

吴海燕,袁秋梅. 导数光谱法快速测定蚕蛹中的多糖含量[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):309-311.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.111

导数光谱法快速测定蚕蛹中的多糖含量

吴海燕^{1,2}, 袁秋梅¹

(1. 南通科技职业学院,江苏南通 226000; 2. 南通市农副产品加工技术协会,江苏南通 226000)

摘要:在 425 ~ 525 nm 波长范围内,扫描多糖-苯酚-硫酸显色反应体系零阶及一阶导数光谱图,发现一阶导数光谱的波峰与波谷间距值与多糖含量成正比。在一阶导数光谱图中,以波峰-波谷间距为纵坐标、以葡萄糖浓度为横坐标,求得标准曲线回归方程,建立了苯酚-硫酸显色导数光谱测定蚕蛹多糖的方法。该测定方法的相对标准偏差为 3.08%,平均回收率在 99.46% ~ 101.54%;显色体系在 120 min 中稳定性好,测定的准确度、精密度高,可以用于蚕蛹中多糖含量的测定。

关键词:多糖-苯酚-硫酸显色反应;导数光谱;蚕蛹多糖;正交试验

中图分类号: S131⁺.2;R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0309-03

蚕蛹为蚕蛾科昆虫家蚕的蛹,具有生津止咳、消食理气等作用,为药膳同源传统中药材,具有很高的营养和药用价值。蚕蛹多糖是蚕蛹中的主要活性成分之一^[1-2]。近年来研究表明,蚕蛹多糖具有明显增强机体免疫功能的作用^[3-6]。

目前蚕蛹多糖的测定方法广泛采用苯酚-硫酸法,此法虽简单、快速、无需多糖纯品和高级仪器,但要求被测溶液本身无色或颜色较淡^[7],而且由于蚕蛹本身有一定的颜色,会对测定产生较大干扰。因此蚕蛹在测定前一般要经过脱色或其他处理,费时费力,容易产生较大误差;另外,蚕蛹多糖结构比较复杂,仅仅用葡萄糖作为标准品不能精确反映多糖含量。

导数光谱又称微分光谱,是将吸收光谱进行数学变换,得到关于波长的微分系数($dA/d\lambda$)对波长(λ)的导数光谱图,属于紫外吸收光谱派生的 1 个分支^[8]。对于复杂的多组物质,导数光谱可不经分离而直接检测,方法简便、快速、准确、灵敏;导数光谱法对重叠谱带及平坦谱带的分辨率高、噪声低,能从重叠的吸收光谱中分离出各自的吸收峰,并能分别进行定量,可排除杂质和颜色的干扰^[9-10]。因此导数光谱法近年来在食品、药品鉴别分析测定领域得到迅速发展和广泛应用^[11-14]。本试验采用一阶导数光谱法测定蚕蛹多糖含量,以期蚕蛹多糖的开发利用和工业化生产提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

蚕蛹粉由南通福尔生物制品有限公司提供;葡萄糖、苯酚、浓硫酸、无水乙醇等试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

TU-1901 紫外-可见分光光度计,北京通用普析仪器有

限责任公司;DZF-6020 真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;SHA-C 数显水浴恒温振荡器,金坛市精达仪器制造厂;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 多糖的提取 称取 5 g 脱脂蚕蛹粉末,加入 100 mL 蒸馏水,在功率为 500 W 的超声波中提取 30 min,过滤,滤液为粗多糖提取液。

1.3.2 多糖的测定

1.3.2.1 线性关系分析 精确量取 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80 mL 0.1 mg/mL 葡萄糖溶液,分别置于 10 mL 干燥比色管中,加蒸馏水至体积为 1.00 mL,加入 0.50 mL 一定浓度的精制苯酚溶液,混匀后迅速加入浓 H_2SO_4 ,放置于水浴锅中加热一定时间,取出冷却至室温。用 TU-1901 紫外-可见分光光度计在 420 ~ 550 nm 波长范围内扫描,记录葡萄糖的零阶和一阶导数吸收光谱,以一阶导数光谱中波峰与波谷间距对葡萄糖含量进行直线回归。

1.3.2.2 样品的测定 将蚕蛹多糖提取液定容至 250 mL,取 10 mL 提取液定容至 100 mL 待测,精确吸取待测液 1.00 mL 置于 10 mL 干燥比色管中,按“1.3.2.1”节方法绘制零阶和一阶导数吸收光谱。将一阶导数光谱中波峰与波谷间距值代入直线回归曲线,求得样品的多糖含量。

1.3.3 苯酚-硫酸法的显色条件优化 以苯酚浓度(A)、浓硫酸用量(B)、水浴温度(C)、水浴时间(D)为考察因素,每个因素各取 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验确定苯酚-硫酸法显色的最优试验条件,详见表 1。

表 1 苯酚-硫酸法显色条件正交试验设计

水平	因素			
	A: 苯酚浓度 (%)	B: 浓硫酸的量 (mL)	C: 水浴温度 (°C)	D: 水浴时间 (min)
1	4	3	30	10
2	5	4	65	15
3	6	5	100	20

1.3.4 精密度试验 取 6 份同一批次的脱脂蚕蛹样品,按照“1.3.1”节的方法进行多糖的提取,提取后的每份试样按照

收稿日期:2014-06-03

基金项目:江苏省教育厅“青蓝工程”资助项目(编号:201423);江苏省南通市农村科技创新及产业化项目(编号:HL2012025)。

作者简介:吴海燕(1978—),女,江苏南通人,副教授,主要从事食品综合利用、食品安全检测的研究。E-mail:why022@126.com。

“1.3.2.2”节的方法求得的一阶导数光谱中波峰与波谷间距值,测定蚕蛹多糖含量来确定方法的精密度。

1.3.5 回收率试验 精确称取 5 g 蚕蛹样品,加入葡萄糖标准品,分别制备添加量为 4、8、16 mg/g 的样品,每个添加量均测定 6 个平行样,按“1.3.1”节的方法提取后,按“1.3.2”节的方法测定多糖含量,计算多糖的回收率。

1.3.6 稳定性试验 精确称取适量多糖样品,按照“1.3.1”节的方法进行多糖的提取,按“1.3.2”节的方法显色后每隔 30 min 测定其一阶光谱导数值的波峰与波谷间的间距值变化。

2 结果与分析

2.1 导数光谱试验

取葡萄糖对照品、空白溶液、蚕蛹多糖提取液,分别在 420 ~ 550 nm 波长范围内扫描,记录葡萄糖的吸收光谱(图 1);利用 UVWin5.0 软件对葡萄糖零阶吸收光谱求导,得到葡萄糖一阶导数光谱(图 2)。一阶导数光谱在 425 ~ 525 nm 间波峰-波谷间距值($dA/d\lambda$)与葡萄糖含量进行直线回归(图 3),可见一阶导数光谱在 425 ~ 525 nm 间的 $dA/d\lambda$ 与葡萄糖含量成正比,因此选择一阶导数光谱在 425 ~ 525 nm 间的波峰-波谷间距值作为定量的依据。

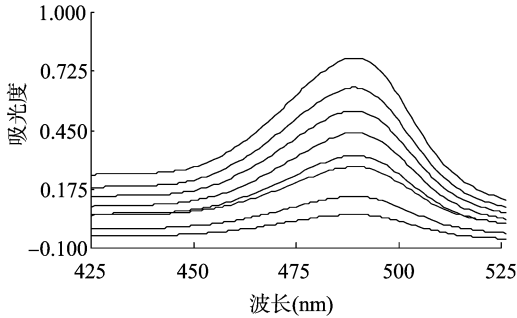


图1 葡萄糖的零阶导数吸收光谱

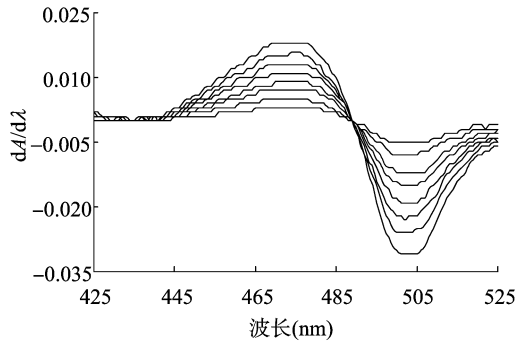


图2 葡萄糖的一阶导数吸收光谱

2.2 显色条件的选择

苯酚-硫酸法显色原理:多糖类物质在硫酸作用下先水解成单糖分子,并迅速脱水成糖醛衍生物,糖醛衍生物再与酚性物质(如苯酚)络合成有色物质。试验发现,此有色物质的一阶导数光谱在 425 ~ 525 nm 间的波峰-波谷间距值定量效果最好。正交试验数据和极差分析结果见表 2。

正交试验中极差的大小反映各个因素对测定指标影响程度,根据表 2 的极差分析可知,各因素对波峰-波谷间距值影

表 2 苯酚-硫酸法显色条件正交试验结果的极差分析

编号	A:苯酚 浓度	B:浓硫酸 的量	C:水浴 温度	D:水浴 时间	$dA/d\lambda$
1	1	1	1	1	0.016
2	1	2	2	2	0.032
3	1	3	3	3	0.023
4	2	1	1	3	0.023
5	2	2	3	1	0.021
6	2	3	1	2	0.028
7	3	1	3	2	0.036
8	3	2	1	3	0.032
9	3	3	2	1	0.032
k_1	0.024	0.025	0.025	0.023	
k_2	0.024	0.028	0.029	0.032	
k_3	0.033	0.028	0.027	0.026	
R	0.009	0.003	0.004	0.009	

注: $dA/d\lambda$ 为一阶导数光谱在 425 ~ 525 nm 间的波峰与波谷间距值。

响程度为:A = D > C > B,苯酚-硫酸法的最佳显色条件为 $A_3B_2C_2D_2$ 组合,即苯酚的浓度为 6%,浓硫酸的用量为 4 mL,水浴温度 65 ℃,水浴时间为 15 min。

2.3 标准曲线

以葡萄糖一阶导数吸收光谱在 425 ~ 525 nm 间的波峰-波谷间距($dA/d\lambda$)为纵坐标、葡萄糖含量(m)为横坐标求得标准曲线(图 3),回归方程为: $dA/d\lambda = 0.5821m + 0.0014$, $r^2 = 0.9982$ 。结果表明,葡萄糖浓度在 1.81 ~ 14.55 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。

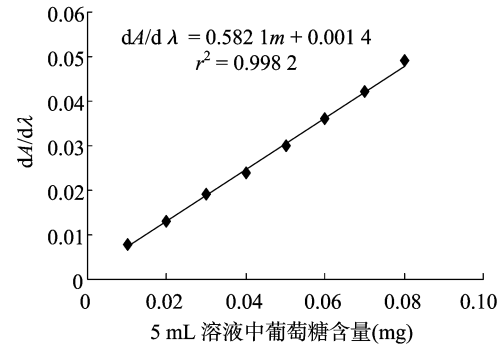


图3 葡萄糖的一阶导数的标准曲线

2.4 精密度试验

蚕蛹多糖含量的精密度试验相对标准偏差为 3.08%,表明采取一阶导数光谱法测定蚕蛹中多糖含量的方法重现性较好。精密度试验结果见表 3。

表 3 精密度试验结果

蚕蛹样品	蚕蛹多糖含量 (mg/g)
平行样 1	20.271
平行样 2	21.130
平行样 3	21.130
平行样 4	20.271
平行样 5	21.989
平行样 6	21.130
平均值	20.987
精密度 RSD	3.08%

2.5 回收率试验

回收率试验结果表明,添加量为 4 mg/g 的样品,平均回收率为 99.46%,*RSD* 值为 2.82%;添加量为 8 mg/g 的样品,平均回收率为 101.54%,*RSD* 值为 2.38%;添加量为 16 mg/g 的样品,平均回收率为 101.25%,*RSD* 值为 2.05%,表明采用一阶导数光谱法测定蚕蛹中多糖含量的方法准确可靠,符合定量分析的准确度要求。多糖的回收率结果见表 4。

表 4 回收率试验结果

样品 序号	样品中含 量(mg/g)	加标量 (mg/g)	测定值 (mg/g)	回收率 (%)	<i>RSD</i> 值 (%)
1	20.987	4	24.566	98.31	
2	20.987	4	25.425	101.75	
3	20.987	4	24.566	98.31	
4	20.987	4	23.707	94.87	
5	20.987	4	25.425	101.75	
6	20.987	4	25.425	101.75	
1~6 平均				99.46	2.82
7	20.987	8	29.720	102.53	
8	20.987	8	28.861	99.57	
9	20.987	8	28.861	99.57	
10	20.987	8	28.861	99.57	
11	20.987	8	29.720	102.53	
12	20.987	8	30.579	105.49	
7~12 平均				101.54	2.38
13	20.987	16	36.592	98.93	
14	20.987	16	38.310	103.57	
15	20.987	16	38.310	103.57	
16	20.987	16	37.451	101.25	
17	20.987	16	37.451	101.25	
18	20.987	16	36.592	98.93	
13~18 平均				101.25	2.05

2.6 稳定性试验

表 5 稳定性试验结果表明,蚕蛹多糖一阶导数光谱的波峰与波谷间距值在显色后 30 min 达到最大,在 120 min 内基本稳定,*RSD* 值为 2.72%。

表 5 稳定性试验结果

时间(min)	dA/dλ
0	0.026
30	0.027
60	0.026
90	0.026
120	0.025
150	0.021

3 结论

导数光谱法测定多糖能消除背景颜色的干扰,可以使蚕蛹多糖不经脱色处理直接测定,提高了测定准确度,避免了由于脱色导致多糖的损失。

本试验利用一阶导数光谱法测定蚕蛹多糖含量。通过试验优化最佳显色条件为:苯酚的浓度为 6%,浓硫酸的用量为 4 mL,水浴温度为 65 ℃,水浴时间为 15 min。显色反应体系的一阶导数光谱值与多糖含量成正比,回归方程为: $dA/d\lambda = 0.5821m + 0.0014$, $r^2 = 0.9982$ 。测定方法的相对标准偏差为 3.08%,平均回收率在 99.46%~101.54%之间,显色体系在 120 min 中稳定性好,测定的准确度和精密度高,可以用于蚕蛹中多糖含量的测定。

参考文献:

[1] 藏其中,万淑莹,何光星,等. 蚕蛹多糖的分离和分析[J]. 中成药,1992,14(3):35-36.

[2] 刘静,徐立,黄先智. 蚕蛹的生物活性成分及药理作用研究进展[J]. 食品科学,2012(17):303-307.

[3] Zhang M, Haga A, Sekiguchi H, et al. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx Mori*) pupa exuvia[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2000, 27(1):99-105.

[4] 黄林清,周世文,张诗平,等. 蚕蛹多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报,2002,18(1):11-13.

[5] 孙龙,冯颖,何钊,等. 蚕蛹多糖的碱液提取及免疫活性初步研究[J]. 林业科学研究,2007,20(6):782-786.

[6] 王国基,殷伟芬,王俊,等. 蚕蛹多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 江苏大学学报:医学版,2007,17(5):373-375.

[7] 伍善广,赖泰君,孙建华,等. 蚕蛹多糖脱蛋白方法研究[J]. 食品科学,2011,32(14):21-24.

[8] Sánchez R F, Bosch O C. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry; 2004—2008: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 635(1):22-44.

[9] 荀许雁,杨圣,王亚军. 紫外可见分光光度计的双向导数光谱法[J]. 分析测试学报,2010,29(7):675-679.

[10] El-Sayed A A, El-Salem N A. Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications[J]. Analytical Sciences, 2005, 21(6):595-614.

[11] 耿霞,梁冰,梁玉祥,等. 苯酚-硫酸导数光谱法快速测定中药中多糖的研究[J]. 四川大学学报:工程科学版,2002,34(3):62-64.

[12] 陈悦娇,马应丹,谢武珊. 导数光谱法快速测定食用菌多糖[J]. 食品与发酵工业,2004,30(6):108-111.

[13] Karljikovic-Rajic K, Novovic D, Marinkovic V, et al. First-order UV-derivative spectrophotometry in the analysis of omeprazole and pantoprazole sodium salt and corresponding impurities[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 32(4/5):1019-1027.

[14] Dinç E, Yücesoy C, Onur F. Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and chemometric methods[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 28(6):1091-1100.