

马 敏,刘嘉宝,陈兰兰. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色条件的优化与改进[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):323-324.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.102

# 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色条件的优化与改进

马 敏,刘嘉宝,陈兰兰

(青海民族大学,青海西宁 810007)

**摘要:**在单因素试验基础上,选择对多糖含量测定结果产生显著影响的4个显色因素:6%苯酚用量、浓硫酸用量、反应温度、水浴显色时间进行正交试验,获得传统苯酚-硫酸法测定多糖含量的最佳显色条件是1 mL 6%苯酚溶液、7 mL 浓硫酸、4℃反应温度、30 min水浴显色。改进后的多糖含量测定的显色条件即按照1:7的比例直接配制苯酚-硫酸显色液,在4℃条件下加入样品溶液,在90℃水浴进行30 min显色后,于490 nm处测定吸光度,计算多糖含量。通过传统最佳显色方法的验证试验和改进后的显色方法测定多糖含量的结果比较,表明改进后的方法具有操作简便、精密度高、准确度高、实用性强的优势。

**关键词:**苯酚-硫酸法;多糖测定;显色条件

**中图分类号:** O657.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0323-02

多糖是一种天然高分子化合物,根据其功能不同可分为活性多糖和膳食纤维2类。活性多糖类化合物作为绝大多数天然产物中的主要降血糖活性成分,具有比重大、作用温和、毒性反应低、作用强的特点,同时兼有降血脂和抗血小板聚集等生理功能和活性<sup>[1]</sup>。因此,从天然产物中筛选、发现、分析、测定多糖类化合物引起了研究者高度重视。目前,多糖含量测定的传统方法有苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、DNS法,但皆存在操作步骤繁琐、耗时长、测定结果重现性和准确度较差的问题<sup>[2]</sup>。因此,本研究将在获得最佳显色条件的基础上,改进显色剂的加入方式,从而获得测定多糖含量的新方法。

## 1 仪器与试剂

葡萄糖(AR,天津市大茂化学试剂)、硫酸(AR,白银市良友化学试剂有限公司)、苯酚(AR,天津市大茂化学试剂)、电子分析天平(FA2204,上海安亭电子)、722E型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、DZKW-4电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

收稿日期:2014-11-18

基金项目:青海民族大学青年基金(编号:2014XJZ09)。

作者简介:马 敏(1984—),女,河南,硕士,讲师,主要从事分析化学研究。E-mail:mamin273670@126.com。

## 2 方法与结果

### 2.1 苯酚液的配制

苯酚100.00 g,加铝片0.10 g和碳酸氢钠0.06 g,常压蒸馏,收集182℃馏分。称取该馏分5.00 g,置100.00 mL容量瓶中,加新鲜蒸馏水稀释至刻度,摇匀,过滤至棕色试剂瓶中,得6%苯酚液,置冰箱中冷藏,待用。

### 2.2 葡萄糖对照品溶液的制备

105℃干燥至恒质量的葡萄糖0.1008 mg,溶解后转移至1000 mL棕色容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得浓度0.1008 mg/mL葡萄糖对照品溶液。

### 2.3 测定波长的选择

量取0.1008 mg/mL葡萄糖对照品溶液3.00 mL,置于25.00 mL具塞比色管中,加蒸馏水1.00 mL,混匀后,加入新配制的6%苯酚液2.00 mL,混匀,迅速滴加浓硫酸7.00 mL,控制在微放热或不放热为宜,90℃水浴加热30 min,取出至冷水中冷却至室温。另取蒸馏水同法平行操作作为空白对照,于400~600 nm范围内扫描获得吸收曲线,结果表明在488 nm波长处有最大吸收(图1),故以490 nm作为测定波长<sup>[3]</sup>。

### 2.4 葡萄糖标准曲线的绘制

精确移取0.15 mg/mL葡萄糖标准溶液0.40、0.50、

学,2010,38(3):342-346。

[9]王伟明,董大明,郑文刚,等. 梨果糖浓度近红外漫反射光谱检测的预处理方法研究[J]. 光谱学与光谱分析,2013,33(2):359-362。

[10]罗曦芸,杜一平,沈美华,等. 红外光谱在纤维质文物材料鉴别中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析,2015,35(1):60-64。

[11]邹孝恒,郝中骐,易荣兴,等. 基于遗传算法和偏最小二乘法的土壤激光诱导击穿光谱定量分析研究[J]. 分析化学,2015,43(2):181-186。

[12]韩瑞珍,宋 韬,何 勇. 基于可见/近红外光谱的土壤有机质含量预测[J]. 中国科学:信息科学,2010,40(增刊1):111-116。

[3]孙仁爽,金哲雄,张哲鹏,等. 牦牛儿苗科11种中药材红外光谱鉴定及聚类分析[J]. 光谱学与光谱分析,2013,33(2):371-375。

[4]鲍一丹,陈 纳,何 勇,等. 近红外高光谱成像技术快速鉴别国产咖啡豆品种[J]. 光学精密工程,2015,23(2):349-355。

[5]祝诗平,王一鸣,张小超,等. 基于遗传算法的近红外光谱谱区选择方法[J]. 农业机械学报,2004,35(5):152-156。

[6]吴燕萍,鲍一丹,何 勇. 基于BP神经网络的黄豆含水率无损检测分析[J]. 农机化研究,2007(2):126-129。

[7]李秀昌,韩曦英,孙 健. 利用DPS数据处理系统进行均匀试验设计与分析[J]. 中国卫生统计,2010,27(2):201,203。

[8]谢 军,潘 涛,陈洁梅,等. 血糖近红外光谱分析的 Savitzky-Golay 平滑模式与偏最小二乘法因子数的联合优选[J]. 分析化

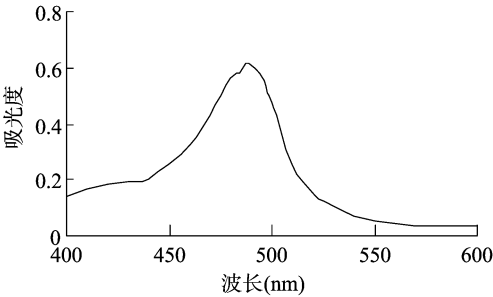


图1 吸收曲线扫描图谱

0.60、0.70、0.80、0.90、1.00 mL,分别置于 10.00 mL 容量瓶中,分别加蒸馏水 1.00 mL,再分别加入 2.00 mL 6% 苯酚溶液,混匀,迅速加入浓硫酸 7.00 mL(控制微放热或不放热为宜),90 ℃ 水浴加热 30 min,冷却至室温后,加蒸馏水定容,摇匀。另取蒸馏水同法平行操作为空白对照,于 490 nm 处分别测定吸光度。计算得到标准曲线方程  $D = 33.343C + 0.0336$ ,  $r^2 = 0.9997$ ,线性范围 6.0 ~ 15.0  $\mu\text{g/mL}$ (见图 2)。

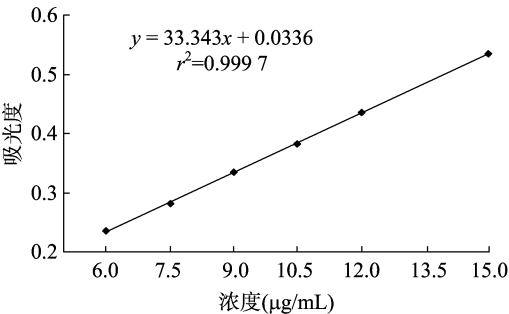


图2 葡萄糖标准曲线

2.5 显色条件的优化

选择 6% 苯酚用量(A)、浓硫酸用量(B)、反应温度(C,加入硫酸时的环境温度)、水浴时间(D,90 ℃ 水浴加热的时间)4 个因素及 3 个水平,建立因素水平表(表 1)。通过正交试验设计助手,根据显色条件试验计划表,测定 490 nm 处的吸光度,以葡萄糖测定含量为评价指标,结果见表 2。

表 1 苯酚-硫酸法测定多糖含量因素水平

水平	A (mL)	B (mL)	C (℃)	D (min)
1	1.00	5.00	4.00	10.00
2	1.50	7.00	20.00	20.00
3	2.00	10.00	90.00	30.00

2.6 正交试验结果

由表 2 可见,通过直观分析法分析可知,在葡萄糖含量测定中,6% 苯酚的加入量对测定值的影响不显著,而浓硫酸的加入量(B)、加入浓硫酸时的反应温度(C)、90 ℃ 水浴的放置时间(D)对测定值有显著性影响,并且产生影响的 4 个因素的次序是  $B > D > C > A$ 。苯酚-硫酸法多糖含量测定的最佳显色条件组合是  $A_1B_2C_1D_3$ 。

2.7 比较试验

精确量取 0.100 8 mg/mL 葡萄糖对照品溶液 2.00 mL,根据最佳显色条件组合,按照“2.3”节测定葡萄糖标准液在 490 nm 处的吸光度值为 0.280,即按照传统显色剂加入法,计

表 2 苯酚-硫酸法测定多糖含量  $L_9(3^4)$  正交试验结果

处理	A	B	C	D	葡萄糖含量 (mg)
试验 1	1	1	1	1	0.292
试验 2	1	2	2	2	0.392
试验 3	1	3	3	3	0.174
试验 4	2	1	2	3	0.396
试验 5	2	2	3	1	0.191
试验 6	2	3	1	2	0.148
试验 7	3	1	3	2	0.018
试验 8	3	2	1	3	0.697
试验 9	3	3	2	1	0.012
$k_1$	0.286	0.235	0.379	0.165	
$k_2$	0.245	0.427	0.267	0.186	
$k_3$	0.242	0.111	0.128	0.422	
R	0.044	0.316	0.251	0.257	

算葡萄糖含量的测定值为 0.184 7 mg( $RSD = 0.20\%$ ,  $n = 6$ )。

精确量取 0.100 8 mg/mL 葡萄糖对照品溶液 2.00 mL,按照最佳显色条件组合配制显色液:将 7.00 mL 浓硫酸缓慢加入 5.00 mL 蒸馏水中稀释,用冰水冷却后加入 1.00 mL 6% 苯酚溶液<sup>[4]</sup>。测定其在 490 nm 处的吸光度值为 0.300,即按照改良的显色液加入法,计算葡萄糖含量的测定值为 0.199 7 mg( $RSD = 0.12\%$ ,  $n = 6$ )。

3 讨论

本试验在单因素试验基础上,建立正交试验设计,考察了 6% 苯酚用量(A)、浓硫酸用量(B)、反应温度(C,加入硫酸时的环境温度)、水浴时间(D,90 ℃ 水浴加热的时间)4 个因素对多糖含量测定的影响程度,通过方差分析可知 6% 苯酚用量对测定值影响不大,而浓硫酸用量、反应温度、水浴加热时间对测定值有显著影响,表明操作中需注意加入浓硫酸时,以不放热或微放热为宜。本试验结论与罗毅等苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选结论<sup>[5]</sup>不同。

显色液的配制,并未改变苯酚-硫酸显色机理的本质,显色液的显色机理:硫酸使碳水化合物缩合生成糠醛,糠醛再与苯酚形成有色物质。配制显色液使反应系统温度一致,使待测组分的水解时间充分,有利于粗多糖含量测定准确度的提高<sup>[6]</sup>。

改良的显色液加入法简化了操作,减少偶然误差和系统误差的产生,有利于在实际工作中多糖的测定。改善传统苯酚-硫酸法测定多糖含量重现性差、准确差问题。

参考文献:

[1] 范晓良,颜继忠,阮伟锋. 香菇多糖提取、纯化、结构表征及生物活性研究[J]. 海峡药学,2012,24(5):1-4.  
[2] 苏玉顺,李艳君,赵方振,等. 紫外-可见分光光度法在植物多糖含量测定中的应用[J]. 光谱实验室,2011,28(3):1101-1107.  
[3] 刘晓涵,陈永刚,林 励,等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J]. 食品科技,2009,34(9):270-272.  
[4] 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.  
[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] 王 超,张曜武. 苯酚-硫酸法的改进发展[J]. 天津化工,2011,25(6):16-18.