

# 基于硫酸-苯酚法的可溶性糖高通量测定 方法及其应用

宋奇, 杨杰, 鲁瑶, 王添敏\*, 邸学, 宋慧鹏, 张慧

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

**摘要:** **目的** 基于硫酸-苯酚法建立一种测定可溶性糖含量的高通量方法, 并应用于五味子、枸杞子和梨的可溶性糖含量测定。**方法** 以硫酸-苯酚比色法为基础, 在微孔板中进行反应和测定, 对苯酚加入顺序、反应温度、浓硫酸用量和苯酚浓度进行考察和优化。以五味子、枸杞子和梨为研究对象, 进行方法学考察, 并与传统苯酚-硫酸法的含量测定结果进行比较。**结果** 先加入浓硫酸后加入苯酚的反应顺序能获得较高吸光度值, 葡萄糖-果糖标准曲线在 1.515~30.285  $\mu\text{g}/\text{孔}$  范围内线性关系良好, 方法的精密度、重复性和稳定性较好, 测定五味子、枸杞子、梨样品中葡萄糖-果糖的加样回收率分别为 98.34%、103.88%、101.26%, 相对标准偏差均小于 5%。**结论** 本研究方法与传统方法相比操作简单、试剂用量小、线性范围广, 可以用作植物样品中可溶性糖的高通量测定。

**关键词:** 硫酸-苯酚法; 高通量; 可溶性糖; 五味子; 枸杞子; 梨

## High-throughput method for determining soluble sugar based on sulfuric acid-phenol method and its application

SONG Qi, YANG Jie, LU Yao, WANG Tian-Min\*, DI Xue, SONG Hui-Peng, ZHANG Hui

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a high-throughput method based on sulfuric acid-phenol method for determining soluble sugar, and apply for the determination of soluble sugar of *Schisandra chinensis* fruits, *Lycium barbarum* fruits and pears. **Methods** The reaction and assay were carried out in the microplate based on the sulfuric acid-phenol colorimetric method, and the influences of phenol addition order, reaction temperature, volume of concentrated sulfuric acid and phenol concentration on the determination of soluble sugar were investigated and the reaction conditions were optimized. The present method was validated with and applied for samples of *Schisandra chinensis* fruits, *Lycium barbarum* fruits and pears, and the content of soluble sugar in the 3 samples determined by the present method and the traditional phenol-sulfuric acid method were compared. **Results** The higher absorbance value can be obtained by adding concentrated sulfuric acid first and then phenol. The standard curve of glucose-fructose had a good linear relationship in the range of 1.515 to 30.285  $\mu\text{g}/\text{well}$ , the method had good

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81703658)、辽宁省科学技术基金项目(2019-MS-223)、沈阳市科技局项目(RC190083)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (81703658), the Science and Technology Foundation of Liaoning Province (2019-MS-223), and the Science and Technology Bureau Foundation of Shenyang (RC190083)

\***通信作者:** 王添敏, 博士, 教授, 主要研究方向为中药品质评价与药效物质基础。E-mail: wang\_tm@163.com

\***Corresponding author:** WANG Tian-Min, Ph.D, Professor, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, No.1, Life Road, Wanli District, Dalian 116600, China. E-mail: wang\_tm@163.com

precision, repeatability and stability, and the recoveries of glucose-fructose spiked in samples of *Schisandra chinensis* fruits, *Lycium barbarum* fruits and pears were 98.34%, 103.88%, 101.26%, with the relative standard deviations value less than 5%. **Conclusion** Compared with the traditional method, the present method is of simple operation, small reagent consumption and has wide linear range, and can be used as a high-throughput method for determining soluble sugar in plant samples.

**KEY WORDS:** sulfuric acid-phenol method; high-throughput; soluble sugar; *Schisandra chinensis* fruits; *Lycium barbarum* fruits; pears

## 0 引言

糖作为植物代谢的中间产物或终产物,调节植物生长、发育、抗性形成等多个生理过程<sup>[1]</sup>。果实中的可溶性糖主要为蔗糖、葡萄糖和果糖,是植物果实成熟的重要指标,一般认为3种可溶性糖的含量越高,果实的成熟度越高<sup>[2-4]</sup>;可溶性糖也是植物育种育苗<sup>[5]</sup>、食品发酵过程控制<sup>[6]</sup>、植物应对环境状况<sup>[7-8]</sup>等的重要指标;可溶性糖在药用植物中虽不作为药效成分,却是中药栽培<sup>[9]</sup>、采收<sup>[10-11]</sup>、加工<sup>[12]</sup>、炮制<sup>[13-14]</sup>等环节的重要质量控制指标。

3,5-二硝基水杨酸法、蒽酮硫酸法和苯酚硫酸法是测定碳水化合物常用的3种比色法,相较于旋光法、色谱法、光谱法和酶反应法等,具有快速、准确、简便、成本低等优点<sup>[15-18]</sup>。其中3,5-二硝基水杨酸法是以糖的还原性为原理,多用于还原糖的含量测定;蒽酮硫酸法和苯酚硫酸法的反应原理均是糖在强酸作用下脱水生成糠醛及其衍生物,再与显色剂生成特定颜色的化合物,但多项研究<sup>[18-21]</sup>表明,两种方法相比,苯酚硫酸法具有简单灵敏、显色稳定等优点,在可溶性糖及多糖的含量测定中广泛应用。

目前文献中苯酚硫酸法的反应条件差异较大。有文献中硫酸体积为样品体积的2.5倍<sup>[22]</sup>,有文献则为3倍<sup>[23]</sup>、4倍<sup>[19]</sup>或5倍<sup>[22,24]</sup>;应用的苯酚浓度有2%<sup>[17]</sup>、4.8%<sup>[25]</sup>、5%<sup>[18,21]</sup>、6%<sup>[26]</sup>、80%<sup>[27-28]</sup>等,最终反应体系中苯酚的浓度为0.5%<sup>[17]</sup>、0.63%<sup>[22]</sup>、0.71%<sup>[14,20]</sup>、0.99%<sup>[28]</sup>、1%<sup>[24]</sup>等;反应温度包括室温<sup>[28]</sup>和不同温度的高温水浴<sup>[14,19,23]</sup>。值得关注的是苯酚溶液的加入顺序,1989年RAO等<sup>[29]</sup>报道先加入苯酚、随即加入硫酸的方法(苯酚-硫酸法)可能造成部分苯酚在高温下发生磺酸化反应,使得显色后的吸光度偏低;而先加入硫酸待反应降至室温后,加入苯酚显色的方法(硫酸-苯酚法)能够获得较高的吸光度和灵敏度。但此后仅有较少文献<sup>[16,18,21]</sup>采用硫酸-苯酚法测定可溶性糖的含量。上述苯酚硫酸法反应条件的差异造成不同学者对相同样品的测定结果存在较大差异<sup>[24]</sup>。

随着代谢组学的兴起,待测样品的数量可达数百甚至上千,简单灵敏、环保、高通量的微孔板法逐渐被应用。目前,基于苯酚硫酸法高通量测定可溶性糖的方法报道较少,可概括为两种:一是先于试管中进行反应,再吸入

微孔板于酶标仪中测定<sup>[22,24,30]</sup>,该法虽减少了操作烦琐,但试剂消耗量仍很大;二是直接于微孔板中进行反应和测定<sup>[16,18,21,23]</sup>,该法虽大大降低了试剂用量,但仍存在不同文献反应条件差异较大、线性范围窄、操作较复杂等问题。

为进一步优化基于苯酚硫酸法高通量测定可溶性糖的方法,本研究对反应体系中苯酚的加入顺序、反应温度、浓硫酸用量、苯酚浓度进行了考察和优化,建立了硫酸-苯酚高通量测定可溶性糖的方法,并将其应用于五味子、枸杞子和梨样品中可溶性糖的测定,为高通量测定可溶性糖的含量提供一种准确简便、节约高效的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验样品:五味子购自辽宁省凤城市(加工方式为烘干),为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) baill.的干燥成熟果实;枸杞子购自海王星辰药房(宁夏永寿堂中药饮片有限公司),为宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L.的干燥成熟果实。以上两种样品均由辽宁中医药大学翟延君教授鉴定无误。库尔勒香梨购自生活超市,采购时选择外表完整、气味正常、成熟度适中的新鲜果实。

药品试剂: D-果糖(纯度 $\geq 99\%$ )、D-无水葡萄糖标准品(纯度 $\geq 98\%$ )(上海源叶生物科技有限公司);苯甲酸、无水乙醇(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司);水(纯净水,大连娃哈哈饮用水有限公司);硫酸(分析纯,沈阳市派尔精细化工制品厂);苯酚(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

SMF2002型苏泊尔磨粉机(浙江苏泊尔家居用品有限公司);GL-3250B型磁力搅拌器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Sartorius电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);HH-ZK4数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);TDZ4-WS型低速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);XW-80A型漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);UV-1750型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);Multiskan FC型酶标仪(芬兰赛默飞公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 标准品溶液的配制

取 0.1 g 苯甲酸, 加入 50 mL 水, 室温下磁力搅拌 4 h 备用(作防腐剂); 分别精密称取 0.10002 g 葡萄糖和 0.10187 g 果糖的标准品于 25 mL 容量瓶中, 加水至刻度线溶解备用。将上述 3 者合并混匀, 配制成 2.0189 mg/mL(含 1 mg/mL 苯甲酸)的葡萄糖-果糖(glucose-fructose, GF)混合标准品溶液。取上述标准品溶液 50 mL, 加入 8 mL 无水乙醇, 定容至 100 mL, 稀释成 1.0095 mg/mL(含 8%乙醇)的 GF 溶液, 再以 8%乙醇溶液逐步稀释成 0.5047、0.2019、0.1009、0.0505 mg/mL(含 8%乙醇)的系列 GF 溶液。

#### 1.3.2 供试品溶液的配制

参考文献[24,31], 精密称取鲜梨胴部 0.2 g, 先以 1 mL 80%乙醇研磨均匀, 再以 9 mL 80%乙醇溶液分次冲洗研磨棒与研钵并入密封离心管中; 另分别精密称取 0.1 g 五味子或枸杞子粉末于密封离心管中, 加入 5 mL 80%乙醇溶液。3 种样品均水浴 90 °C 加热提取 10 min, 室温放冷后离心(2200 g) 10 min, 取上清液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度线, 稀释的五味子和梨提取液即为相应的供试品溶液。取 1 mL 稀释的枸杞子提取液加入 3 mL 8%乙醇溶液进一步稀释, 即得枸杞子的供试品溶液。

#### 1.3.3 苯酚溶液的配制

精密称取 40.00 g 苯酚于 1000 mL 容量瓶中, 加水至刻度线, 摇匀后转置于棕色试剂瓶中, 即得浓度为 4%的苯酚溶液, 置于室温通风橱中备用。2%、3%的苯酚溶液均由 4%苯酚溶液以水稀释得到。

#### 1.3.4 测定波长的选择

分别取 0.1009 mg/mL 的 GF 溶液、各供试品溶液 0.5 mL, 加入 2.5 mL 浓硫酸室温反应 30 min, 同时以 8%乙醇溶液为溶剂空白, 进行全波长(190~800 nm)扫描; 另取上述各溶液 0.5 mL, 加入 2.5 mL 浓硫酸室温反应 30 min 后, 加入 3%苯酚溶液 1 mL 室温反应 30 min, 同时以 8%乙醇溶液为溶剂空白, 于紫外分光光度计下进行全波长(190~800 nm)扫描。

#### 1.3.5 反应条件的优化

##### (1) 苯酚加入顺序的考察

试管内反应参考文献[24]方法, 分别取 GF 溶液(0.1009 mg/mL)、五味子供试品溶液 0.25 mL 置于试管中, 先加入 0.5 mL 2%苯酚溶液, 立即加入 1.25 mL 浓硫酸, 室温暗处反应 10 min 后室温水浴 15 min; 另分别取 GF 溶液(0.1009 mg/mL)、五味子供试品溶液 0.25 mL 置于试管中, 调整苯酚加入顺序, 先加入 1.25 mL 浓硫酸室温反应 30 min, 再加入 0.5 mL 2%苯酚溶液, 室温暗处反应 10 min 后室温水浴 15 min。不同反应顺序均以 8%乙醇溶液为溶剂空白, 反应结束后于紫外分光光度计下 492 nm 处测定吸光度值, 比较试管反应中苯酚加入顺序对 492 nm 处吸光度值的影响。

微孔板内先加入苯酚的反应参考文献[24]反应顺序及试剂用量的比例, 分别取 GF 溶液(0.1009 mg/mL)、五味子供试品溶液 30  $\mu$ L 于 96 微孔板中, 先加入 60  $\mu$ L 2%苯酚溶液, 立即加入 150  $\mu$ L 浓硫酸, 室温暗处反应 10 min 后室温放置 20 min; 另分别取 GF 溶液(0.1009 mg/mL)、五味子供试品溶液 30  $\mu$ L 于 96 微孔板中, 先加入浓硫酸 150  $\mu$ L, 室温反应 30 min, 再加入 2%苯酚溶液, 室温反应 30 min, 不同反应顺序均以 8%乙醇溶液为溶剂空白, 反应结束后于酶标仪 492 nm 处测定吸光度值, 比较微孔板反应中苯酚加入顺序对 492 nm 处吸光度值的影响。

##### (2) 反应温度的考察

分别取系列 GF 溶液、五味子供试品溶液及 8%乙醇溶液 30  $\mu$ L 于 96 微孔板中, 加入 150  $\mu$ L 浓硫酸, 分别于室温和 90 °C 水浴条件<sup>[21]</sup>下反应 30 min 后, 加入 60  $\mu$ L 3%苯酚溶液室温反应 30 min 后测定和计算。比较室温与 90 °C 水浴对 492 nm 处吸光度值及五味子样品中可溶性糖含量测定结果的影响。

##### (3) 浓硫酸用量的考察

将五味子供试品溶液进一步稀释 2 倍、2.5 倍、4 倍, 得到 4 个不同浓度的系列五味子供试品溶液。分别取系列 GF 溶液、系列五味子供试品溶液及 8%乙醇溶液 30  $\mu$ L 于 96 微孔板中, 分别加入 60、90、120、150、180  $\mu$ L 的浓硫酸室温反应 30 min, 于 320 nm 处测定吸光度值。比较硫酸的用量对 320 nm 处吸光度值的影响。

##### (4) 苯酚浓度的考察

分别取系列 GF 溶液、五味子供试品溶液及 8%乙醇溶液 30  $\mu$ L 于 96 微孔板中, 加入 150  $\mu$ L 浓硫酸室温反应 30 min 后, 分别加入 60  $\mu$ L 2%、3%、4%的苯酚溶液, 室温反应 30 min, 按照“1.3.6”项下方法测定和计算。比较不同浓度苯酚溶液对 492 nm 处吸光度值及五味子样品中可溶性糖含量测定结果的影响。

#### 1.3.6 可溶性糖含量的测定和计算

各标准品、供试品、8%乙醇溶液按照不同反应条件与浓硫酸和苯酚反应后, 于酶标仪 492 nm 处测得吸光度值为  $A_{492}$ ; 为消除样品中干扰成分的影响, 参考文献[24]方法以水代替苯酚溶液作平行校正, 校正的各标准品、供试品、8%乙醇溶液于酶标仪 492 nm 处测得吸光度值为  $A'_{492}$ 。

以 GF 溶液的质量浓度为横坐标( $X$ , mg/mL), GF 溶液(或其不加苯酚的平行校正)减去溶剂空白的吸光度值为纵坐标( $Y$ ), 设置截距为 0, 得到 GF 加苯酚(或不加苯酚)的线性回归方程, 按公式(1)计算样品中可溶性糖的含量。

样品中可溶性糖含量/(mg/g)=

$$\frac{(A_{492\text{样品}} - A_{492\text{溶剂空白}}) - (A'_{492\text{样品}} - A'_{492\text{溶剂空白}})}{\frac{k - k'}{\text{稀释倍数}}} \times \text{称样量} \quad (1)$$

式中:  $A_{492\text{样品}}$  为样品溶液在 492 nm 处测定的吸光度值;

$A_{492}$  溶剂空白为8%乙醇溶液在492 nm处测定的吸光度值;  $A'_{492}$  样品为样品溶液不加苯酚的平行校正;  $A_{492}$  为样品溶液不加苯酚的平行校正;  $A'_{492}$  溶剂空白为8%乙醇溶液不加苯酚的平行校正;  $k$  为GF加苯酚的线性回归方程的斜率;  $k'$  为GF不加苯酚的线性回归方程的斜率。

### 1.3.7 可溶性糖的高通量测定方法的应用

分别取系列GF溶液、各供试品溶液及8%乙醇溶液30  $\mu$ L于96微孔板中,加入150  $\mu$ L浓硫酸于室温反应30 min,加入60  $\mu$ L 3%苯酚溶液室温反应30 min,按照“1.3.6”项下方法进行测定和计算。

### 1.3.8 与传统苯酚-硫酸比色法的比较

传统苯酚-硫酸比色法按照文献[24]步骤,分别取五味子、枸杞子、梨供试品溶液0.25 mL置于试管中,加入0.5 mL 2%苯酚溶液,立即加入1.25 mL浓硫酸,室温暗室处反应10 min,室温水浴15 min,吸取210  $\mu$ L于96微孔板中;另分别取同一五味子、枸杞子、梨供试品溶液30  $\mu$ L,按照1.3.7项下条件反应。两种方法均按照1.3.6项下方法测定和计算,比较两种方法含量测定结果的差异。

### 1.3.9 数据处理与绘图工具

方法中在试管内进行的反应均重复2次,在微孔板内的反应和测定均设置3个复孔。采用GraphPad Prism 8软件进行数据的独立样本 $t$ 检验与图形绘制,采用Excel 2019软件进行线性回归分析和相对标准偏差(relative standard

deviations, RSDs)值的计算。

## 2 结果与分析

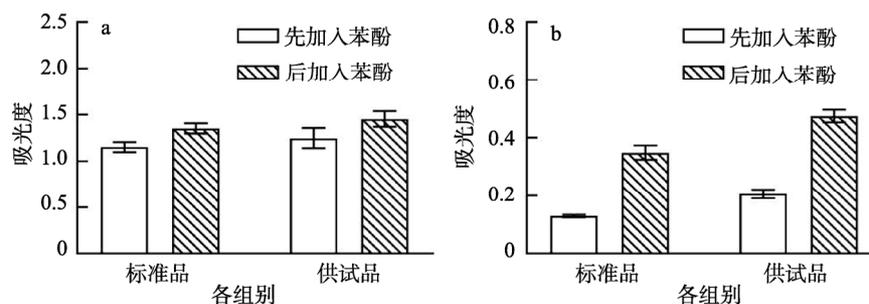
### 2.1 测定波长

测得GF溶液(0.1009 mg/mL)和五味子供试品溶液加入浓硫酸后生成糠醛及其衍生物的最大吸收波长在(320 $\pm$ 3) nm处,与文献[29]报道的糠醛最大吸收波长一致,故选择320 nm为其测定波长;生成的糠醛及其衍生物与苯酚溶液反应后的最大吸收波长均在492 nm处,故选择492 nm为其测定波长。

### 2.2 苯酚加入顺序

试管内先加入苯酚和后加入苯酚溶液反应后,GF溶液(0.1009 mg/mL)在492 nm处的吸光度值分别为1.151、1.352,五味子供试品溶液的吸光度值分别为1.246、1.453,说明后加入苯酚反应测得的吸光度值较高(图1a),与文献[29]报道结果一致。

微孔板内先加入苯酚和后加入苯酚溶液反应后,GF溶液(0.1009 mg/mL)在492 nm处的吸光度值分别为0.130、0.349,五味子供试品溶液的吸光度值分别为0.206、0.475,说明后加入苯酚反应测得的吸光度值较高(图1b),也与文献[29]报道结果一致。故选择先加入浓硫酸后加入苯酚溶液的反应顺序。



注: a 为试管内反应(n=2); b 为微孔板内反应(n=3)。

图1 苯酚加入顺序对标准品和供试品(五味子)溶液在492 nm处吸光度的影响

Fig.1 Influences of the order of phenol addition on the absorbances of standard and sample (*Schisandra chinensis* fruits) solution at 492 nm

### 2.3 反应温度

室温和90  $^{\circ}$ C水浴反应条件下,GF溶液(0.1009 mg/mL)在492 nm处的吸光度值分别为0.349、0.333,五味子供试品溶液的吸光度值分别为0.475、0.411。室温反应条件下GF溶液与五味子供试品溶液测得的吸光度值均较高,但前者无显著差异( $P=0.3771$ )。室温和90  $^{\circ}$ C水浴反应条件,测得五味子中可溶性糖含量分别为(77.472 $\pm$ 2.963)、(56.955 $\pm$ 2.306) mg/g,室温条件下测得的含量较高,两者具有统计学差异( $P < 0.05$ ),因此选择

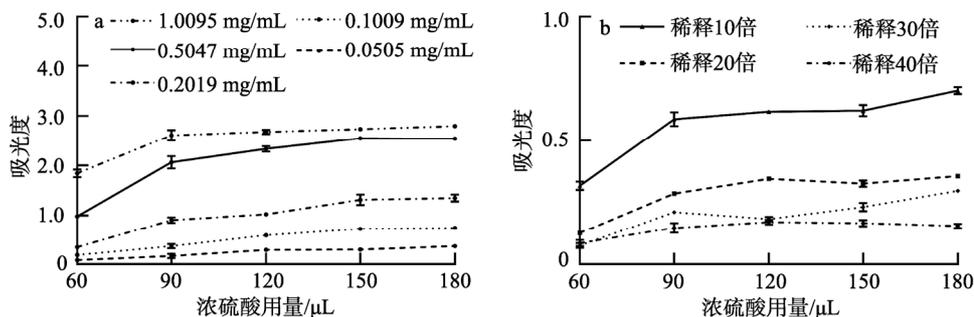
室温条件下进行反应。

### 2.4 浓硫酸的用量与反应时间

反应中,硫酸作为催化剂提供了 $H^+$ 参与催化反应,同时使反应体系温度瞬间达110  $^{\circ}$ C以上<sup>[29]</sup>促进糖脱水反应的发生,因此硫酸加入量影响反应的速度和程度,产物糠醛及其衍生物在320 nm处的吸光度值则与反应程度呈正相关。浓硫酸的用量对320 nm处吸光度值的影响如图2所示,随浓硫酸用量的增加,不同浓度的标准品和样品溶液在320 nm处的吸光度值有不同程度增

加的趋势,浓硫酸加入体积为标准品或样品溶液体积的 4~6 倍时,吸光度值变化较为平缓,综合考虑标准品和样品的吸光度变化、试剂用量,选择浓硫酸的用量为

150  $\mu\text{L}$ 。加入 150  $\mu\text{L}$  硫酸 30 min 后,反应体系温度降至室温,且 30~60 min 内吸光度值无明显变化,因此反应时间选择 30 min



注: a 为标准品溶液; b 为五味子供试品溶液。

图 2 浓硫酸用量对标准品和供试品(五味子)溶液在 320 nm 处吸光度的影响( $n=3$ )

Fig.2 Influences of the volume of concentrated sulfuric acid on the absorbance of standard and sample (*Schisandra chinensis* fruits) solution at 320 nm ( $n=3$ )

## 2.5 苯酚的浓度与反应时间

加入 60  $\mu\text{L}$  2%、3%、4%苯酚溶液显色后,GF 溶液(0.1009 mg/mL)在 492 nm 处的吸光度值分别为 0.335、0.349、0.301,3%苯酚溶液显色后吸光度值显著高于 4%苯酚溶液,与 2%苯酚溶液无显著差异( $P=0.4443$ );五味子供试品溶液的吸光度值分别为 0.373、0.475、0.469,3%苯酚溶液显色后吸光度值显著高于 2%苯酚溶液,与 4%苯酚溶液无显著差异( $P=0.8158$ )。2%、3%、4%苯酚溶液显色后,测得五味子中可溶性糖含量分别为 (56.936 $\pm$ 5.240)、(77.472 $\pm$ 2.963)、(75.814 $\pm$ 5.658) mg/g,表明加入 60  $\mu\text{L}$  3%苯酚溶液测得的含量较高,与加入 4%苯酚溶液无显著性差异( $P=0.7320$ ),与 2%苯酚溶液有显著性差异( $P < 0.05$ )。结合吸光度值、含量测定结果及试剂用量,选择加入的苯酚浓度为 3%。反应体系加入 3%苯酚溶液显色后,5~30 min 内 492 nm 处吸光度值逐渐增大,30~60 min 内吸光度值无明显变化,因此反应时间选择 30 min。

## 2.6 方法学考察结果

### 2.6.1 线性范围

精密吸取系列浓度 GF 溶液,按 1.3.7 项下方法进行测定和计算线性回归方程,结果见表 1。减去溶剂空白的吸光度值后,线性回归方程应过原点,所以设置截距为 0,不同微孔板反应中得到多个 GF 溶液加苯酚的线性回归方程为  $Y_1=kX_1$ ,  $k$  值的范围在 2.6470~3.1500 之间,  $r_1^2$  值在 0.9968~0.9998 之间;GF 溶液不加苯酚的线性回归方程为  $Y_2=k'X_2$ ,  $k'$  值在 0.0590~0.0955 之间,  $r_2^2$  值在 0.9906~0.9998 之间,线性关系良好。线性范围为 1.515~30.285  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ,较文献报道微孔板法<sup>[16,18,21,23]</sup>的线性范围大。

表 1 线性回归方程

Table 1 Equations of linear regressions

序号	$Y_1=kX_1$	$r_1^2$	$Y_2=k'X_2$	$r_2^2$
1	$Y_1=2.8590 X_1$	0.9989	$Y_2=0.0726 X_2$	0.9940
2	$Y_1=3.1176 X_1$	0.9998	$Y_2=0.0737 X_2$	0.9977
3	$Y_1=2.9581 X_1$	0.9968	$Y_2=0.0785 X_2$	0.9969
4	$Y_1=3.1289 X_1$	0.9997	$Y_2=0.0865 X_2$	0.9972
5	$Y_1=2.9822 X_1$	0.9998	$Y_2=0.0840 X_2$	0.9962
6	$Y_1=2.6470 X_1$	0.9997	$Y_2=0.0673 X_2$	0.9987
7	$Y_1=3.0572 X_1$	0.9978	$Y_2=0.0660 X_2$	0.9906
8	$Y_1=2.7277 X_1$	0.9997	$Y_2=0.0789 X_2$	0.9990
9	$Y_1=3.0438 X_1$	0.9998	$Y_2=0.0737 X_2$	0.9977
10	$Y_1=3.1346 X_1$	0.9991	$Y_2=0.0590 X_2$	0.9963
11	$Y_1=2.9015 X_1$	0.9974	$Y_2=0.0721 X_2$	0.9988
12	$Y_1=2.8210 X_1$	0.9997	$Y_2=0.0668 X_2$	0.9989
13	$Y_1=3.1500 X_1$	0.9998	$Y_2=0.0955 X_2$	0.9998

### 2.6.2 精密度、稳定性、重复性和加样回收率

精密度考察取 0.1009 mg/mL 的 GF 溶液 30  $\mu\text{L}$ ,按照 1.3.7 项下条件反应和测定,平行测定 6 次,测得吸光度值的 RSDs 值为 0.14%,说明仪器的精密度良好。稳定性考察采用五味子、枸杞子、梨的供试品溶液,测定其放置 0、2、4、6、8、12 h 后可溶性糖含量的变化,计算得 RSDs 值分别为 5.03%、5.58%、4.06%,说明各供试品溶液在 12 h 内的稳定性较好。重复性考察取五味子、枸杞子、梨样品,按照 1.3.2 项下方法制备供试品溶液,均平行 6 份,按照 1.3.7 项下条件测定和计算得可溶性糖含量的 RSDs 值分别为

4.48%、3.13%、4.07%, 说明方法的重复性良好。

加样回收率考察分别精密称取五味子、枸杞子粉末 0.05 g、梨胴部 0.1 g, 均平行 6 份, 加入相当于样品中量 100% 的 GF 溶液(含 80%乙醇), 按照 1.3.2 项下方法制备供

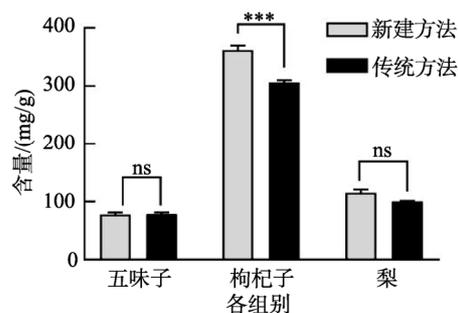
试品溶液, 按照 1.3.7 项下条件测定和计算得加样回收率结果见表 2, 各样品中可溶性糖的平均加样回收率分别为 98.34%、103.88%、101.26%, RSDs 值均小于 5%, 说明方法的准确度良好。

表 2 测定方法的加样回收率  
Table 2 Recoveries of the determination method

样品名称	样品序号	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSDs/%
五味子	1	3.7187	3.9837	7.5622	96.48	98.34	4.17
	2	3.7961		7.6365	96.40		
	3	3.9511		8.0630	103.22		
	4	3.6412		7.4427	95.43		
	5	3.8736		7.6430	94.62		
	6	4.0285		8.1663	103.87		
枸杞子	1	19.5693	20.307 0	40.5612	103.37	103.88	2.54
	2	21.3813		42.8995	105.96		
	3	20.2941		40.3991	99.01		
	4	19.9317		41.0011	103.75		
	5	18.8445		40.3991	106.14		
	6	18.1198		39.4499	105.04		
梨	1	11.1492	11.831 1	22.2710	94.00	101.26	4.43
	2	12.1836		24.6417	105.30		
	3	11.8388		24.1675	104.21		
	4	11.8388		24.2624	105.01		
	5	11.2641		23.1786	100.70		
	6	11.3791		23.0161	98.36		

2.7 可溶性糖高通量测定方法的应用及其与传统苯酚-硫酸比色法的比较

采用建立的高通量方法, 测得五味子、枸杞子、梨样品中可溶性糖的平均含量分别为 (77.472±3.629)、(362.395±7.739)、(114.940±5.711) mg/g; 采用传统苯酚-硫酸比色法测得五味子、枸杞子、梨样品中可溶性糖的平均含量分别为(77.903±2.800)、(306.184±4.064)、(100.197±1.452) mg/g。采用独立样本 *t* 检验对新建立的方法与传统苯酚-硫酸法的数据进行比较, 结果如图 3 所示, 两种方法测得的五味子和梨样品中可溶性糖含量均无显著性差异 ( $P=0.0870$ 、 $P=0.1571$ ), 而两种方法测得的枸杞子中可溶性糖含量有显著性差异( $P < 0.05$ ), 新建方法所测得的含量相对较高; 且新建方法测得各供试品溶液的吸光度值均较大, 方法灵敏度较高。



注: ns 为差异不显著,  $P > 0.05$ ; \*\*\*为差异显著,  $P < 0.001$ 。

图 3 新建高通量方法与传统苯酚-硫酸比色法测定可溶性糖含量的比较( $n=3$ )

Fig.3 Comparison of the content of soluble sugar determined by new high-throughput method and traditional phenol-sulfuric acid colorimetric method ( $n=3$ )

### 3 结论与讨论

本研究比较了试管与微孔板反应中苯酚-硫酸法与硫酸-苯酚法的差异,证明且进一步扩展了 RAO 等<sup>[29]</sup>的研究结论。

硫酸-苯酚法中硫酸为催化剂并产生高温促进反应发生,苯酚可以与 1 或多个分子糠醛缩合形成橙红色化合物,因此反应体系中加入过量的硫酸和适量的苯酚才能获得较高的吸光度和灵敏度。本研究通过合理地优化反应条件,确定反应体系中硫酸终浓度应达 82%,最适苯酚终浓度为 0.75%。

除本研究中描述的实验结果外,反应条件优化的大量数据还提示,当反应条件固定时,无论先加入或后加入苯酚溶液、反应温度为室温或 90 °C 水浴、硫酸加入体积为样品体积的 3 倍或 4 倍或 5 倍、苯酚浓度为 2% 或 3% 或 4%,标准曲线的相关系数均符合含量测定要求,部分含量测定结果有统计学差异,但均未达 1.5 倍以上差异。该结果也说明了不同文献中苯酚硫酸法反应条件差异较大,但均可应用的原因。但在优化的反应条件下,测得的 492 nm 处吸光度值较高,标准曲线斜率较高,因此测定的灵敏度也较高。

本研究建立了以硫酸-苯酚法为基础的可溶性糖高通量测定方法,与文献方法<sup>[16,18,21,23]</sup>相比,无需高温水浴,具有操作简单、试剂用量少,回归方程线性范围广的优势,因此该方法可以用作植物样品中可溶性糖的高通量测定。

#### 参考文献

- [1] 赵江涛, 李晓峰, 李航, 等. 可溶性糖在高等植物代谢调节中的生理作用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6423–6425, 6427.  
ZHAO JT, LI XF, LI H, *et al.* Research on the role of the soluble sugar in the regulation of physiological metabolism in higher plant [J]. *Anhui Agric Sci*, 2006, 34(24): 6423–6425, 6427.
- [2] 张志刚, 刘玉芳, 李长城, 等. 不同成熟度对杏果实品质的影响[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(8): 1402–1408.  
ZHANG ZG, LIU YF, LI CC, *et al.* Effect of different maturity on fruit quality of apricot [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2021, 33(8): 1402–1408.
- [3] 陈钰祺, 徐玉娟, 林羨, 等. 不同成熟度及海拔地区刺梨果实营养成分比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9556–9564.  
CHEN YQ, XU YJ, LIN X, *et al.* Comparisons of nutritional and bioactive components of *Rosa roxburghii* fruits of different maturities, altitudes and regions [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(24): 9556–9564.
- [4] 白蓓蓓, 王佳, 叶秀旭, 等. 芒果成熟过程中果肉可溶性糖组分分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(13): 4457–4463.  
BAI BB, WANG J, YE XX, *et al.* Analysis of soluble sugar components in mango flesh during ripening [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, 18(13): 4457–4463.
- [5] 张玉梅, 胡润芳, 林国强. 大豆籽粒可溶性糖和淀粉含量的初步研究[J]. 福建农业学报, 2018, 33(6): 604–607.  
ZHANG YM, HU RF, LIN GQ. A preliminary study on contents of soluble sugars and starch in soybeans [J]. *J Fujian Agric*, 2018, 33(6): 604–607.
- [6] 姬妍茹, 杨庆丽, 张正海, 等. 菊芋等 3 种食材发酵过程中糖分含量变化研究[J]. 食品科技, 2018, 43(12): 99–103.  
JI YR, YANG QL, ZHANG ZH, *et al.* Change of sugar content in *Jerusalem artichoke* and other food [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(12): 99–103.
- [7] 任城帅. 外源钙对氯化钠胁迫下绦柳幼苗生长及生理特性的影响研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.  
REN CS. Effects of exogenous calcium on the growth and physiological characteristics of *Salix matsudana* seedlings under NaCl stress [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [8] BAO GZ, TANG WY, AN QR, *et al.* Physiological effects of the combined stresses of freezing-thawing, acid precipitation and deicing salt on alfalfa seedlings [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 204.
- [9] 马玉涛. 黄连壮苗稀植栽培技术及产地初加工干燥方法研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.  
MA YT. Study on sparse planting techniques of vigorous seedlings of *Coptidis chinensis* and its primary progressing drying method [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [10] 张梦娜. 厚朴叶和厚朴籽化学成分分析及生物活性研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2019.  
ZHANG MN. Analysis of chemical constituents and biological activities of *Magnolia officinalis* leaves and seeds [D]. Mianyang: Southwest University of Science Technology, 2019.
- [11] KHODABANDE Z, JAFARIAN V, SARIRI R. Antioxidant activity of *Chelidonium majus* extract at phenological stages [J]. *Appl Biol Chem*, 2017, 60(5): 497–503.
- [12] 李子唯, 崔秀明, 张磊, 等. 三七晾晒干燥过程生理生化变化研究[J]. 中药材, 2017, 40(2): 328–333.  
LI ZW, CUI XM, ZHANG L, *et al.* Physiological and biochemical changes in *Panax notoginseng* sun-cure dry process [J]. *J Chin Med Mater*, 2017, 40(2): 328–333.
- [13] 林彬彬, 邵彪, 郑惠华, 等. 药食源植物泽泻炮制前、后可溶性糖的变化规律[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 241–245.  
LIN BB, SHAO B, ZHENG HH, *et al.* Assay the soluble sugar change of *Rhizoma alisma* before and after processing [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(10): 241–245.
- [14] 邓贤芬, 罗春丽, 杨继勇, 等. 正交试验优选醋炙金钗石斛的炮制工艺[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(11): 138–141.  
DENG XF, LUO CL, YANG JY, *et al.* Optimization of *Dendrobium nobile* vinegar-processing technology by an orthogonal test [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2018, 46(11): 138–141.
- [15] 孙晓燕, 蔡昌利, 徐丽莉, 等. 多糖含量测定方法的比较[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(3): 58–62.  
SUN XY, CAI CL, XU LL, *et al.* Comparison of methods for determination of polysaccharide content [J]. *Chin Med J Res Prac*, 2015, 29(3): 58–62.
- [16] LI Y, MEHTA R, MESSING J. A new high-throughput assay for determining soluble sugar in sorghum internode-extracted juice [J]. *Planta: An Int J Plant Biol*, 2018, 248(4): 785–793.
- [17] CHOW PS, LANDHAUSSER SM. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues [J]. *Tree Physiol*, 2004, 24(10): 1129–1136.
- [18] KONDO M, MULIANDA R, MATAMURA M, *et al.* Validation of a phenol-sulfuric acid method in a microplate format for the quantification

- of soluble sugars in ruminant feeds [J]. *Anim Sci J*, 2021, 92(1): e13530.
- [19] 杨勤, 谷文超, 周浓, 等. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(1): 343-350.
- YANG Q, GU WC, ZHOU N, *et al.* Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in *Lycopus Lucidus* Tilrcz. Var. *hirtus* regel [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(1): 343-350.
- [20] 夏文, 杜洪志, 董立莎, 等. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定切面红色与切面白色土茯苓药材中多糖含量的比较[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(11): 2572-2574.
- XIA W, DU HZ, DONG LS, *et al.* Determination of polysaccharide in rhizoma of *Smilax glabra* with red and white transverse section by anthrone sulfuric acid method and phenol sulfuric method [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2015, 26(11): 2572-2574.
- [21] MASUKO T, MINAMI A, IWASAKI N, *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. *Anal Biochem*, 2005, 339(1): 69-72.
- [22] 高倩, 刘风华, 史雅然, 等. 一种基于酶标仪检测天然植物复方多糖中多糖含量的方法[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 922-929.
- GAO Q, LIU FH, SHI YR, *et al.* Determination method of polysaccharide content in natural plant polysaccharide compound based on microplate [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2019, 31(2): 922-929.
- [23] 田艳花, 李石飞, 李梓菁, 等. 基于微孔板比色法的总糖含量测定方法的建立及应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(7): 2921-2927.
- TIAN YH, LI SF, LI ZJ, *et al.* Establishment and application of a method for content determination of total sugar based on colorimetric microplate format [J]. *Genomics Appl Biol*, 2018, 37(7): 2921-2927.
- [24] LANDHAUSSE R, SIMON M, CHO W, *et al.* Standardized protocols and procedures can precisely and accurately quantify non-structural carbohydrates [J]. *Tree Physiol*, 2018, 38(12): 1764-1778.
- [25] 张媛媛, 张彬. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J]. *食品科学*, 2016, 37(4): 158-163.
- ZHANG YY, ZHANG B. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in green tea [J]. *Food Sci*, 2016, 37(4): 158-163.
- [26] 尹丽丽. 山楂的质量评价研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- YIN LL. Quality evaluation of *Hawthorn* [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [27] DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [28] RAO P, PATTABIRAMAN TN. Further studies on the mechanism of phenol-sulfuric acid reaction with furaldehyde derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1990, 189(2): 178-181.
- [29] RAO P, PATTABIRAMAN TN. Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses [J]. *Anal Biochem*, 1989, 181(1): 18-22.
- [30] 袁世琳, 尚宇, 邱杨. 一种测定食用菌中总糖含量的新方法[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(18): 78-79, 164.
- YUAN SL, SHANG Y, QIU Y. A new method on determination of the total sugar content in edible fungi [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(18): 78-79, 164.
- [31] 刘婉君, 张莹, 张玉星, 等. 18个品种授粉‘鸭梨’果实品质和香气成分分析与评价[J/OL]. *食品科学*: 1-16. [2021-11-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210406.1057.004.html>
- LIU WJ, ZHANG Y, ZHANG YX, *et al.* Analysis and evaluation of fruit quality and aroma components of ‘Yali’ pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) pollinated by eighteen pollinizers [J/OL]. *Food Sci*: 1-16. [2021-11-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210406.1057.004.html>

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

## 作者简介



宋奇, 硕士研究生, 主要研究方向为中药品质评价与药效物质基础。  
E-mail: 1142562290@qq.com



王添敏, 博士, 教授, 主要研究方向为中药品质评价与药效物质基础。  
E-mail: wang\_tm@163.com