



不同前处理对测定甜高粱茎秆汁液3种糖含量的影响

周振祥 赵博 王唯先 仝骁鹏 郑剑波 李艳红 高建明 罗峰 孙守钧 裴忠有

Determination of three soluble sugars in stem juice of sweet sorghum by anthrone colorimetry

ZHOU Zhenxiang, ZHAO Bo, WANG Weixian, TONG Xiaopeng, ZHENG Jianbo, LI Yanhong, GAO Jianming, LUO Feng, SUN Shoujun, PEI Zhongyou

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0660>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

硼处理根瘤菌接种液对紫花苜蓿根、茎、叶中可溶性糖含量的影响

Effects of boron-treated rhizobial inoculum on soluble sugar concentration in alfalfa roots, stems, and leaves

草业科学. 2021, 38(6): 1138 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0375>

甜高粱的利用技术

Utilisation technology of sweet sorghum

草业科学. 2017, 11(4): 831 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0218>

盐碱地不同基因型甜高粱的能源品质形成规律及其评价

Evaluation of the regularity of energy formation of sweet sorghum in saline-alkali soils

草业科学. 2017, 11(1): 3 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0177>

垄作模式下甜高粱对农田渍害胁迫的响应

Responses of sweet sorghum under ridge culture pattern to farmland waterlogging stress

草业科学. 2018, 12(7): 1713 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0470>

饲用甜高粱青贮对肉羊养分利用的影响

Effect of forage sweet sorghum silage on nutrient utilization in mutton sheep

草业科学. 2018, 12(5): 1240 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0545>

不同甜高粱品种(系)在甘肃旱作区的产量与营养品质比较

Comparative study on the yield and nutritional quality of different sweet sorghum varieties in the dry farming area of Gansu Province

草业科学. 2021, 38(5): 947 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0358>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0660

周振祥, 赵博, 王唯先, 仝骁鹏, 郑剑波, 李艳红, 高建明, 罗峰, 孙守钧, 裴忠有. 不同前处理对测定甜高粱茎秆汁液 3 种糖含量的影响. 草业科学, 2022, 39(5): 940-948.

ZHOU Z X, ZHAO B, WANG W X, TONG X P, ZHENG J B, LI Y H, GAO J M, LUO F, SUN S J, PEI Z Y. Determination of three soluble sugars in stem juice of sweet sorghum by anthrone colorimetry. Pratacultural Science, 2022, 39(5): 940-948.

不同前处理对测定甜高粱茎秆汁液 3 种糖含量的影响

周振祥, 赵博, 王唯先, 仝骁鹏, 郑剑波, 李艳红,
高建明, 罗峰, 孙守钧, 裴忠有

(天津农学院, 天津 300384)

摘要: 茎秆含糖量是甜高粱 (*Sorghum dochna*) 重要的农艺性状, 其可溶性糖的组分与含量的测定, 是甜高粱 QTL 定位和性状改良的前提。本研究以粒用高粱的‘忻梁 52’与甜高粱‘W452’重组自交系 F₈ 代 255 个群体为材料, 采用改良蒽酮比色法来测定蔗糖、果糖和葡萄糖含量。结果表明: 可溶性总糖的最佳显色时间为 10 min, 显色温度为 100 °C; 测定蔗糖的最佳处理条件为 1 mol·L⁻¹ 的 KOH 溶液处理 10 min; 果糖测定的最佳显色温度为 50 °C, 显色时间为 3 min。优化过后的蒽酮比色法能测得较稳定的数值, 精密度和稳定性较好, 可用于测定甜高粱汁液的糖含量。重组自交系后代糖锤度与可溶性糖总量之间呈极显著正相关关系 ($P < 0.01$), 相关系数为 0.885, 线性回归方程为 $y = 37.082 \times \text{可溶性糖总量} + 3.990$ 。

关键词: 甜高粱; 可溶性糖; 蔗糖; 果糖; 葡萄糖; 锤度; 蒽酮比色法

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2022)05-0940-09

Determination of three soluble sugars in stem juice of sweet sorghum by anthrone colorimetry

ZHOU Zhenxiang, ZHAO Bo, WANG Weixian, TONG Xiaopeng, ZHENG Jianbo,
LI Yanhong, GAO Jianming, LUO Feng, SUN Shoujun, PEI Zhongyou
(Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: Sugar content in stem is an important agronomic character of sweet sorghum (*Sorghum dochna*). The determination of the composition and content of soluble sugar in sweet sorghum is the premise of QTL mapping and character improvement of sweet sorghum. In this study, the content of sucrose, fructose and glucose was determined by improved anthrone colorimetry using 255 populations of ‘Xinliang 52’ and ‘W452’ recombinant inbred Lines of grain sorghum as materials. The results showed that the best color developing time of soluble sugar was 10 min and the color developing temperature was 100 °C. The optimal treatment condition for sucrose determination was 1 mol·L⁻¹ KOH solution for 10 min. The optimum temperature and time for the determination of fructose were 50 °C and 3 min. The optimized anthrone colorimetric method can be used to determine the sugar content of sweet sorghum juice with good precision and stability. The results showed that there was a significant positive correlation between the weight of the progeny of this variety

收稿日期: 2021-11-04 接受日期: 2021-12-28

基金项目: “十三五”国家重点研发计划“七大农作物育种”专项 (2017YFD0100500); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201503134)

第一作者: 周振祥 (1999-), 男, 浙江万全人, 在读硕士生, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 17694804542@163.com

通信作者: 裴忠有 (1967-), 男, 辽宁大连人, 博士, 研究员, 研究方向为作物分子育种。E-mail: zhongyoupei@tjau.edu.cn

and the total amount of soluble sugar, and the value of the correlation was 0.885. The Linear regression equation was $y = 37.082 \times \text{total soluble sugar} + 3.990$.

Keywords: sweet sorghum; soluble sugar; sucrose; fructose; glucose; brix; anthrone colorimetric method

Corresponding author: PEI Zhongyou E-mail: zhongyoupei@tjau.edu.cn

甜高粱 (*Sorghum dochna*) 作为普通高粱的变种, 因其抗逆、耐旱、适应能力强, 且植株高大、茎秆富含糖分, 是我国重要的能源作物和优质饲料作物, 其茎秆的糖分主要由蔗糖、果糖、葡萄糖组成^[1-2]。根据品种的不同, 一般占可溶性总糖的 95% 以上。甜高粱茎秆含糖量是衡量其利用价值的重要标准。而准确测定甜高粱茎秆的可溶性糖含量, 是甜高粱茎秆可溶性糖 QTL 定位的基础和甜高粱茎秆糖分相关基因的克隆并进行功能验证的前提。

育种者习惯用汁液锤度 (Brix) 和出汁量来估算可溶性糖产量^[3]。但通过锤度法衡量茎秆可溶性总糖含量时, 除了没有统一的估算方法外, 还存在无法分析糖组分的缺点。目前, 在对可溶性糖进行分析时分别采用了不同的测定方法, 方法各有优缺点。孟利等^[4]在分析甜高粱茎秆可溶性糖组分时, 分别运用了蒽酮比色法、3,5-二硝基水杨酸法和离子色谱法测定了茎秆可溶性总糖含量、还原糖含量和可溶性糖的种类, 均取得了较好的结果。赵大云等^[5]在研究苜蓿多糖的测定方法中, 对蒽酮硫酸法和苯酚硫酸法进行了对比, 结果显示, 蒽酮硫酸法的稳定性和重现性则均优于苯酚硫酸法, 而且苯酚硫酸法在测定过程中存在反应液体容易飞溅等试验安全性问题^[6]; 宋占午等^[7]对 3,5-二硝基水杨酸法和蒽酮硫酸法进行了对比, 结果显示, 3,5-二硝基水杨酸法的灵敏度要低于蒽酮比色法, 而且 3,5-二硝基水杨酸法的反应试剂需要在室温下保存 7~10 d 后才可使用, 存在配制麻烦、耗时的缺点^[8]; 在使用斐林试剂比色法的显色试剂次甲基蓝与空气接触容易发生氧化, 易对显色结果造成影响^[9]; 在使用高效液相色谱法测定甜高粱茎秆中的可溶性糖含量存在仪器昂贵, 维护复杂^[10]等缺点。综上所述, 蒽酮比色法操作简便、反应快速等优缺点^[11], 但对糖分含量的测定存在问题还需改进^[12-14]。因此本研究在蒽酮比色法基础上通过优化反应条件和样品处理方法, 对测定总糖、蔗糖、果糖的条件进行探究, 为甜高粱茎秆可溶性糖含量测定寻找最便捷有效方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘忻梁 52’与‘W452’重组自交系群体 F₈ 代 255 个于 2019 年 4 月 30 日于天津静海区良种场种植, 行长 2.5 m, 行间距 0.5 m, 株距 0.2 m 进行, 田间管理同常规大田生产。于蜡熟期收获去掉叶、叶鞘和穗柄, 留下茎秆部分用榨汁机对其进行 2 次榨汁, 测定锤度后收集至 5 mL 离心管作为待测样本。

1.2 溶液配制

1) 85% 硫酸: 取 780 mL 浓硫酸 (98%), 缓慢加入水中, 定容至 1 L。

2) 0.1% 蒽酮溶液: 取 0.1 g 蒽酮溶于 100 mL 85% 的硫酸中 (现配现用)。

3) 葡萄糖、果糖、蔗糖标准糖液: 准确称取 1 g 葡萄糖、果糖、蔗糖分别溶于 1 000 mL 容量瓶中并用蒸馏水稀释至刻度线, 摇匀后置于冰箱中冷藏备用, 浓度为 1 000 g·L⁻¹。

1.3 标准曲线的绘制

分别配制 0、10、20、40、60、80、100 mg·L⁻¹ 葡萄糖、果糖、蔗糖溶液, 各自吸取 1 mL 到 7 个比色管中, 然后加入蒽酮试剂 4 mL, 然后将系列标准溶液在 100 °C 水浴 10 min 的条件进行反应, 在 620 nm 的波长下测定吸光值, 并另取一组果糖的一系列标准糖溶液以 50 °C 水浴 3 min 的条件进行反应, 在 620 nm 的波长下测定吸光值, 并与 100 °C 水浴后的果糖标液进行对比, 若两者显色的吸光值一致, 则可以直接采用 50 °C 水浴 3 min 这组标液所绘制的标准曲线, 否则应对结果计算进行矫正, 并以含糖量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 并通过 Excel 软件绘制标准曲线 (图 1)。

1.4 材料处理

1) 去蛋白: 吸取甜高粱汁液置于 2 mL 离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 吸取上清液置于 2 mL 离心管中, 放入水浴锅中 100 °C 水浴 10 min, 再置

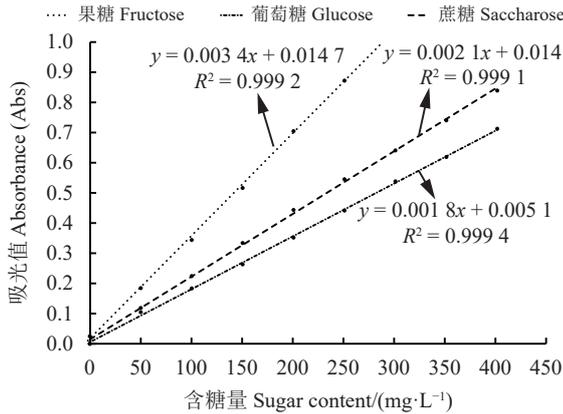


图 1 葡萄糖、果糖、蔗糖的标准曲线

Figure 1 Standard curve of glucose, fructose and sucrose

于冰上冷却 5 min, 112 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 吸取上清液置于 2 mL 离心管中后。

2) 去色素: 向 2 mL 离心管中加入一小勺活性炭粉末 (加入的量可以视颜色的深浅而定), 震荡后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 吸取上清液 2 mL 离心管中, 低温保存, 作为待测样品。

3) 确定稀释倍数: 选择 5 组锤度从小到大的样品, 分别吸取 1、2、4、6、8、10 μL 原液, 加入蒸馏水配至 1 mL, 用传统蒽酮比色法进行测定, 选出最合适的反应体系。

1.5 测定方法的优化

1.5.1 可溶性总糖显色条件的优化

1) 筛选合适的反应温度

向试管中加入 1 mL 标准葡萄糖溶液, 然后加入蒽酮试剂 4 mL, 分别于 50、60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 10 min, 冷却后于 620 nm 波长下测定吸光值, 分析温度对吸光值的影响。

2) 筛选合适的反应时间

向试管中加入 1 mL 标准葡萄糖溶液, 然后加入蒽酮试剂 4 mL, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 分别水浴 0、1、4、7、10、13、16 min, 冷却后于 620 nm 波长下测定吸光值, 分析时间对吸光值的影响。

1.5.2 蔗糖处理条件的优化

1) 筛选合适稀碱浓度

以加入 KOH 的浓度为变量, 向含有 1 mL 蔗糖、果糖、葡萄糖标准溶液的试管中分别加入浓度为 1、2、3、4、5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KOH 溶液 1 mL, 再加入 3 mL 蒸馏水, 放入水浴锅中加热 10 min, 去除果糖和葡萄糖, 定容至 10 mL, 然后取 1 mL 样品加入比色管

中, 再加入蒽酮试剂 4 mL, 然后加入沸水浴中加热 10 min, 冷却后于 620 nm 波长下测定吸光值, 选出 KOH 最佳的处理的浓度。

2) 筛选合适的稀碱处理时长

以加热时间为变量, 向含有 1 mL 蔗糖、果糖、葡萄糖标准溶液的试管中分别加入浓度为 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KOH 溶液 1 mL, 放入水浴锅中分别加热 0、2、4、6、8、10、12 min, 去除果糖和葡萄糖, 定容至 10 mL, 然后取 1 mL 样品加入比色管中, 再加入蒽酮试剂 4 mL, 然后放入沸水浴中加热 10 min, 冷却后于 620 nm 波长下测定吸光值, 选出最佳的处理时长。

1.5.3 果糖显色条件的优化

1) 筛选合适的显色时长

以反应时间为变量, 分别向试管中加入 1 mL 标准葡萄糖、果糖、蔗糖溶液, 并加入 4 mL 蒽酮试剂后, 放入 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中分别处理 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 min 后, 冷却后于 620 nm 波长下测定吸光值, 选出最佳的显色时长。

2) 筛选合适显色温度

以反应温度为变量, 分别向试管中加入 1 mL 标准葡萄糖、果糖、蔗糖溶液, 并加入 4 mL 蒽酮试剂, 分别放入 35、50、65、80、100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热, 分别加热 5 min 后冷却, 于 620 nm 波长下测定吸光值, 选出最佳显色温度。

1.6 葡萄糖的含量换算公式

将处理好的汁液按照最佳的试验条件进行测定。依次测出样品的总糖、蔗糖、果糖的吸光值, 再通过公式估算出葡萄糖的含量。计算公式如下:

$$\text{可溶性糖含量}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{G \times V_S \times D}{V_t \times 10^3}; \quad (1)$$

$$\text{蔗糖含量}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{S \times V_S \times D}{V_t \times 10^3}; \quad (2)$$

$$\text{果糖含量}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{F \times V_S \times D}{V_t \times 10^3}; \quad (3)$$

$$\text{葡萄糖含量}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{(G - S - F) \times V_S \times D}{V_t \times 10^3}. \quad (4)$$

式中: G 为在标准曲线上查出的总糖的含量 (mg); S 为在标准曲线上查出的蔗糖的含量 (mg); F 为在标准曲线上查出的果糖的含量 (mg); V_S 为提取液的总体积 (mL); D 为稀释倍数; V_t 为反应体系的总体

积。

1.7 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件对所测数据统计分析, 显著性差异分析采用 t 检验, 差异显著设置为 $P < 0.05$, 差异极显著设置为 $P < 0.01$ 。分别对锤度和可溶性糖总量、可溶性糖、蔗糖、葡萄糖、果糖进行相关性分析, 采用 Excel 2020 制图。

2 结果与分析

2.1 甜高粱茎秆汁液样品的前处理

2.1.1 去除茎秆汁液中的蛋白质

为了降低甜高粱汁液样品中蛋白质对显色反应的影响, 通过煮沸处理达到去除蛋白的目的。通过蛋白质与考马斯亮蓝显色反应在分光光度计 595 nm 波长下吸光值建立蛋白的标准曲线, 得到回归方程为 $y = 0.5986x + 0.0023$, 回归系数为 $R^2 = 0.99$ 。然后通过回归方程计算部分样品处理前后的蛋白含量 (图 2), 可以看出, 经煮沸法处理后样品的蛋白质含量明显下降。

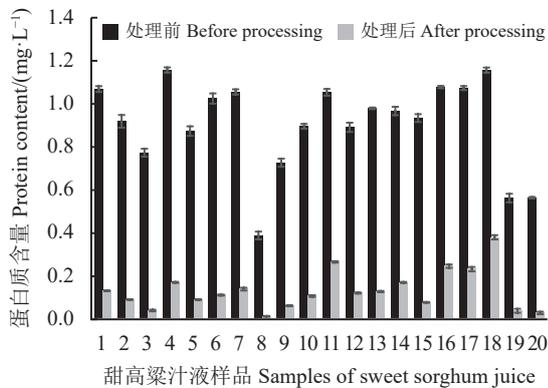


图 2 样品处理前后的蛋白质含量对比

Figure 2 Comparison of protein content of samples before and after treatment

2.1.2 样品的脱色处理

为了降低色素对显色结果的影响, 通过往样品中加入活性炭粉末的方式来去除色素。随机挑选 10 个颜色深浅不一的样品进行处理, 样品经处理后最终效果 (图 3) 表明, 浑浊有色液体变得澄清透明, 脱色效果明显。

2.1.3 样品的稀释处理

随机挑选 5 组糖锤度差异较大的样品分别稀释不同倍数后测定吸光值, 所有测定均重复 3 次。当

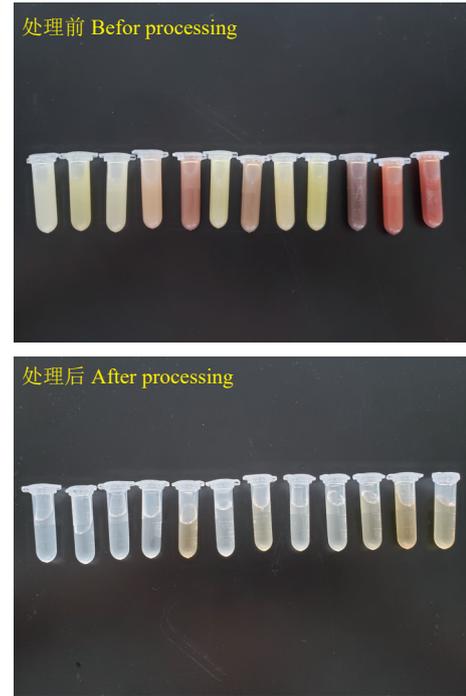


图 3 样品脱色处理前后的对比

Figure 3 Comparison of samples before and after decolorization

稀释倍数为 500~1 000 倍时, 各个锤度的样品测得的吸光值都在标准曲线的线性范围内, 但考虑到加入样品的浓度太小, 会导致误差加大, 本试验选择将处理后的样品稀释 500 倍后用于蒽酮比色法的测定 (表 1)。

2.2 可溶性糖蒽酮比色法测定条件优化

2.2.1 可溶性总糖显色条件的优化

通过改变反应温度和反应时间得到可溶性总糖吸光值变化趋势曲线 (图 4), 控制反应时间为 10 min, 改变处理温度, 样品所测得的吸光值随反应温度的升高而升高, 在 100 °C 水浴条件下吸光值达到最大, 因此试验中选择的反应温度为 100 °C。控制反应温度为 100 °C, 改变处理时间, 当加热时间达到 7 min 时, 吸光值达到最大值, 显色反应完全, 因此本试验选择 100 °C 水浴 7 min 为可溶性总糖测定的最佳反应条件。

2.2.2 蔗糖含量测定的条件优化

通过改变 KOH 处理样品的浓度, 可溶性糖吸光值变化趋势不同 (图 5), 当加入浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH 溶液 1 mL 后, 样品中葡萄糖和果糖的吸光值已经基本上接近于 0, 而蔗糖吸光值不受影响, 因

表 1 不同样品的稀释后的吸光值
Table 1 Dilution results of different samples (Abs)

样品锤度 Sample brix	稀释倍数 Dilution ratio					
	1000	500	250	166	125	100
4.8	0.086 ± 0.002	0.161 ± 0.002	0.320 ± 0.004	0.478 ± 0.001	0.624 ± 0.001	0.781 ± 0.003
7.6	0.182 ± 0.003	0.355 ± 0.003	0.717 ± 0.003	1.059 ± 0.004	1.237 ± 0.012	1.439 ± 0.004
9.7	0.321 ± 0.002	0.638 ± 0.002	1.038 ± 0.031	1.131 ± 0.003	—	—
12.7	0.395 ± 0.002	0.790 ± 0.001	1.239 ± 0.003	1.258 ± 0.023	—	—
16.2	0.495 ± 0.002	0.991 ± 0.001	1.289 ± 0.011	1.319 ± 0.007	—	—

0 < abs < 1时在标准曲线线性范围内。

The linear range of the standard curve for 0 < abs < 1.

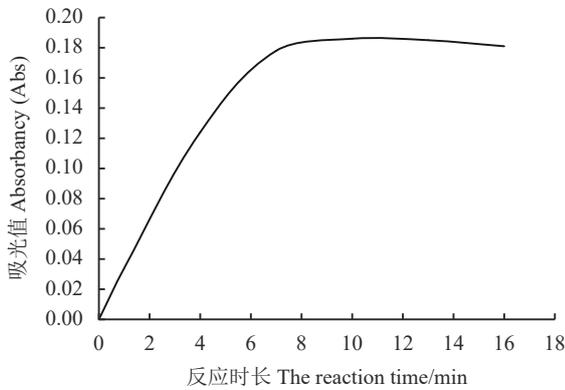
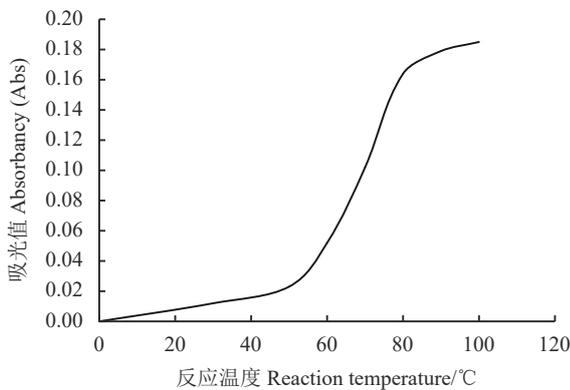


图 4 可溶性总糖测定中不同反应条件对吸光值的影响
Figure 4 Influence of different reaction conditions on absorbance value in the determination of soluble total sugar

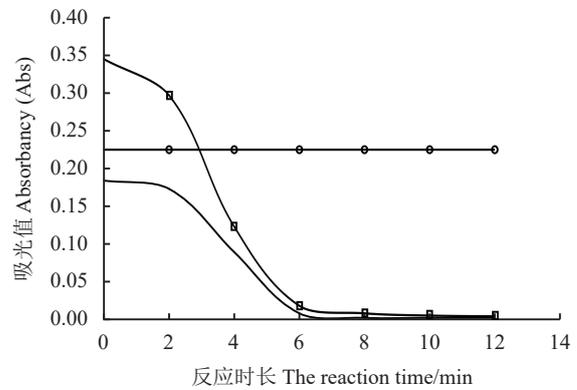
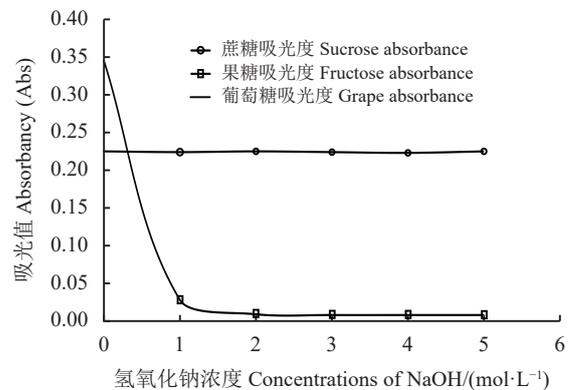


图 5 蔗糖含量测定前不同样品处理条件对吸光值的影响
Figure 5 Effect of different sample treatment conditions on absorbance value before determination of sucrose

此 1 mol·L⁻¹ 的 KOH 溶液加入可以有效去除汁液中葡萄糖和果糖, 减少葡萄糖和果糖对蔗糖含糖测定的影响。通过加入 1 mol·L⁻¹ 的 KOH 溶液 1 mL 后进行不同时长处理, 测得可溶性糖吸光值变化趋势 (图 5), 当反应时长达到 8 min 时, 葡萄糖和果糖溶液的吸光值已接近于 0, 而对蔗糖的吸光值没有影响, 说明此时 KOH 溶液已经完全去除汁液中葡萄糖和果糖, 因此后续蔗糖含量测定选择将反应时长控制在

8 min。

2.2.3 果糖含量测定的条件优化

在果糖测定中, 为了获得最佳的测定温度, 采用不同温度处理来测定果糖吸光值的变化趋势 (图 6)。由图可以看出, 当反应温度在 35 °C 时, 果糖达到最大吸光值, 而葡萄糖和蔗糖的吸光值接近于 0, 因此, 可以确定在测定样品中果糖含量时, 温度应控制在 35 °C 左右。控制反应温度为 35 °C 时, 对不同

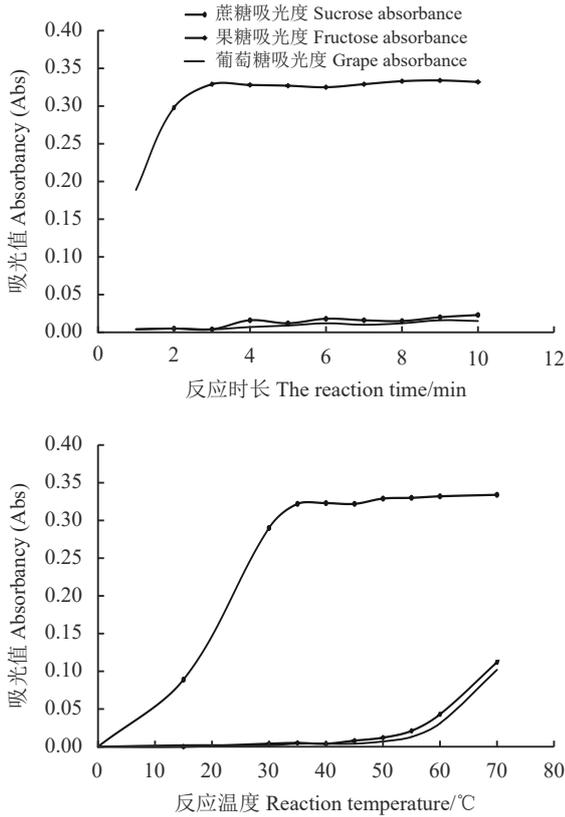


图 6 果糖测定中不同反应条件对吸光值的影响
Figure 6 Effect of different reaction conditions on absorbance value in determination of fructose

处理时长对果糖吸光值影响进行研究,当处理时长为 3 min 时,果糖溶液的吸光值达到最大值,因此本研究在测定果糖含量时应选择处理时长为 3 min。

2.3 可溶性糖含量测定

2.3.1 精密度试验

取同一样品平均分装成 15 份,以试验所得出的最佳条件分别测定可溶性总糖、蔗糖、果糖含量(表 2),

可溶性总糖、蔗糖、果糖测定方法相对标准偏差为 0.96%、1.88%、2.63%,说明该方法具有较好的精密度。

2.3.2 重复性试验

选取 9 份已知含量的样品溶液,分为 3 组,分别加入葡萄糖、蔗糖、果糖对照样品 10 μg,以试验所得出的方法进行测定吸光度,求出回收率,结果表明该方法稳定可靠(表 3)。

2.3.3 甜高粱群体茎秆汁液中可溶性总糖、果糖、蔗糖、葡萄糖含量的测定

在获得可溶性总糖、果糖、蔗糖、葡萄糖以上测定参数后,本试验对甜高粱群体后代 282 个样品的含糖量进行测定,将所测得的结果由 Excel 软件整理后导入 SPSS 工具进行作图(图 7),可溶性糖、蔗糖、果糖、葡萄糖的变化趋势相同,可溶性糖含量较高的样品,蔗糖、果糖、葡萄糖的含量都相应较高,同时也可以看出汁液锤度和可溶性总糖含量之间存在相关性。通过使用 SPSS 工具对可溶性总糖与所有性状进行相关分析,相关系数分别为 0.700、0.860、0.499,且呈极显著正相关($P < 0.01$);蔗糖和果糖之间极显著正相关($P < 0.01$),相关系数为 0.956,但和葡萄糖间都存在显著负相关关系($P < 0.01$),相关系数为 -0.459,果糖与葡萄糖之间相关不明显($P > 0.05$)。同时对可溶性总糖含量与锤度之间进行相关性分析,锤度和可溶性糖总量之间的相关系数值为 0.885,并且呈现出极显著正相关关系($P < 0.01$)。通过线性回归分析,锤度和可溶性糖总量之间呈线性回归,回归方程为:锤度 = $37.082 \times$ 可溶性糖总量 + 3.990,在测定甜高粱汁液锤度后,利用该公式可以估算出可溶性糖总量。

表 2 精密度试验结果

Table 2 Precision experimental results

指标 Item	样品号 Sample number					平均值 Average	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
	1	2	3	4	5		
可溶性糖 Soluble sugar/%	17.22	17.61	17.54	17.68	17.47	17.48	0.96
蔗糖 Sucrose/%	6.34	6.72	6.88	6.34	6.14	6.32	1.88
果糖 Fructose/%	9.64	9.05	9.16	9.30	9.53	9.34	2.63

3 讨论与结论

在果糖比色条件的优化过程中,甜高粱汁液样

品在 35 °C 的温度下反应 3 min 时所测得的结果并不理想,反应时试管中往往会产生黄绿色和白色絮状物,无法测定吸光值,通过延长反应时间和震荡

表3 回收率试验结果
Table 3 Recovery test results

标准品 Standard markers	样品编号 Number of samples	样品糖含量 Sample sugar content/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加入量 Add quantity/ μg	实测糖含量 Measured sugar content/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 Recovery rate/%	平均回收率 Average recovery rate/%	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
葡萄糖 Glucose	1	101.59	10.00	113.17	101.42	99.21	2.13
	2	104.53	10.00	111.34	97.22		
	3	103.35	10.00	112.22	99.00		
蔗糖 Sucrose	4	125.90	10.00	132.11	97.21	98.46	1.74
	5	108.78	10.00	116.12	97.76		
	6	108.73	10.00	119.21	100.41		
果糖 Fructose	7	101.82	10.00	109.32	97.76	98.08	0.30
	8	106.37	10.00	114.21	98.14		
	9	102.66	10.00	110.78	98.33		

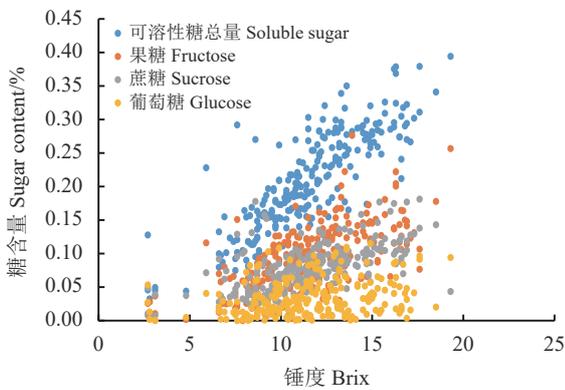


图7 甜高粱汁液中可溶性总糖、果糖、蔗糖、葡萄糖含糖量的测定结果

Figure 7 Determination results of soluble total sugar, fructose, sucrose and glucose in sweet sorghum juice

无法消除这种絮状物,但可以通过提高反应温度来消除,推测该种絮状物可能是甜高粱汁液中某种糖的组分与硫酸发生不完全显色反应的结果。当反应温度提高至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,该种现象发生较少,且该条件下,葡萄糖和蔗糖对果糖的吸光值影响较小,可以忽略不计,可以选择 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 3 min 作为果糖测定的反应条件。有学者研究发现,在室温时加入蒽酮试剂易使葡萄糖与之发生显色反应,而在冰水条件下加入蒽酮试剂可以降低葡萄糖与试剂发生显色反应的影响,能减少试验误差^[15]。本研究采用文献^[15]中的条件后,测得葡萄糖的吸光值减小,能降低葡萄糖对果糖测定的影响。硫酸的浓度和用量也会对显色结果产生影响^[16],选用 85% 的硫酸能使得果糖充分脱水,效果最好,与本研究选用的条件相同。

本研究在可溶性糖和所有性状之间极显著正相关,且相关系数蔗糖、果糖、葡萄糖逐一增大,蔗糖和果糖之间极显著正相关,但与葡萄糖间存在显著负相关关系。毛鑫等^[17]研究结果与本研究相反,甜高粱茎秆汁液中果糖含量与葡萄糖含量显著正相关,果糖与蔗糖则无显著相关性,葡萄糖与蔗糖间正相关,推测可能是由品种间的差异和环境因素引起的。有研究表明^[2],在盐碱胁迫下,甜高粱茎秆汁液的组分将会受到影响,各种糖分之间的相关性系数将会降低。Guden^[18]在甜高粱基因型对相关性状的影响中研究发现,果糖和葡萄糖浓度 ($r = 0.856^{**}$) 极显著正相关。刘海波等^[19]发现,总糖、蔗糖、果糖和葡萄糖含量会随盐胁迫程度加重呈先增加后降低的趋势,且盐胁迫会提高蔗糖的相对含量,但对葡萄糖和果糖的相对含量无影响。而本研究的甜高粱材料种植于天津静海,土壤的类型为盐化潮土,土壤含盐量较高,这可以解释为何本研究所得的结果会与其他学者的研究结果存在差异。

本研究通过对传统蒽酮比色法测糖的条件进行优化,寻找出了便捷有效的测定方法,解决了传统的蒽酮比色法无法测定果糖、蔗糖含量的问题,同时与传统的蒽酮比色法一样,具有较好的精密度和稳定性。而硫酸苯酚法^[20-21]和 3,5-二硝基水杨酸法^[22-23]目前多用于多糖和可溶性总糖的测定,在果糖、蔗糖上的测定还尚无报道,相比之下,改良之后的蒽酮比色法更适用于甜高粱茎秆糖含量的测定。

参考文献 References:

- [1] 周广麒, 翟景先. 甜高粱茎秆汁的成分及其乙醇发酵的研究. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 85-88.
ZHOU G Q, ZHAI J X. Study on components and ethanol fermentation of sweet sorghum stalk juice. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(1): 85-88.
- [2] 李桂英, 岳美琪, 叶凯, 聂元冬, 顿宝庆, 刘洋, 赵伟华. 甜高粱茎秆汁液锤度与可发酵糖含量的关系. 核农学报, 2013, 27(7): 968-974.
LI G Y, YUE M Q, YE K, NIE Y D, DUN B Q, LIU Y, ZHAO W H. Relationship between malleability of sweet Sorghum stem juice and fermentable sugar content. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(7): 968-974.
- [3] 冷传远, 郝怀庆, 景海春. 甜高粱茎秆持汁性研究进展. 生物技术通报, 2019, 35(5): 9-14.
LENG C Y, HAO H Q, JING H C. Advances in studies on stem juice retention of sweet sorghum. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(5): 9-14.
- [4] 孟利, 刘峰, 付海燕, 雷虹, 李秀凉, 韩德权, 平文祥. 甜高粱秸秆中可溶性糖提取及组成分析. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2015, 31(2): 166-169.
MENG L, LIU F, FU H Y, LEI H, LI X L, HAN D Q, PING W X. Extraction and composition analysis of soluble sugar from sweet sorghum straw. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Science Edition), 2015, 31(2): 166-169.
- [5] 赵大云, 杨丽娥, 赵仪华, 胡雪华. 苜蓿多糖提取及测定方法的比较. 上海交通大学学报(农业科学版), 2004(3): 256-260, 265.
ZHAO D Y, YANG L E, ZHAO Y H, HU X H. Comparison of extraction and determination methods of alfalfa polysaccharide. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Sciences Edition), 2004(3): 256-260, 265.
- [6] 祝文伟, 周令国, 叶宸志, 龙勇, 蒋文萃. 香菇柄中可溶性糖的测定. 农产品加工, 2015, 14(6): 43-45.
ZHU Y W, ZHOU L G, YE C Z, LONG Y, JIANG W P. Determination of soluble sugar in lentinus edodes stalks. Agricultural Processing, 2015, 14(6): 43-45.
- [7] 宋占午, 王莱, 刘艳玲, 郭江暖. 3, 5-二硝基水杨酸测定还原糖含量的条件探讨. 西北师范大学学报(自然科学版), 1997, 27(2): 55-58.
SONG Z W, WANG L, LIU Y L, GUO J N. Determination of reducing sugar by 3, 5-dinitrosalicylic acid. Journal of Northwest Normal University (Natural Science Edition), 1997, 27(2): 55-58.
- [8] 罗志刚, 曾满枝, 凌晨, 林文波, 龚志平, 严利文. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定烟草中水溶性总糖. 中国烟草科学, 2000, 22(2): 40-42.
LUO Z G, ZENG M Z, LING C, LIN W B, GONG Z P, YAN L W. Determination of water-soluble total sugar in tobacco by colorimetric method of 3, 5-dinitrosalicylic acid. Chinese Tobacco Science, 2000, 22(2): 40-42.
- [9] 郑荣庆. 烟叶中还原糖的斐林试液比色测定法. 烟草科技, 1985, 14(2): 26-31.
ZHENG R Q. Colorimetric determination of reducing sugar in tobacco leaves by phillin solution. Tobacco Science and Technology, 1985, 14(2): 26-31.
- [10] 孟伊娜, 张瑞廷, 史强, 傅力, 叶凯. 高效液相色谱法测定甜高粱茎秆中3种糖含量. 中国农学通报, 2010, 26(8): 90-95.
MENG Y N, ZHANG R T, SHI Q, FU L, YE K. Determination of three sugars in sweet sorghum stalk by high performance liquid chromatography. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(8): 90-95.
- [11] 张述伟, 宗营杰, 方春燕, 黄赛华, 李静, 许建华, 王亦菲, 刘成洪. 蒽酮比色法快速测定大麦叶片中可溶性糖含量的优化. 食品研究与开发, 2020, 41(7): 196-200.
ZHANG S W, ZONG Y J, FANG C Y, HUANG S H, LI J, XU J H, WANG Y F, LIU C H. Optimization of rapid determination of soluble sugar content in barley leaves by anthrone colorimetry. Food Research and Development, 2020, 41(7): 196-200.
- [12] 位杰, 吴翠云, 蒋媛, 王合理. 蒽酮法测定红枣可溶性糖含量条件的优化. 食品科学, 2014, 35(24): 136-140.
WEI J, WU C Y, JIANG Y, WANG H L. Optimization of anthrone method for determination of soluble sugar content in Jujube. Food Science, 2014, 35(24): 136-140.
- [13] 李晓旭, 李家政. 优化蒽酮比色法测定甜玉米中可溶性糖的含量. 保鲜与加工, 2013, 13(4): 24-27.
LI X X, LI J Z. Determination of soluble sugar in sweet corn by optimized Anthrone colorimetry. Preservation and Processing, 2013, 13(4): 24-27.

- [14] 丁雪梅, 张晓君, 赵云, 谭智敏, 李玉梅, 王鹏, 唐鸿宇, 丛彦龙, 包国章, 马骥超, 张金玉, 沈景林. 蒽酮比色法测定可溶性糖含量的试验方法改进. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 57(23): 230-233.
DING X M, ZHANG X J, ZHAO Y, TAN Z M, LI Y M, WANG P, TANG H Y, CONG Y L, BAO G Z, MA J C, ZHANG J Y, SHEN J L. Improvement of anthrone colorimetric method for determination of soluble sugar content. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinarian, 2014, 57(23): 230-233.
- [15] 任婧, 李景富, 张佳, 刘俊芳, 许向阳, 姜景彬. 基于蒽酮硫酸比色法建立一种快速测定果糖含量的方法. 黑龙江科学, 2017, 8(10): 82-85.
REN Q, LI J F, ZHANG J, LIU J F, XU X Y, JIANG J B. A fast method for the determination of fructose content was established based on anthrone sulfuric acid colorimetry. Heilongjiang Science, 2017, 8(10): 82-85.
- [16] 张友杰. 以蒽酮分光光度法测定果蔬中的葡萄糖、果糖、蔗糖和淀粉. 分析化学, 1977, 6(3): 167-171.
ZHANG Y J. Determination of glucose, fructose, sucrose and starch in fruits and vegetables by anthrone spectrophotometry. Analytical Chemistry, 1977, 6(3): 167-171.
- [17] 毛鑫, 宇鑫, 王鹏飞, 常方照, 段可, 张宁, 李明莹. 不同品种甜高粱茎秆中糖分积累规律的研究. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 77-79.
MAO X, YU X, WANG P F, CHANG F Z, DUAN K, ZHANG N, LI Y Y. Study on the rule of sugar accumulation in stem of different varieties of sweet sorghum. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(1): 77-79.
- [18] GUDEN B. Evaluation of sweet sorghum genotypes for bioethanol yield and related traits. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2020, 15(2): 545-562.
- [19] 刘海波, 魏玉清, 周维松, 邹程. 土壤盐分胁迫对甜高粱茎秆糖分积累及蔗糖代谢相关酶活性的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(5): 41-47.
LIU H B, WEI Y Q, ZHOU W S, ZOU C. Effects of soil salt stress on sugar accumulation and activities of enzymes related to sucrose metabolism in sweet sorghum stalk. Journal of Northwest (Natural Science Edition), 2017, 45(5): 41-47.
- [20] 牛晓芳, 高一军, 怀宝刚, 尹二彦, 马腾洲, 李克明, 黄利敏, 王培, 侯明超, 姜伟洲. 硫酸-苯酚法测定六种牡丹叶中总多糖的含量. 山东农业工程学院学报, 2021, 38(4): 33-35.
NIU X F, GAO Y J, HUAI B G, YIN E Y, MA T Z, LI K M, HUANG L M, WANG P, HOU M C, JIANG W Z. Determination of total polysaccharides in six kinds of tree peony leaves by sulfuric acid-phenol method. Journal of East Agricultural Engineering College, 2021, 38(4): 33-35.
- [21] 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. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 323-324.
MA M, LIU J B, CHEN L L. Optimization and improvement of color conditions for the determination of polysaccharides by phenol-sulfuric acid method. Jiangsu Agricultural Science, 2015, 43(12): 323-324.
- [22] 张志君, 孙伟, 李永亮, 张朝凤. 3, 5-二硝基水杨酸法联合苯酚-浓硫酸法测定不同产地黄精中多糖含量. 中国试验方剂学杂志, 2012, 18(6): 106-109.
ZHANG Z J, SUN W, LI Y L, ZHANG Z F. 3 determination of polysaccharides in rhizoma polygonatum from different habitats by 5-dinitrosalicylic acid method combined with phenol-concentrated sulfuric acid method. Chinese Journal of Experimental Prescription, 2012, 18(6): 106-109.
- [23] 王莉丽, 梅文泉, 陈兴连, 方海仙, 刘兴勇, 杨东顺, 王卫清. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定大米中水溶性糖含量. 中国粮油学报, 2020, 35(9): 168-173.
WANG L L, MEI W Q, CHEN X L, FANG H X, LIU X Y, YANG D S, WANG W Q. 3 determination of water-soluble sugar in rice by 5-dinitrosalicylic acid colorimetry. China Journal of Cereals and Oils, 2020, 35(9): 168-173.

(责任编辑 苟燕妮)