

两种检测还原糖方法的比较

Comparative study on two methods for sugar detection in Jerusalem artichoke

张学英¹ 黄忠意² 章发盛¹ 石艳¹ 黄静¹

ZHANG Xue-ying¹ HUANG Zhong-yi² ZHANH Fa-sheng¹ SHI Yan¹ HUANG Jing¹

(1. 湘西自治州食品药品检验所, 湖南 吉首 416000; 2. 湖南省食品监督检测研究院, 湖南 长沙 410000)

(1. Xiangxi Autonomous Prefecture, The Food and Drug Inspection, Jishou, Hunan 416000, China;

2. Hunan Food Supervision and Inspection Institute, Changsha, Hunan 410000, China)

摘要:采用费林试剂滴定法和 3,5-二硝基水杨酸比色法测定湘西野生菊芋中还原糖(及总糖)含量,分析比较二者的测定结果及可操作性等。结果表明,费林试剂滴定法平行样检测 RSD 值为 2.00%,精密密度为 8%~13%;3,5-二硝基水杨酸比色法平行样检测 RSD 值为 1.68%,精密密度为 2.5%~4.0%;费林试剂滴定法易受终点计量等因素的干扰,特别是对于糖含量低的样品检测误差较大,但较适用于自带颜色产品的检测;3,5-二硝基水杨酸比色法操作简单、快速、适宜批量处理,其显色反应体系在 135 min 内同一标准点 RSD 值为 0.55%,且显色反应体系相当稳定,客观因素对其低浓度样品影响较小,检测结果准确度较高。

关键词:3,5-二硝基水杨酸比色法;费林试剂滴定法;菊芋;还原糖

Abstract: This paper compared the pros and cons, the operability of two methodology, by using the Fenlin reagent titration and the 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry, to determine the reducing sugar content and the total sugar content in the wild *Jerusalem artichoke* from Xiangxi. The RSD value is 2.00% by using Fenlin reagent titration and the precision is 8%~13%, while, the RSD value is 1.68% by using 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry and the precision is 2.5%~4.0%. It is concluded that the Fenlin reagent titration method is susceptible to the finish measurement etc factors, especially for samples with low sugar content, but is more suitable for detection of sample with color, while the 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric method is simple, fast and suitable for batch processing, the RSD value is 0.55% when the color reaction system is in 135 min, the color reaction system is quite stable, little effect on the low concentration sample, and the result is more accurate.

Keywords: 3, 5-2 nitro salicylic acid colorimetry; the fehling reagent titration; inulin; reducing sugar

菊芋,又名洋姜,为菊科向日葵属多年生宿根性草本植物,地下块茎富含菊糖,因菊糖对人体内糖含量有双重调节作用,故菊糖是食品、保健食品和医药领域重要的加工原料。其地上茎秆既可作为造纸的原料,也可作为生物发电的燃料,同时由于其生长适应性强,近年在风沙治理领域运用广泛^[1-2]。菊芋在食品加工领域主要用于制作酱腌菜、蜜饯等食品,在食品精细加工及保健食品研究方面主要是对块茎中菊糖、低聚果糖、高果糖浆等提纯及应用,新鲜菊芋的总糖含量高达 20%~35%,其中鲜菊芋中菊糖含量也较高达 15%~20%^[2-3]。

食品中还原糖(及总糖)的含量测定,有旋光法、气相色谱法、液相色谱法、分光光度计法和化学滴定法,一般现常见有高锰酸钾滴定法(但操作复杂、费时,需高锰酸钾法糖类检索表)、费林试剂滴定法(含直接滴定法和返滴定法)、浓硫酸苯酚法(此法因使用有强腐蚀性的浓硫酸,且检测过程中比色样液量太少而不宜使用)和 3,5-二硝基水杨酸比色法等方法。实验室常用的方法有费林试剂滴定法和 3,5-二硝基水杨酸比色法。前人曾对滴定法、比色法两种测糖法进行过研究,如王欢等^[4]固态发酵食醋中还原糖、总糖含量测定,董林青等^[5]应用不同方法测定发酵液中糖的含量,何红梅等^[6]在食品中还原糖含量测量的不确定度评估,邱晓红等^[7]在富含脂肪食品总糖含量的测定,研究了检测方法、不确定度、前处理方法等。但对两种检测方法的对比研究较少,特别是检测方法适用性研究较少,本试验拟通过对菊芋鲜样品进行总糖和还原糖含量检测方法研究,比较分析费林试剂滴定法和 3,5-二硝基水杨酸比色法在实际应用中的利弊,并分析糖含量高低对于检测结果的影响及方法的适用性,旨在为食品质量安全检验和食品企业指导生产服务。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验用湘西野生菊芋和网购菊芋(浙江金华县)作为

作者简介:张学英(1975-),女,湘西自治州食品药品检验所高级工程师,硕士。E-mail: 1760013691@qq.com

收稿日期:2017-01-03

检测对象。

1.2 试剂

盐酸、氢氧化钠:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;
葡萄糖:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;
五水硫酸铜:分析纯,广东省化学试剂工程技术研究开
发中心;
酒石酸钾钠:分析纯,湖南汇虹试剂有限公司;
3,5-二硝基水杨酸试剂:化学纯,国药集团化学试剂有
限公司。

1.3 设备与仪器

紫外可见分光光度计:UV-2500 型,岛津仪器(苏州)有
限公司;
分析天平:BSA 224S 型,长沙康源科技开发有限公司;
电热恒温水浴锅:DZKW-S 型,北京市永光明医疗仪器
有限公司。

1.4 样品检测

1.4.1 样品前处理

(1) 制样:样品洗净、阴干、取可食部分,用均质器均质
3 min,制成均匀样品备用。
(2) 样品中还原糖检测:称取均匀样品 5~6 g 置于
250 mL 三角瓶中,直接用 50 mL 水振荡提取(必要时加入乙
酸锌和亚铁氰化钾各 5 mL,用于去除蛋白质和脂肪),然后
用水定容至 250 mL 过滤即可。
(3) 样品中总糖的检测:称取约样品 2 g 置于 250 mL 三
角瓶中,加入盐酸水溶液(3:20)130 mL,于三角瓶上加 1 m
长玻璃回流管,沸水浴中酸水解 15 min,然后冷水冷却,用
6 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至中性(必要时加入乙酸锌和
亚铁氰化钾各 5 mL,用于去除蛋白质和脂肪),并用水定容
至 250 mL 用滤纸过滤,得总糖水解液。

1.4.2 费林试剂滴定法(简称滴定法)

(1) 费林 AB 液标定:准确吸取费林 A、B 溶液各 5 mL
放入预先加入 20 mL 水的 200 mL 锥形瓶中(可预先加入一
定量的标准葡萄糖液,一般加入 9~10 mL),摇匀后置于电
炉上加热至沸腾(为使三角瓶受热均匀及易于观察终点颜
色,可在电炉上加一石棉网),用 1.0 mg/mL 葡萄糖标准液滴
定至终点(蓝色刚好消失),记录消耗葡萄糖标准溶液的体

积,即得 K 值(即费林 AB 液各 5 mL 相当于 1.0 mg/mL 葡
萄糖标准液量)。

(2) 样品预滴定:准确吸取费林 A、B 溶液各 5 mL 放入
预先加入 20 mL 水的 200 mL 锥形瓶中,摇匀后置于电炉上
加热至沸腾,用样品水解液滴定至终点,记录消耗水解液的
体积。

(3) 样品正式滴定:准确吸取费林 A、B 溶液各 5 mL 放
入预先加入 20 mL 水的 200 mL 锥形瓶中,加入比预滴定少
1 mL 的样品水解液,摇匀后置于电炉上加热至沸腾,用样品
水解液滴定至终点,记录消耗水解液的体积(注:整个滴定过
程控制在 2 min 内完成)。

(4) 还原糖(以葡萄糖计)含量计算:

$$X = \frac{K \times 250 \times 100}{m \times V \times 1\,000},$$

式中:

X——试样中还原糖的含量,%;
K——费林 AB 液各 5.0 mL 相当于 1.0 mg/mL 葡萄糖
标准液量,mL;

250——样品检测过程定容体积,mL;
V——试样滴定费林 AB 时消耗的体积,mL;
M——样品重量,g。

1.4.3 3,5-二硝基水杨酸比色法(简称比色法)

(1) 样品及标准液前处理:按表 1 试验设计取不同体积
的 1.0 mg/mL 葡萄糖标准溶液和样品处理液放入 25 mL 比
色管中,并补足水量至 3 mL,各比色管中加入显色试剂
2.0 mL,沸水浴中加热 5 min,冰水浴中冷却后定容至 25 mL
摇匀(注:沸水浴及冰水冷却条件尽量一致),比色反应
30 min 后在 540 nm 波长处测定其吸光度 Abs 值,由葡萄糖
标准液浓度(质量含量)与吸光度 Abs 值作标准曲线。

(2) 还原糖(以葡萄糖计)含量计算:

$$X = \frac{m' \times 250 \times f \times 100}{m \times v \times 1\,000},$$

式中:

X——试样中还原糖的含量,%;
m'——根据标准曲线计算得的比色液中葡萄糖含
量,mg;

表 1 样品及标准液前处理设计表 [†]						
Table 1 Liquid samples and standards before processing design table						
编号	葡萄糖标准液 吸取量/mL	标准葡萄 糖量/μg	补水量/ mL	DNS 试剂/ mL	沸水浴中加热 时间/min	冷却后定容 体积/mL
1	0.0	0	3.0	2.0	6	25
2	0.5	500	2.5	2.0	6	25
3	1.0	1 000	2.0	2.0	6	25
4	1.5	1 500	1.5	2.0	6	25
5	2.0	2 000	1.0	2.0	6	25
6	1.0(菊芋样 品,多批次)	/	2.0	2.0	6	25

[†] 沸水浴完成后,于冰水中快速冷却至室温。

250——样品检测过程定容体积,mL;
 f ——稀释倍数;
 v ——比色测定时移取试样待测液的体积,mL;
 m ——样品重量,g。

2 检测结果与数据分析

2.1 吸收光谱波长的选择

经查王欢等^[4]、董林青等^[5]等论文资料,及 NY/T 2332—2013《红参中总糖含量的测定 分光光度法》等标准,对 DNS 比色法检测波长通常为 490,500,510,520,540 nm,本试验通过对标准系列中间点 1 500 μg 在 400~600 nm 进行光谱扫描,发现在 540 nm 处吸收最为明显且稳定,故本试验检测波长用 540 nm。

2.2 显色反应体系的稳定性

通过对标准系列中间点 1 500 μg 在不同时间段内吸光值及标准物含量的检测,检测结果及数据分析见表 2。

表 2 显色反应体系的稳定性 [†]				
Table 2 The stability of chromogenic reaction system				
显色反应 时间/min	Abs 值	质量含 量/ μg	精密度(与标 准值比较)/%	标准质量 含量/ μg
30	0.295	1 544.55	2.97	1 500
50	0.302	1 551.72	3.45	1 500
65	0.304	1 560.81	4.05	1 500
85	0.304	1 563.87	4.26	1 500
95	0.304	1 564.59	4.31	1 500
115	0.305	1 567.89	4.53	1 500
135	0.304	1 566.12	4.41	1 500

[†] 数据分析:平均值 1 559.93 μg ,极差值 21.57 μg ,SD 值 8.60, RSD 值 0.55%。

由表 2 可知,标准葡萄糖 1 500 μg 显色反应体系的稳定性很高,30~135 min 显色反应体系非常稳定,平均值 1 559.93 μg ,极差值 21.57 μg ,精密度均大于 95%以上,RSD 值 0.55%。

2.3 标准曲线的情况

按表 1 设计所得葡萄糖标准曲线为 $X_1=6\ 392.070\ 57Y+12.233\ 5$,相关系数 $R^2=0.999$,估计的标准误差为 45.539 7;

残余标准偏差为 40.732 0(仪器系统提供的数据);本试验同时用果糖作为标准品进行比色法测定,其标准曲线为 $X_2=5\ 272.656\ 2Y-9.275\ 7$,相关系数 $R^2=0.999$,说明两种标准品得出的标准曲线均非常理想,标准液检测结果及数据分析见表 3。

表 3 标准液检测结果及数据分析			
Table 3 Standard test results and data analysis			
序号	还原糖质量 含量/ μg	X_1 Abs 值	X_2 Abs 值
1	0	0.000	0.000
2	500	0.069	0.098
3	1 000	0.165	0.196
4	1 500	0.232	0.282
5	2 000	0.304	0.382
6	3 000	0.470	/

标准曲线		$X_1=6\ 392.070\ 57Y+$	$X_2=5\ 272.656\ 2Y-$
方程		12.233 5	9.275 7
相关系数 R^2		0.999	0.999

2.4 样品总糖检测

用两种不同检测方法对同一样品总糖进行 5 次平行检测,所得检测结果及相对平均偏差、相对标准偏差等数据分析见表 4。

由表 4 可知,样品总糖检测直接滴定法重复测定 5 次,通过计算测定结果,相对平均偏差为 1.59%,RSD 为 2.00%,说明其精密度比较高。用比色法对同一样品重复测定 5 次,由表 4 中“对应比色液糖含量”和样品检测结果分析可知,相对平均偏差为 1.37%,RSD 为 1.68%(因为数据分析要考虑样品称样量及处理过程稀释倍数等因素,故在此只分析检测结果数据而不分析比色液糖含量数据),说明样品比色液糖含量 1 500 μg 以上的样品,比色法的精密度也很高。

2.5 样品还原糖检测

用两种不同检测方法对 5 个样品进行还原糖项目的检测,所得结果及数据分析见表 5。

由表 5 可知,比色液糖含量低于 1 500 μg 的样品滴定法检测样品平行性较差(因为数据分析要考虑样品称样量及处理过程稀释倍数等因素,故在此只分析检测结果数据而不分

表 4 样品总糖检测结果及数据分析												
Table 4 Samples of total sugar test results and data analysis												
检测方法	样品/%					平均值/ %	极差	极差与平均 比值/%	平均 偏差 d	相对平均 偏差/%	标准 偏差 SD	相对标准偏 差 RSD/%
滴定法	26.44	26.02	25.21	25.29	25.85	25.76	1.23	4.77	0.41	1.59	0.52	2.00
比色法	32.69	32.25	31.36	31.64	31.67	31.92	1.33	4.17	0.44	1.37	0.54	1.68

对应比色液 糖含量/ μg	1 696	1 713	1 537	1 791	1 479							

表 5 样品还原糖检测结果及数据分析[†]

Table 5 Sample reducing sugar test results and data analysis

%

样品	滴定法			比色法		
	1	2	精密度	1	2	精密度
样品 1	2.37	2.63	10.40	2.59/924	2.64/896	2.50
样品 2	1.92	2.10	8.96	2.06/829	1.98/801	3.96
样品 3	3.12	2.78	11.53	2.69/809	2.78/1 096	3.29
样品 4	1.76	2.00	12.77	1.79/938	1.87/902	4.37
样品 5	3.18	3.46	8.43	3.52/1 030	3.61/854	2.52

† 样品 1、3、5 为湘西野生菊芋；样品 2、4 为浙江金华菊芋；精密度是指在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%。“/”后数据为对应比色液糖含量，单位为 μg 。

析比色液糖含量数据)，精密度一般在 8%~13%，而比色法精密度一般在 2.0%~4.5%，说明比色液糖含量低于 1 500 μg 样品的检测比色法比滴定法平行性和重现性均高很多。

2.6 不同浓度葡萄糖标液的检测

用两种检测方法检测不同溶度标准葡萄糖液，所测结果及数据分析见表 6。

表 6 不同浓度葡萄糖标液测定结果及数据分析[†]

Table 6 Different concentrations of glucose standard solution determination results and data analysis

检测方法	标准葡萄糖 质量含量/ μg	检测结果/ μg	平均值/ μg	精密度/ %	标准偏差 SD	相对标准 偏差 RSD/%
滴定法	1 500	1 524,1 569,1 578	1 557	3.80	28.93	1.89
	150	183,179,172	178	18.67	8.97	5.04
比色法	1 500	1 583,1 529,1 490	1 534	2.27	46.70	3.04
	150	153,149,159	154	2.44	5.03	3.27

† 精密度指检测平均值减去标准值的差值与标准值比值，反应检测值与标准值的相符性或接近性。

3 结论

试验证明 1 500 μg 标准葡萄糖显色反应体系在常温下稳定性很高，平均值 1 559.93 μg ，极差值 21.57 μg ，精密度均大于 95% 以上，RSD 值 0.55%，标准曲线相关系数 $R^2 = 0.999$ 。在测定菊芋中总糖和还原糖含量时，费林试剂滴定法和 3,5-二硝基水杨酸比色法均适用于较高浓度（比色液糖含量 1 500 μg 以上）样品的检测，滴定法 RSD 为 2.00%，比色法 RSD 为 1.68%；但对于浓度较低（比色液糖含量低于 1 500 μg 以下）样品的检测宜使用比色法，滴定法检测样品平行性较差，精密度一般在 8%~13%，而比色法精密度一般在 2.0%~4.5%。3,5-二硝基水杨酸比色法应用较为广泛，处理过程简单可控，可用于大批量检测，适用于不同含量样品的检测，但不适用于自带颜色样品的检测。

参考文献

[1] 郭洪涛, 郭衍银. 菊芋资源开发与利用研究进展[J]. 山东农业科学, 2011(11): 69-70.

由表 6 可知，采用直接滴定法测定不同浓度（或质量含量）的葡萄糖标液含量，1 500 μg 标准葡萄糖液 RSD 值滴定法为 1.86%，比色法为 3.04%，而 150 μg 葡萄糖标准液 RSD 值滴定法为 5.04%，比色法 3.27%，可见滴定法较适宜于检测高浓度样品，与 2.4 和 2.5 的分析一致。综上可知，① 两种方法检测样品的重复性均较好，但滴定法在检测较低浓度样品时其精密度和相对标准偏差较大，如表 5 中样品 1、3、4，以及表 6 中的 150 μg 的标准液，因为费林试剂滴定法影响因素较多如玻璃仪器、滴定时间、化学反应、人员因素等，且滴定法终点计量控制为 1 滴或半滴，而没有更准确的计量方法，从而导致的误差对于低浓度样品则更为突显。而比色法对高低浓度的检测精密度控制均在于其氨基化合物的生成量，以化学量比关系反应作为计量方法，故浓度高低对于检测结果影响不大（只要保证显色剂过量和 Abs 值在标准曲线范围内即可）；② 在比色法检测过程中发现，相同浓度的标准点其每次的吸光度 Abs 值相差较大，故要求每次检测样品必同时做相同条件的标准曲线，比色法对于受热程度、煮沸时间、冷却时间等控制要求一致，并且每批次检测必做相同条件的标准曲线；③ 滴定法检测适用于高浓度样品的检测，其对于自带颜色产品检测又有其特定优势，比色法检测适用于高浓度和低浓度样品检测，但对于自带颜色样品的检测受干扰影响较大。

[2] 乌日娜, 朱铁霞, 于永奇, 等. 菊芋的研究现状及开发潜力[J]. 草业科学, 2013(8): 1 295-1 300.

[3] 赵琳静, 燕方龙, 宋小平, 等. 菊芋菊糖的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008(4): 186-187.

[4] 王欢, 卢红梅, 张义明, 等. 固态发酵食醋中还原糖、总糖含量测定[J]. 中国酿造, 2011(9): 172-174.

[5] 董林青, 牛国文, 刘志毅, 等. 应用不同方法测定发酵液中的糖含量[J]. 广东化工, 2009(9): 177-178.

[6] 何红梅, 陈利国, 黄辉, 等. 食品中还原糖含量测量的不确定度评估[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 96-97, 107.

[7] 邱晓红, 周炳全. 富含脂肪食品总糖含量的测定[J]. 食品与机械, 2005, 21(6): 55-57.