖较六碳醛糖容易,生成的5-羟甲基糠醛产率也较高,因此,在测定过程中要综合考虑各种因素来确定反应时间。

4 小结

通过对比试验确定了硫酸-苯酚法测定竹叶多糖的最佳条件:对照品为无水葡萄糖;苯酚用量 5%;苯酚溶液 2.0 mL,浓硫酸用量 7.0 mL,反应后静置 30 min,涡流混匀,冷水浴冷却,检测波长 490 nm,标准曲线的相关系数 R^2 为 0.9993,重现性试验的标准

差为 0.0055,变异系数为 0.74%,平均加样回收率 99.22%,标准偏差 1.3363,变异系数为 1.35%。以上分析条件测定竹叶中多糖的含量操作简单,准确度高,可靠性强。该法操作简单,试验温度较低,显色稳定,灵敏度高,重现性好。

参考文献

- [1] 罗金岳,陈芳,朱春雷,等.超临界 CO_2 从箬竹叶提取叶绿素的研究[J].林产化学与工业,2005,25(3):81-84
- [2] 张英,冯磊,陈霞,等.一种新型的保健啤酒-竹啤[J].竹子研究汇刊,2000,19(1):33-37
- [3] 陆志科,谢碧霞.近十年我国竹叶研究论文的调查与分析[J].竹子研究汇刊,2003,22(2):49-52
- [4] Yu Zhang, Xiaowei Tie, Bili Bao, *et al.* Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats[J].British Journal of Nutrition,2007,97:484-494
- [5] 陈建华,毛丹,马宗艳,等.毛竹叶片的生理特性[J].中南林学院学报,2006,26(6):76-80
- [6] 毛燕,刘志坤.毛竹叶挥发性成分的提取与 GC-MS 分析[J].福建林学院学报,2001,21(3):265-267
- [7] 陆志科,廖威.毛竹叶化学成分初步测定[J].山西大学学报(自然科学版),2003,26(1):46-48
- [8] 毛燕.苦竹叶水溶性糖提取最佳方案的设计和纯度的鉴定[J].竹子研究汇刊,2002,21(3):46-50
- [9] 李胜华,郁建平.竹叶多糖的提取工艺[J].吉首大学学报(自然科学版),2006,27(1):118-121

高蛋白质饮食可控制饥饿激素

美国研究人员说,富含高蛋白质的饮食可有效控制饥饿激素,脂肪在这方面的表现最差,而碳水化合物则会造成本激素反弹。

饥饿激素是一种刺激食欲的荷尔蒙,美国西雅图华盛顿大学的研究小组探讨了不同营养物质在控制这种激素方面的功效。据卡明斯博士说,控制饥饿激素能够让人们在吃东西的时候,会感到饱足。

研究小组为 16 名研究对象提供三种不同的饮料,每种饮料都含有不同成分的碳水化合物、脂肪和蛋白质。在研究对象喝下第一杯饮料之前,研究人员抽取了他们的血液样本,在之后的六个小时里,每 20 分钟检验样本中的饥饿激素水平。

卡明斯说:“这个有趣的调查结果显示,脂肪在抑制饥饿激素方面,表现相当差。”

根据研究结果,蛋白质无论在抑制饥饿激素的程度,或是时间方面,表现都最好。卡明斯说,这是很令人满意的,因为几乎所有受欢迎的饮食中,都含有丰富的蛋白质。

(新闻来源:中国食品科技网)