

文章编号: 1674-7054(2017)03-0359-05

利用3,5-二硝基水杨酸法测定 菜用甘薯叶中的多糖含量

张小贝, 朱国鹏, 祝志欣, 南文卓, 吴志鹏

(海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法对菜用甘薯叶片还原糖和总糖的吸收光谱、测定和提取条件进行研究,以间接测定多糖含量。结果表明,菜用甘薯叶片中还原糖的最适检测波长为493 nm,DNS显色剂用量为2.0 mL,显色反应时间为10 min,显色反应后静置时间10 min。还原糖及总糖样品液提取水浴温度为100 ℃,水浴时间为30 min;总糖样液酸解时盐酸用量为2.0 mL,沸水浴时间为20 min。此方法精密度、重现性和回收率符合实验要求,可准确测定菜用甘薯叶片中的多糖含量,实现了对菜用甘薯叶片中还原糖、总糖和多糖含量的同时测定。

关键词: 菜用甘薯叶;3,5-二硝基水杨酸法(DNS);还原糖;总糖;多糖

中图分类号: S 531

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.03.018

菜用甘薯(*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill)叶营养丰富,具有良好的保健价值,医学界已将其列入抗癌蔬菜之一,其含有的多糖成分具有调节免疫、抗氧化、抗肿瘤、降血糖等功效,是重要的生物活性物质^[1-2]。因此,测定菜用甘薯叶多糖的含量具有重要的意义。多糖含量的传统测定方法有苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法,但它们测定的是样品中总糖的含量,不能排除还原糖的干扰,导致多糖测定值偏高^[3]。此外,硫酸具有较强的腐蚀性,给实验操作带来安全隐患。3,5-二硝基水杨酸(DNS)法是测还原糖的经典方法,DNS与还原糖共热后生成棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸,在一定的范围内,还原糖的含量和反应液颜色成正比,可利用比色法测定^[4]。多糖的水解产物为还原糖,通过多糖水解前后所测还原糖与总糖含量的差值,即可换算多糖的含量^[5]。DNS法测多糖的方法操作简便、快速、准确性高、重现性好,近年来逐渐被应用于植物药、中成药、海洋生物药等药物中多糖含量的测定^[6]。不同材料应用DNS法测定多糖含量时最佳检测条件会有所不同,且测定值差异较大^[7-9]。为了准确测定菜用甘薯中多糖含量,笔者以菜用甘薯叶片为材料,对还原糖和总糖含量测定条件进行了研究(包括最佳检测波长、显色液用量、显色反应时间、总糖样液酸解最适温度和时间等),同时对总糖和还原糖的提取条进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料 以菜用型甘薯品种徐菜薯1号为材料对实验条件进行优化,再对菜用型甘薯品种徐菜薯1号、鄂菜薯1号和莆薯53的多糖含量进行测定。供试材料种植于海南大学热带农林学院教学实践基地。

1.2 试剂 葡萄糖标准液:准确称取0.50 g无水葡萄糖,加蒸馏水定容至1 000 mL,即得0.50 g·L⁻¹的葡萄糖标准液。DNS试剂:分别取6.50 g DNS,325 mL 2 mol·L⁻¹的NaOH溶液,加入15 mL丙三醇,搅

收稿日期: 2017-03-29

修回日期: 2017-06-21

基金项目: 热作无公害生产技术集成与示范推广(15RZJN-57); 优质富硒菜用甘薯周年生产技术示范与推广(HNXH201530); 海南富硒地区甘薯硒的富集能力、贮存形态及分布规律研究(20163067)

作者简介: 张小贝(1989-),男,海南大学热带农林学院2014级硕士研究生, E-mail: 1169683249@qq.com

通信作者: 朱国鹏(1971-),男,研究员,研究方向: 蔬菜学与植物营养学, E-mail: guopengzhu@163.com

拌溶解冷却后加蒸馏水定容至 1 000 mL,贮存于棕色瓶中备用。酚酞指示剂:称取 0.10 g 酚酞,溶解于 250 mL 70% 乙醇中。I-KI 溶液:称取 1.00 g 碘及 8.00 g 碘化钾放入 20 mL 烧杯中,加蒸馏水溶解后移入 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀。 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl:取 495.34 mL 37.5% 的盐酸,再加入 504.66 mL 蒸馏水稀释。 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH:称取 120.00 g NaOH,加入 500 mL 的蒸馏水溶解。

1.3 样品液的制备 还原糖样液:取同一生长期的甘薯叶片用蒸馏水清洗干净,晾干剪碎混匀。准确称取 1.00 g 叶片,取 3.0 mL 的蒸馏水并加少量的石英砂研磨后转移到 10 mL 离心管中,定容到 10 mL 刻度线。沸水浴提取 30 min 后, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min。上清液为还原糖样液,放入 4℃ 冰箱备用。总糖样液:取上述上清液 2.0 mL,加入 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液 2.0 mL,沸水浴中酸解 20 min,取出溶液滴 2 滴于白瓷板上,加 1 滴 I-KI 溶液检验是否水解完全,溶液不呈现黄色为水解完全。冷却后加入 1 滴酚酞作为指示剂,用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中和到微红色,用蒸馏水定容至 10 mL 后, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液即为总糖样液。

1.4 吸收光谱的测定 分别取葡萄糖标准液、还原糖样液、总糖样液和蒸馏水各 1.0 mL 于 4 支试管中,加入 2.0 mL 的 DNS 试剂,混匀后在沸水中水浴 10 min,取出后立即用自来水冷却,加蒸馏水 9 mL 摇匀后静置 10 min。以加蒸馏水的试管为对照,在 400 ~ 540 nm 波长范围内测定吸光值。

1.5 显色反应条件的优化 在 1.4 步骤的基础上,分别对 DNS 试剂用量、显色反应时间、静置时间进行优化,实验进行 3 次重复;加标回收率的测定,检测方法为:取 2 支试管,分别加入还原糖样液 0.5 mL,其中 1 份加入 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖标准液 0.5 mL,另一份加入 0.5 mL 蒸馏水,按优化后的实验方法测定吸光值,实验进行 6 次重复。同时用蒽酮比色法^[10]测定样品的精密度及回收率(对照)。

1.6 标准曲线的绘制 取 11 支试管,分别加入 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 和 1.0 mL 的葡萄糖标准液,并分别向各试管中加入蒸馏水使总体积为 1.0 mL。然后加入 2.0 mL 的 DNS 试剂混匀,按 1.4 步骤,在 493 nm 波长下测定各试管的吸光值。每个样品 3 次重复,以葡萄糖含量为横坐标,各管吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

1.7 还原糖和总糖提取条件的优化 样品磨样处理后,在 1.3 步骤的基础上,分别对还原糖样液提取的水浴温度、水浴时间及多糖样液酸解时盐酸用量、酸解时间进行优化,实验进行 3 次重复。

1.8 样品测定 按已优化的实验条件,对样品进行还原糖和总糖的提取处理后,与 DNS 试剂反应,并在 493 nm 下测定吸光值,根据葡萄糖标准曲线方程计算出相应的还原糖毫克数。对于总糖含量,需进行稀释后的比例换算,公式为:总糖 = 水解后还原糖毫克数 $\times$ 稀释倍数 $\times 0.9$ ^[11],每个样品 3 次重复。多糖含量为总糖含量减去还原糖含量的差值。

1.9 数据处理 实验数据用 Excel 2013 进行处理和作图,并使用 SPSS 21.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 吸收光谱的测定 从图 1 可知,葡萄糖标准液、还原糖和总糖样液吸收曲线大致相同,最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}} = 493 \text{ nm}$,在常用的 510 nm 等波长处有极显著差异,所以实验选取 493 nm 作为测定波长。

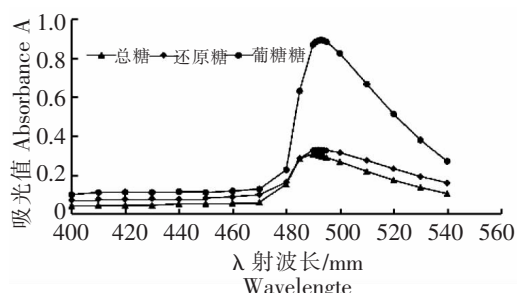


图 1 葡萄糖、还原糖和总糖样液与 DNS 反应后的紫外-可见吸收光谱
Fig.1 UV-Vis absorption spectra of glucose, reducing sugar and total sugar after reacted with DNS

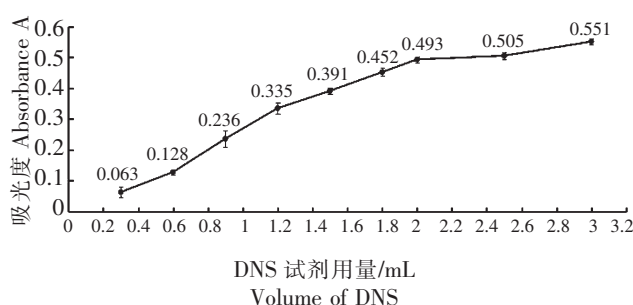


图 2 DNS 试剂用量对吸光值的影响
Fig.2 Effect of different volumes of DNS on absorbance

2.2 显色反应条件的优化及方法可靠性研究

2.2.1 显色反应剂用量 取9支试管各加1.0 mL葡萄糖标准液,并分别加入0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.0、2.5和3.0 mL的DNS试剂,各水平都用1.0 mL的蒸馏水加相应的DNS试剂为对照。从图2可知,当DNS试剂用量小于2.0 mL时,溶液吸光值随DNS试剂用量的增加而增大;当DNS试剂用量大于2.0 mL时,溶液吸光值基本保持稳定。因此,DNS试剂的最佳用量为2.0 mL。

2.2.2 显色反应时间 分别取葡萄糖标准液、还原糖及总糖样液1.0 mL于15 mL的试管中,在1.4实验步骤的基础上,沸水浴时间分别调整为1、2、3、4、5、7、10、13、15和17 min。实验结果表明,前10 min内,由于DNS的还原反应,溶液吸光值持续增加;10 min之后吸光值基本保持稳定,故显色反应时间定为10 min。

2.2.3 显色反应后静置时间 在1.4实验步骤的基础上,静置时间分别调整为10、20、30和60 min及1.5、2.0、2.5、3.0、4.0和5.0 h。结果表明,在显色之后的30 min内保持稳定,随后有所降低,在5 h后减少约10%。蒽酮比色法在显色反应后吸光值随时间不断增加,在4 h后增加了2倍,不利于大量样品的准确测定。DNS法稳定性好,利于控制实验误差,依据实验对精确度的要求,本实验选择显色反应后静置时间为10 min。

2.2.4 实验方法可靠性的研究 方差分析结果表明,实验具有良好的精密度和重现性,还原糖和总糖样液的回收率分别为106.5%和96.73%,平行测定葡萄糖、还原糖和总糖吸光值标准偏差分别为1.12%、1.71%和1.31%,此方法可靠性较高,符合实验要求。实验中用的蒽酮法测定总糖样品吸光值的标准偏差为4.24%,回收率为92.40%,说明蒽酮法测定菜用甘薯叶中总糖含量的稳定性及回收率不如DNS法。

2.3 标准曲线的测定 从图3可知,葡萄糖含量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与相应的吸光值(A)具有良好的相关性,相关方程为 $y = 1.7855x - 0.04127$,相关系数 $R^2 = 0.99539$ ($n = 10$)。

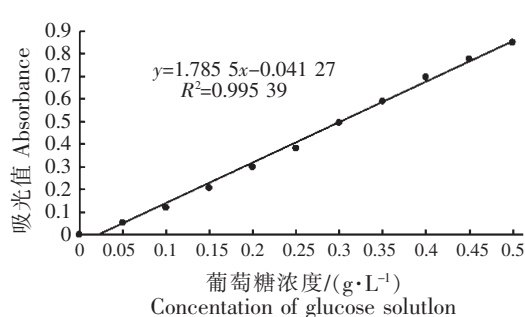


图3 葡萄糖标准曲线

Fig.3 Glucose standard curve

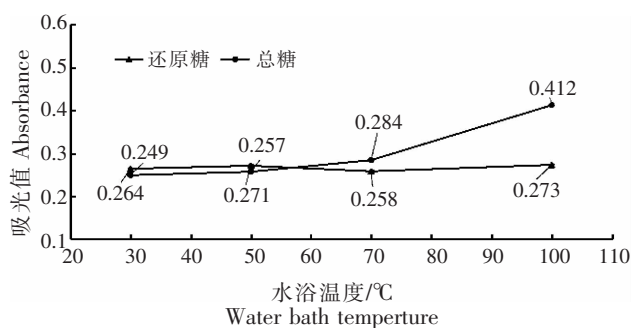


图4 样品提取温度对吸光值的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on absorbance

2.4 样品提取条件的优化

2.4.1 样品提取温度 甘薯叶分别取样碾磨后,在30、50、70、100 °C下水浴提取30 min,按1.5优化的实验步骤测定不同提取温度下的吸光值。从图4可知,提取温度并不影响还原糖的吸光值(方差分析 $P < 0.01$,无统计意义差异),但对总糖的吸光值影响显著,在100 °C时,总糖提取率最大。所以实验选取100 °C为样品的提取温度。

2.4.2 样品提取时间 甘薯叶取样碾磨后,在沸水浴中分别提取10、20、30、40、50、60 min,按1.5优化的实验步骤测定不同提取时间下的吸光值。从图5可知,还原糖和总糖的吸光值先是随时间的增加而增大,并在30 min时达到最大值,之后吸光值逐渐减少。故本实验样品提取的水浴时间选定为30 min。

2.4.3 总糖样液酸解时盐酸用量及酸解时间 分别取上清液2 mL于7支试管中,依次加入0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5和4.0 mL的盐酸($6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液,在沸水浴中酸解30 min,按照实验方法测定吸光值。从图6可知,盐酸用量小于2.0 mL时,

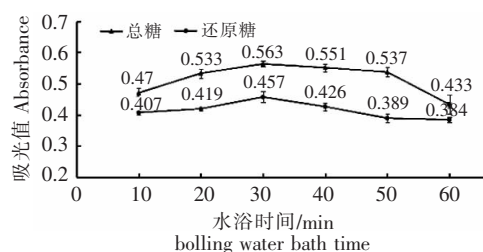


图5 样品提取时间对吸光值的影响

Fig.5 Effect of extraction time on absorbance

吸光值随盐酸用量增加而增大,并在盐酸用量为 2.0~2.5 mL 时趋于稳定;当盐酸用量大于 2.5 mL 时吸光值呈下降趋势。因此,实验选取盐酸用量为 2.0 mL。

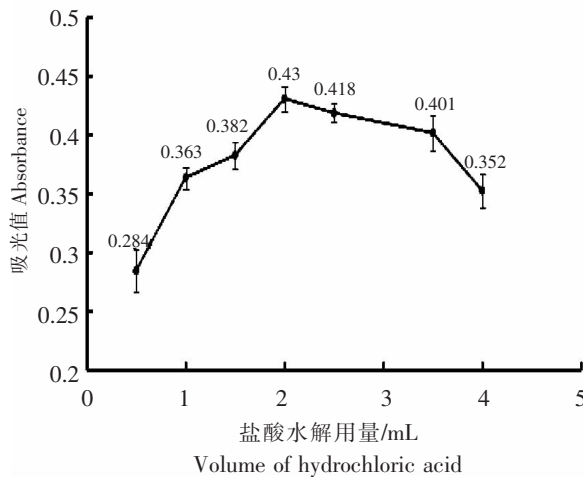


图 6 总糖样液酸解时盐酸用量对吸光值的影响
Fig.6 Effect of hydrochloric acid volume on the absorbance of total sugar solution

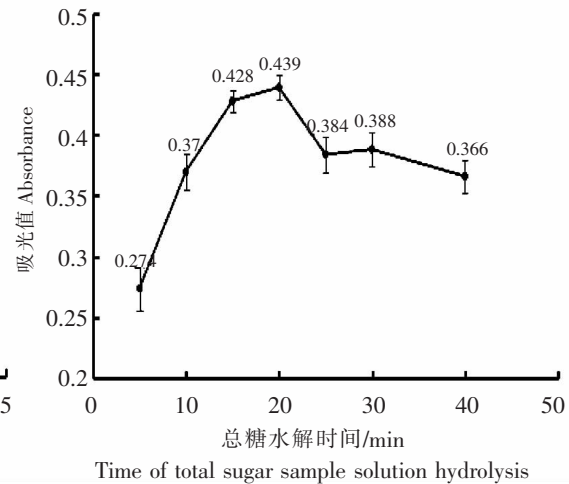


图 7 总糖样液酸解时间对吸光值的影响
Fig.7 Effect of hydrolysis time on the absorbance of total sugar solution

酸解时间 取 7 支试管分别加入 2.0 mL 上清液及 2.0 mL 盐酸 ($6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液,在沸水浴中分别酸解 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 40 min,按照实验方法测定吸光值。总糖酸解过程中,水浴时间小于 20 min 时吸光值随时间不断增加,20 min 之后吸光值不断减小(图 7)。故实验选取酸解水浴时间为 20 min。

2.5 菜用甘薯叶片样品测定 按照确定的实验方法对 3 种菜用甘薯的还原糖与总糖进行提取测定,并通过其差值计算其中的多糖含量。从图 8 可以看出,徐菜薯 1 号、鄂菜薯 1 号、莆薯 53 3 种菜用甘薯叶片中多糖含量分别为 12.63 、 13.49 和 $18.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

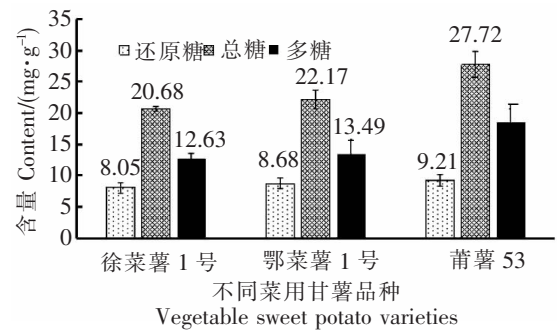


图 8 不同品种菜用甘薯叶片还原糖、总糖和多糖含量的测定值
Fig.8 Contents of reducing sugar, total sugar and polysaccharide in sweet potato leaves of different varieties

3 讨论

对 DNS 法测定菜用甘薯叶片中还原糖和总糖含量

的吸收光谱、测定及提取的影响因素进行了实验优化。结果表明,菜用甘薯叶片还原糖的最适检测波长为 493 nm,样品液为 1.0 mL 时,DNS 显色剂用量为 2.0 mL,沸水浴显色时间为 10 min,显色反应后静置 10 min 检测吸光值;还原糖及总糖样液提取最佳水浴温度为 100°C ,水浴时间为 30 min;总糖样液酸解时每 1.0 mL 样品液的盐酸用量为 1.0 mL,沸水浴时间为 20 min。实验证明,此方法精密度重现性和回收率符合实验要求。以本方法测定 3 种菜用甘薯叶片中多糖含量分别为 12.63 、 13.49 和 $18.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在实验温度范围内,提取还原糖样液时水浴温度对还原糖测定值没有影响,提取总糖样液的最适温度为 100°C ,与现有实验方法采取 50°C [12]、 80°C [13] 水浴提取液用来检测还原糖有所不同。实验对 DNS 法测定操作流程进行优化,采用 100°C 水浴 30 min 制备待测液,取上清液分别进行还原糖和总糖的测定,简化实验流程的同时,消除了样品制备误差,从而实现对菜用甘薯叶片中还原糖、总糖和多糖含量的高效准确测定。与蒽酮比色法相比,DNS 法测定菜用甘薯叶片中多糖含量,具有测定值稳定,显色反应后吸光值稳定等优点,适合大批量样品测定。蒽酮比色法对实验操作要求高,实验中往往由于操作原因造成较大误差稳定性差 [4]。因此,DNS 法测定菜用甘薯叶片中多糖含量更好。

应用 DNS 法测定还原糖含量,不同的材料最佳吸收光波长有所不同,可能受到仪器性能、灵敏度、实验材料中还原糖含量、可溶性物质种类及 DNS 试剂用量等因素的影响。笔者通过反复实验,确定菜用甘薯叶片中还原糖和总糖含量测定的最佳波长为 493 nm,与一般方法采用的波长测定值存在极显著差异。本研究为测定菜用甘薯中还原糖、总糖和多糖的含量提供了方法依据。

参考文献:

- [1] 高荫榆,罗丽萍,洪雪娥,等.甘薯叶柄藤多糖的免疫调节作用研究[J].食品科学,2006,27(6):200-202.
- [2] 全桂静,宋文婷.甘薯多糖提取条件及抗氧化性的研究[J].沈阳化工大学学报,2014,28(4):325-328.
- [3] 毛淑敏,许家珍,周帅飞,等.苯酚-硫酸法联合 DNS 法测定金银花不同花期多糖的含量[J].中南药学,2015,13(1):65-67.
- [4] 张伟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987:2.
- [5] 王丽娜,陈水钊,张兵,等.3,5-二硝基水杨酸法测定多糖含量的研究进展[J].吉林医药学院学报,2009,30(4):232-234.
- [6] 周春丽,钟贤武,范鸿冰,等.果蔬及其制品中可溶性总糖和还原糖的测定方法评价[J].食品工业,2012(5):89-92.
- [7] 章丽华,张利平,胡锦群,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定毛五加中多糖的含量[J].中国中医药信息杂志,2008,15(5):49-51.
- [8] 王俊刚,张树珍,杨本鹏,等.3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J].甘蔗糖业,2008(5):45-49.
- [9] 赵海霞,何毓敏,姜美杰,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定竹节参中多糖含量[J].食品工业科技,2010(6):327-329.
- [10] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [11] 宇正祥.食品分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [12] 程柳,李静.3,5-二硝基水杨酸法测定山楂片中还原糖和总糖含量[J].轻工科技,2016(3):25-28.
- [13] 李环,陆佳平,王登进.DNS 法测定山楂片中还原糖含量的研究[J].分析科学,2013,34(18):75-77.

Determination of the Polysaccharide Content of Sweet Potato Leaves by Using 3,5'-Dinitrosalicylic Acid (DNS)

ZHANG Xiaobei, ZHU Guopeng, ZHU Zhixin, NAN Wenzhuo, WU Zhipeng

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry/Ministry of Education Key Laboratory of Protection, Development and Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The reducing sugar and total sugar contents of the leaves of vegetable sweet potato (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill) were determined by using the 3,5'-dinitrosalicylic acid (DNS) method to indirectly determine the leaf content of polysaccharides of three vegetable sweet potato varieties. The optimum conditions for the determination of reducing sugar and total contents were as follows: Optimum wavelength 493 nm, DNS reagent 2.0 mL, coloring reaction 10 min, and setting time 10 min. For the reducing sugar and total sugar, the best extraction conditions would be boiling water bath for 30 min. The total sugar was hydrolyzed with hydrochloric acid at a rate of 2.0 mL, and extracted in boiling water bath for 20 min. With this method the polysaccharide contents of the leaves of the three vegetable sweet potato varieties were 12.63, 13.49 and 18.51 mg · g⁻¹ FW respectively. The repeatability and recovery of this method meet the test requirements. It is concluded that this method can be used for the determination of polysaccharide content in vegetable sweet potato leaves, and can also be used for the determination of reducing sugar and total sugar.

Keywords: Vegetable sweet potato leaves; DNS; reducing sugar; total sugar; polysaccharide

专家简介 | Brief |



朱国鹏，男，1971年6月生，湖北黄冈人，硕士，研究员。现任海南大学热带农林学院副院长，中国热带作物学会热带园艺专业委员会副主任，海南省园艺学会常务理事，海南省热带作物学会理事。海南省“515人才工程”第三层次入选人才。1993年毕业于华中农业大学园艺系，获农学硕士学位，2003年毕业于华南农业大学植物营养系，获农学硕士学位。多年来从事热带园艺作物栽培、植物营养学等教学与科研工作。目前主要以热带地区蔬菜、甘薯等为研究对象，在种质资源收集、评价与利用，新品种选育及高产栽培技术等方面开展研究工作。曾先后主持包括国家级、省部级等各类科研项目等十多项，以第一作者或通讯作者发表论文30多篇，申请专利2项，合作出版专著2部，曾获海南省科技进步二等奖2项，海南省科技成果转化二等奖1项，海南省教学成果二等奖1项。



于旭东，男，汉族，1973年4月生，博士，副教授，硕士生导师。分别于1998，2006年，本科、硕士毕业于华南热带农业大学，2009年获得海南大学理学博士学位。曾先后担任海南大学政治辅导员、党总支委员、综合办主任、党总支书记和管委会主任等职，现任海南大学热带农林学院副院长；兼任中国花卉协会蕨类植物分会第五届理事会常务理事、中国农业科学协会会员、《世界中西医结合》杂志社编委、中华中医药学会中青年科技创新专家委员会委员、海南省林木品种审定委员会经济林专业审定组专家委员，儋州市“百名专家连百村”活动专家组成员；入选2016、2017儋州“优秀人才”。主持参与国家、省部级课题9项，主持校级课题4项，获国家专利5项，发表学术论文30余篇。长期研究马槟榔、肾茶、巢蕨属植物、兰科植物等，其中“石斛属植物在海南栽培适应性及其保育研究”获海南省第四届高校优秀科研成果“一等奖”。组建农业综合体项目规划团队，为田园综合体、共享农庄、美丽乡村、一镇一业、一村一品建设做出积极贡献。推广胡新文教授研发的胡氏1号海南山柚1万多亩；研发推广的海南肾茶成为儋州知名品牌；倡导建设世界地瓜博览园、光村沙虫主题公园得到市委市政府高度重视；在植保无人机、太阳能抽水、红心橙推广、气体刺激割胶、电动割胶等新技术推广应用方面成效显著。