

瑞香狼毒茎叶糖类成分的定性与定量分析

杨国栋,宋晓平,华彩丽,付明哲,杨向颖,程 飞

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**对瑞香狼毒茎叶中糖类成分进行定性定量分析。**【方法】**采用薄层色谱法,以氯仿-冰醋酸-蒸馏水混合液($V(\text{氯仿}):V(\text{冰醋酸}):V(\text{蒸馏水})=18:21:3$)为展开剂,苯胺-二苯胺磷酸丙酮溶液为显色剂,对瑞香狼毒茎叶中的可溶性糖进行定性检测。采用苯酚-硫酸比色法,以葡萄糖标准液制作标准曲线,对瑞香狼毒茎叶中可溶性糖和总糖含量进行测定。**【结果】**瑞香狼毒茎叶提取液的薄层色谱显示2个斑点, R_f 值分别为0.457、0.519,分别与蔗糖、葡萄糖对照品的 R_f 值一致。葡萄糖标准液在490 nm处有最大吸收峰,其标准曲线方程为 $Y=0.0078X-0.016$ (Y 为490 nm处吸光度, X 为葡萄糖标准液含量),相关系数 $r=0.9986$ 。采用苯酚-硫酸比色法测定瑞香狼毒茎叶中的糖含量可靠性高。**【结论】**瑞香狼毒茎叶中的可溶性糖主要为葡萄糖和蔗糖,可溶性糖和总糖含量分别为34.2和77.8 g/kg。

[关键词] 瑞香狼毒;茎叶;糖类成分;苯酚-硫酸法

[中图分类号] S859.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)12-0212-05

Qualitative and quantitative analysis of saccharide compositions in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L

YANG Guo-dong, SONG Xiao-ping, HUA Cai-li, FU Ming-zhe,

YANG Xiang-ying, CHENG fei

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The total sugar and soluble sugar in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L was investigated. **【Method】**The soluble sugar was detected by thin layer chromatography(TLC). The plate was developed with chloroform-glacial acetic acid-distilled water($V(\text{chlorlform}):V(\text{glacial acetic acid}):V(\text{distilled water})=18:21:3$). The spots were located by exposing the plate to the solution of aniline, diphenylamine, phosphoric acid and acetone. The content of sugar was determined with phenol-sulfuric acid method and by reference to glucose. **【Result】**There were two spots in the plate, the R_f values were 0.457 and 0.519 respectively, which accorded with that of glucose and sucrose. The glucose standard liquid had the highest absorptive peak at 490 nm wavelength and the regression equation was $A=0.0078C-0.016$ and Correlation coefficient $r=0.9986$. The average recoveries and relative standard deviation were 98.97% and 1.662% respectively. The contents of soluble sugar and total sugar in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L detected by phenol-sulfuric acid method were credible. **【Conclusion】**The main compositions of soluble sugar in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L were glucose and sucrose, and the contents of soluble sugar and total sugar in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L were 34.2 g/kg and 77.8 g/kg respectively.

* [收稿日期] 2008-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571402)

[作者简介] 杨国栋(1982—),男,河南洛阳人,在读硕士,主要从事中药成分及药理作用研究。

[通讯作者] 宋晓平(1963—),男,陕西周至人,教授,博士,主要从事中药成分及药理作用研究。E-mail: sxpxbnl@163.com

Key words: *Stellera chamaejasme* L; leaf and stem; content of sugar; phenol-sulfuric acid method

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L)俗称断肠草、馒头花,生命力强、抗风、抗寒、耐旱,是一种广泛分布于我国东北、华北、西南、西北等地区的草原有毒植物^[1]。据《神农本草经》记载,瑞香狼毒与大戟科植物狼毒大戟、月腺大戟同作狼毒入药,其性味苦平,全草有毒,有逐水祛痰、破积杀虫之功效^[2]。目前,国内外对瑞香狼毒的研究主要集中在化学成分^[3-6]、生物活性及药理作用^[7-8]等方面,而对瑞香狼毒植株中,尤其是茎叶中糖类成分的定性定量分析鲜有报道。为此,本研究用薄层色谱法、苯酚-硫酸比色法对瑞香狼毒茎叶中糖类成分进行定性定量检测,以期对瑞香狼毒的综合开发利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 瑞香狼毒茎叶,2007-08 采集于陕西省太白县境内,阴干、粉碎过 250 μm 筛备用。

1.1.2 主要试剂 葡萄糖,天津市博迪化工有限公司生产;木糖,北京奥博星生物技术责任有限公司生产;果糖,国药集团化学试剂有限公司生产;蔗糖,天津市登峰化学试剂厂生产,以上试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 Specord-50 紫外可见分光光度计,德国耶拿公司生产;101A 型电热鼓风干燥箱,上海实验仪器有限公司生产;JA12002 电子天平,上海天平制造厂生产;RE-52A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司生产。

1.2 瑞香狼毒茎叶中可溶性糖的定性检测

1.2.1 瑞香狼毒茎叶提取液的制备 精确称取干燥至恒重的瑞香狼毒茎叶粉末 1.000 g,加入 15 mL 丙酮,回流脱色 1 h,过滤弃滤液,向残渣中加入体积分数 85% 的乙醇溶液 150 mL,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温浸 30 min,过滤,残渣再依同法提取 3 次,合并各次滤液,定容至 1 000 mL。

1.2.2 可溶性糖标准液的配制 准确称取葡萄糖、蔗糖、木糖、果糖各 0.100 0 g,分别用蒸馏水溶解,并定容至 10 mL。依次得到葡萄糖、蔗糖、木糖、果糖的标准溶液。

1.2.3 瑞香狼毒茎叶中可溶性糖的检测 用 3 g/L 羧甲基纤维素钠溶液制备 5 cm $\times$ 20 cm 的硅胶 G 薄层板,自然晾干,用前在 110 $^{\circ}\text{C}$ 活化 30 min。在薄层板上依次等间距进行点样:瑞香狼毒茎叶提取

物、木糖、葡萄糖、果糖和蔗糖标准液。点样后展开(展开剂为氯仿-冰醋酸-蒸馏水混合液,V(氯仿):V(冰醋酸):V(蒸馏水)=18:21:3),喷显色剂苯胺-二苯胺磷酸丙酮溶液^[9],85 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 15 min。根据各斑点的比移值 R_f ,初步确定可溶性糖的种类。

1.3 瑞香狼毒茎叶中糖含量的测定

1.3.1 标准曲线的绘制 (1)苯酚的精制。称取苯酚 100 g,依次加入铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g,常压蒸馏,收集(180 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 的馏分。精密称取该馏分 9.0 g 置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀后转置于棕色试剂瓶中,即得苯酚溶液^[10-11],将其置冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。(2)葡萄糖标准液的配制。精确称取经 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重的葡萄糖 0.010 g,加入 40 mL 蒸馏水,充分溶解后定容至 100 mL,即得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖标准液。(3)最大吸收波长的确定。取 0.4 mL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葡萄糖标准液,用蒸馏水补充至 1 mL,加入精制的 90 g/L 苯酚水溶液 1 mL,摇匀;加入 5 mL 浓硫酸,振摇 10 min,室温放置 20 min 后,放入 Specord-50 紫外分光光度计中,在 200~800 nm 进行扫描,测定最大吸收波长。(4)标准曲线的绘制。取 8 支试管,分别加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖标准液 0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL,用蒸馏水补充体积至 1 mL,使每支试管中的葡萄糖质量依次为 0,10,20,30,40,50,60 μg 。向各试管中依次加入精制的 90 g/L 苯酚水溶液 1 mL,摇匀,加 5 mL 浓硫酸,振摇 10 min,室温放置 20 min,在最大吸收波长处测定吸光度(A),绘制标准曲线^[10-12]。

1.3.2 瑞香狼毒茎叶中糖含量的测定 (1)可溶性糖含量的测定。精确称取干燥至恒重的瑞香狼毒茎叶粉末 3 份(A、B、C),每份重 1.000 g,按“1.2.1”的方法制备瑞香狼毒茎叶提取物,取每份定容后的样品液 1 mL,分别加入精制的 90 g/L 苯酚水溶液 1 mL,摇匀,加 5 mL 浓硫酸,振摇 10 min,室温放置 20 min,在紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度(A)^[12],每份样品重复测定 3 次。按标准曲线方程计算可溶性糖含量。(2)总糖含量的测定。精确称取干燥至恒重的瑞香狼毒茎叶粉末 3 份(D、E、F),每份重 1.000 g,加入 15 mL 丙酮,回流脱色 1 h,过滤弃滤液,向残渣中加入体积分数 15% 盐酸 50 mL,沸水浴水解 45 min,以酚酞做指示剂,用 100 g/L NaOH 中和至微红色,定容至 1 000 mL。分别

取 5 mL 上述制备液,定容至 10 mL。取定容后的样品液 1 mL,加入精制的 90 g/L 苯酚水溶液 1 mL,摇匀,加 5 mL 浓硫酸,振摇 10 min,室温放置 20 min,在紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度(A)。每份样品重复测定 3 次。按标准曲线方程计算总糖含量。

1.3.3 测定方法的可靠性 (1)显色剂稳定性试验。取配制的 40 μg/mL 葡萄糖标准液,按上述可溶性糖含量的测定方法,每隔 15 min 测定 1 次其在 490 nm 处的吸光度,连续测 6 次。(2)加样回收率试验。精密量取“1.2.1”所制备的定容后瑞香狼毒茎叶提取液 3 份(G、H、I),各 0.2 mL,分别加入 100 μg/mL 葡萄糖标准液 0.1,0.2,0.3 mL,并定容至 1 mL。按可溶性糖含量的测定方法进行测定,按下面的公式计算回收率:回收率/%=(混合后可溶性糖含量-样品中可溶性糖含量)/加入的葡萄糖含量×100%。(3)精密度试验。取 1 份瑞香狼毒茎叶提取液,测定可溶性糖含量,重复 6 次,计算相对标准偏差(RSD)。

2 结果与分析

2.1 瑞香狼毒茎叶中可溶性糖的定性检测

对瑞香狼毒茎叶提取液进行薄层色谱分析,结果显示有 2 个斑点,且其 R_f 值分别为 0.457 和 0.519,

分别与蔗糖、葡萄糖的 R_f 值一致。表明瑞香狼毒茎叶中的可溶性糖主要是蔗糖和葡萄糖。

2.2 瑞香狼毒茎叶中糖含量的测定

2.2.1 标准曲线 葡萄糖标准液在 490 nm 处有最大吸收,标准曲线方程为: $Y=0.0078X-0.016$,相关系数 $r=0.9986$ (图 1),式中:Y 为溶液在 490 nm 处的吸光度(A),X 为葡萄糖标准液含量。

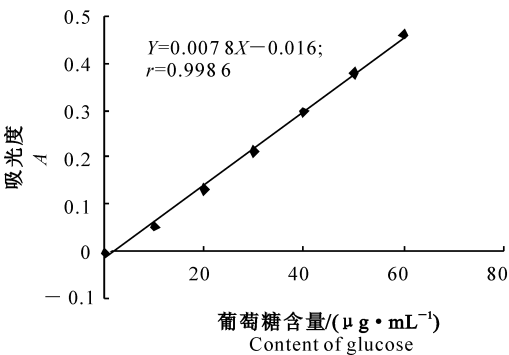


图 1 葡萄糖标准液的吸光曲线

Fig.1 Aabsorptive curve of glucose solution

2.2.2 瑞香狼毒茎叶中的糖含量 瑞香狼毒茎叶中可溶性糖和总糖含量的测定结果见表 1 和表 2。由表 1 可知,瑞香狼毒茎叶中可溶性糖平均含量为 34.2 g/kg。由表 2 可知,瑞香狼毒中总糖平均含量为 77.8 g/kg。

表 1 瑞香狼毒茎叶中的可溶性糖含量

Table 1 Content of soluble sugar in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L

样品 Sample	吸光度(A) Absorbance			可溶性糖含量/(g · kg ⁻¹) Content of soluble sugar	
	1	2	3	各样品计算值 Calculated value	平均值 Average
A	0.254 6	0.254 5	0.254 6	34.7	34.2
B	0.247 5	0.247 6	0.247 6	33.8	
C	0.249 9	0.249 9	0.249 7	34.1	

表 2 瑞香狼毒茎叶中的总糖含量

Table 2 Content of total sugar in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L

样品 Sample	吸光度(A) Absorbance			总糖含量/(g · kg ⁻¹) Content of soluble sugar	
	1	2	3	各样品计算值 Calculated value	平均值 Average
D	0.281 9	0.281 9	0.282 0	76.4	77.8
E	0.291 4	0.291 3	0.291 3	78.8	
F	0.288 9	0.299 0	0.288 9	78.2	

2.3 瑞香狼毒茎叶中糖含量测定方法的可靠性检测

显色剂稳定性试验中,6 次测定的吸光度分别为 0.295 9,0.295 9,0.296 1,0.295 9,0.296 0,0.295 9,RSD 为 0.033 8%($n=6$);加样回收率试验

结果显示,平均回收率为 98.97%,RSD 为 1.662%(表 3);精密度试验结果显示,RSD 为 1.339%($n=6$)。以上结果说明,采用苯酚-硫酸比色法测定瑞香狼毒茎叶中的糖含量是可靠的。

表 3 瑞香狼毒茎叶中糖含量测定方法的加样回收率试验结果($n=3$)

Table 3 Result of average recovery test of determination method for the sugar determination in the leaf and stem of *Stellera chamaejasme* L

样品 Sample	样品中可溶性糖 平均含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Average content of soluble sugar	加入葡萄糖含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Content of added glucose	测得可溶性糖含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Measured value	回收率/% Recovery	平均回收率/% Average recovery
G	6.84	10	16.92	100.8	98.97
H	6.84	20	26.35	97.55	
I	6.84	30	36.41	98.57	

3 讨 论

3.1 瑞香狼毒茎叶中糖含量的测定

苯酚-硫酸比色法测定糖含量的原理是,多糖或者寡糖在浓硫酸和适当高温作用下,水解产生单糖,并迅速脱水成具有呋喃环结构的糖醛衍生物,该衍生物在强酸作用下与苯酚产生络合物,该种络合物在 480~490 nm 处有最大吸收(戊糖和糖醛酸在 480 nm,己糖在 490 nm)^[10,13-14],且在一定的浓度范围内,其吸光度值和糖含量呈线性关系,从而可以利用比色法测定糖含量。苯酚硫酸法测定糖含量具有简单、快捷、无需多糖纯品和高级仪器等特点,在糖的定量测定中得到广泛应用^[15]。但是该方法要求被测溶液本身无颜色或颜色较浅^[16]。而瑞香狼毒茎叶部位由于含有叶绿素,其糖类成分提取液颜色深,必须经过脱色处理才能进行测定。作者在预试验中,通过对石油醚、乙酸乙酯、丙酮提取脱色,活性炭吸附,双氧水氧化脱色等方法进行对比发现,在瑞香狼毒茎叶中糖类成分提取液进行脱色时,丙酮回流提取脱色效果最好,经脱色后溶液几乎无色,可以满足比色法的测定要求。有报道称,在对未知糖和混合糖的含量进行测定时,以葡萄糖计的相对含量产生的误差较小^[17]。为了便于将试验结果同已有文献的报道进行横向比较,本试验选择以葡萄糖为标准品,用苯酚-硫酸比色法对瑞香狼毒茎叶部位的糖含量进行测定。

3.2 瑞香狼毒茎叶中糖的种类及含量

本试验采用薄层色谱法对瑞香狼毒茎叶中的糖类成分进行定性检测,结果表明,其可溶性糖主要是葡萄糖和蔗糖。葡萄糖是植物光合作用的主要产物之一,也是自然界分布最广泛的己醛糖,常以游离的葡萄糖或以二糖、多糖、糖苷等结合形式存在于植物体内。蔗糖是植物体内碳水化合物运输的主要形式,光合作用产生的葡萄糖转变成蔗糖后再向植物各部位运输,到各部位后又迅速地转化为葡萄糖供植物利用^[18]。用苯酚-硫酸比色法对瑞香狼毒茎叶

中的可溶性糖和总糖含量测定结果表明,瑞香狼毒茎叶可溶性糖含量为 34.2 g/kg,总糖含量为 77.8 g/kg。本试验结果与孙志忠等^[12]报道的瑞香狼毒根部的可溶性糖含量 207.4 g/kg,总糖含量 463.1 g/kg 相比,茎叶中糖含量较低。这可能与瑞香狼毒植株的形态特征有关,瑞香狼毒系多年生草本植物,根部木质化,粗大且呈圆柱型^[19],储存有大量营养成分,因而根部糖含量较高,而瑞香狼毒茎叶较细小,冬季枯萎,来年再生长,营养物质在茎叶部位的蓄积作用不明显,故其糖含量也相对较低。

[参考文献]

[1] 刘 英,龙瑞军,姚 拓. 草地狼毒研究进展 [J]. 草业科学, 2004(6):55-61.
Liu Y, Long R J, Yao T. Research progress on *Stellera chamaejasme* L in grassland [J]. Pratacultural Science, 2004 (6):55-61. (in Chinese)

[2] 李文娟. 瑞香狼毒抑菌活性及其作用机制的初步研究 [D]. 成都:四川大学,2006.
Li W J. The antibiotic activities of the extracts of the root of the *Stellera chamaejasme* L and the preliminary studies on the mechanism [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006. (in Chinese)

[3] 梁 冉. 瑞香狼毒中香豆素类化学成分研究 [D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学,2005.
Liang R. Study on coumarin constituents from *Stellera Chamaejasme* L [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2005. (in Chinese)

[4] 元 超. 瑞香狼毒根的化学成分初步研究 [J]. 中外健康文摘, 2007,4(3):90-92.
Yuan C. Study on the chemical components of *Stellera chamaejasme* L [J]. World Health Digest, 2007,4(3):90-92. (in Chinese)

[5] Feng B M, Pei Y H, Hua H M. Chemical constituents of *Stellera chamaejasme* L [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2001,10(2):65-66.

[6] Jin Y P, Fu Q D, Qi W X. Orthogonal test design for optimization of supercritical fluid extraction of daphnoretin, 7-methoxy-daphnoretin and 1, 5-diphenyl-1-pentanone from *Stellera chamaejasme* L and subsequent isolation by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A,

- 2006,1135(2):151-157.
- [7] 卓兆莲,高英,李卫民.蒙药瑞香狼毒的生物活性及毒副作用研究[J].中国现代中药,2007,9(12):32-34.
Zhuo Z L,Gao Y,Li W M.Study on the biological activity and toxic and side effects of mongolian medicine *Stellera chamaejasme* L [J]. Modern Chinese Medicine,2007,9(12):32-34. (in Chinese)
- [8] 潘为高,高平,刘燕萍,等.瑞香狼毒各组分杀螨活性及组分间相互作用的研究[J].四川大学学报:自然科学版,2004,41(1):208-211.
Pan W G,Gao P,Liu Y P,et al. The toxicity of components extracted from the root of *Stellera chamaejasme* L to Panonychus citri and the interaction between components [J]. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 2004, 41 (1): 208-211. (in Chinese)
- [9] 王俊儒.天然产物提取分离与鉴定技术[M].陕西杨陵:西北农林科技大学出版社,2003.
Wang J R. The extraction and isolation technology of nature products [M]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University Press,2003. (in Chinese)
- [10] 张青,张天民.苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J].山东食品科技,2004(7):17-18.
Zhang Q,Zhang T M. Phenol-sulfuric acid method for the determination of polysaccharide [J]. Shandong Food Science and Technology,2004(7):17-18. (in Chinese)
- [11] 凌育赵.导数光谱法快速测定白花蛇舌草类多糖的研究[J].化学与生物工程,2005(6):23-25.
Ling Y Z. Study on derivative spectrometry of reaction system for rapid determination of polysaccharides in *Hedyotis diffusa* Willd Kind [J]. Chemistry & Bioengineering,2005(6):23-25. (in Chinese)
- [12] 孙志忠,黎勇,郝文辉,等.瑞香狼毒与大戟狼毒糖类成分的比较研究[J].黑龙江大学自然科学学报,1996,13(4):89-91.
Sun Z Z,Li Y,Hao W H,et al. A comparative study on the composition of saccharine of *Stellera chamaejasme* L and *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Journal of Natural Science of Hei Long Jiang University,1996,13(4):89-91. (in Chinese)
- [13] 周跃斌,王伟,周向荣.苯酚-硫酸比色法测定毛竹叶多糖的研究[J].现代食品科技,2008,24(2):180-183.
Zhou Y B,Wang W,Zhou X R. Determination of polysaccharides in phyllostachys pubescens leaves by phenol-vitriolic colorimetry [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2):180-183. (in Chinese)
- [14] 周菁,王伯初,王阳.浮萍多糖总糖含量测定与评价[J].重庆大学学报:自然科学版,2005,28(10):111-114.
Zhou J,Wang B C,Wang Y. Determination and evaluation of saccharides content in extract of *Herba spirodelae seu Lemnae* polysaccharides [J]. Journal of Chongqing University : Natural Science Edition,2005,28(10):111-114. (in Chinese)
- [15] 何江川,韩永萍,缪刚.姬松茸多糖粉中总糖含量的测定[J].食用菌,2005(2):6-8.
He J C,Han Y P,Liao G. Determination of total sugar in polysaccharide powder of *Agaricus brasiliensis* [J]. Edible Fungi,2005(2):6-8. (in Chinese)
- [16] 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.
Geng X,Liang B,Liang Y X,et al. Study on derivative spectrometry of polysaccharide -phenol- sulfuric acid reaction system for rapid determination of polysaccharides in Chinese herbal medicine [J]. Journal of Sichuan University:Engineering Science Edition,2002,34(3):62-64. (in Chinese)
- [17] 吴晓,徐佳,池玉梅,等.猫爪草中总糖和多糖含量测定方法的研究[J].南京中医药大学学报,2007,23(3):169-171.
Wu X,Xu J,Chi Y M,et al. Method for determination of content of total sugar and polysaccharides in *Radix ranunculi ternati* [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine,2007,23(3):169-171. (in Chinese)
- [18] 傅建熙.有机化学[M].北京:高等教育出版社,2000.
Fu J X. Organic chemistry [M]. Beijing: Higher Education Press,2000. (in Chinese)
- [19] 王永学.瑞香狼毒化学成分的研究[D].陕西杨陵:西北农林科技大学,2004.
Wang Y X. Study on chemical compounds in *Stellera chamaejasme* L [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2004. (in Chinese)