

一种改良的糖醛酸含量测定方法

中国科学院上海有机化学研究所(200023) 林颖* 黄琳娟 田庚元

摘要 用硫酸-咔唑法测定天然多糖化合物中糖醛酸含量时,发现中性糖对测定结果有影响,并提出相应的改进方法,即测定中性糖的吸收度,从样品的吸收度值减去中性糖的吸收度值,即为糖醛酸的吸收度值。

关键词 硫酸-咔唑法 糖醛酸 多糖

An Improved Method for the Quantitative Determination of Uronic Acid

Lin Ying, Huang Linjuan and Tian Gengyuan (Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract The quantitative determination of uronic acid in natural polysaccharides by the traditional sulfuric acid-carbazole colorimetry, was found to be interfered by the presence of neutral sugars. Accordingly, an improved method was developed by determining the absorbance of the neutral sugar and subtract this value from the absorbance of the sample to obtain the corrected value of uronic acid.

Key words sulfuric acid-carbazole colorimetry uronic acid polysaccharides

糖醛酸含量的测定方法目前常用的仍是硫酸-咔唑法^[1],但在实际工作中,特别是在测定天然产物中糖醛酸含量时,发现测得的结果往往与实际情况不符,因此探索正确测定天然化合物中糖醛酸含量的方法是很重要的。在文献中,虽然有关于影响糖醛酸测定结果的论述^[2,3],但未见有中性糖存在对其影响的实验报道及方法上的改进。我们用实验证明中性糖的存在对糖醛酸的测定结果有较大的影响,并提出了一种消除中性糖影响的方法,现报道如下。

1 材料与仪器

0.1% 咔唑试液(50 mg 咔唑溶于 50 mL 95%乙醇),葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)、鼠李糖(Rha)、果糖(Fru)均为化学纯,枸杞多糖样品 LbGP3, LbGP4, LbP1, LbP2, LbP3

由本课题组提供。722 分光光度计。

2 方法与结果

2.1 常用的硫酸-咔唑法

2.1.1 标准曲线绘制:精确称取干燥的单糖标准样品 10 mg,定容于 25 mL 容量瓶中。然后准确量取 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 单糖标准溶液于带塞试管中,各管加水至 1 mL。在冰水浴中向各管加入 6 mL 浓硫酸,摇匀后,改在 85℃水浴中保持 20 min,取出后冷至室温,各管加 0.2 mL 咔唑液,在室温下保持 2 h,测定吸收度(530 nm),以浓度对吸收度作标准曲线。

2.1.2 测定各单糖在 530 nm 处的检测响应:分别准确吸取各种单糖溶液(10 mg/25 mL)0.4 mL,补水至 1 mL 用 2.1.1 项下方法测得其吸收值,结果如表 1。

上述结果表明,用咔唑法测定时,天然多糖化合物中常见的各种中性单糖在 530 nm

* Address: Lin Ying, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai

处也均有程度不同的吸收。

表 1 呋唑法测定时各单糖在 530 nm 处的吸收值

Gal	Glc	Man	Xyl	Ara	Rha	Fru	GalA	GlcA
0.0493	0.1018	0.0503	0.0840	0.0251	0.0140	0.1245	0.2603	0.2498

2.2 各单糖浓度与呋唑法测定时在 530 nm 处吸收值的线性关系:以常用呋唑法(参考 2.1.1)测定各单糖吸收标准曲线(其中 GalA 和 GlcA 标准溶液的配制为精确称取干燥的糖醛酸 10 mg 溶于 100 mL 容量瓶),其线性回归方程及相关系数如下。

Glc $Y=0.4631X+0.004939(r=0.9996)$
Gal $Y=0.2358X+0.004567(r=0.9993)$
Man $Y=0.1587X+0.002963(r=0.9998)$
Xyl $Y=0.2559X+0.000884(r=0.9997)$
Fru $Y=0.1727X+0.001872(r=0.9960)$
Rha 吸收值基本保持不变

表 2 各种中性单糖对糖醛酸影响的定量考察结果

A ₅₃₀	加入标准中性糖体积(mL)			A ₅₃₀	加入标准中性糖体积(mL)		
	0.0	0.4	0.6		0.0	0.4	0.6
GalA+Glc	0.2738	0.3732	0.3920	GlcA+Glc	0.2438	0.3506	0.4043
Glc	0.0000	0.1017	0.1377	Glc	0.0000	0.1183	0.1741
(GalA+Glc)Glc	0.2738	0.2715	0.2543	(GlcA+Glc)Glc	0.2438	0.2323	0.2302
GalA+Gal	0.2549	0.3059	0.3495	GlcA+Gal	0.2603	0.3143	0.3406
Gal	0.0000	0.0513	0.0914	Gal	0.0000	0.0473	0.1051
(GalA+Gal)Gal	0.2549	0.2546	0.2584	(GlcA+Gal)Gal	0.2603	0.2670	0.2355
GalA+Man	0.2636	0.3152	0.3100	GlcA+Man	0.2403	0.3050	0.3101
Man	0.0000	0.0463	0.0552	Man	0.0000	0.0533	0.0854
(GalA+Man)Man	0.2636	0.2636	0.2548	(GlcA+Man)Man	0.2403	0.2517	0.2247
GalA+Xyl	0.2692	0.3455	0.3837	GlcA+Xyl	0.2600	0.3432	0.3710
Xyl	0.0000	0.0759	0.1275	Xyl	0.0000	0.084	0.1072
(GalA+Xyl)Xyl	0.2692	0.6296	0.2562	(GlcA+Xyl)Xyl	0.2600	0.2592	0.2638
GalA+Rha	0.2218	0.2400	0.2223	GlcA+Rha	0.2204	0.2370	0.2215
Rha	0.0000	0.0090	0.0170	Rha	0.0000	0.0100	0.0120
(GalA+Rha)Rha	0.2218	0.2310	0.2063	(GlcA+Rha)Rha	0.2204	0.2270	0.2095
GalA+Fru	0.2444	0.3721	0.4432	GlcA+Fru	0.2204	0.3585	0.4335
Fru	0.0000	0.1345	0.2191	Fru	0.0000	0.1103	0.2097
(GalA+Fru)Fru	0.2444	0.2376	0.2241	(GlcA+Fru)Fru	0.2204	0.2482	0.2338
GalA+Ara	0.2551	0.2678	0.3125	GlcA+Ara	0.2360	0.2619	0.28885
Ara	0.0000	0.0072	0.0539	Ara	0.0000	0.0254	0.0558
(GalA+Ara)Ara	0.2551	0.2606	0.2586	(GlcA+Ara)Ara	0.2360	0.2365	0.2327

上述实验结果表明样品的吸收值随中性糖的含量增加而增大(Rha 除外),而样品吸收值与中性糖吸收值之差和糖醛酸的吸收值基本一致。

2.4 改进的硫酸-呋唑法:根据 2.3 的实验结果,我们提出一种改进的硫酸-呋唑法测定

GalA $Y=0.5857X+0.005917(r=0.9998)$

GlcA $Y=0.4264X+0.000601(r=0.9999)$

上述结果可知,各中性单糖在 0.04~0.32 mg/mL 范围内、GalA 和 GlcA 在 0.01~0.08 mg/mL 范围内各单糖浓度与呋唑法检测吸收值呈线性。

2.3 定量考察各中性单糖对呋唑法测定糖醛酸含量的影响

2.3.1 分别准确量取 GalA 和 GlcA(10 mg/100 mL)0.4 mL,各加入 0.0,0.4,0.6 mL 各中性单糖溶液(10 mg/25 mL),分别补水至 1 mL,按呋唑法测其吸收值。

2.3.2 分别准确量取各中性单糖溶液(10 mg/25 mL)0.0,0.4,0.6 mL,分别补水至 1 mL,按呋唑法测其吸收值。得数据如表 2。

糖醛酸含量的方法,即样品的吸收值减去中性糖的吸收值为样品的吸收值。

2.4.1 标准溶液的配制

溶液 1. 准确量取 GalA(10 mg/100 mL)0.2 mL,加入 0.2 mL Gal(10 mg/25 mL)和 0.2 mL Glc(10 mg/25 mL),补水至 1 mL。

溶液 2. 准确量取 GalA(10 mg/100 mL) 0.4 mL, 加入 0.2 mL Gal(10 mg/25 mL) 和 0.2 mL Glc(10 mg/25 mL), 补水至 1 mL。

溶液 3. 准确量取 GalA(10 mg/100 mL) 0.6 mL, 加入 0.2 mL Gal(10 mg/25 mL) 和 0.2 mL Glc(10 mg/25 mL), 补水至 1 mL。

中性单糖溶液. 量取 0.2 mL Gal(10 mg/25 mL) 和 0.2 mL Glc(10 mg/25 mL), 补水至 1 mL。

2.4.2 方法改进前后糖醛酸测定结果的比较: 上述中性单糖溶液按吡啶法测定在 530 nm 处的吸收值为 0.0442。

表 3 所列结果表明, 改进的吡啶法所测得的标准溶液中糖醛酸吸收值与实际测定值基本一致, 因此这种改进的硫酸-吡啶法在测定各种样品中糖醛酸的含量时, 排除了样品中中性糖对测定的影响, 因而要比常用的硫酸-吡啶法准确。

表 3 不同方法的糖醛酸测定结果

	溶液 1	溶液 2	溶液 3
吡啶法测定值	0.1497	0.2482	0.3628
改良吡啶法测定值	0.1055	0.2040	0.3186
糖醛酸实际值	0.1092	0.2058	0.3207

注: 改进的吡啶法测定值为常用吡啶法测定值与标准配制溶液中中性单糖吸收值(0.0442)之差。

2.5 改进的吡啶法测定糖醛酸实例: 从枸杞子中分离得到的多糖样品 LbGP3, LbGP4, LbP1, LbP2 和 LbP3 中的糖醛酸含量测定, 具体操作如下:

2.5.1 样品中中性糖吸收值的测定: 要求得样品中中性糖对检测的吸收干扰值, 首先必须知道其中中性糖的含量和组成比。根据蒽酮-硫酸法^[4]可测得中性糖的含量。组成比的测定需先将样品全水解^[5], 然后再用 HPLC 或 GC 测得样品中各中性单糖的组成比。以此称取各种相应标准中性单糖配成混合液, 然后取 1 mL 溶液于带塞试管中, 然后按 2.1.1 所述的标准曲线制备操作, 测得其吸收值。

2.5.2 样品的吸收值测定: 按吡啶法(方法

同 2.1.1), 测得样品吸收值(注: 样品中中性糖浓度应在其线性范围内)。

2.5.3 样品中糖醛酸含量的测定: 样品中糖醛酸的吸收值为样品吸收值与中性糖吸收值之差, 再根据对应标准的回归方程, 计算出该样品中糖醛酸含量。实验结果如表 4 所示。

表 4 常用的与改进的吡啶法测定糖醛酸含量结果的比较

多糖样品	糖醛酸含量(%)	
	常用吡啶法	改进吡啶法
LbGP3	5.3	3.4
LbGP4	10.4	6.4
LbP1	8.8	5.9
LbP2	8.1	6.7
LbP3	8.7	5.7

从表 4 结果可以看出常用吡啶法测定糖醛酸的含量其值偏高。

3 讨论

在吡啶法所规定的测定波长下, 中性戊糖和中性己糖均有吸收, 影响糖醛酸含量测定的准确性。为此我们对 7 种不同的中性糖分别进行了考察, 测得其浓度与吸收值的线性范围。实验结果表明 Xyl, Man, Glc, Gal, Fru 分别找到了各自的线性范围, Rha 随着浓度的改变其吸收值基本保持不变, Ara 较难判断。各种单糖线性范围的测得, 不仅证实了中性糖的存在对吡啶法测定糖醛酸的结果产生干扰, 而且为提出一种比常用吡啶法准确性高的糖醛酸测定方法提供了实验依据。

用吡啶法测定各种中性单糖对糖醛酸影响的定量考察实验表明, 糖醛酸和各中性单糖在其各自的线性范围内取样, 样品的吸收值与中性糖吸收值之差与不含中性糖的糖醛酸实际测得吸收值基本一致。

参考文献

1 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术(第一版). 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 6
2 李好枝, 等. 中草药, 1995, 26(7): 347
3 Bitter T, et al. Anal Biochem, 1962, 4: 330
4 Dubis M, et al. Anal Chem, 1956, 28: 350
5 黄琳娟, 等. 药学报, 1998, 33(7): 512

(1999-03-02 收稿)