



# 还原糖和总糖的测定

## (3,5-二硝基水杨酸比色法)

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

# 一、实验目的

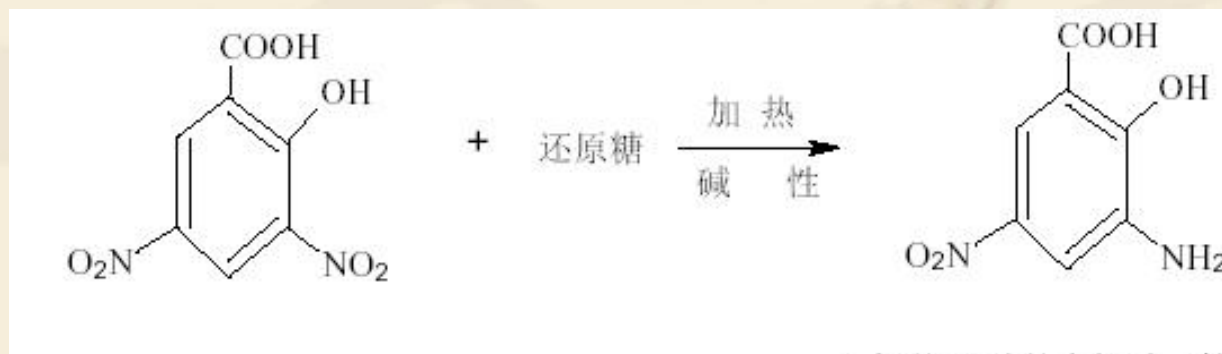
## 一、实验目的

- 1、掌握还原糖和总糖测定的基本原理
- 2、学习比色法测定还原糖的操作方法和分光光度计的使用

## 二、实验原理

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖是指含有自由醛基或酮基的糖类，单糖都是还原糖，双糖和多糖不一定是还原糖，其中乳糖和麦芽糖是还原糖，蔗糖和淀粉是非还原糖。利用糖的溶解度不同，可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来，对没有还原性的双糖和多糖，可用酸水解法使其降解成有还原性的单糖进行测定，再分别求出样品中还原糖和总糖的含量(还原糖以葡萄糖含量计)。

还原糖在**碱性条件**下加热可被氧化成糖酸及其它产物，而氧化剂**3,5-二硝基水杨酸**则被还原为棕红色的**3-氨基-5-硝基水杨酸**。在一定范围内，还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成正比关系，利用分光光度计在**540nm**波长下测定光密度值，查对标准曲线并计算，便可求出样品中还原糖和总糖的含量。由于多糖水解为单糖时，每断裂一个糖苷键需加入一分子水，所以在计算多糖含量时应乘以系数**0.9**。





# 三、实验材料和试剂

1、实验材料 面粉

2、实验试剂

① 1mg/ml葡萄糖标准液

② 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂

③ 碘-碘化钾溶液:

④ 酚酞指示剂:

⑤ 6M HCl和6M NaOH

## 四、实验器材

具塞玻璃刻度试管

50ml离心管

100ml烧杯

100ml三角瓶

100ml容量瓶

移液管：1ml；2ml；10ml

恒温水浴锅

离心机

天平

分光光度计

# 五、操作步骤

## 1、制作葡萄糖标准曲线

取7支具塞刻度试管编号，按表1分别加入浓度为1mg/ml的葡萄糖标准液、蒸馏水和DNS试剂，配成不同浓度的葡萄糖反应液。

将各管摇匀，在沸水浴中准确加热5min取出，冷却至室温，用蒸馏水补足至10ml，加塞后颠倒混匀，在分光光度计上进行比色。调波长540nm，用0号管调零点，分别测出1~6号管的光密度值。以光密度值为纵坐标，葡萄糖含量(mg)为横坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。

表1 葡萄糖标准曲线制作

| 管号 | 1mg/ml<br>葡萄糖<br>标准液<br>(ml) | 蒸馏<br>水<br>(ml) | DNS<br>(ml) | 葡萄糖<br>含量(mg) | 光密度值<br>(OD-540nm) |
|----|------------------------------|-----------------|-------------|---------------|--------------------|
| 0  | 0                            | 2               | 1.5         |               |                    |
| 1  | 0.2                          | 1.8             | 1.5         |               |                    |
| 2  | 0.4                          | 1.6             | 1.5         |               |                    |
| 3  | 0.6                          | 1.4             | 1.5         |               |                    |
| 4  | 0.8                          | 1.2             | 1.5         |               |                    |
| 5  | 1.0                          | 1.0             | 1.5         |               |                    |
| 6  | 1.2                          | 0.8             | 1.5         |               |                    |



## 2、样品中还原糖和总糖的测定

### ① 还原糖的提取

准确称取**3.00g**食用面粉，放入**100ml**烧杯中，先用少量蒸馏水调成糊状，然后补足至**50ml**蒸馏水，搅匀，置**50℃**恒温水浴中保温**20min**，使还原糖浸出。将浸出液(含沉淀)转移到**50ml**离心管中，于**4,000r/min**离心**5min**，沉淀可用**20ml**蒸馏水洗一次，再离心，将二次离心的上清液收集在**100ml**容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，混匀，作为还原糖待测液。

## ② 总糖的水解和提取

准确称取1.00g食用面粉，放入100ml三角瓶中，加15ml蒸馏水及10ml 6M HCl，置沸水浴中加热水解30min(水解是否完全可用碘-碘化钾溶液检查)。待三角瓶中的水解液冷却后，加入1滴酚酞指示剂，用6mol/l NaOH中和至微红色，用蒸馏水定容在100ml容量瓶中，混匀。将定容后的水解液过滤，取滤液10ml，移入另一100ml容量瓶中定容，混匀，作为总糖待测液。

### ③ 显色和比色

取4支具塞刻度试管，编号，按表2所示分别加入待测液和显色剂，空白调零可使用制作标准曲线的0号管。加热、定容和比色等其余操作与制作标准曲线相同。

表2 样品还原糖测定

| 管号 | 还原糖待测液 (mL) | 总糖待测液 (mL) | 蒸馏水 (mL) | DNS (mL) | 光密度值 (OD-540nm) | 查曲线葡萄糖量 (mg) |
|----|-------------|------------|----------|----------|-----------------|--------------|
| 7  | 0.5         |            | 1.5      | 1.5      |                 |              |
| 8  | 0.5         |            | 1.5      | 1.5      |                 |              |
| 9  |             | 1          | 1        | 1.5      |                 |              |
| 10 |             | 1          | 1        | 1.5      |                 |              |

## 五、结果与计算

计算出7、8号管光密度值的平均值和9、10管光密度值的平均值，在标准曲线上分别查出相应的还原糖毫克数，按下式计算出样品中还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖(\%)} = \frac{\text{查曲线所得葡萄糖毫克数} \times \text{提取液总体积/测定时取用体积}}{\text{样品毫克数}} \times 100$$

$$\text{总糖(\%)} = \frac{\text{查曲线所得水解后还原糖毫克数} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品毫克数}} \times 0.9 \times 100$$



## 六、注意

- 1、离心时对称位置的离心管必须配平。
- 2、标准曲线制作与样品测定应同时进行显色，并使用同一空白调零点和比色。

## [思考题]

- 1、3,5-二硝基水杨酸比色法是如何对总糖进行测定的？
- 2、如何正确绘制和使用标准曲线？

分光光度计的基本原理是溶液中的物质在光的照射下，产生了对光吸收的效应，物质对光的吸收是具有选择性的。各种不同的物质都具有其各自的吸收光谱，因此当某单色光通过溶液时，其能量就会被吸收而减弱，光能量减弱的程度和物质的浓度有一定的比例关系，也即符合比色原理——**Lambert-Beer's law**:

数学表达式:

$$A = \lg(1/T) = KCL$$

**A**为吸光度

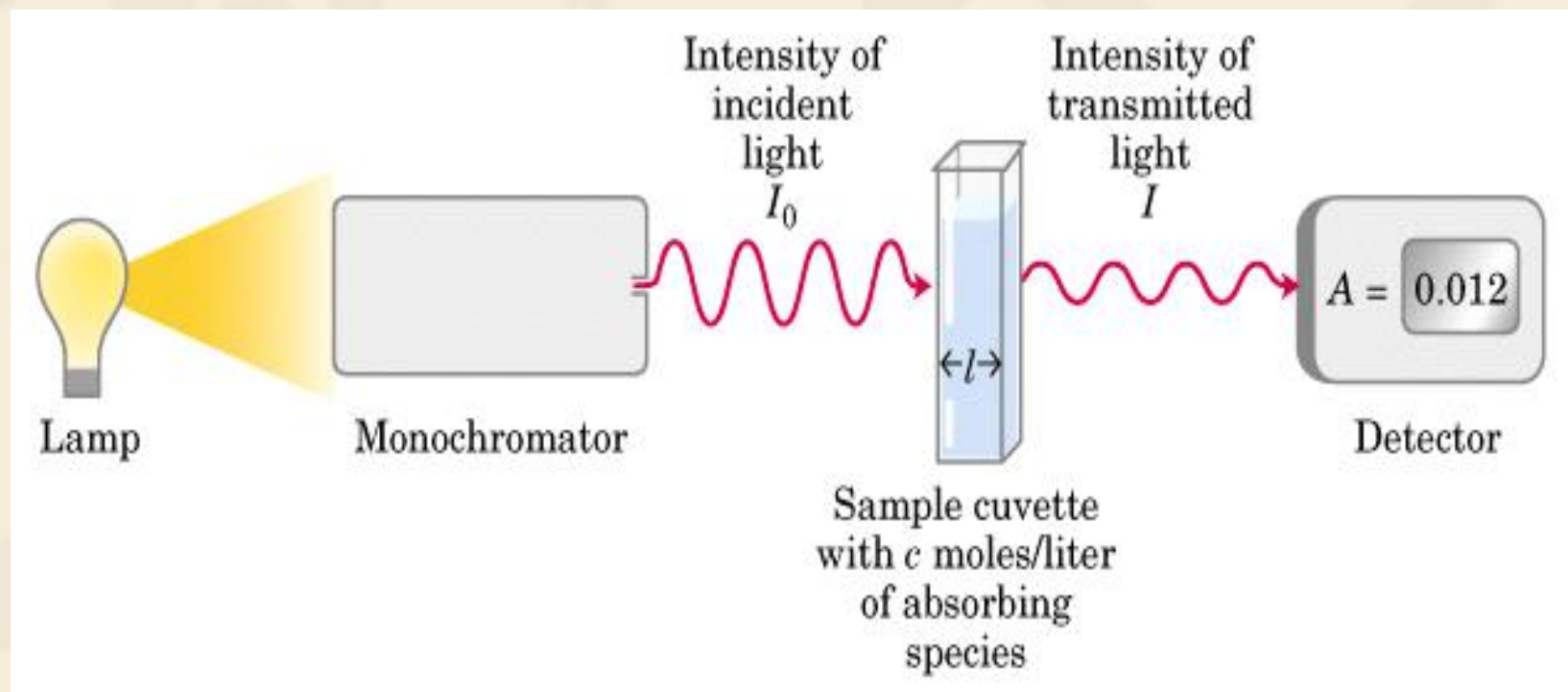
**T**为透射率,是投射光强度比上入射光强度

**C**为吸光物质的浓度

**L**为吸收层厚度

**K**为吸收系数

物理意义是当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时，其吸光度**A**与吸光物质的浓度**C**及吸收层厚度**L**成正比。







## 仪器操作键介绍

“方式设定”键 (**MODE**)：用于设置测试方式

“**100%T/0ABS**”键：用于自动调整

**100.0%T(100.0透射比)或0ABS(零吸光度)**

“**0%T**”键：用于自动调整零透射比

“波长设置”旋钮：用于设置分析波长

## 样品测试操作

- ① 打开电源开关，使仪器预热**20分钟**
- ② 用“**波长设置**”按钮将波长设置在您将要使用的分析波长位置上
- ③ 打开样品室盖，将挡光体插入比色皿架，并将其推或拉入光路
- ④ 盖好样品室盖，按“**0%T**”键调透射比零
- ⑤ 取出挡光体，盖好样品室盖，按“**100%T**”调**100%**透射比
- ⑥ 按“**方式键**”（**MODE**）将测试方式设置为吸光度方式(**A**)
- ⑦ 将参比溶液和被测溶液分别倒入比色皿中
- ⑧ 打开样品室盖，将盛有溶液的比色皿分别插入比色皿槽中，盖上样品室盖
- ⑨ 将参比溶液推入或拉入光路中，按“**100%T**”调零**A**
- ⑩ 将被测溶液拉入光路中，此时，显示器上所显示是被测样品的吸光度参数

实验完成后，关闭电源，洗净比色皿，并盖好盖布。