

姜 琼, 谢 好. 苯酚-硫酸法测定多糖方法的改进[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 316-318.

# 苯酚-硫酸法测定多糖方法的改进

姜 琼, 谢 好

(宜春学院化学与生物工程学院/江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西宜春 336000)

**摘要:** 苯酚-硫酸法是一种广泛使用的多糖测定方法, 此法灵敏度高, 且不需贵重仪器, 但准确性和重现性不佳, 本研究在试验的基础上对苯酚-硫酸定糖法进行了改进, 对新方法从显色时间、显色温度、稳定性、重现性、回收率、显色剂配制时间与吸光度等方面进行了考察, 并使用酶标仪进行吸光度测定。改进后的方法提高了精密度和准确性, 又进一步简化了操作, 提高了效率, 尤其是同时检测较多样品时可以减轻劳动强度, 节约大量试剂与时间。

**关键词:** 苯酚-硫酸法; 多糖; 酶标仪

**中图分类号:** Q53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0316-02

多糖是一类具有诸多生物活性的高分子化合物, 由于其结构复杂, 不同种类多糖的分子组成和相对分子质量各不相同, 目前国家对其含量测定方法还没有统一标准, 苯酚-硫酸比色法(简称苯酚-硫酸法)是较常用的一种方法。苯酚-硫酸法由 Dubois 等<sup>[1]</sup>建立, 其原理是利用浓硫酸将多糖水解成单糖, 并迅速脱水生成糠醛衍生物, 再和苯酚缩合成有色化合物, 再在 490 nm 处进行比色测定。该法灵敏度高, 且不需贵重仪器, 但准确性和重现性受试验条件影响较大, 且费时费事、样品和试剂消耗较多。徐光域等通过对苯酚-硫酸法操作步骤的改进, 以减少因人为的操作而产生的误差, 改进后的方法提高了精密度和准确性, 操作也有所简化<sup>[2]</sup>。商澎等将苯酚-硫酸法与酶标仪相结合, 先用苯酚硫酸与多糖产生显色反应, 再使用酶标仪测吸光度, 适合快速大批量的测定, 但试验的准确性较低, 误差较大<sup>[3]</sup>。本研究结合了 2 种改进思路, 探索试验了一种既准确精密, 又操作简便, 适合于快速批量检测多糖含量的试验方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器与试剂

酶标仪, Stat Fax 2100; 葡萄糖, 分析纯, 105 °C 烘烤至恒重后备用;  $\beta$ -葡聚糖, 分子量 500 ku, 上海工硕生物技术有限公司; 98% 浓硫酸、苯酚均为分析纯。

### 1.2 试剂制备

**1.2.1 苯酚试剂的制备** 取苯酚 100 g, 置于蒸馏烧瓶中加热, 收集 180 °C 左右馏分, 配成 5% 的溶液, 放入棕色瓶中, 置于冰箱中保存备用。

**1.2.2 显色液的制备** 取 5% 苯酚溶液与 98% 浓硫酸按体积比为 1:5 混合, 并置于冰水中冷却。浓硫酸应靠烧杯内壁缓慢加入, 以防止溶液飞溅, 显色液应防止放置时间过久, 以免影测定结果。

## 2 方法与结果

### 2.1 显色时间对苯酚-硫酸法测定多糖含量结果的影响

向 12 支微量离心管中加入 0.18 mg/mL 葡萄糖溶液, 每管 60  $\mu$ L, 各加入显色剂 180  $\mu$ L, 混匀并放置于 100 °C 的沸水中加热, 观察加热时间对溶液的显色影响, 使用酶标仪测定  $D_{490\text{nm}}$ , 试验结果见图 1。从图 1 可以看出, 随着加热时间的延长, 显色效果迅速增大, 显色 25 min 时,  $D_{490\text{nm}}$  达到最大; 此后继续加热,  $D_{490\text{nm}}$  反而缓慢降低。因此, 加热时间以 25 min 为宜。

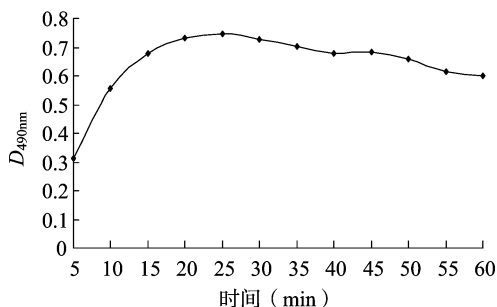


图1 苯酚-硫酸法测定多糖含量的显色时间对  $D_{490\text{nm}}$  的影响

### 2.2 显色温度对苯酚-硫酸法测定多糖含量结果的影响

向 12 支微量离心管中加入 0.18 mg/mL 葡萄糖溶液, 每管 60  $\mu$ L, 各加入显色剂 180  $\mu$ L, 混匀并放置于不同的温度中加热, 观察加热温度对溶液显色的影响, 加热时间设定为 25 min, 使用酶标仪检测  $D_{490\text{nm}}$ , 试验结果见表 1。从表 1 可知, 当温度低于 80 °C 时, 混合溶液完全不能显色, 100 °C 的显色效果明显强于 80 °C 的显色效果, 因此加热温度应为 100 °C。

表1 苯酚-硫酸法测定多糖含量的显色温度与  $D_{490\text{nm}}$  的关系

温度 (°C)	$D_{490\text{nm}}$		
	重复 1	重复 2	重复 3
20	0	0	0
40	0	0	0
60	0	0	0
80	0.261	0.263	0.258
100	0.678	0.651	0.647

收稿日期: 2013-06-21

基金项目: 宜春学院与香港津威国际集团发展有限公司横向合作课题(编号: 2012001)。

作者简介: 姜 琼(1980—), 男, 湖北监利人, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物的研究与开发。E-mail: qqj20@163.com。

2.3 苯酚-硫酸法测定多糖含量的稳定性

向 12 支微量离心管中加入 0.18 mg/mL 葡萄糖溶液,每管 60  $\mu$ L,各加入显色剂 180  $\mu$ L,混匀,放置于 100  $^{\circ}$ C 的沸水中加热 25 min 并冷却,连续测定间隔不同时间后的  $D_{490\text{ nm}}$ ,以观察显色后的稳定性,试验结果见表 2。从表 2 可知,葡萄糖与显色液反应后试剂显色效果较为稳定,在常温下放置时几乎不会因时间的推移而使溶液吸光度降低或升高, $D_{490\text{ nm}}$  保持在一个相对稳定的范围之内, $RSD=0.448\%$ 。

表 2 苯酚-硫酸法测定多糖含量的稳定性

时间 (min)	$D_{490\text{ nm}}$
0	0.659
5	0.654
10	0.653
15	0.654
20	0.654
30	0.656
40	0.657
50	0.657
60	0.657
90	0.653
120	0.652
150	0.649
180	0.650

2.4 苯酚-硫酸法测定多糖含量的重现性

取 0.18 mg/mL 葡萄糖溶液 8 份与临时配制的显色液,混匀,在温度为 100  $^{\circ}$ C 沸水浴中加热 25 min 并冷却,用酶标仪快速测定此 8 份溶液的  $D_{490\text{ nm}}$ ,试验结果见表 3。从表 3 可知,改进型的苯酚-硫酸法测多糖的重现性相对比较稳定, $RSD=2.833\%$ 。

表 3 苯酚-硫酸法测定多糖含量的重现性

试验号	葡萄糖浓度 (mg/mL)	$D_{490\text{ nm}}$
1	0.18	0.645
2	0.18	0.618
3	0.18	0.624
4	0.18	0.648
5	0.18	0.608
6	0.18	0.598
7	0.18	0.613
8	0.18	0.612

2.5 苯酚-硫酸法测定多糖含量的回收率

取 5 支微量离心管,分别加入 0.6 mg/mL 葡萄糖标准溶液 10、13、16、19、22  $\mu$ L,在每份溶液中各加 10  $\mu$ L 0.401 mg/mL  $\beta$ -葡聚糖溶液,并加蒸馏水定容到 60  $\mu$ L,再滴加 180  $\mu$ L 显色液混匀,沸水浴中加热 25 min 并冷却,用酶标仪测定  $D_{490\text{ nm}}$ ,结果见表 4。从表 4 可知,通过葡萄糖回归方程计算混合溶液中多糖和葡萄糖的总重量,并以此减去葡萄糖重量得到测定的多糖重量,计算测定的多糖重量占总重量的比例,平均值为 101.52%, $RSD=3.981\%$ ,说明该方法有较好的精确度。

2.6 显色剂配制时间对苯酚-硫酸法测定多糖含量结果的影响

以体积比 5 : 1 将 98% 浓硫酸缓慢滴加到 5% 苯酚溶液

表 4 苯酚-硫酸法测定多糖含量的回收率

葡萄糖重量 ( $\mu$ g)	添加的多糖重量 ( $\mu$ g)	总重量 ( $\mu$ g)	测得的多糖重量 ( $\mu$ g)	比例 (%)
6.0	4.01	10.01	9.944 03	98.35
7.8	4.01	11.81	11.865 67	101.39
9.6	4.01	13.61	13.488 81	96.98
11.4	4.01	15.41	15.578 36	104.12
13.2	4.01	17.21	17.481 34	106.77

中,置于冰水中使之迅速冷却。将配制好的显色剂放于室内常温下保存,测定显色剂放置时间对显色效果的影响,结果见图 2。从图 2 可知,显色剂配制时间对显色效果有很大的影响,随着配制时间的延长,显色效果先迅速降低,8 h 后缓慢降低。因此,使用本方法时应尽量快速操作,以免因操作时间过长造成试验误差。另外,测定大量样品时可以考虑提前 8 h 配制显色剂,以减小前后样品间因操作时间不同造成的误差。

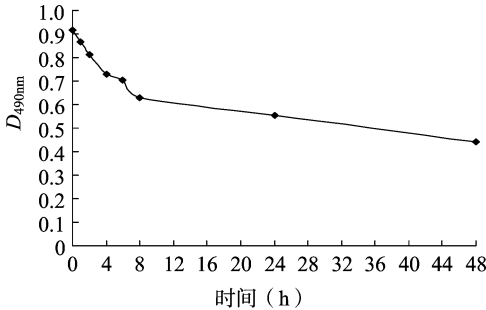


图2 显色剂配制时间对  $D_{490\text{ nm}}$  的影响

2.7 苯酚-硫酸法测定多糖含量的标准曲线

取 6 支微量离心管,分别加入 0.6 mg/mL 葡萄糖标准溶液 0、4.8、9.6、14.4、19.2、24、28.8、33.6、36  $\mu$ L,并分别加入蒸馏水稀释到 60  $\mu$ L,再滴加 180  $\mu$ L 显色液,混匀后沸水浴中加热 25 min 并冷却,用酶标仪测定吸光度并作标准曲线,试验结果见图 3。由图 3 可以看出,本方法线性关系良好。

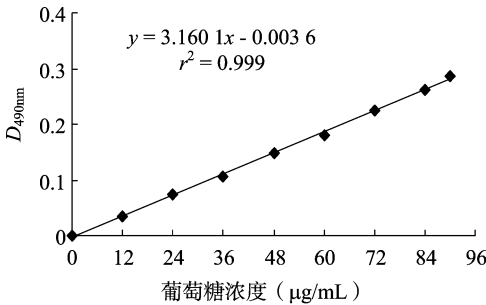


图3 葡萄糖标准曲线

3 结论

苯酚-硫酸法是一种常用的测定多糖含量的方法,此方法虽然具有灵敏度高等优点,但也有诸多问题,如准确性和重现性不佳、操作费时、消耗样品及试剂较多等。前人虽进行了一些改进,也取得了一定的效果<sup>[4-9]</sup>,但并没有同时解决上述问题。本试验先以预先配制显色液然后统一加热显色的方法大大提高了准确性和重现性,后又配合酶标仪的使用,大大减

董占营,何文辉,华雪铭,等. 清洁虾氨基酸组成及含量分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):318-320.

# 清洁虾氨基酸组成及含量分析

董占营,何文辉,华雪铭,李鲜鲜,焦建刚,何亚丁

(上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:**对 3 种规格清洁虾(*Lyasmata amboinensis*)的氨基酸组成及含量进行分析。结果表明:总氨基酸含量呈现规律为小规格<中规格<大规格;总必需氨基酸含量呈现相同的变化规律,且 3 种规格间无显著差异( $P>0.05$ );总必需氨基酸含量占总氨基酸含量的百分比呈现规律为大规格<中规格<小规格。从单个氨基酸来看,大部分氨基酸含量表现出小规格<中规格<大规格的变化规律,只有谷氨酸、组氨酸、蛋氨酸不符合该规律。对清洁虾肌肉、虾壳、受精卵 3 个组织进行的氨基酸分析结果表明:清洁虾不同组织中的总氨基酸含量和必需氨基酸含量均存在显著差异( $P<0.05$ ),其中肌肉中总氨基酸含量最高,虾卵次之,虾壳最低。对于必需氨基酸含量,虾壳中组氨酸最高,肌肉中精氨酸含量最高,受精卵中为亮氨酸>赖氨酸>组氨酸>精氨酸。

**关键词:**清洁虾;氨基酸;组成;含量;规格

**中图分类号:**S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)12-0318-03

清洁虾(*Lyasmata amboinensis*)别称加勒比海清洁虾、医生虾,隶属于藻虾科鞭藻虾属<sup>[1]</sup>,主要分布在印度尼西亚与马来西亚海岸地区。清洁虾因其体色鲜艳、形体小巧,日益受到水族爱好者的青睐,有很高的市场需求<sup>[2]</sup>,但其人工繁殖尚未成功,主要和未找到仔虾合适的开口饵料、变态期过长且死亡率高等问题有关。目前对清洁虾的研究主要集中在生物学观察<sup>[3-4]</sup>、亲虾繁殖<sup>[1]</sup>及性别决定机制<sup>[5]</sup>等方面,未见有清洁虾氨基酸成分分析的报道。然而,氨基酸与生物的生命活动有着密切的关系,是生物体内不可缺少的营养成分。目前研

究认为,饵料蛋白质的氨基酸组成及含量与虾类自身氨基酸组成及含量相似者可视为最好的饵料<sup>[6]</sup>。因此,对虾类进行氨基酸组成的研究具有重要意义,既可为虾类生化研究提供基础资料,又可为开口饵料的选择和配合饲料研制提供理论依据。有众多学者在该领域进行了研究:娄伟风等和梁亚全等分别对中国对虾和斑节对虾的氨基酸组成进行了分析<sup>[7-8]</sup>;刘玉梅等进行了中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究<sup>[9]</sup>;孙溢等对中国对虾幼体发育各阶段氨基酸组成进行了研究<sup>[10]</sup>。本试验主要对 3 种不同规格的清洁虾以及 3 种组织的氨基酸组成和含量进行测定,以期为清洁虾的营养需求及繁育工作提供理论数据。

收稿日期:2013-04-19

作者简介:董占营(1987—),男,山东东营人,硕士研究生,研究方向为水产动物营养与饲料科学。E-mail: dongzhanying1987@163.com。

通信作者:何文辉,副教授,硕士生导师,主要从事水域生态修复及观赏鱼繁育等方面的研究。E-mail: whhe@shou.edu.cn。

少了样品及试剂消耗并提高了检测效率。通过对加热时间<sup>[10]</sup>、加热温度<sup>[11]</sup>等影响显色的重要因素的考察,得到最佳加热时间为 25 min、温度为 100℃。试验时应保证显色剂迅速滴加,即能得到重现性好且准确可靠的测定结果。采用本试验优选的显色方式,测定过程简便可行、结果准确,尤其适合大批量的检测分析。传统的苯酚-硫酸法的每个样品须加浓硫酸 5 mL,这对操作人员的安全构成一定的威胁,采用本方法每个样品仅需浓硫酸 0.15 mL,试验安全性大大提高。

## 参考文献:

- [1] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars[J]. Nature, 1951, 28(7): 167-168.
- [2] 徐光域,颜 军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 342-346.
- [3] 商 澎,高 蓉,梅其炳,等. 苯酚-硫酸法改用酶联免疫测定仪快速测定多糖组分[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(3): 27-

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用虾

所用清洁虾于 2011 年 4 月通过海口美兰鼎成海洋生物经销部从印度尼西亚采购,共 200 尾,规格为 0.1~4.0 g,体

- 29.
- [4] 刘立超,黄洪林,赖正权,等. 苯酚硫酸法测定梔子水溶性多糖含量[J]. 安徽医药, 2005, 9(11): 831-832.
- [5] 罗 毅,潘细贵,刘 刚,等. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(1): 45-46.
- [6] 苏 颖,周选围. 改进苯酚-硫酸法快速测定虫草多糖含量[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 118-121.
- [7] 贺福元,罗杰英,刘平安,等. 差示酚磺法的建立及对五子衍宗颗粒剂中多糖测定比较研究[J]. 中医药导报, 2006, 12(1): 2-5.
- [8] 董 群,郑丽伊,方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(9): 550-553.
- [9] 徐 斌,董 英,林 琳,等. 改良苯酚-硫酸法测定苦瓜多糖含量[J]. 食品科技, 2005, 2(7): 79-82.
- [10] 师 勤,马果玉,徐璐珊,等. 比色法测定蒺藜中多糖的含量[J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(5): 39-41.
- [11] 吴苏澄,姜云平,谭永红,等. 胃炎停中多糖的含量测定[J]. 华西药理学杂志, 1999, 14(3): 187-188.