

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.034

3,5-二硝基水杨酸法测定蔓菁中还原糖和总糖含量*

高文军,李卫红[△],王喜明,乔丽芳

(山西省医药与生命科学研究院,山西 太原 030006)

摘要:目的 建立测定晋南蔓菁还原糖和总糖含量的3,5-二硝基水杨酸比色(DNS)法。方法 以葡萄糖为对照品,DNS试剂的用量为2.0 mL,90℃水浴加热6 min,于540 nm波长下测定蔓菁中还原糖和总糖含量。结果 还原糖和总糖平均加样回收率分别为101.66%和96.44%,RSD分别为2.86%和1.71%(n=6);3批蔓菁中还原糖和总糖的含量分别为5.86%~6.93%和44.65%~46.50%。结论 该方法简便、准确、重复性好,可用于检测蔓菁中还原糖和总糖的含量。

关键词:蔓菁;还原糖;总糖;3,5-二硝基水杨酸;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0113-04

Determination of Reducing Sugar and Total Sugar in Turnip by 3,5-Dinitrosalicylic Acid Colorimetry

GAO Wenjun, LI Weihong, WANG Ximing, QIAO Lifang

(Shanxi Institute of Medicine and Life Sciences, Taiyuan, Shanxi, China 030006)

Abstract: Objective To establish a 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry(DNS) method for the determination of reducing sugar and total sugar content in Jinnan turnip. **Methods** Glucose was used as the reference substance; the amount of DNS reagent was 2.0 mL, heated in a 90℃ water bath for 6 min, and measured at 540 nm to determine the content of reducing sugar and total sugar in Jinnan turnip. **Results** The average recoveries of reducing sugar and total sugar were 101.66% and 96.44%, respectively; the RSDs were 2.86% and 1.71%, respectively(n=6). The content of reducing sugar and total sugar in 3 batches of turnip were 5.86%~6.93%, 44.65%~46.50%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reproducible, and can be used to detect the reducing sugar and total sugar content in turnip.

Key words: turnip; reducing sugar; total sugar; 3,5-dinitrosalicylic acid; content determination

蔓菁 *Brassica rapa* L. 为十字花科芸薹属植物蔓菁的根,具有开胃消食、下气宽中、止咳化痰、利湿解毒、温和脾胃之功效^[1]。其根富含多种糖类^[2-3]、有机酸、甾体、

三萜、生物碱^[4]等化合物,以及核黄素、烟酸、维生素C及钙、磷、铁^[5]等无机元素,具有抗缺氧、提高免疫力^[6]、抗辐射、滋补等功效。蔓菁在新疆、西藏、四川、陕西、山

*基金项目:山西省科技厅面上自然基金项目[201801D121296]。

第一作者:高文军,男,硕士研究生,助理工程师,研究方向为食品药品成分分析,(电子信箱)qxygwj@163.com。

[△]通信作者:李卫红,女,大学本科,教授级高级工程师,研究方向为食品药品检测技术及质量标准,(电子信箱)lwh191@sohu.com。

- 调查[J]. 中药材,2001,24(1):20-21.
- [2] 毛文山,严智慧,马兴民,等. 中药真伪鉴别[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1984:261.
- [3] 卫生部药品生物制品检定所-中国科学院植物研究所. 中药鉴别手册(二册)[M]. 北京:科学出版社,1979:265.
- [4] 肖培根. 新编中药志:一卷[M]. 北京:化学工业出版社,2001:691.
- [5] 韦欣,任广聪,孙庆文,等. 贵州产菝葜属及肖菝葜属8个品种的鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(2):492-494.
- [6] 杜素兰,张晋宏,耿爱萍,等. 短梗菝葜的定性定量检测方法研究[J]. 中国药事,2008,22(3):230-232.
- [7] 陈艺艸,吴小利,聂飞,等. 短梗菝葜药材的生药学鉴别研究[J]. 中药材,2018,41(2):313-316.
- [8] 张凌燕,叶冰莹,黄骐,等. MPLC测定虎杖中白藜芦醇含量[J]. 天然产物研究与开发,2006(2):308-310.
- [9] 张存莉,李文闯,高锦明,等. 黑刺菝葜中的甾体皂甙研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):163.
- [10] SIEMANN EH, CREASY LL. Concentration of the phytoalexin

resveratrol in wine[J]. *Enology and Viticulture*, 1992, 43(1): 49-52.

- [11] CARUSO F, TANSKI JA, VILLEGAS E, et al. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(24): 7279-7285.
- [12] FARZANEGAN A, SHOKUHIAN M, JAFARI S, et al. Anti-histaminic Effects of Resveratrol and Silymarin on Human Gingival Fibroblasts[J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1622-1629.
- [13] CHEN YR, CHEN YS, CHIN YT, et al. Thyroid hormone-induced expression of inflammatory cytokines interfere with resveratrol-induced anti-proliferation of oral cancer cells[J]. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2019, 132: 110693.
- [14] 培勤,郭传勇. 自藜芦醇药理作用的研究进展[J]. *医药导报*, 2006, 25(6): 524-525.

(收稿日期:2019-09-16)

西等地多有种植。《食疗本草》《本草纲目》《千金方》《本草从新》《名医别录》《药物宝库》等古代文献均有记载,其中《本草纲目》有“辛、苦、平,无毒,可升可降,能汗能吐,能下能利小便,又能明目解毒,其效甚伟”的描述。蔓菁的藏药名为“妞玛”,具有解毒、滋补功效,主治各种中毒症、“龙”病、身体虚弱等;维吾尔族名为“恰玛古”,是维吾尔族人喜爱并有较长历史的药食同源之品,且以藏药、维药的形式收载于卫生部药品标准中^[7]。山西晋南地区出产的蔓菁应用广泛,在当地已有上百年的食用历史,其形似人参,在当地有“小人参”之称。对其物质基础的研究有助于进一步开发利用该产品,为当地蔓菁资源的利用提供依据。目前,仅对晋南蔓菁化学成分分析及蛋白质含量测定有报道^[8],此外未见其他文献对晋南蔓菁有研究。晋南蔓菁多糖含量较多,而植物多糖具有免疫调节、抗疲劳、抗氧化、降血糖等作用^[9]。为此,本研究中建立了测定晋南蔓菁中糖含量的方法,为蔓菁的产品开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Biomate 3S 型紫外可见分光光度计(Thermo Fisher 公司);AUW220D 型电子天平(Shimadzu 公司,精度为十万分之一);WB-4 型恒温水浴锅(常州峥嵘仪器有限公司);SB-500DTY 型超声波多频清洗机(宁波新芝生物科技有限公司);XF-100 型粉碎机(江苏杰瑞尔电器有限公司);Vortex-2 型涡旋混匀仪(上海沪析实业有限公司)。

1.2 试剂

蔓菁(采自山西运城,批号分别为 20181220, 20181230, 20190105);D-无水葡萄糖(中国食品药品检定研究院,批号为 110833-201205,含量不低于 99.5%);盐酸(国药集团化学试剂有限公司),3,5-二硝基水杨酸(上海科丰化学试剂有限公司),苯酚(天津市申泰化学试剂有限公司),均为分析纯;DNS 试剂(将 6.9 g 结晶重蒸馏酚溶于 15.2 mL 10% 氢氧化钠溶液中,稀释至 69 mL 后加入 6.9 g 亚硫酸氢钠,作为 A 液;将 255 g 酒石酸钾钠加入 300 mL 10% 氢氧化钠溶液中,再加入 880 mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液,作为 B 液;将 A 液、B 液混合,得黄色溶液,贮于棕色瓶中备用,常温下放置 1 周后使用^[10]);其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

对照品贮备溶液:精密称取 D-无水葡萄糖对照品 8.53 mg,用水溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,作为对照品贮备溶液(质量浓度为 0.849 mg/mL)。

还原糖供试品溶液:取样品粉末(过 20 目筛)约

0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入蒸馏水 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 20 min,取出,放至室温,再称定质量,补足减失质量,摇匀,滤过,即得。

总糖供试品溶液:取样品粉末(过 20 目筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞刻度大试管中,加 6 mol/L 盐酸 10 mL,沸水浴水解 10 min,取出,流水冷却至室温,用 40% 氢氧化钠溶液调至中性,加蒸馏水至 25 mL,摇匀,过滤,精密移取滤液 1 mL 置 5 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀,即得。

2.2 样品含量测定方法

精密量取以上还原糖供试品溶液、总糖供试品溶液各 2 mL,置 25 mL 具塞刻度大试管中,空白对照组加蒸馏水至 2 mL,各加入 2 mL DNS 试剂,摇匀,90 °C 水浴显色 6 min,取出,流水冷却至室温,加水至 25 mL,摇匀,于 540 nm 波长处检测吸光度。

2.3 检测条件确定

检测波长:采用 DNS 法测定时波长的选择方法不一,但多集中在 400 ~ 800 nm^[11-13]。考虑到显色剂、紫外分光光度计相关因素的影响,本研究中对 DNS 法测定还原糖含量的最佳波长进行了筛选,在 400 ~ 800 nm 波长范围内对试验样品进行了扫描。精密量取稀释的对照品贮备溶液和蒸馏水各 2.0 mL,分别置 25 mL 具塞试管中,各加入 2 mL DNS 试剂,摇匀,90 °C 水浴加热 6 min,迅速冷却,加水定容至 25 mL,分别于 400 ~ 800 nm 波长范围内对葡萄糖显色液(以蒸馏水为空白对照)、DNS 试剂(以蒸馏水为空白对照)、葡萄糖显色液(以 DNS 试剂为空白对照),确定检测波长。结果见图 1。可见,葡萄糖显色液(以 DNS 试剂为空白对照)曲线最大吸收峰处的波长为 490 nm,但在此波长下 DNS 也具有一定的吸光度,选择 490 nm 波长对样品的测定干扰较大。由另外 2 条曲线可见,DNS 试剂以水为空白对照时,在低波长处自身的吸收较明显,但随着波长的增大吸收越来越小,当波长不短于 540 nm 时,葡萄糖显色液(以 DNS 试剂为空白对照)曲线和葡萄糖显色液(以蒸馏水为空白对照)曲线近乎重合。可见,当波长不短于 540 nm 时,DNS 试剂自身的吸收对葡萄糖显色液的干扰可忽略,故将 540 nm 作为检测波长。

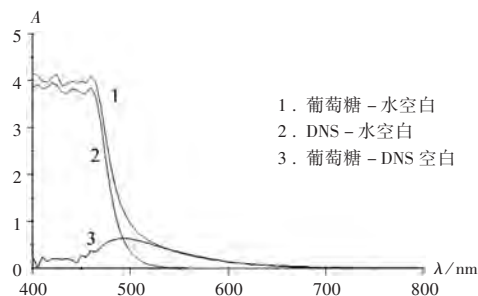


图1 葡萄糖溶液吸收光谱图

显色剂用量:分别精密量取 2 mL 还原糖供试品溶液,置编号为 1~6 号的 25 mL 具塞试管中,分别加入 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL DNS 试剂,沸水浴中加热 10 min,迅速冷却,用蒸馏水定容至 25 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。结果见图 2 A。可见,当 DNS 试剂用量为 2 mL 时,用量继续增加,吸光度浮动较小。为了减小 DNS 试剂对吸光度测定的影响,用量不应小于 2.0 mL,故本试验中 DNS 试剂用量选择 2.0 mL。

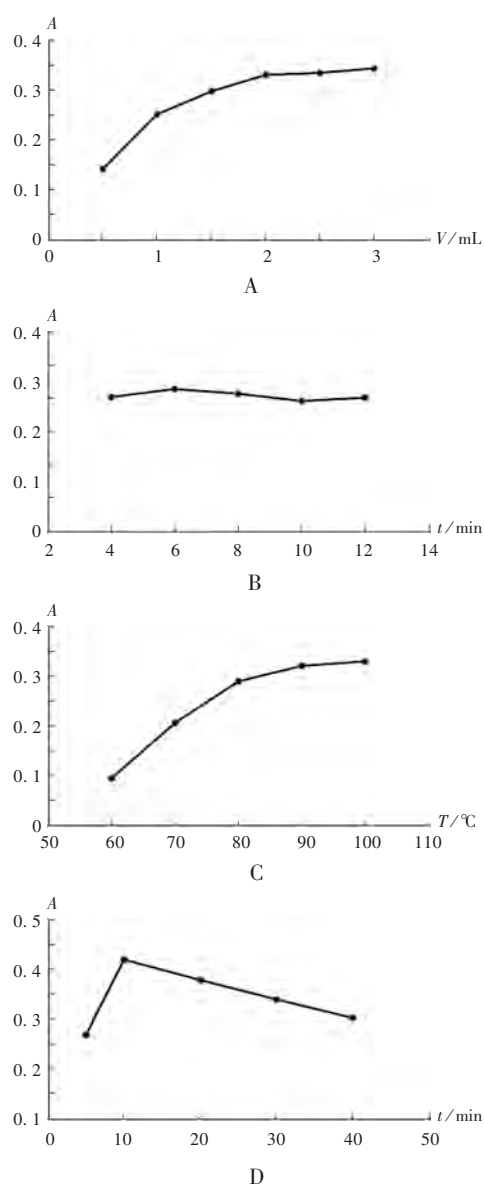
显色时间:分别精密量取 2 mL 还原糖供试品溶液,置编号为 1~5 号的 25 mL 具塞试管中,分别加入 2.0 mL DNS 试剂,沸水浴分别加热 4, 6, 8, 10, 12 min,迅速冷却,用蒸馏水定容至 25 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。结果见图 2 B。可见,沸水浴显色 4, 6, 8, 10, 12 min 时的吸光度变化不明显,较稳定;当显色时间长于 4 min 时,显色时间对于试验的影响不明显。考虑到 4 min 时间过于短暂,显色时间过短操作较局促,故本试验中最终选择 6 min 为显色时间。

显色温度:分别精密量取 2 mL 还原糖供试品溶液 5 份,置编号为 1~5 号的 25 mL 具塞试管中,分别加入 2.0 mL DNS 试剂,分别在 60, 70, 80, 90, 100 °C 水浴中加热 6 min,迅速冷却,用蒸馏水定容至 25 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。结果见图 2 C。可见,显色温度达 90 °C 时,结果趋于稳定,故本试验中选择 90 °C 为显色温度。

总糖水解时间:分别取蔓菁粉末(过 20 目筛)6 份,每份约 0.1 g,精密称定,置编号为 1~5 号的具塞刻度大试管中,加 6 mol/L 盐酸 10 mL,分别沸水浴水解 5, 10, 20, 30, 40 min,取出,流水冷却至室温,用 40% 氢氧化钠溶液调至中性,加水至 25 mL,摇匀,过滤,精密量取滤液 1 mL,置 5 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得总糖供试品溶液,按拟订检测方法测定。结果见图 2 D。可见,水解时间为 10 min 时吸光度最高,10 min 后吸光度开始下降,趋势图同文献[14]报道一致,猜测可能水解液又发生了新的反应,故本试验中选择 10 min 为总糖的水解时间。

2.4 方法学考察

标准曲线绘制:分别精密吸取对照品贮备溶液 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 mL,置 5 mL 容量瓶中,蒸馏水定容至刻度,摇匀,即得系列质量浓度溶液。精密量取对照品溶液 2 mL,置具塞刻度大试管中,加入 2 mL DNS 试剂,摇匀,90 °C 水浴显色 6 min,取出,流水冷却至室温,加水至 25 mL,摇匀,在 540 nm 波长处检测吸光度。以质量浓度(C , mg/mL)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A = 1.1127C + 0.0191$, $r = 0.9989$ ($n = 5$)。结果表明,葡萄糖质量浓



A. 显色剂用量 B. 显色时间 C. 显色温度 D. 总糖水解时间
图2 检测条件考察结果

度在 0.042 45 ~ 0.509 4 mg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:分别取蔓菁原料的还原糖、总糖供试样品溶液,按样品测试方法连续测定 6 次,记录吸光度。结果还原糖的吸光度分别为 0.300 4, 0.300 4, 0.300 4, 0.300 5, 0.300 5, 0.300 5, 总糖的吸光度分别为 0.405 6, 0.405 7, 0.405 3, 0.405 2, 0.405 6, 0.406 1, 还原糖和总糖的 RSD 分别为 0.02% 和 0.08% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:分别取蔓菁原料的还原糖、总糖供试样品溶液,按样品测定方法测定,显色反应完成后,每隔 10 min 测定 1 次。结果见表 1,表明样品在 50 min 内稳定性良好。

重复性试验:分别制备 6 份蔓菁原料的还原糖、总

表1 稳定性试验结果($n=6$)

待测成分	吸光度						RSD (%)
	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	
还原糖	0.302 6	0.304 5	0.305 5	0.306 6	0.307 7	0.309 0	0.75
总糖	0.412 2	0.413 3	0.414 0	0.415 6	0.417 0	0.418 8	0.59

糖供试品溶液,按样品测试方法测定,记录吸光度,并计算含量。结果还原糖平均含量为 6.29%、RSD 为 1.13% ($n=6$),总糖平均含量为 44.51%、RSD 为 2.06% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:分别称取 6 份还原糖、总糖蔓菁样品,每份约 0.05 g,精密称定,分别准确加入无水葡萄糖对照品适量,依法制备供试品溶液,按拟订样品测试方法测定,记录吸光度,并计算含量。结果见表 2。

表2 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3.15	22.41	3.15	22.11	6.33	43.60	101.95	95.84				
3.28	22.33	3.01	22.16	6.26	43.66	99.00	96.25				
3.18	22.30	3.15	22.17	6.43	43.55	103.17	95.85				
3.15	22.17	3.14	21.53	6.31	42.71	100.63	95.40	101.66	96.44	2.86	1.70
3.15	22.26	3.21	21.47	6.32	42.76	98.75	95.48				
3.16	22.31	3.24	22.37	6.61	44.62	106.48	99.73				

注:A 为还原糖,B 为总糖。

2.5 样品含量测定

取 3 批次样品,按拟订样品测定方法测定还原糖和总糖含量,根据葡萄糖标准曲线,分别计算蔓菁样品中还原糖和总糖含量。结果见表 3。可见,晋南蔓菁还原糖和总糖的百分含量分别为 5.86%~6.93%,44.65%~46.50%,还原糖和总糖含量均较高。由于糖类成分在晋南蔓菁中占比较高,不同的糖对人体有重要的生理作用,为下一步研究糖的组成和活性奠定了基础。

表3 3 批样品含量测定结果(%)

批次	还原糖	总糖	批次	还原糖	总糖
20181220	6.42	46.50	20190105	6.93	45.43
20181230	5.86	44.65	$\bar{X}$	6.40	45.53

3 讨论

测定样品中糖的含量经常采用的方法有苯酚-硫酸法^[15]、蒽酮-硫酸法^[16]、3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[17],但前 2 种方法用的硫酸腐蚀性较强,会造成一定的安全隐患。另外,前 2 种方法不能对样品中单糖进行测定,有一定局限性。DNS 法是半微量定糖法^[18],该方法操作简单、便捷、杂质干扰较少,便于批量测定,是一种常用方法。该方法的原理是在碱性条件下,还原糖将 3,5-二硝基水杨酸中的硝基还原成氨基,生成橘红色

化合物,在一定范围内,还原糖含量与颜色成正比。本研究同时考察了 DNS 试剂用量、显色温度和反应时间,保证了反应的可靠性。经方法学考察,DNS 法重复性好、操作简便、快速、准确、灵敏,可用于测定晋南蔓菁中多糖的含量。

参考文献:

- [1] 刘 艺. 合阳蔓菁化学成分及药理活性研究[D]. 西安:陕西科技大学,2011.
- [2] 范芳芳,魏伯平,李 宁,等. HPLC 法测定藏药蔓菁中葡萄糖含量及其特征图谱分析[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(7): 1465-1468.
- [3] 王 娜,高 杰,妥秀兰,等. 不同来源芫菁品种营养品质分析与评价[J]. 天津农业科学,2015,21(10):1-6.
- [4] 古娜娜·对山别克,王 菁,海力茜·陶尔大洪. 新疆芫菁根挥发油的气相色谱质谱联用分析[J]. 西北药学杂志,2013,28(4):331-332.
- [5] 拜 年. 维药恰麻古儿化学成分的基础研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2011.
- [6] 孙 艳,安熙强,马 媛,等. 恰玛古蜜膏对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国医药导报,2010,7(6):20-22.
- [7] 周 林. 藏药蔓菁抗疲劳、抗氧化活性筛选及质量分析初步研究[D]. 成都:成都中医药大学,2012.
- [8] 李卫红. 晋南蔓菁化学成分分析及蛋白质的含量测定[J]. 农产品加工,2016,27(7):48-50.
- [9] 杨宇博,夏红梅,袁恒翼. 植物多糖及其提取方法[J]. 中国甜菜糖业,2008(2):34-37.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1112.
- [11] 曾志恒,曾 辉,程 翔,等. 双孢蘑菇发酵液还原糖和总糖的含量测定[J]. 中国食用菌,2018,37(6):40-43.
- [12] 赵 凯,许鹏举,谷广辉. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学,2008,29(8):534-536.
- [13] 王鹏亭,赵宗杰,周荣灵,等. 3,5-二硝基水杨酸法测定樟芝中多糖的含量[J]. 食品研究与开发,2016,37(9):163-167.
- [14] 程 柳,李 静. 3,5-二硝基水杨酸法测定山楂片中还还原糖和总糖含量[J]. 轻工科技,2016(3):25-28.
- [15] 梁 琰,赵志国,张敏敏,等. 超声辅助提取苯酚-硫酸法测定野生平盖灵芝多糖含量[J]. 食品研究与开发,2018,39(16):125-129.
- [16] 冯文军,李文春,解黎雯,等. 改良硫酸-蒽酮法测定双黄连粉针剂中总糖的含量[J]. 中国科技纵横,2018(13): 186-188.
- [17] 杨 玉,胡 亮,王 芳. 3,5-二硝基水杨酸吸光度法测定马铃薯淀粉废水中还还原糖含量[J]. 甘肃科技,2013,29(5):139-140.
- [18] 宋娇娇,裴 斐,马 勇,等. 3,5-二硝基水杨酸法测定黄水中总糖的含量[J]. 酿酒科技,2019(4):113-117.

(收稿日期:2019-09-25)