

苯酚-浓硫酸比色定糖法的应用

司世麟 赵春桂* 薛晓梅 张 晶

(河北省科学院生物所, 石家庄)

随着肿瘤免疫学研究的不断深入, 一些担子菌类多糖、高等植物多糖等, 作为免疫型抗癌药受到了国内外广泛重视^[1]。在这些多糖的提取、纯化、制剂过程中, 要多次测定糖含量。目前广泛采用的是蒽酮比色法^[2,3], 此法虽快速, 但易受其它物质的干扰, 显色不稳定; 而且蒽酮试剂只能当日配制当日使用, 不方便。也有人用斐林试剂比色法、3, 5-二硝基水杨酸比色法等^[2,3], 但它们仅适用于有还原性的单糖, 对多糖则必须先进行完全水解。

我们在香菇多糖提纯工作中, 采用了苯酚-浓硫酸比色定糖法^[4]。该法简便易行、快速有效、不需特殊设备和试剂, 且适用于各种糖的测定。

一、材料和方法

仪器 721 型分光光度计。

主要试剂 1. 80% 苯酚溶液(80g 重蒸馏苯酚, 加入 20ml 重蒸馏水)。2. 浓硫酸(比重 1.84, 含量 98%)。3. 糖标准贮存液(精确称取 1.0g 标准糖(A·R), 用 0.25% 苯甲酸定容至 100ml)。4. 糖标准应用液(糖标准贮存液 1 ml, 用重蒸馏水定容至 100ml)。5. 其它试剂均为分析纯。

方法:

1. 标准曲线的制作 吸取糖标准应用液(100 μ g/ml) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0ml, 分别加入到各试管中, 用重蒸馏水补足至每管 2ml, 使各管糖含量分别为 0、10、20、30、40、60、80、100 μ g。各管加 0.05 ml 80% 苯

酚溶液, 再冲入浓硫酸 5ml (勿沿管壁加入, 以便使硫酸和样品快速混匀), 静置 10 分钟。30 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟, 在 490nm 测各管的 OD 值。以糖浓度为横坐标, 各管的 OD 值为纵坐标作图。

2. 样品测定 取 2ml 待测样品(糖浓度控制在 5—50 μ g 之间), 加入试剂量和操作方法同标准曲线的制作, 测其 OD 值, 在标准曲线上可查出样品含糖量。

二、结果和讨论

还原糖与苯酚-浓硫酸反应, 呈现桔黄色, 六碳糖在 485nm—490nm 有最大吸收峰, 五碳糖在 480nm 有最大吸收峰^[4]。若糖浓度在 5—50 μ g 之间, 其光密度在 0.05—1.0 之间, 呈很好的线性关系(图 1)。

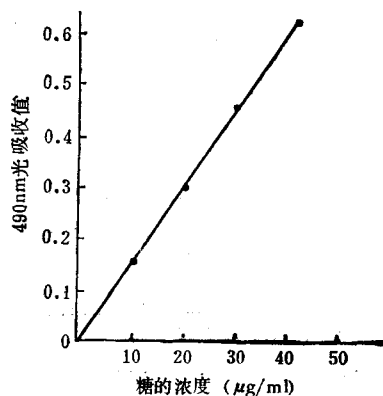


图1 糖的标准曲线
此图所用样品为葡萄糖

* 河北中医学院生化教研室。

10 分钟桔黄色即达最深。在室温下, 颜色很稳定, 至少 4 小时内无明显变化 (4 小时后未测; 表 1)。

对寡糖和多糖, 水解 ($2N\ H_2SO_4$, $80^\circ-90^\circ C$ 水解 4 小时) 和未水解样品, 用此法测得的 OD 值无显著差异 (表 2)。说明该法不仅适用于测定单糖, 而且也适于直接测定多糖, 勿需先水解。

表 1 颜色稳定性试验

时 间 (小 时)	490nm 的 OD 值				
	葡萄糖	果糖	蔗糖	松三糖	淀粉
0.5	0.35	0.3	0.375	0.335	0.352
1	0.35	0.3	0.372	0.335	0.352
2	0.35	0.31	0.387	0.335	0.345
4	0.35	0.325	0.40	0.345	0.35

表 2 水解、未水解样品试验比较

糖的处理	在 490nm 处的 OD 值			
	蔗 糖	松三糖	淀 粉	香菇多糖
未水解	0.335	0.36	0.31	0.43
水 解	0.36	0.36	0.325	0.435

以植物或动物为材料的糖提取液中, 常含有维生素 C、半胱氨酸等还原物质, 为确定这些物质有无干扰, 我们做了以下比较试验: ①在五支试管里各加等量的葡萄糖 (或果糖) 标准应用液, 其中四管内分别加维生素 C、半胱氨酸、腺嘌呤、尿素等干扰物, 另一管不加, 同法测定 OD 值 (表 3)。②在每组试管里各加等量的葡萄糖标准应用液, 各管内分别加不同量的干扰物, 另一管不加, 然后测 OD 值 (表 4)。结果表明, 上述物质对测定并无干扰, 甚至各类物质分别加大到 $50\ \mu g$, 光密度值仍无显著变化。

表 3 非糖还原物质的干扰试验

样品	在 490nm 处的 OD 值				
	未加 干扰物	加干扰物 ($30\ \mu g$)			
		维生素 c	腺嘌呤	半胱氨酸	尿素
葡萄糖	0.39	0.40	0.395	0.42	0.395
果 糖	0.36	0.335	0.34	0.335	0.335

表 4 干扰物水平的试验

干扰物名称	在 490nm 处的 OD 值			
	未加干扰物 (样品为 葡萄糖)	加不同量的干扰物 (样品为葡萄糖)		
		$30\ \mu g$	$40\ \mu g$	$50\ \mu g$
维生素 c	0.35	0.365	0.375	0.36
腺嘌呤	0.35	0.345	0.34	0.335
半胱氨酸	0.35	0.37	0.36	0.39
尿素	0.35	0.35	0.347	0.35

为查明植物等材料粗提液中是否还有其它干扰物质, 我们做了糖的回收试验: 二试管中各加入等量的香菇 (或苹果等) 糖提取液, 一管内再加入定量的葡萄糖, 另一管不加, 同法测定 OD 值, 并计算糖含量。实验证明, 加入的葡萄糖量几乎全部被测出。说明本法灵敏度高、重复性好, 样品中单宁、蛋白质等其余物质对本法无干扰 (表 5)。

表 5 糖的回收试验

样品	糖含量 (μg)		糖的回收率 (%)
	样品中未加 葡萄糖	样品中加入 $50\ \mu g$ 葡萄糖	
香菇多糖粗提液	3	53	100
香菇多糖纯化液	7	58.5	103
香菇多糖精制液	7.5	56	97
苹果糖提取液	19.5	69.5	100

综上所述, 此法适于测定单糖、寡糖和多糖, 且简单易行, 重复性好。

须注意的是纤维素干扰本法对糖的测定, 因此实验用品勿用滤纸等擦抹, 以免影响结果。

参 考 文 献

[1] 刘爱静:《吉林医学》, 5(3), 45—48, 1984。
[2] 蔡武城等:《生物物质常用化学分析法》, 科学出版社, 4—9, 1982。
[3] 北京大学生物系生化教研室编:《生物化学实验指导》, 人民教育出版社, 22—30, 1979。
[4] Dubois, M. et al.; *Anal. Chem.*, 28: 350, 1956.

[本文于 1986 年 2 月 5 日收到]