

第一部分 糖类

实验一 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖和总糖

一、目的和要求

掌握 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法的原理和方法，并用此法测定山芋粉中的还原糖和总糖。

二、基本原理

糖的测定方法有物理和化学两类。物理方法是通过糖的折光率、比旋度的变化来进行测定，也可利用比重计进行测定。比较精确和常用的方法是化学测定法。

在进行糖的定量测定时，还应该明确什么是化学计量法，什么是非化学计量法。因为用于还原糖定量的方法只有少数是化学计量法，如次亚碘酸法；而大多数是非化学计量反应，如铜试剂法，3,5-二硝基水杨酸法，硫酸或盐酸处理后的比色法等，也就是写不出化学反应式的反应。使用这些方法时要严格按照规定操作，并经常作标准曲线。一般说来，在测单一的糖时问题不大，但当有其他糖存在时应特别注意。选择不同的波长也可以分别测定不同的糖。

用 3,5-二硝基水杨酸比色法定量测定还原糖是糖定量测定的一种基本方法。还原糖是指含有自由醛基或酮基的糖类。单糖都是还原性糖；双糖和多糖不一定是还原糖，其中乳糖和麦芽糖是还原糖。利用单糖、双糖与多糖的溶解度不同可使它们分离开，并且可用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖彻底水解成具有还原性的单糖，再进行测定，这样就可以分别求知样品中总糖和还原糖的量。

3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物，在一定范围内还原糖的量和反应液的颜色深度成正比。因此，可利用分光光度计进行比色测定，求得样品的含糖量。



三、材料与试剂

1. 实验材料：山芋粉。

2. 实验试剂

(1) 1g/L 葡萄糖标准液：准确称取 100mg 分析纯葡萄糖（预先在 105℃ 烘干至恒重），置于小烧杯中，用少量蒸馏水溶解后，定量转移到 100mL 容量瓶中，以蒸馏水定容至刻度，摇匀，冰箱保存备用。

(2)3,5-二硝基水杨酸试剂 (DNS 试剂) :

甲液 ——溶解 6.9g 结晶酚于 15.2mL 10% NaOH 溶液中,并稀释至 69mL,在此溶液中加入 6.9g 亚硫酸氢钠。

乙液 ——称取 255g 酒石酸钾钠,加到 300mL 10% NaOH 溶液中,再加入 880mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。

将甲液与乙液混合即得黄色试剂,储于棕色试剂瓶中。室温放置 7~10 天后使用。

(3)6mol/L HCl 溶液

(4)6mol/L NaOH 溶液

四、实验器材

①容量瓶 (100mL、25mL)

②吸量管(1mL、5mL)

③量筒 (100mL)

④吸量管架

⑤试管

⑥大试管

⑦标签纸

⑧滴管

⑨玻棒

⑩抽滤瓶或离心机

⑪擦镜纸

⑫吸耳球

⑬分光光度计

⑭恒温水浴箱 (50℃、100℃)

⑮称量纸

⑯烧杯 50mL 或 100mL)

⑰比色管(25mL)

五、操作方法

1. 葡萄糖标准曲线的制作

取 6 支比色管,分别按表 1 顺序加入各种试剂。

表 1

管 号	0(空白)	1	2	3	4	5
含糖总量(mg)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
葡萄糖标准液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水(mL)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
DNS 试剂(mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

混匀后置 100℃恒温水浴保温 5min,立即用流动水冷却。最后加蒸馏水稀释至 25mL 刻度线。

等各管混匀后,在 540nm 波长下,用 0 号管调零,分别读取各管的光吸收值;以光吸收值为纵坐标,以葡萄糖的质量 (mg) 为横坐标绘制标准曲线。

2. 样品中还原糖和总糖含量的测定

(1)样品中还原糖的提取:准确称取 1g 山芋粉,放入大试管中。先以少量水调成糊状,然后加 30mL 蒸馏水,搅匀,50℃恒温水浴保温 20min,使还原糖浸出。抽滤或离心,用少量蒸馏水洗涤残渣。将滤液收集在 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)样品中总糖的水解和提取:准确称取 0.2g 山芋粉,放入大试管中。用吸量管加入 5mL 6mol/L HCl 溶液、8mL 蒸馏水,摇匀后在 100℃恒温水浴保温 30min,经流动水冷却后,用 6mol/L NaOH 溶液中和至中性,抽滤或离心,滤液用蒸馏水定容到 100mL 容量瓶中,此为总糖待测液。使用时把它稀释 1 倍再按量进行。

(3) 样品中含糖量的测定：取 5 支比色管，编号，按表 2 加入各种试剂。

表 2

管 号	空 白	还原糖测定管		总糖测定管	
		I	II	①	②
还原糖待测液(mL)	0	1.0	1.0	0	0
总糖待测液(mL)	0	0.0	0	1.0	1.0
蒸馏水(mL)	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DNS 试剂(mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

将上述各管分别混匀，其余操作均与制作葡萄糖标准曲线时相同，测定各管光吸收值。

3. 计算

将 2 管光吸收值平均后在标准曲线上查出相应的还原糖质量 (mg)，按下列公式计算样品中还原糖和总糖含量：

$$\text{还原糖质量分数} / \% = \frac{\text{还原糖质量 (mg)} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品质量 (mg)}} \times 100$$

$$\text{总糖质量分数} / \% = \frac{\text{样品水解后还原糖质量 (mg)} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品质量 (mg)}} \times 100$$

(于晓虹)

实验二 蒽酮比色定糖法

一、目的和要求

1. 了解多糖水解的基本原理和操作方法。
2. 掌握蒽酮比色定糖法的原理及方法。

二、基本原理

多糖含有几百个或更多残基，但只有一个还原基团，因此它的还原能力极弱，对于它们的测定，应先将它们用酸水解成单糖组分。

蒽酮比色法是一种快速而简便的定糖方法，糖类遇浓硫酸脱水生成糠醛或其衍生物，该衍生物与蒽酮发生反应，反应后溶液呈蓝绿色，于 620nm 处有最大吸收。蒽酮也可与其他一些糖类发生反应，但显现的颜色不同，当存在含有较多色氨酸的蛋白质时，反应不稳定，呈现红色。对于以上特定的糖类物质，反应较稳定。

本法多用于测定糖元含量，亦可用于测定葡萄糖含水量。

三、材料与试剂

1. 实验材料：多糖。

2. 实验试剂

(1)浓盐酸溶液

(2)5mol/L 氢氧化钠溶液

(3)KI-I₂ 溶液

(4)Benedict 溶液：溶解 85g 柠檬酸钠及 50g 无水碳酸钠于 400mL 水中，另溶解 8.5g CuSO₄ 于 50mL 热水中，将 CuSO₄ 溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中，边加边搅拌，如有沉淀，可过滤。本试剂可长期使用，如放置时间过久，出现沉淀，可取用其上清液。

(5)2g/L 蒽酮试剂：溶解 2g 蒽酮于 1L 浓硫酸(A. R., $d=1.84, 98\%$) 中，当日配制使用。

(6)0.1g/L 葡萄糖溶液（可加几滴甲苯作防腐剂）

(7)0.1g/L 糖元溶液（可加几滴甲苯作防腐剂）

四、实验器材

①试管及试管架

②吸量管(1mL、5mL)

③恒温水浴箱（100℃）

④制冰机

⑤分光光度计

⑥滴管

⑦白瓷板

五、操作方法

1. 多糖的水解

取约 10mL 多糖溶液放入试管中，加 10 滴浓盐酸溶液，慢慢煮沸，每分钟用滴管取出 1 滴溶液，同已加在白瓷板上的 1 滴碘液相混合，同时取 3 滴溶液，用 NaOH 溶液中和，加入含 5mL Benedict 溶液的试管中，连续取样到 6min 或者适宜的时候，把这些含有 Benedict 溶液的

各测定管放在 100℃ 恒温水浴箱中保温 3min，冷却后观察并解释结果。

2. 制作标准曲线

取 100mg/L 的糖元溶液（或 100mg/L 的葡萄糖溶液）0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mL，分别加入 6 支试管中，用蒸馏水补足至 1.00mL 后，再加入 3.00mL 蒽酮试剂，迅速浸于冰水中冷却，待几支试管均匀加完后，一起浸入 100℃ 恒温水浴箱中，为防止水分蒸发，应在试管口上加盖一个玻璃球。自温度重新升至 100℃ 起计时，准确保温 10min 后取出，用流动水冷却。然后，于室温中平衡片刻（约 10min 左右），再在分光光度计上，波长 620nm，用 0.5cm 厚度的比色杯，以空白管做对照空白，进行比色。

3. 测定样品含糖量

取 1mL 无蛋白的糖类溶液，加入 3.00mL 蒽酮试剂，迅速浸于冰水中冷却，冷却后置于 100℃ 恒温水浴中，准确保温 10min。取出，用流动水冷却后比色。其他条件与测标准曲线相同。

4. 计算

在标准曲线上查出与测得的未知样品的光吸收值相对应的还原糖质量（mg），计算出未知样品还原糖浓度（g/L）。

思考题

1. 本法多用于测定什么样品？
2. 加蒽酮试剂时为什么盛有样品的试管必须浸于冰水中冷却？
3. 本法是否可以用来测定血液、水果、蜂蜜及蔬菜的总糖含量？是否可以用来测定这些物质的还原糖含量？为什么？
4. 分光光度计的原理及操作注意事项是什么？

（于晓虹）

实验三 费林 (Fehling)试剂热滴定定糖法

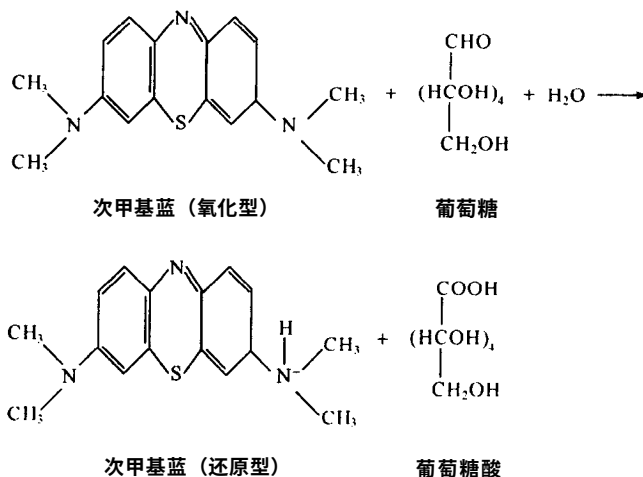
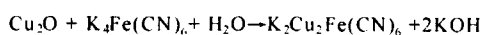
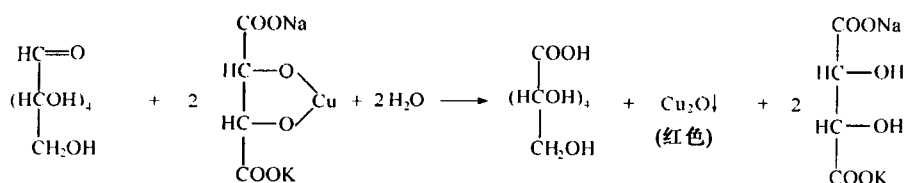
一、目的和要求

1. 初步掌握费林试剂热滴定定糖法的原理和方法。
2. 正确掌握滴定管的使用方法和热滴定终点的判断方法。

二、基本原理

还原糖是指含有自由醛基（如葡萄糖）或酮基（如果糖）的单糖和某些二糖（如乳糖、麦芽糖）。在碱性溶液中，还原糖能将金属离子（ Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 等）还原，而还原糖本身则被氧化成各种羧酸类化合物。该特性常用于还原糖的定性和定量测定。

本实验采用费林试剂热滴定法，费林试剂是氧化剂，由甲、乙两种溶液组成，甲液含硫酸铜和次甲基蓝（氧化还原指示剂）；乙液含氢氧化钠、酒石酸钾钠和亚铁氰化钾。当甲、乙两溶液混合时，硫酸铜与氢氧化钠反应生成天蓝色的氢氧化铜沉淀。在碱性溶液中，酒石酸钾钠与沉淀的氢氧化铜作用形成可溶性的络合物，后者与还原糖（如葡萄糖）进行热滴定时发生下述反应：



三、材料与试剂

1. 实验材料：山芋粉。

2. 实验试剂

(1) 费林试剂

① 费林甲液：称取 15g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 和 0.05g 次甲基蓝，溶于 1000mL 蒸馏水中。

② 费林乙液：称取 50g 酒石酸钾钠、54g 氢氧化钠和 4g 亚铁氰化钾，溶于 1000mL 蒸馏水中。

(2) 标准葡萄糖溶液：称取葡萄糖（预先在 105℃ 烘干至恒重）1g 用少量蒸馏水溶解后加入 8mL 浓盐酸中（防止微生物生长），再用蒸馏水定容至 1000mL。

(3) 6mol/L 盐酸溶液

(4) 10% 氢氧化钠溶液

(5) 85% 乙醇

(6) 酚酞指示剂

(7) 碘试剂：KI 2g, I_2 1g 溶于 10mL 蒸馏水中，用前加蒸馏水 90mL。

四、实验器材

① 酸式滴定管 (25mL)

② 吸量管 (5、10mL) 及吸量管架

③ 容量瓶 (100mL)

④ 电炉或煤气灯

⑤ 石棉网

⑥ 铁架台

⑦ 万能夹和双顶丝

⑧ 锥形瓶 (250mL)

⑨ 滴管

⑩ 点滴板

⑪ 恒温水浴箱 (50℃、100℃)

五、操作方法

1. 空白测定

准确吸取费林甲、乙两种溶液各 5mL 和蒸馏水 5mL 放入 250mL 锥形瓶中，再用滴定管加入一定量的标准葡萄糖液，混匀后放在电炉上均匀加热，应使瓶内溶液在 2min 内达到沸腾，以每 4~5s 1 滴的速度由滴定管滴入标准葡萄糖液直至蓝色消失为止。沸腾前加入的标准葡萄糖液量与沸腾后滴定时所用的标准葡萄糖液量的总和，就是测定空白所耗用的标准葡萄糖液的体积 (V_1) (mL)。

全部滴定过程必须在沸腾状态下快速进行，一般应在 3min 内完成。因此，除控制滴定速度外，滴定前需加入一部分标准葡萄糖液。加入该液的数量，应在正式滴定前的预备滴定试验时确定，同时练习掌握条件。

2. 还原糖的测定

准确称取山芋粉 4g 放入 250mL 锥形瓶中，加入 85% 乙醇 50mL。置 50℃ 恒温水浴浸提半小时，并经常搅拌，过滤，收集滤液，滤渣按上法再用 85% 乙醇处理 2 次，过滤，用 50℃ 的 85% 乙醇洗涤残渣。合并上述滤液，蒸去乙醇，移入 100mL 容量瓶内，用蒸馏水定容至刻度，即为测定还原糖的样品液。

用乙醇 (80%~85%) 提取待测样品的还原糖，是因为用水（甚至用冰水）或稀乙醇 (10%) 提取时，可溶性淀粉均能和还原糖一起溶解，从而导致测出的还原糖含水量偏高，而淀粉含量偏低，若待测样品内无可溶性淀粉（遇碘呈蓝色），则可用水提取还原糖。采用 85% 乙醇提取是假定样品是干燥的，如果样品含水量高，则乙醇浓度需相应提高。

准确吸取样品液 5mL 放入 250mL 锥形瓶中，加入费林甲液、乙液各 5mL，在电炉上加热

至沸腾，然后按空白测定的滴定速度滴入标准葡萄糖液直至蓝色消失，记下滴定所需的体积 (V_2)(mL)。

氧化作用与温度、保温时间、溶液浓度和酸碱度条件有密切关系，除准确量取试剂外，还应严格操作，在滴定样品时，应与空白测定的操作条件尽可能一致。

3. 糖的测定

准确称取山芋粉 1g, 加入 6mol/L 盐酸 10mL, 蒸馏水 15mL, 混匀, 100℃ 恒温水浴保温半小时后, 取出几滴水解, 用碘化钾-碘溶液检查水解是否完全, 若已经水解完全, 则不呈现蓝色。冷却后加入酚酞指示剂 1 滴, 用 10% 氢氧化钠溶液中和至溶液呈微红色。过滤, 滤液定容至 100mL。准确吸取该溶液 10mL, 移入 100mL 容量瓶内并定容至刻度, 即为测定总糖的样品液。

准确吸取样品液 5mL 放入 250mL 锥形瓶内, 加入费林甲液、乙液各 5mL, 混匀后按测定还原糖同样操作步骤和条件进行滴定, 于表 1 中记下耗用标准葡萄糖的体积 (mL)。

表 1

测定样品及编号		取样量 (mL)	费林试剂(mL)		标准葡萄糖液用量(mL)
			甲液	乙液	
空 白	1	5	5	5	
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
还原糖	1	5	5	5	
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
总 糖	1	5	5	5	
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	

计算公式如下：

还原糖（或总糖）质量分数 / %

$$= \frac{(V_1 - V_2) \times \text{标准葡萄糖液的质量浓度 (kg/L)} \times \text{稀释倍数}}{\text{称取样品的质量 (g)}} \times 100$$

式中 V_1 ——测定空白耗用的标准葡萄糖液体积 (mL)；

V_2 ——测定还原糖或总糖时耗用的标准葡萄糖液体积 (mL)。

思考题

1. 本实验所使用的费林试剂含有什么化学成分？它们的作用是什么？
2. 为什么要做空白测定？试说明该法实验误差的来源及消除方法。
3. 用 3,5-二硝基水杨酸比色法和费林试剂热滴定法测定山芋粉还原糖和总糖的含量，比较这两种方法的优缺点。
4. 如何应用费林试剂热滴定法测定植物材料的淀粉含量？

(于晓虹)

实验四 SHS 碱性铜试剂法滴定还原糖

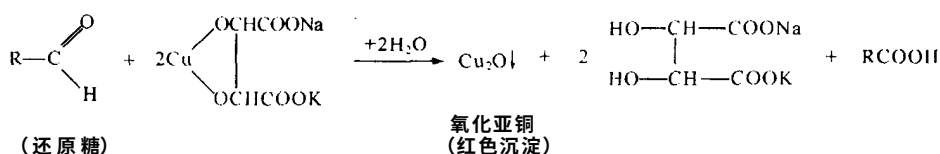
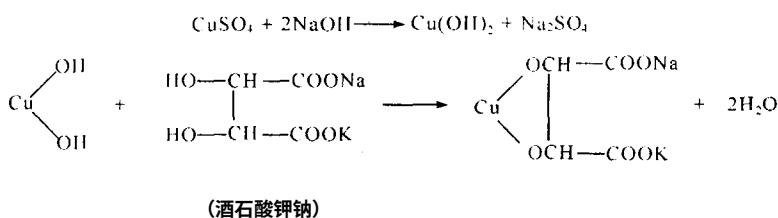
一、目的和要求

1. 掌握 SHS 碱性铜试剂法滴定还原糖的原理——间接碘量法与二价铜离子的还原。
2. 掌握 SHS 碱性铜试剂滴定法的操作方法及要领。
3. 掌握标准硫代硫酸钠溶液的配制及标定。
4. 学会测定微生物发酵液中的总糖及还原糖，或测定小麦萌发前、后种子中还原糖的含量。

二、基本原理

SHS 碱性铜试剂法滴定还原糖 (Shaffery-Hartmann-Somogyi 法) 是利用在碱性条件下, 还原糖溶液可使铜离子 (Cu^{2+}) 还原成亚铜离子 (Cu^+), 后者又被过量的碘氧化。用标准硫代硫酸钠溶液滴定剩余的碘, 即可算出还原糖的含量。其详细反应过程如下:

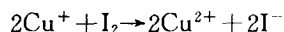
还原糖存在时, 试剂中 Cu^{2+} 被还原成 Cu^+ :



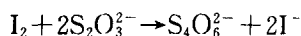
当硫酸加到一定量的 SHS 试剂 (内含碘酸钾、碘化钾、硫酸铜、酒石酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠及草酸钾) 中时, 即有一定的游离碘析出, 反应式如下:



氧化亚铜可被析出的游离碘氧化而溶解。



剩余的碘可用硫代硫酸钠溶液滴定:



还原糖愈多, 产生的氧化亚铜也愈多, 耗去的碘也愈多; 当溶液中碘酸钾量固定不变时, 还原糖愈多时, 碘的剩余量愈少, 滴定耗去的标准硫代硫酸钠溶液的体积也愈少。因此, 用硫代硫酸钠滴定剩余的碘, 可以间接地计算出还原糖的含量。

在测定中, 除 $2\text{Cu}^+ + \text{I}_2 \rightarrow 2\text{Cu}^{2+} + 2\text{I}^-$ 外, 还有副反应 $2\text{Cu}^+ + 4\text{I}^- \rightarrow 2\text{CuI} + \text{I}_2$, 加入草酸钾, 可阻止此副反应。为防止氢氧化铜不稳定, 易沉淀, SHS 试剂中含有酒石酸钾可络合氢氧

化铜。试剂中用无水碳酸钠与碳酸氢钠代替氢氧化钠，可大大提高反应的灵敏度。

本法的优点是终点易于观察，灵敏度较高，测定范围为 0.1~2.0mg 还原糖。

本实验测定植物材料中的还原糖及发酵液中的总糖及还原糖，操作中应注意严格控制煮沸时间及其他条件。

三、材料与试剂

1. 实验材料

未知浓度的糖溶液：可选用果汁、植物提取液、微生物发酵的发酵液、无蛋白血滤液及粮食作物种子粉的乙醇抽提液及水解液等。

2. 实验试剂

(1)SHS 碱性铜试剂：取酒石酸钾钠 12g，无水碳酸钠 25g，碳酸氢钠 25g，同溶于 500mL 蒸馏水中。另准确称取结晶硫酸铜 6.5g 溶于 100mL 蒸馏水中，将硫酸铜溶液边加边搅拌地加入到上面的混合液中，再取碘酸钾 0.80g 准确称量至 0.01g)，溶于约 100mL 蒸馏水中，再加入 18g 碘化钾及 18g 草酸钾，然后合并入上述混合液中。最后，加蒸馏水稀释到 1L。

配制此试剂时碳酸钠、碳酸氢钠及碘酸钾均不要加热，但应不断地搅拌帮助溶解。试剂中碘化钾若已发黄，不宜应用，应使用白色的药品；配制时，应待碘酸钾溶解后，再加入草酸钾及碘化钾，过早加入，碘化钾与空气接触太久会使溶液变黄，使空白偏高，标准曲线不能通过原点。

(2) 标准糖溶液：

1.0g/5mL，即 200mg/L 标准糖溶液；

0.8g/5mL 即 160mg/L 标准糖溶液；

0.6g/5mL 即 120mg/L 标准糖溶液；

0.4g/5mL 即 80mg/L 标准糖溶液；

0.2g/5mL 即 40mg/L 标准糖溶液。

每种溶液中加入几小粒苯甲酸钠以防腐，摇匀，保存于冰箱中。

(3) 碘化钾粉末及 10%碘化钾溶液

(4)8mol/L 盐酸溶液

(5)4mol/L 硫酸溶液

(6)0.1%淀粉指示剂

(7)0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液

(8)0.0017mol/L 重铬酸钾溶液

(9)80%乙醇溶液

(10)3mol/L 盐酸溶液

(11)3mol/L 氢氧化钠溶液

(12)0.5mol/L 氢氧化钠溶液

(13)0.5mol/L 硫酸溶液

(14)0.5%酚酞乙醇溶液

(15)10% 硫酸锌溶液

表明 I_2 即将被滴定完，硫酸铜颜色逐渐显现。滴定到黄色继续变淡，溶液呈苹果绿时，加入 2 滴淀粉指示剂，这时溶液立即变为蓝黑色，继续滴定，加入硫代硫酸钠溶液的速度放慢，溶液逐渐变为浅蓝色透明溶液，直到如同稀的蓝墨水时，小心地逐滴地滴入 0.005mol/L 硫代硫酸钠溶液，至溶液突然变为鲜亮的淡天蓝色（或近似于鸭蛋青色）为止，此时即为终点，记下硫代硫酸钠溶液的耗用量。

6. 如此练习数次，直到学会判断终点，滴定值稳定为止。求滴定值的平均值，算出空白消耗硫代硫酸钠溶液的体积（mL）。

（三）测定葡萄糖标准曲线

1. 按空白练习步骤，将水换成标准葡萄糖溶液，取三份 $5\text{mL } 1.0\text{g/L}$ 溶液进行滴定，依次再取 0.8g/L 、 0.6g/L 、 0.4g/L 、 0.2g/L 进行滴定。

2. 将空白滴定的平均值减去各标准葡萄糖样品滴定的平均值，得出各标准样品的实际消耗硫代硫酸钠的体积（mL），以此为纵坐标，以 5mL 样品含糖的质量（mg）为横坐标，绘制滴定的标准曲线。

（四）测定植物材料及发酵液的总糖或还原糖

一般测定未知浓度的还原糖溶液样品，先将样品作适当稀释，使其还原糖含量在 $0.1 \sim 0.2\text{mg}$ 范围内，然后依上法滴定，最后于标准曲线上查出它的含糖量。未知样品可以是果汁、无蛋白血滤液、发酵液及植物样品等。

1. 植物材料中还原糖的测定

在分析天平上，称未萌发及萌发过的小麦干粉各三份，每份约为 0.5g （记下准确的重量），放入干燥的锥形瓶中，沿瓶壁加入 $15\text{mL } 80\%$ 乙醇溶液，装上回流管，在 85°C 恒温水浴中提取 30min 取出，静止片刻，将上清液滤入 50mL 容量瓶中。同样地，再用 10mL 乙醇进行第二次提取，上清液滤入同一容量瓶中，如此反复几次，直到提取完全为止。

检查方法：第三次提取以后，取其一一份，用测定标准葡萄糖液的方法，检验提取液是否提取完全。

提取完全后，用数毫升 80% 热乙醇洗涤瓶中残渣，滤入 50mL 容量瓶中，最后稀释至刻度。摇匀，用同样方法测定提取液中还原糖含量。

计算植物样品中每克干重所含还原糖的质量（mg）以葡萄糖为代表）。

2. 测定微生物发酵中发酵液的总还原糖及可溶性还原糖

（1）样品稀释：用大口吸量管吸取 5mL 发酵液，放入 25mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀。注意，擦去吸量管外壁的发酵液，再放出吸量管内的发酵液，如易起泡，可预先加几滴乙醇消沫。

（2）酸水解：用吸量管吸取 0.5mL 已稀释的样品，放入到 50mL 容量瓶中，加 $5\text{mL } 3\text{mol/L}$ 盐酸溶液，置于 100°C 恒温水浴中保温，进行酸水解，保温（保温时间根据淀粉或多糖含量高低而定，一般地，随发酵时间的延长而缩短酸水解时间） $10 \sim 45\text{min}$ （如测可溶性还原糖可少去这一步操作）。

冷却后先用 3mol/L ，后用 0.5mol/L 氢氧化钠溶液中和，加入 3 滴 0.5% 酚酞指示剂调到微红，移到 50mL 容量瓶中，稀释至刻度。

3. 除去蛋白质

如果样品需去除蛋白质，可依下法处理：向冷却后的水解液 1 加入 $10\text{mL } 10\%$ 硫酸锌溶液（若测可溶性还原糖，应取前述稀释 5 倍的发酵液 10mL ， 3000r/min 离心 15min ，离心后，取

5mL 上清液,加 10mL 10%硫酸锌溶液),加 3 滴 0.5%酚酞指示剂,先用 3mol/L 氢氧化钠溶液调酸度,再小心地用 0.5mol/L 氢氧化钠溶液调至微红(若过头,可用 0.05mol/L 硫酸溶液调回),稀释至刻度,摇匀,过滤,收集滤液。

4. 与 SHS 碱性铜试剂反应

取 6 支大试管(或 100mL 锥形瓶),3 个作样品管,3 个作空白对照管,按表 1 操作。

表 1

	样品 1	样品 2	样品 3	空白 1	空白 2	空白 3
滤液(mL)	5	5	5	—	—	—
蒸馏水(mL)	—	—	—	5	5	5
SHS 碱性铜试剂(mL)	5	5	5	5	5	5
置 100℃ 恒温水浴保温 15min						
置 35℃ 恒温水浴冷却 5~7min(切勿摇动)						
0.05mol/L 硫酸溶液(mL)	5	5	5	5	5	5
0.005mol/L 硫代硫酸钠溶液(mL)	A			B		

根据滴定差值(空白滴定值 B—样品滴定值 A),从糖的滴定标准曲线中可查出相当于糖的质量(mg),再计算 100mL 发酵液所含糖的质量(g)。

$$\begin{aligned} \text{发酵液含糖量} / \% &= \frac{\text{从标准曲线中查出的糖的质量(mg)}}{\text{测定所取体积(mL)}} \times \text{稀释倍数} \\ &= \frac{W(\text{mg})}{5} \times \left(\frac{25}{5} \times \frac{50}{0.5} \right) \times 100 \\ &= \frac{W(\text{mg})}{10^3} \times 100 \end{aligned}$$

式中 W——5mL 稀释液中含糖量。

思考题

1. 本实验采用什么物质为标定硫代硫酸钠溶液基准物质?基准物质应具备什么条件?
2. 除用本实验指出的物质外,是否可以选用碘酸钾(KIO₃)为基准物质?为什么?选用它后在滴定过程中出现的颜色变化会有什么不同?此外,是否还可使用高锰酸钾及溴酸钾为基准物质?
3. 标定硫代硫酸钠溶液浓度时,选用浓度约大一倍的基准物质溶液有何优点?
4. 氧化还原反应和哪些因素有关?测定时应注意些什么?
5. 测定中控制加热时间、试管口加盖、控制滴定速度等有何意义?
6. 何谓直接碘量法及间接碘量法?碘量法的主要误差有哪些?应如何避免?
7. 为什么用本法测定水果、蔬菜、糖蜜等样品含糖量时要加入盐酸(或硫酸)溶液共同加热?有或无这一步,测出来的糖是哪一种糖?
8. 小麦萌发前后还原糖含量有何变化?
9. 不同发酵时间发酵液中总糖含量有何变化?

(于晓虹)

实验五 Somogyi 铜试剂比色法测定还原糖

一、目的和要求

1. 掌握 Somogyi 铜试剂比色法测定还原糖的原理和方法。
2. 学会测定米粉或面粉的淀粉含量。

二、基本原理

还原糖将铜试剂还原生成氧化亚铜，在浓硫酸存在下，砷钼酸试剂可与氧化亚铜生成蓝色溶液，生成的砷钼酸溶液在 560nm 下的光密度与还原糖含量呈正比关系。利用这点，将 Somogyi 铜试剂法由滴定改为比色，更改后其方法的灵敏度提高，测定范围为 25~200 μ g，而且产物很稳定。所以，不仅可以提高测定速度，而且便于测定多份样品。因此，Somogyi 铜试剂比色法是目前糖定量测定法中较好的方法之一。

本实验通过用 Somogyi 铜试剂比色法测定还原糖，从而测出米粉或面粉中的淀粉含量。

三、材料与试剂

1. 实验材料：未知样品液或水稻米粉，或小麦面粉。
2. 实验试剂

(1) Somogyi 铜试剂：称取酒石酸钾钠 12g，无水碳酸钠 24g，研成细粉，再称取碳酸氢钠 16g，三者分别溶于三份 200mL 蒸馏水中，然后将这三份溶液混匀。另外取硫酸铜 4g，溶于约 200mL 蒸馏水中，完全溶解后，将此液慢慢地、边加边搅拌地加到上面的混合液中。然后再称取 180g 无水硫酸钠溶于其中，最后将上述混合液放在 100℃ 恒温水浴箱中保温 20min。冷却后若出现沉淀，应过滤除去，最后稀释到 1000mL。此液易出现结晶，应保存于 20℃ 以上的地方。

(2) 砷钼酸试剂：称取 25g 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ ，溶于 450mL 蒸馏水中，再加入 22mL 浓硫酸，充分混匀。另取 3g 砷酸氢钠 $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ ，溶于 25mL 蒸馏水中，将此溶液与上述酸性钼酸铵溶液混合均匀，将这份最终的混合液于 37℃ 处保温 24~48h 后可以用于测定。此试剂应储于棕色瓶子中。

(3) 标准葡萄糖溶液 (150g/L)：准确称取 150mg 葡萄糖，溶于 1000mL 蒸馏水中，溶液中可加几滴甲苯或几粒苯甲酸钠防腐。

(4) 2% 盐酸溶液

(5) 10% 氢氧化钠溶液

(6) 甲基红指示剂

(7) 5% 硫酸锌溶液

(8) 碘-碘化钾试剂

(9) 0.3mol/L 氢氧化钡溶液

四、实验器材

- ① 长试管 (1.5mm×20mm) ② 吸量管 (1mL, 10mL) ③ 玻璃球 (或玻璃塞)

④分光光度计

⑤筛(60~100 目)

⑥大试管

⑦恒温水浴箱(100℃)

⑧白瓷板

⑨量筒(25mL)

⑩容量瓶(100mL, 50mL)

⑪小漏斗

五、操作方法

1. 制作标准曲线

取 6 支长试管, 分别加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0mL 150g/L 的葡萄糖溶液, 再加蒸馏水补充到 1.0mL, 第一号管为空白对照, 然后准确加入 1.0mL 铜试剂, 管口用小玻璃球或玻璃塞盖上。放入 100℃水浴箱中(试管必须浸入 1/2), 自温度再升至 100℃起准确计时, 保温 20min 后立即取出, 放在流动水中冷却 5min。最后, 分别加入 1.0mL 砷钼酸试剂, 再加 7.0mL 蒸馏水稀释, 摇匀后于 560nm 处或绿色滤光片比色。以光吸收值为纵坐标, 葡萄糖溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 不同葡萄糖溶液浓度最好同时平行做三份。

2. 测定米粉或面粉中淀粉含量

一般测定未知样品的还原糖含量时, 将样品稀释到糖浓度为 0~200g/L, 吸取 1.0mL, 以下按与制作标准曲线同样的方法操作。

淀粉在稀盐酸(2%)作用下, 可全部转变为糊精和麦芽糖, 最后都转化成葡萄糖, 所以可先测定葡萄糖含量, 再按脱去一分子水, 折算出淀粉的含量。但用稀酸水解测得的结果要稍高于淀粉酶水解的结果。称三份平行样品, 其中一份用于检查淀粉水解是否完全。

(1) 水解: 准确称取烘干磨碎的样品 0.05~0.25g (样品必须过 60~100 目筛)。本实验用米粉或面粉, 准确称取 100mg, 无损地倒入干燥的大试管中, 加入 25mL 2% 盐酸溶液, 用玻璃塞盖好(防止加热时水分蒸发), 将大试管浸入 100℃恒温水浴箱中保温水解, 并经常摇动。经过 1.5~2h 后, 取其中一个试管的固体颗粒滴入白瓷比色板中, 加 2 滴碘-碘化钾试剂检查淀粉水解是否完全, 如固体颗粒不显蓝绿色, 说明水解已完全。如果水解不完全, 再继续水解半小时, 并再行检查, 直到水解完全为止。

(2) 转移和沉淀蛋白质: 样品冷却后, 将大试管中的水解液小心地全部转移到 100mL 容量瓶中, 并用蒸馏水冲洗试管 3 次, 加 1 滴甲基红指示剂。用 10% 氢氧化钠溶液将溶液中和至呈微碱性(用滴管加到溶液由红变淡黄), 再慢慢加入 5mL 5% 硫酸锌溶液及 5mL 0.3mol/L 氢氧化钡溶液沉淀蛋白质, 振荡后静置, 待上层出现清液后, 再加几滴 0.3mol/L 氢氧化钡溶液直至无白色沉淀为止, 然后加蒸馏水至容量瓶刻度, 混匀放置过夜(或过滤)。

用吸量管吸取上清液(或滤液)5mL, 放入 50mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释到刻度。

用吸量管准确吸取中和后的稀释液 1.0mL, 以下步骤按与制标准曲线同样的方法进行, 测量光吸收值后, 从标准曲线查出葡萄糖的含量。

(3) 样品中淀粉含量的计算: 样品中总还原糖含量减去可溶性糖, 再乘 0.9 即为淀粉含量。但成熟的谷物籽粒中可溶性糖的含量很低, 可以忽略不计, 总还原糖含量按下式计算:

$$\text{总还原糖含量} \% = \frac{G \times \frac{50}{1} \times \frac{100}{5}}{0.1 \times 1 \times 10} \times 100$$

式中 G——从标准曲线上查出的葡萄糖质量浓度 (mg/L);

$\frac{50}{1}$ 和 $\frac{100}{5}$ ——稀释倍数。

$$\text{淀粉含量} \% = (\text{总还原糖含量} - \text{可溶性还原糖含量}) \times 0.9$$

利用本法还可以比较萌发前、后的水稻米粉或小麦面粉中可溶性还原糖含量，操作时可先将萌发前、后的种子烘干，磨粉（可保存），再进行抽提及测定。

思考题

1. Somogyi 铜试剂比色法的适用范围及优点是什么？
2. 试述 3,5-二硝基水杨酸比色法、费林试剂热滴定法、磷钼酸比色法（测定血糖用）、蒽酮比色法、SHS 碱性铜试剂滴定法、Somogyi 铜试剂比色法的适用范围，比较它们的优缺点。

（于晓虹）

实验六 血糖的测定

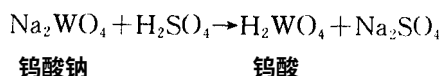
一、目的和要求

1. 掌握磷钼酸比色法测定血糖的原理及方法。
2. 学会制备无蛋白滤液。

二、基本原理

葡萄糖的醛基具有还原性，与碱性铜试剂混合加热后，被氧化成羧基，而碱性铜试剂中的二价铜(Cu^{2+})则被还原成红色的氧化亚铜(Cu_2O)沉淀，氧化亚铜又可使磷钼酸还原，生成钼蓝，使溶液呈蓝色，其蓝色的深度与血液液中葡萄糖的浓度成正比，可用比色法于 620nm 下测定之。

测定血糖含量时必须先除去其中的蛋白质，制成无蛋白滤液，再行检验。向抗凝血（如加入草酸钾的血液）中加入钨酸钠、硫酸锌、氢氧化锌及三氯乙酸等均可制得无蛋白滤液，现常用钨酸法。钨酸钠与硫酸作用，生成钨酸，可使血红蛋白等凝固、沉淀，离心或过滤除去沉淀，即得无蛋白滤液，此种滤液还适用于测定非蛋白氮、肌酸和尿酸等。



三、材料与试剂

1. 实验材料：抗凝血。

2. 实验试剂

(1) 草酸钾粉末(A. R.)

(2) 10% 钨酸钠溶液：此溶液应为中性或弱碱性，否则蛋白沉淀不完全，其校正方法是取此溶液 10mL，加入 0.05mol/L 硫酸溶液 0.4mL，再加入 1% 酚酞指示剂 1 滴，溶液应呈粉红色，若呈紫红色，可加入 0.05mol/L 硫酸溶液，若呈黄色，需加入 0.1mol/L 氢氧化钠溶液，直到出现不褪色的粉红色的中性反应为止，计算出应加的酸或碱的量。

(3) $\frac{1}{3}$ mol/L 硫酸溶液

(4) 葡萄糖标准液

储存液：称取 1000mg 恒重过的葡萄糖(A. R.)，溶于水，稀释到 100mL，其质量浓度为 10g/L。

应用液：取 1mL 储存液置于 100mL 容量瓶中，用苯甲酸稀释到刻度，质量浓度为 0.1 g/L。

(5) 碱性铜试剂：在 400mL 蒸馏水中加入 40g 无水碳酸钠；在 300mL 蒸馏水中加入 7.5g 酒石酸，在 200mL 蒸馏水中加入 4.5g 硫酸铜结晶，分别加热使溶解，冷却后将酒石酸溶液倾入碳酸钠溶液中，混合液移入到 1000mL 容量瓶中，再将硫酸铜溶液倾入并加蒸馏水至刻度。此试剂可于室温下长期保存。如有沉淀产生，需过滤后方可使用。

(6) 磷钼酸试剂：在烧杯内加入钼酸 70g、钨酸 10g、10% 氢氧化钠溶液 400mL 及蒸馏水