枸杞多糖中中性糖的含量测定

华中农业大学生命科学技术学院(武汉 430070) 何进* 梁运祥 阎淳泰

摘要 采用苯酚-硫酸法显色,探讨了测定波长的选择、标准品的配制以及半乳糖醛酸干扰的校正等问题,建立了测定枸杞多糖中中性糖含量的简便方法。

关键词 枸杞多糖 中性糖 含量测定

枸杞多糖(LBP)具有增强免疫力、抗癌、抗衰老等方面的药理作用^[1-3]。但目前LBP的药理及临床试验,多以其粗制品进行,样品未达到应有的纯度,活性说不清楚、结构无法确定。何进等从枸杞中分离得到LBP-I、LBP-II、LBP-III、LBP-IV 4种LBP,都是由Ara、Rha、Xyl、Man、Gal、Glc与GalA组成的酸性杂多糖同多肽或蛋白质构成的复合多糖。复合多糖中氨基酸含量以氨基酸自动分析仪测定;GalA以咔唑-硫酸法^[4]测定,此时中性糖无干扰;单糖组成的摩尔比以GC法测定。GC法操作复杂,样品在操作过程中有损失,直接计算各种单糖含量,误差很大。本文着重讨论各种LBP中中性糖含量的测定方法。

1 材料与仪器

1.1 样品:LBP-I、LBP-III、LBP-IV本实验

表1 60 μ g/ml各种糖溶液的苯酚-硫酸显色特征

显色特征	Xyl	Man	Rha	Dextran	Ara	Glc	Gal	GalA
最大吸收波长(nm)	478.3	489.4	480.9	487.5	479.0	487.7	488.9	481.4
最大吸收度值	1.412	1.054	1.050	0.946	0.854	0.822	0.691	0.300

为解决上述问题,采取以下两种措施。

第一:分别采用与相应LBP中单糖组成摩尔比:相同的单糖混合物作标准,在显色反应的 $\lambda_{\max}$ 处测定吸收值(ABS)建立回归方程。LBP-I的标准以100mgAra、500mgRha、50mgMan、200mgGal、及150mgGlc溶于100ml水中,稀释成浓度(CONC)为10~100 μ g/ml的标准系列,显色。在 $\lambda_{\max}$ 482nm处测定ABS,建立回归方程:ABS=0.

室自制。

1.2 试剂:各种单糖均为上海试剂二厂生产的生化试剂,半乳糖醛酸(Sigma公司生产)及其它试剂均为分析纯。

1.3 仪器:岛津UV-265FW紫外可见分光光度计,1cm色皿。波长扫描使用峰检测功能,读取最大吸收波长及最大吸收值。

2 方法与结果

采用苯-硫酸法^[5]测定中性糖含量,应注意2个问题:第一,由于每种多糖含多种单糖,不同单糖显色反应的最大吸收波长与最大吸收值有一定差异(表1),如何选用标准及测定波长是本实验的关键;第二GalA能参与显色反应,其显色特征(见表1)与单糖有很大差异。这样,多糖中GalA的存在(含量见表2)对中性糖含量的测定产生干扰。

01230CONC+0.01939, $r=0.9999$ 。LBP-III、LBP-IV单糖组成基本一致,采用同一标准,即以200mgAra、450mgRha、100mgXyl、50mgMan、100mgGlc溶于100ml水中,稀释成CONC为10~100 μ g/ml的标准系列,显色,在 $\lambda_{\max}$ 482nm处测定ABS,建立回归方程,ABS=0.01293 CONC+0.02714, $r=0.9999$ 。

* Address: He Jin, Institute of Life Science and Technology, Middle China Agricultural University, Wuhan

配制 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右的各种多糖溶液, 在各自的 λ_{max} (均为 482nm) 处测定其 ABS。

第二, 建立与不同标准(或样品)比色波长相对应的 GalA 的苯酚-硫酸显色反应的回归方程, 由于 LBP- III、LBP- IV 及其标准的 λ_{max} 相同, 只需建立一个回归方程: $\text{ABS} = 0.05084\text{CONC} - 0.005023, r = 0.9996$ 。根据

样品中 GalA 的含量, 可以计算出它在 LBP 显色反应中产生的 ABS(结果见表 2)。

样品的 ABS 与样品中 GalA 产生的 ABS 之差即为中性糖所产生的 ABS, 再根据对应标准的回归方程计算出该样品中中性糖含量, 结果见表 2。

表 2 中性糖含量的计算(λ 为 482nm)

枸杞多糖	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	吸收度值 (482nm)	半乳糖醛酸 含量(%)	半乳糖醛酸 吸收度值	中性糖 吸收度值	中性糖 含量(%)	总糖 含量(%)
LBP- I	102.0	0.995	8.26	0.038	0.957	74.73	82.99
LBP- III	116.3	0.981	33.33	0.192	0.789	50.66	83.99
LBP- IV	101.3	0.68	58.35	0.295	0.373	26.41	84.76

3 讨论

3.1 采用 Mckelvy 改进的苯酚-硫酸法测定多糖, 不需要加热, 试剂用量少, 显色稳定, 灵敏度高, 重复性好。氨基己糖, 蛋白质的存在对反应无影响。但要求操作迅速准确。

3.2 目前, 使用苯酚-硫酸法测定样品中多糖含量, 普遍存在以下问题: 一是没有选用适当的标准而直接以 Glc 或 Dextran 作标准; 二是以 490nm 作为测定波长。从表 1 可以看出, 戊糖、6-脱氧己糖、糖醛酸显色反应的 λ_{max} 在 480nm 附近, 己糖显色反应的 λ_{max} 在 490nm 附近, 多糖显色反应的 λ_{max} 随单糖的组成不同, 最好对其显色产物进行波长扫描, 选定其 λ_{max} 作为测定波长。对于含糖醛酸的酸性多糖, 以苯酚-硫酸法进行多糖组份研究时, 由于没有考虑到糖醛酸的影响产生下列错误: 一是直接以多糖的 ABS 计算总糖含量, 认为总糖含量减去糖醛酸含量后即为中性糖含量; 二是直接以多糖的 ABS 计算中性糖含量, 再加上糖醛酸含量得出总糖含量。所得结果前者偏低, 后者偏高, 均不能反应真实值。

3.3 GalA 的苯酚-硫酸显色反应的 λ_{max} 接近各种多糖总的 λ_{max} , 这样各种 LBP 与其对应标准显色反应的 λ_{max} 一致, 不会由于代入回归方程计算而产生误差。LBP- I 因量少未能进行本实验, LBP- I 己糖含量高, 显色反应的 λ_{max} 在 485 处。GalA 的存在可能使其标准(若按单糖组成摩尔比配制)与样品显色反应的 λ_{max} 有微小差别。只是由于该样品中 GalA 含量仅 3.69%, 其影响是可以忽略的。

3.4 本实验采用经纯化的各种 LBP, 无单糖的干扰, 样品基本无色, 对测定无影响, 校正了 GalA 的干扰, 所得结果可靠。通过此种处理, 也为含糖醛酸复杂多糖组份的研究建立了一种方法。

参考文献

- 1 李东阳, 等. 中草药, 1989, 20(10): 26
- 2 王柏昆, 等. 中国药理学与毒理学杂志, 1988, 2(2): 127
- 3 戴寿芝, 等. 老年学杂志, 1990, 10(20): 94
- 4 李好枝, 等. 中草药, 1995, 26(7): 347
- 5 Mckelvy J F, et al. Arch Biochem Biophys, 1969, 132(1): 99

(1995-03-13 收稿)

Studies on the Total Content of Monosaccharides in Barbary Wolfberry (*Lycium barbarum*) Polysaccharides

He Jin

A simplified phenol-sulfuric acid colorimetric determination of monosaccharides in *Lycium barbarum* polysaccharides was developed. The selection of wavelegth, preparaton of standards and correction of galacturonic acid interference were discussed.