

测定食品中还原糖方法的研究

刘 焯^{1*}, 马 微²

(1. 绥芬河出入境检验检疫局, 绥芬河 157300; 2. 东宁出入境检验检疫局, 东宁 157299)

摘 要: **目的** 研究测定食品中还原糖的影响因素, 研制快捷、滴定结果准确的装置。**方法** 样品经离心(必要时)、稀释后, 根据廉一爱农法, 利用研制的无氧滴定装置进行测定。**结果** 当滴定达到无氧环境条件时, 还原糖的测定结果不受加热强度和滴定时间的影响。3种样品的3个水平加标平均回收率为98.0%~100.7%($n=6$), 相对标准偏差为0.7%~2.0%。在本试验条件下1 mol葡萄糖相当于5.78 mol硫酸铜, 非常接近6。从而证实斐林试剂化学反应计量关系为葡萄糖:硫酸铜=1:6的推断。**结论** 本方法操作简便、终点易于分辨, 测定数据重复性强, 易于操作。

关键词: 食品; 还原糖; 斐林试剂; 廉一爱农法; 无氧滴定装置

Research on the method for determination of reducing sugar in food

LIU Ye^{1*}, MA Wei²

(1. Suifenhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suifenhe 157300, China; 2. Dongning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dongning 157299, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the influencing factors of determination of reducing sugar in food and develop a rapid, accurate titration device. **Methods** According to the Lane-Eynon method, samples were measured by developed anaerobic titration device after centrifugation (if necessary) and dilution. **Results** When titration reached at anaerobic environmental conditions, measurement results were not affected by the strength and reducing sugar titration time of heating. Average recoveries of 3 kinds of samples at 3 spiked levels were 98.0%~100.7% ($n=6$), and the relative standard deviations (RSDs) were in range of 0.7%~2.0%. Under these experimental conditions, 1 mol glucose might be equivalent to 5.78 mol copper sulfate, very close to 6. It was confirmed that the stoichiometry relationship of Fehling's reagent was glucose: copper sulfate =1:6. **Conclusion** The method is simple, easier distinguishing, accurate, direct titration on the determination of reducing sugar.

KEY WORDS: food; reducing sugar; Fehling's reagent; Lane-Eynon method; anaerobic titration device

1 引言

食品中还原糖的测定方法的研究和应用很多, 如曼森-沃克方法(Munson and Walker Method), 碘化物-硫代硫酸盐法^[1], 廉一爱农法(Lane-Eynon Method)及改进方法^[2],

分光光度法^[3,4]等。其中廉一爱农法应用最为广泛, 即碱性酒石酸甲铜在加热条件下, 还原糖将 Cu^{2+} 还原成 Cu_2O 。在实际应用中, 为了便于观察反应终点, 廉一爱农在斐林反应基础上加入亚甲蓝试剂作为指示反应终点, 形成了国际上常用的测定还原糖的定量方法。许多国家和国际组织把

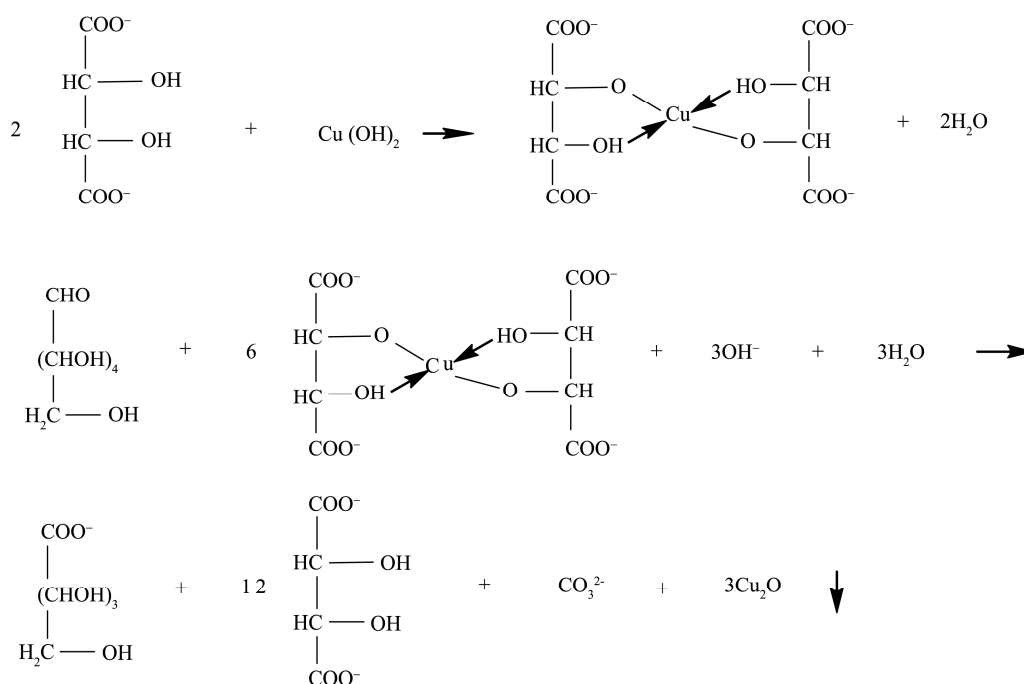
基金项目: 黑龙江出入境检验检疫局科技项目(2015HK008)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (2015HK008)

*通讯作者: 刘焯, 副主任医师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: liuye116@sohu.com

*Corresponding author: LIU Ye, Deputy Chief Physician, Suifenhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yanhe Road, Suifenhe 157299, China. E-mail: liuye116@sohu.com

此法定为标准分析方法^[5-11],但也留下了至今未解的难题,就是加热过程中,溶液中残留的氧含量极大地影响了化学反应过程。只有绝对无氧环境才能得到正确的结果。在过去的一些研究中,由于都没有达到绝对无氧要求,所得结果多种多样。一般认为,斐林试剂反应与加热强度和滴定时间等多种因素有关^[12-15],而且不存在确定化学计量关系。

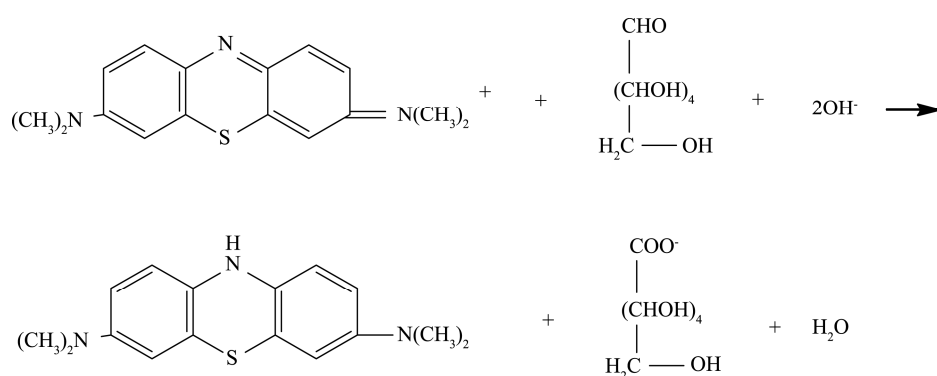


实际应用中,为便于终点判断,斐林试剂中加入亚甲蓝指示终点。当溶液中 Cu^{2+} 还原完成后,过量的还原

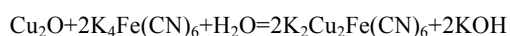
针对存在的问题,本课题组研制了一套无氧滴定装置,突破滴定过程中苛刻的加热条件限制和滴定时间限制,使测定结果更加准确。该无氧滴定装置的原理是利用节流适配器使锥形瓶中溶液在加热时形成正向压力的饱和蒸汽,隔绝空气与斐林试剂接触,通过加长弹性石英毛细管透过蒸汽屏障进行滴定。该装置结构简单,方便实现。

据李酉开研究^[16],斐林试剂与还原糖的反应式为:

糖将亚甲蓝还原为无色,此时化学反应达到等当点。其反应式为:



我国标准方法中,在引用 Lane-Eynon 方法时,做出部分改良,即在斐林试剂乙中添加亚铁氰化钾,滴定过程生成的氧化亚铜溶于亚铁氰化钾,溶液滴定到终点时,颜色变为淡黄色。其反应式为:



2 材料与方法

2.1 材料与试剂

格瓦斯(俄罗斯, Москва); 橙汁(俄罗斯, Tetra Pak); 食用醋(天津天立老醋)。

硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 纯度 98%~102%, 美国 CNW。酒石酸钾钠(优级纯, 天津光复科技发展有限公司); 氢氧化钠(优级纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 亚甲蓝(指示剂, 中国医药公司(北京)); 无水葡萄糖(纯度 99%, Alfa Aesar)。实验用水: 配制试剂用亚沸水, 其它用去离子水。

碱性酒石酸铜甲液: 称取 15.00 g 硫酸铜及 0.05 g 亚甲蓝, 溶于水中并定容至 1000 mL。

碱性酒石酸铜乙液: 称取 50 g 酒石酸钾钠、4 g 亚铁氰化钾及 75 g 氢氧化钠, 溶于水中并稀释至 1000 mL。

葡萄糖标准溶液: 称取 0.6 g 干燥的无水葡萄糖于 250 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至刻度。

2.2 实验设备

电子天平(XP205、PL20021C, 瑞士梅特勒公司); 磁力搅拌电加热板(SP131320-33, 美国赛默飞世尔公司); 分体式滴定管(10 mL, 分度值 0.02 mL, 德国普兰德公司); 弹性石英毛细管滴头($\Phi 0.53 \text{ mm} \times 120 \text{ mm}$)。

锥形瓶: 100 mL, 带节流适配器。

3 实验方法

葡萄糖标准溶液滴定: 吸取碱性酒石酸铜甲、乙液各 5.0 mL 于锥形瓶中, 再加 30 mL 去离子水。放在磁力搅拌电加热板上加热并磁力搅拌。安装还原糖滴定装置, 待溶液沸腾后, 按约 1 滴/s 速度, 滴加葡萄糖标准溶液, 至溶液变为澄清淡黄色。记录消耗葡萄糖标准溶液体积。

样品溶液稀释与滴定: 有固体悬浮样品, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清溶液。根据还原糖含量适当稀释, 用样品稀释溶液代替葡萄糖标准, 同上操作。

4 结果与讨论

4.1 滴定终点的判定

还原糖滴定终点判定与滴定溶液中还原糖的含量、滴定管控制精度和滴定速度有很大关系。如果滴定溶液中还原糖含量高, 滴定管控制精度差或滴定速度过快, 滴定过程中每个色差变化都可认为是终点。但利用自制的滴定装置, 滴定管控制精度可达到 0.01 mL/滴, 以葡萄糖标准溶液($C=1.2 \text{ mg/mL}$)为例, 还原糖含量为 12 μg /滴, 溶液颜色的变化过程为: 蓝色 红色 无色 淡黄色 深黄色, 其中无色 淡黄色为瞬间变化, 其他为缓慢渐变过程。滴定过量时出现黄绿色, 甚至深绿色; 当用样品滴定时, 由于样品成分复杂或有本底颜色, 如食用醋, 颜色变化为: 蓝色 蓝黑 红色 亮黄色 深黄色。其中, 红色 淡黄色为瞬间变化, 其他为缓慢渐变过程。无论是标准品溶液或是样品溶液颜色突变点都是黄色出现, 而且都很容易鉴别。因此, 滴定终点溶液颜色为淡黄色或亮黄色。对于特殊样品稀释后, 仍无法鉴别颜色突变点, 则需要对样品进

行脱色处理。

4.2 终点颜色变化的延迟与滴定等待时间的确定

当快速滴加样品溶液后, 化学反应并非立刻出现颜色变化, 而是有一定时间的延迟, 尤其是快速滴加溶液达到终点时, 终点颜色出现的延迟时间应该控制在大于 20 s; 滴加试剂越过量, 则延迟时间越短。而且不同样品延迟时间也不相同。为防止滴定过量, 当快速滴加大量的溶液时, 等待时间应该大于延迟时间, 推荐 2 min 后, 当溶液仍未到达黄色时, 方可继续滴加样品溶液至终点颜色。

4.3 滴定过程氧气残留对滴定结果的影响

由于亚甲蓝还原后极不稳定, 所以滴定必须在绝对无氧状态下才能得到真实有效的结果^[17,18]。如果斐林溶液未沸腾, 或滴定使用敞口反应瓶都会存在氧气残留。在这种状态下, 亚甲蓝相当于催化剂, 催化还原糖氧化, 此时亚甲蓝颜色变化非常缓慢, 需要过量的还原糖, 方能引起亚甲蓝颜色突变。所以, 许多标准方法中都要求严格控制加热时间和滴定时间。为达到结果的重现性, 需要预滴定、先加入滴定溶液、应用少量溶液滴定。但实验证明这种做法并不正确, 因为溶液在未沸腾状态下, 并不是绝对无氧环境, 因此, 最终测定结果都是过量的。

为了证明溶液中残留氧气对滴定结果的影响程度, 先按本方法测定每个样品溶液达到终点时使用的体积(V_0), 然后将 V_0 加到冷斐林溶液中, 加热和磁力搅拌, 同时计时(X)至斐林溶液沸腾止, 等待 2 min 后, 用样品溶液继续滴定至终点, 记录样品总消耗的体积(V)。计算滴定过量百分比为:

$$Y = \frac{V - V_0}{V_0} \times 100$$

如下图 1 所示, 提前加入试剂后不同加热时间与滴定过量的关系。纵坐标(Y)为过量百分比, 横坐标(X)为溶液加热至沸腾的时间。

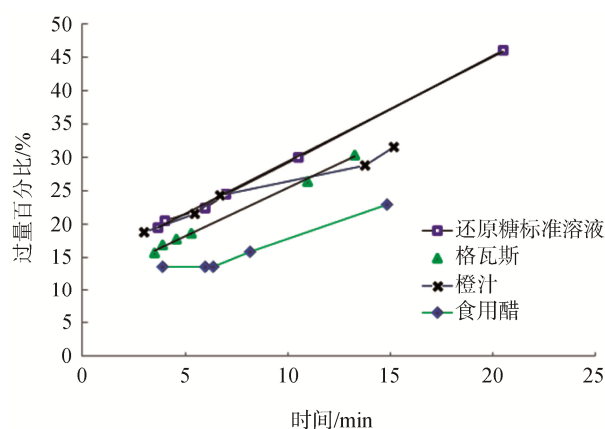


图 1 加热时间与滴定过量的关系

Fig. 1 Relationship of heating time and excess of titration

图中:

还原糖标准溶液: $Y=1.578X+13.519$, $R^2=0.9981$.

格瓦斯: $Y=1.4398X+10.923$, $R^2=0.9975$.

橙汁: $Y=0.9557X+16.512$, $R^2=0.9715$.

食用醋: $Y=0.94X+8.4964$, $R^2=0.9464$.

从图 1 中看出, 往冷斐林溶液中滴加样品溶液后, 加热至沸腾时, 经历时间越长, 就需要加入越多样品溶液才能达到终点。4 种样品测定结果, 经过曲线拟合后, 非常像直线。但不同样品之间直线斜率不同, 按照上述计算, 在冷斐林溶液中预加样品溶液后, 开始加热, 即使 2 min 至沸腾, 滴定至终点时, 其过量也大于 10%。所以, 正确的操作方法是当斐林溶液完全沸腾后, 才可以滴定或直接加入样品溶液。

4.4 滴定时间、加热情况对滴定结果的影响

本研究提供了无氧滴定装置, 实现更精密的滴定控

制。利用本法试验, 还原糖的测定结果不受滴定时间、加热情况(包括加热强度、加热时间)等的影响。如表 1 所示。

4.5 还原糖与斐林试剂间的化学反应关系

据研究, 还原糖与斐林试剂间化学反应非化学计量关系, 而是依反应时铜过量的多少而定, 一般在 1:5~1:7 之间^[19]。李西开根据实验得到, 1 mol 葡萄糖相当于 5~5.5 g 当量, 而且葡萄糖分子在化学反应过程中发生降解和氧化。推断最有可能化学计量关系为, 1 mol 葡萄糖相当于 6 g 当量。利用本法验证得到, 1 mol 葡萄糖相当于 5.78 g 当量, 非常接近 6, 从而证实其推断是正确的。如表 2 所示。

4.6 加标回收率试验

选用 3 种样品, 用本法进行加标回收率试验, 结果如表 3 所示。还原糖 3 个水平加标平均回收率为 98.0%~100.7% ($n=6$), 表明该法测定结果准确。

表 1 滴定时间与还原糖消耗量的关系(葡萄糖浓度 $C=2.64$ mg/mL, $n=6$)
Table 1 Relationship of titration time and the consumption of reducing sugar

滴定时间*(min)	X 1	1<X 3	3<X 5	5<X 8	8<X 13	X>13
消耗还原糖平均体积(mL)	3.74	3.78	3.72	3.76	3.73	3.75

*注: 通过调节加热强度(功率), 维持锥形瓶中溶液体积相对稳定, 延长滴定时间。

表 2 葡萄糖与斐林试剂计量关系(葡萄糖浓度 $C=1.20$ mg/mL, $n=6$)
Table 2 Stoichiometry relationship of glucose and Fehling's reagent

5 mL 碱性酒石酸铜甲液	含量(mg/mL)	消耗葡萄糖体积(mL)
亚甲蓝	0.05	0.32
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	15.48	8.37
亚甲蓝	0.05	
Cu/葡萄糖(mol/mol)		5.78

表 3 不同添加水平下还原糖的加标回收率、相对标准差($n=6$)
Table 3 Average recoveries and relative standard deviations of reducing sugar at different spiked levels ($n=6$)

样品名	本底*(mg/mL)	加标量(mg/mL)	平均回收率(%)	RSD(%)
格瓦斯	0.416	1.166	99.4	1.4
	0.649	0.388	98.9	1.4
	0.382	0.491	98.0	1.9
橙汁	0.653	0.362	100.0	1.4
	0.576	0.604	100.7	1.7
	0.461	0.966	100.2	0.7
食用醋	0.342	0.725	98.4	1.7
	0.342	0.362	99.2	1.2
	0.911	0.483	99.4	2.0

*注: 稀释后样品中还原糖含量。

5 结 论

本文研制的还原糖无氧滴定装置是最接近斐林试剂反应要求的结构。利用该结构, 溶液在加热时产生正压蒸汽屏障, 消除氧气的影响, 结合毛细管使用实现精准的滴定控制。滴定过程中不受加热、滴定时间等影响因素, 故不需要预滴定, 也不需要预加滴定试剂, 而直接滴定即可。3种样品的3个水平加标平均回收率为98.0%~100.7%($n=6$), 相对标准偏差为0.7%~2.0%。本方法操作简便、实用性强, 解决了廉一爱农法操作要求严格、难以掌握的问题

参考文献

- [1] NY/T 1751-2009 甜菜还原糖的测定[S].
NY/T 1751-2009 Determination of reducing sugar in sugar beet root [S].
- [2] 魏立立, 乔丽娜. 粮食中还原糖和非还原糖测定国家标准(GB/T 5513-2008)中存在问题的修改建议[J]. 粮油加工, 2014, 9: 54-55.
Wei LL, Qiao LN. Suggestions for problems of reducing sugar and non reducing sugar in grain with national standard (GB/T5513-2008) [J]. Grain Process, 2014, 9: 54-55.
- [3] Sözgen Başkan K, Tütem E, Akyüz E, *et al.* Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction [J]. Talanta, 2016, 147(15): 162-168.
- [4] LeotérioDMS, SilvaPAB, Souza GCS, *et al.* Copper-4,4'-dipyridyl coordination compound as solid reagent for spectrophotometric determination of reducing sugar employing a multicommutation approach [J]. Food Control, 2015, 57(11): 225-231.
- [5] Official methods of analysis association of official analytical chemists, 15th edition, method 923.09, invert sugar in sugars and syrups, Lane-Eynon general volumetric method, final action [S].
- [6] Official methods of analysis association of official analytical chemists, 15th edition, method 935.62, glucose in sugars and sirups, chemical methods, final action [S].
- [7] GB/T 22428.1-2008 (ISO 5377:1981)淀粉水解产品 还原力和葡萄糖当量测定[S].
GB/T 22428.1-2008 (ISO 5377:1981) Starch hydrolysis products-determination of reducing power and dextrose equivalent [S].
- [8] GB/T 5009.7-2008 食品中还原糖的测定[S].
GB/T 5009.7-2008 Determination of reducing sugar in foods [S].
- [9] GB/T 5513-2008 粮油检验 粮食中还原糖和非还原糖测定[S].
GB/T 5513-2008 Inspection of grain and oils-determination of reduced sugar and non reduced sugar in grain [S].
- [10] GB 5413.5-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定[S].
GB 5413.5-2010 National food safety standard determination of lactose and sucrose in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [11] GB/T 19777-2013 地理标志产品 山西老陈醋[S]. GB/T 19777-2013 Product of geographical indication—Shanxi extra aged vinegar [S].
- [12] 李雪梅, 杨俊慧, 张得群, 等. 还原糖测定方法的比较[J]. 山东科学, 2008, 21(2): 18-20.
Li XM, Yang JH, Zhang DQ, *et al.* Comparisons of determination approaches of reducing sugar [J]. Shandong Sci, 2008, 21(2): 18-20.
- [13] 罗在粉, 王兴章, 卿云光. 斐林试剂测定食品中还原糖影响因素的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 9(4): 951-961.
Luo ZF, Wang XZ, Qing YG. The discuss of Fehling reagent effect factors of reducing sugar in the food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 9(4): 951-961.
- [14] 杨林娥, 彭晓光, 杨庆文, 等. 斐林试剂法测定还原方法的改进[J]. 中国酿造, 2010, (2): 160-161.
Yang LE, Peng XG, Yang QW, *et al.* Improvement of the determination of reducing sugar with Fehling's reagent method [J]. China Brew, 2010, (2): 160-161.
- [15] 毛瑞丰, 郭立冬, 王双飞, 等. 酒类行业生产中还原糖测定水平鉴定方法研究[J]. 中国酿造, 2010, (3): 153-155.
Mao RF, Guo LD, Wang SF, *et al.* A method for reducing sugar determination in alcoholic drink industry [J]. China Brew, 2010, (3): 153-155.
- [16] 李西开. 论费林溶液与还原糖的反应[J]. 北京农业大学学报, 1984, 10(4): 361-365.
Li YK. Study on the reactions of Fehling's solution with reducing sugars [J]. J Beijing Agric Univ, 1984, 10(4): 361-365.
- [17] 叶海辉, 何秀芬, 王秀兰. 费林试剂滴定法测定还原糖方法的改进[J]. 热带农业科学, 2001, (3): 9-11.
Ye HH, He XF, Wang XL. Improved methods of reducing sugar for Fehling's reagents titration [J]. Chin J Trop Agric, 2001, (3): 9-11.
- [18] 涂小珂, 林燕奎, 金晓蕾, 等. 空气隔断-连续流动分析法快速测定葡萄酒中总糖[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 87-90.
Tu XK, Lin YK, Jin XL, *et al.* Determination of total sugar in wine by air-segmented continuous flow analysis [J]. Food Sci, 2015, 36(14): 87-90.
- [19] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州, 浙江大学出版社, 1994.
Zhang WJ. Glycoconjugates biochemistry technology [M]. Hangzhou, Zhejiang University Press, 1994.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



刘 焯, 副主任医师, 主要研究方向为食品理化检验。
E-mail: liuyel16@sohu.com



马 微, 高级工程师, 主要研究方向为营养与食品安全。
E-mail: mawei1599@126.com