

中 华 人 民 共 和 国 国 家 标 准

食 品 中 葡 萄 糖 的 测 定 方 法
酶 - 比 色 法 和 酶 - 电 极 法

Method for determination of glucose in food
—Enzyme-colorimetric method and enzyme-electrode method

国 家 技 术 监 督 局 发 布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

**食品中葡萄糖的测定方法
酶-比色法和酶-电极法**

GB/T 16285—1996

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

电 话:68522112

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

版权专有 不得翻印

*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 13 千字

1996年10月第一版 1996年10月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·1-12951 定价 6.00 元

*

标 目 296—14

前 言

食品中葡萄糖的测定方法,一般采用《国际食糖分析方法统一委员会》规定的“兰-埃农法”(Lane and Eynon's method)和“姆松-华尔格法”(Munson and Walker's method),即菲林氏溶液氧化还原滴定法。此法虽沿用已久,但测定结果只是近似值。因使用菲林氏溶液滴定葡萄糖(还原糖)时,其他具有还原能力的单糖会干扰测定结果。本标准采用的酶-比色法和酶-电极法是在检索了近 20 年 107 篇国外文献的基础上,经过反复实验、验证而制定的。酶-比色法和酶-电极法使用的葡萄糖氧化酶(GOD)具有专一性,只能催化葡萄糖水溶液中的 β -D-葡萄糖起反应(被氧化),因此测定结果是真实值。

本标准的酶-比色法为仲裁法;酶-电极法为快速法。

本标准的附录 A、附录 B 都是标准的附录。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:中国农垦北方食品监测中心(酶-比色法);山东省科学院生物研究所(酶-电极法)。

本标准经全国食品工业标准化技术委员会秘书处审核。

本标准主要起草人:张宗城、刘宁、冯德荣、孙士青、宋家华、郝煜。

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 酶-比色法	1
3 酶-电极法	3
附录 A(标准的附录) 葡萄糖氧化酶、过氧化物酶的技术要求、试验方法及判定规则	6
附录 B(标准的附录) 葡萄糖氧化酶酶膜圈性能判定方法	6

中华人民共和国国家标准

食品中葡萄糖的测定方法 酶-比色法和酶-电极法

GB/T 16285—1996

Method for determination of glucose in food
—Enzyme-colorimetric method and enzyme-electrode method

1 范围

本标准规定了用酶-比色法和酶-电极法测定食品中葡萄糖的方法。

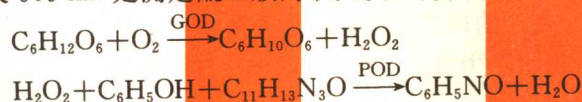
本标准适用于各类食品中葡萄糖的测定,亦适用于食品中其他组分转化为葡萄糖的测定。

本标准酶-比色法的最低检出限量为 0.01 μg (葡萄糖)/mL(试液);酶-电极法的最低检出限量为 1.0 mg/100 mL。

2 酶-比色法

2.1 原理

葡萄糖氧化酶(GOD)在有氧条件下,催化 β -D-葡萄糖(葡萄糖水溶液状态)氧化,生成 D-葡萄糖酸- δ -内酯和过氧化氢。受过氧化物酶(POD)催化,过氧化氢与 4-氨基安替比林和苯酚生成红色醌亚胺。在波长 505 nm 处测定醌亚胺的吸光度,计算食品中葡萄糖的含量



2.2 试剂

2.2.1 组合试剂盒

1 号瓶:内含 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0)100 mL,其中 4-氨基安替比林为 0.001 54 mol/L;

2 号瓶:内含 0.022 mol/L 苯酚溶液 100 mL;

3 号瓶:内含葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)400 U(活力单位)、过氧化物酶(辣根,peroxidase)1 000 U(活力单位)。

1、2、3 号瓶须在 4℃左右保存。

2.2.2 酶试剂溶液:将 1 号瓶和 2 号瓶的物质充分混合均匀,再将 3 号瓶的物质溶解其中,轻轻摇动(勿剧烈摇动),使葡萄糖氧化酶和过氧化物酶完全溶解。此溶液须在 4℃左右保存,有效期 1 个月。

2.2.3 0.085 mol/L 亚铁氰化钾溶液:称取 3.7 g 亚铁氰化钾[$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,GB 1273,分析纯],溶于 100 mL 重蒸馏水中,摇匀。

2.2.4 0.25 mol/L 硫酸锌溶液:称取 7.7 g 硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,GB 666,分析纯),溶于 100 mL 重蒸馏水中,摇匀。

2.2.5 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 4 g 氢氧化钠(GB 629,分析纯),溶于 1 000 mL 重蒸馏水中,摇匀。

2.2.6 葡萄糖标准溶液:称取经 100±2℃烘烤 2 h 的葡萄糖(HG 3—1094,分析纯)1.000 0 g,溶于重

国家技术监督局 1996-04-10 批准

1996-12-01 实施

蒸馏水中,定容至 100 mL,摇匀。将此溶液用重蒸馏水稀释 $V_{2.00} \rightarrow V_{100}$,即为 200 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖标准溶液。

2.3 仪器和设备

实验室常规仪器及下列各项:

- 2.3.1 研钵或粉碎机。
- 2.3.2 分析筛。
- 2.3.3 组织捣碎机。
- 2.3.4 恒温水浴锅。
- 2.3.5 可见光分光光度计。
- 2.3.6 微量移液管:1.00 mL,精度 0.01 mL。

2.4 试样的制备

2.4.1 固体样品

粉末状样品:取有代表性的样品至少 200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

颗粒状样品:取有代表性的样品至少 200 g,用粉碎机粉碎,或用研钵研细,通过 100 目分析筛,置于密闭的玻璃容器内。

新鲜水果、蔬菜等固体样品:取有代表性的可食部分至少 200 g,用组织捣碎机捣碎,置于密闭的玻璃容器内。

2.4.2 糊状样品

取有代表性的样品至少 200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

2.4.3 固液体样品

取有代表性的样品至少 200 g,用组织捣碎机捣碎,置于密闭的玻璃容器内。

2.4.4 液体样品

取有代表性的样品至少 200 mL,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。如样品中含二氧化碳,须用三角瓶取 200 mL,旋摇至基本无气泡,安装冷凝管,置沸水浴中加热 10 min,取出冷却至室温。

2.5 试液的制备

2.5.1 不含蛋白质的试样:用 100 mL 烧杯称取试样(2.4)1~10 g(精确至 0.000 1 g),加少量重蒸馏水,转移到 250 mL 容量瓶中,稀释至刻度。摇匀后用快速滤纸过滤。弃去最初滤液 30 mL,即为试液。

试液中葡萄糖含量大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,应适当增加定容体积。

2.5.2 含蛋白质的试样:用 100 mL 烧杯称取试样(2.4)1~10 g(精确至 0.000 1 g),加少量重蒸馏水,转移到 250 mL 容量瓶中,加入 0.085 mol/L 亚铁氰化钾溶液(2.2.3)5 mL、0.25 mol/L 硫酸锌溶液(2.2.4)5 mL 和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液(2.2.5)10 mL,用重蒸馏水定容至刻度。摇匀后用快速滤纸过滤。弃去最初滤液 30 mL,即为试液。

试液中葡萄糖含量大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,应适当增加定容体积。

2.6 分析步骤

2.6.1 标准曲线的绘制

用微量移液管取 0.00,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL 葡萄糖标准溶液(2.2.6),分别置于 10 mL 比色管中,各加入 3 mL 酶试剂溶液(2.2.2),摇匀,在 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴锅中恒温 40 min。冷却至室温,用重蒸馏水定容至 10 mL,摇匀。用 1 cm 比色皿,以葡萄糖标准溶液含量为 0.00 的试剂溶液调整分光光度计的零点,在波长 505 nm 处,测定各比色管中溶液的吸光度。

以葡萄糖含量为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制标准曲线。

2.6.2 试液吸光度的测定

用微量移液管取 0.50~5.00 mL 试液(2.5)(依试液中葡萄糖的含量而定),置于 10 mL 比色管中。以下按 2.6.1 步骤操作,但须用等量试液(2.5)调整分光光度计的零点。

测出试液吸光度后,在标准曲线上查出对应的葡萄糖含量。

2.7 分析结果的表述

样品中葡萄糖的含量以质量百分率表示,按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{C}{m \times \frac{V_2}{V_1}} \times \frac{1}{1\,000 \times 1\,000} \times 100$$

$$= \frac{C}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 10\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中: X_1 ——样品中葡萄糖的含量,质量百分率, %;

C ——标准曲线上查出的试液中葡萄糖含量, μg ;

m ——试样的质量, g

V_1 ——试液的定容体积, mL;

V_2 ——测定时吸取试液的体积, mL。

计算结果精确至小数点后第二位。

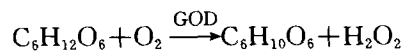
2.8 允许差

同一样品的两次测定值之差,不得超过两次测定平均值的 5.0%。

3 酶-电极法

3.1 原理

葡萄糖氧化酶(GOD)在有氧条件下催化 β -D-葡萄糖(葡萄糖水溶液状态)氧化,生成 D-葡萄糖酸- δ -内酯和过氧化氢。过氧化氢与过氧化氢型电极接触产生电流。该电流值与 β -D-葡萄糖的浓度呈线性比例,在酶电极葡萄糖分析仪上直接显示葡萄糖含量。



3.2 试剂

3.2.1 组合试剂盒

a. 葡萄糖氧化酶酶膜圈:含葡萄糖氧化酶(GOD)15 U(活力单位);须在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 左右保存,有效期 12 个月。

b. 复合试剂:含磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸二钠、氯化钠、苯甲酸钠、庆大霉素硫酸盐;常温保存,有效期 24 个月。

c. β -D-葡萄糖标准溶液:浓度 100.0 mg/100 mL;密封保存,有效期 12 个月。

3.2.2 缓冲溶液

将一袋复合试剂(3.2.1b)溶解在 1 000 mL 蒸馏水中,摇匀。pH=7.2 $\pm$ 0.1。

3.3 仪器和设备

实验室常规仪器及下列各项:

3.3.1 研钵或粉碎机。

3.3.2 分析筛。

3.3.3 组织捣碎机。

3.3.4 酶电极葡萄糖分析仪:直接读数式,测量范围 $0\sim 100.0$ mg/100 mL(β -D-葡萄糖);测量精度 ± 1.0 mg/100 mL(β -D-葡萄糖)。

3.3.5 微量进样器:容量 50 μL ,精度 1 μL 。

3.4 试样的制备

3.4.1 固体样品

粉末状样品:取有代表性的样品至少 200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

颗粒状样品:取有代表性的样品至少 200 g,用粉碎机粉碎,或用研钵研细,通过 100 目分析筛,置于密闭的玻璃容器内。

新鲜水果、蔬菜等固体样品:取有代表性的可食部分至少 200 g,置于密闭的玻璃容器内。

3.4.2 糊状样品

取有代表性的样品至少 200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

3.4.3 固液体样品

取有代表性的样品至少 200 g,用组织捣碎机捣碎,置于密闭的玻璃容器内。

3.4.4 液体样品

取有代表性的样品至少 200 mL,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。如样品中含有二氧化碳,须用三角瓶取 200 mL,摇至基本无气泡,安装冷凝管,置沸水浴中加热 10 min,取出冷却至室温。

3.5 试液的制备

3.5.1 固体试样和固液体试样

一般固体试样和固液体试样:称取试样(3.4)1~10 g(使之定容后葡萄糖含量为 1~200 mg/mL)于 100 mL 烧杯内,精确至 0.000 1 g,用蒸馏水移入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,放置 30 min(摇动 2~3 次)。用快速滤纸或脱脂棉过滤。弃去最初滤液,收集 1~2 mL 滤液于带盖小试管中。

水果、蔬菜试样:称取试样(3.4)1~10 g 于 100 mL 烧杯内(使之定容后葡萄糖含量为 1~200 mg/mL),精确至 0.000 1 g。加入煮沸的蒸馏水 30~50 mL 和 5 mL 缓冲溶液(3.2.2),继续煮沸 3~5 min,冷却至室温后用研钵研细或用组织捣碎机捣碎。用蒸馏水移入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。用快速滤纸或脱脂棉过滤。弃去最初滤液,收集 1~2 mL 滤液于带盖小试管中。

食用葡萄糖试样:称取试样(3.4)1~10 g 于 100 mL 烧杯内,精确至 0.000 1 g。加入约 50 mL 蒸馏水,溶解后煮沸 2 min。冷却后用蒸馏水移入 1 000 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。

3.5.2 糊状和液体试样

称取试样(3.4)1~10 g(使定容后葡萄糖含量为 1~200 mg/mL)于 100 mL 烧杯内,精确至 0.000 1 g。用蒸馏水移入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。用快速滤纸或脱脂棉过滤(如溶液呈透明状,可免除过滤)。弃去最初滤液,收集 1~2 mL 滤液于带盖小试管中。

3.6 分析步骤

3.6.1 校正仪器

从组合试剂盒中取出电极,将其表面清理干净,吸取缓冲溶液(3.2.2)滴在电极表面。用小镊子取一片酶膜圈,安装在电极表面,使酶膜圈中心和电极中心的白金完全贴紧,形成无气泡的薄层液体,然后将电极安装在反应池内。

仪器开机后,缓冲溶液即自动进入反应池,并自行冲洗。当仪器出现进样指令后,用微量进样器准确吸取 25 μ L 标准溶液(3.2.1c),用滤纸擦净针尖外部,将标准溶液注入进样口内。20~40 s 后仪器自动显示标准溶液的指示值。再等 30~60 s,仪器自行完成冲洗过程,即可重复注入标准溶液(3.2.1c)数次,直至仪器显示允许开始测定样品。当连续两次标准溶液显示值的相对误差小于 2.0% 时,即完成校正步骤。

3.6.2 测定样品

用试液(3.5)冲洗微量进样器,至少两次。准确吸取 25 μ L 试液(3.5),用滤纸擦干针尖外部,注入进样口。20~40 s 后读取显示值。

3.7 分析结果的表述

样品中葡萄糖的含量以质量百分率表示,按式(2)计算:

$$X_2 = \frac{\frac{R \times V_3}{1\,000 \times m_1}}{100} \times 100 = \frac{R \times V_3}{1\,000 \times m_1} \dots\dots\dots (2)$$

式中: X_2 ——样品中葡萄糖的含量,质量百分率, %;

R ——仪器测定值, mg/100 mL;

V_3 ——试液的定容体积, mL;

m_1 ——试样的质量, g。

计算结果精确至小数点后第 1 位。

3.8 允许差

同一样品的两次测定值之差:

样品中葡萄糖含量小于 1.0% 时, 不得超过两次测定平均值的 5.0%;

样品中葡萄糖含量大于或等于 1.0% 时, 不得超过两次测定平均值的 2.0%。

附录 A

(标准的附录)

葡萄糖氧化酶、过氧化物酶的技术要求、试验方法及判定规则

A1 技术要求

A1.1 酶活力

葡萄糖氧化酶酶活力(U/mg): ≥ 20 ;过氧化物酶酶活力(U/mg): ≥ 50 。

A1.2 干扰酶

葡萄糖氧化酶、过氧化物酶中都不得含有纤维素酶、淀粉葡萄糖苷酶、 β -果糖苷酶、半乳糖苷酶和过氧化氢酶。

A2 试验方法

用移液管吸取 0.50 mL 葡萄糖标准溶液(2.2.6),置于 10 mL 比色管中,加入 100 μ g 可溶性淀粉(HGB 3095,分析纯)、100 μ g 纤维二糖(生化试剂)、100 μ g 乳糖(HG 3-1 000,分析纯)和 100 μ g 蔗糖(HG 3-1001,分析纯),再加入 3 mL 酶试剂溶液(2.2.2)。以下按 2.6.1 步骤操作。

测定吸光度后,在标准曲线(按 2.6.1)上查出对应的葡萄糖含量,按式(A1)计算葡萄糖的回收率:

$$F = \frac{C}{0.5 \times 200} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A1)$$

式中: F ——葡萄糖的回收率, %;

C ——葡萄糖的实测值, μ g。

A3 判定规则

测得葡萄糖的回收率,如在 95%~105% 范围内,则判定葡萄糖氧化酶和过氧化物酶符合要求。

附录 B

(标准的附录)

葡萄糖氧化酶酶膜圈性能判定方法

B1 酶膜活性的判定

校正仪器时,注入 25 μ L 标准溶液(3.2.1c),仪器显示标准溶液的指示值后,按下酶膜响应键,则显示出酶膜活性相对值。如相对值大于 10.0,则表示酶膜活性符合要求;相对值小于 10.0 时,应更换新酶膜。

B2 酶膜线性的判定

校正仪器操作步骤完成后,仪器显示酶膜线性检查指令。用微量进样器注入 50 μ L 标准溶液(3.2.1c),如显示值大于 184.0,表示酶膜线性良好;小于 184.0 时,应按下仪器线性校正键,进行线性

校正,或更换新酶膜。

B3 酶膜抗干扰性的判定

校正仪器操作步骤完成后,用微量进样器吸取 25 μL 新配制的 1% 亚铁氰化钾溶液,注入反应池进样口。当仪器显示值为 $-2.0 \sim +6.0$ 时,表示酶膜抗干扰符合要求;否则应更换新酶膜。

1% 亚铁氰化钾溶液的配制:用 100 mL 烧杯准确称取 1.15 g 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, GB 1273, 分析纯],加入少量蒸馏水使之溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。
