

## 电化学安培技术检测还原糖方法的建立

李雪梅<sup>1,2</sup>, 孙士青<sup>1</sup>, 马耀宏<sup>1</sup>, 杨 艳<sup>1</sup>, 赵玉斌<sup>3</sup>, 史建国<sup>1,2</sup>

1(山东省科学院生物研究所, 山东 济南, 250014) 2(山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南, 250014)

3(山东鲁洲食品集团技术中心, 山东 沂水, 276400)

**摘 要** 建立了电化学安培技术检测还原糖含量的新方法,与已知方法相比降低了反应温度,使反应更易控制;缩短反应时间,提高了还原糖的分析速度。该方法在还原糖浓度 0~20.0 mg/20mL 范围内有良好的线性关系,线性相关系数  $r=0.9999$ ;最低检出限为  $2.00\mu\text{g/mL}$ ,灵敏度较高;对同一份标准液连续测定( $n=9$ )的相对标准偏差为 0.841%,说明精密度良好。分别检测了橙汁、发酵液、糖化液 3 种样品,回收率在 99.6%~102.0%,表明此方法抗干扰性能良好,能满足测定不同类型样品的需要。

**关键词** 还原糖,电化学安培法,亚铁氰化钾

还原糖是发酵、食品领域最基本的工业原料,快速、准确的测定还原糖对生产过程控制和食品质量检验具有重要的意义。还原糖的测定方法很多<sup>[1]</sup>,目前工业生产中普遍采用的是费林试剂滴定法<sup>[2]</sup>。该方法要求在沸腾状态下滴定,操作不便,干扰因素多<sup>[3]</sup>,人为误差较大,给生产过程控制和产品质量检验带来很多麻烦。仪器分析方法有液相色谱法<sup>[4]</sup>、放射测定<sup>[5]</sup>、气质联用、紫外及红外光谱分析、核磁共振等,由于操作条件要求高,样品需经衍生或处理后才能测定,时间长,测定和维护成本较高,不适于大批量样品的糖类化合物含量检测,在我国实际生产和科研领域中一般不被采用。分光光度法可用于检测蜂蜜中的还原糖<sup>[6,7]</sup>,但对于浑浊和有不同颜色的样品实用性则较差。

电化学分析具有快速、准确、操作简单特点,本文研究了一种电化学检测还原糖含量的新方法。利用还原糖检测的一种经典试剂——铁氰化钾,与还原糖发生氧化还原反应后生成的亚铁氰化钾可以进行电化学安培检测的原理,建立基于亚铁氰化钾检测的还原糖安培检测技术,旨在为还原糖快速、准确的测定及企业生产过程控制和产品质量检验提供检测方法。目前尚未见此还原糖检测方法的文献报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

CHI614c 电化学分析仪(上海辰华仪器公司), HH-S 恒温水浴锅(江苏国胜实验仪器厂),电化学三电极体系由自制 Ag/AgCl 参比电极(1 mol/L

KCl)、直径 4 mm 玻碳工作电极(天津兰力分析仪器经营有限公司)和 Pt 片辅助电极(天津艾达恒晟科技发展有限公司)组成。

5.00 mg/mL 葡萄糖标准溶液,4.00%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液,10.0% NaOH 溶液,所用试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 测试样液的配制

橙汁样液:用移液管移取 10.0 mL 橙汁饮料(市售某品牌)至 100 mL 容量瓶,加蒸馏水定容。配制或稀释 20 倍的橙汁测试液。

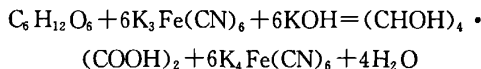
发酵液:用移液管移取 5.00 mL 山东济宁市菱花集团味精发酵上清液至 10 mL 容量瓶,加蒸馏水定容。配制或稀释 2 倍的发酵液测试液。

糖化液:将山东鲁洲集团提供的 7 份糖化液(1#~7#)离心后取上清液,分别按照 1:15、1:15、1:20、1:20、1:20、1:30、1:40 的比例稀释,配制或待测液。

### 1.3 实验原理和方法

#### 1.3.1 实验原理

还原糖在碱性溶液中能把铁氰化钾( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )还原为亚铁氰化钾( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ),以葡萄糖为例,其反应式为:



在反应中若  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  过量,则还原糖含量与生成的  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  的浓度呈比例关系,而  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  是一种电化学氧化还原活性物质,当工作电极上加一定正电位, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  能够被氧化生成  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 。 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  的氧化电流与还原糖浓度呈一定比例关系,因此可以根据测得的  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  的氧化电流信号计算还原糖的含量。

第一作者:博士,助理研究员(史建国为通讯作者)。

收稿日期:2008-03-10

### 1.3.2 标准工作曲线的绘制

分别移取 0、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 5.00 mg/mL 葡萄糖标准溶液于 20 mL 具塞刻度试管中,加入 8 mL 4.00%  $K_3Fe(CN)_6$  和 2.5 mL 10.0% NaOH 溶液,用蒸馏水稀释至 20 mL,混匀。将试管置于 80℃ 水浴中反应 1.0 min,取出冷却至室温。将反应液分别倒入 100 mL 烧杯中,进行电化学安培法检测。将 Ag/AgCl 参比电极、玻碳工作电极和 Pt 片辅助电极置于盛有待测液的烧杯中,分别与 CHI614c 电化学分析仪对应的电极夹相连。选择仪器软件中的安培技术进行检测,恒定工作电极电位 0.4 V,记录  $K_4Fe(CN)_6$  被氧化的电流-时间( $i-t$ )曲线,如图 1 所示。取 30 s 时的稳定电流  $i$ ,绘制电流-葡萄糖浓度( $i-C$ )标准工作曲线。

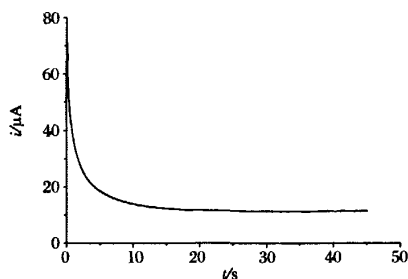


图 1  $K_4Fe(CN)_6$  氧化反应的  $i-t$  曲线

### 1.3.3 样品的测定

分别移取 1 mL 按照 1.2 中方法配制好的橙汁、发酵液和糖化液于 20 mL 具塞刻度试管中,以下同标准曲线的绘制。将  $i-t$  曲线上 30 s 时的稳定电流  $i$  数值代入标准工作曲线,从而计算出待测样液中还原糖的百分含量(以葡萄糖计)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 测定电位的选择

移取 5.00 mg/mL 葡萄糖标准溶液 1 mL 于 20 mL 具塞刻度试管中,与绘制工作曲线时相同,再加入  $K_3Fe(CN)_6$  和 NaOH 溶液,稀释至 20 mL。水浴加热反应 1.0 min,取出冷却至室温。将反应液倒入 100 mL 烧杯中,由 Ag/AgCl 参比电极、玻碳工作电极和 Pt 片辅助电极形成三电极系统,使用电化学分析仪的循环伏安技术记录工作电极在 0~+0.45 V 间的循环伏安曲线,如图 2 所示。

由于  $K_3Fe(CN)_6$  和  $K_4Fe(CN)_6$  是一对可逆的氧化还原物质,所以图 2 为溶液中过量的  $K_3Fe$

$(CN)_6$  与反应生成的  $K_4Fe(CN)_6$  共同在玻碳工作电极上反应产生的循环伏安图。从图 2 看出, $K_4Fe(CN)_6$  从 +0.1 V (vs. Ag/AgCl) 开始被氧化为  $K_3Fe(CN)_6$ ,电位为 +0.26 V 时氧化电流达到峰值。当用安培法测定  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流时,工作电极的检测电位必须设定为比 +0.26 V 更正的电位,在实验中选择 +0.4 V。

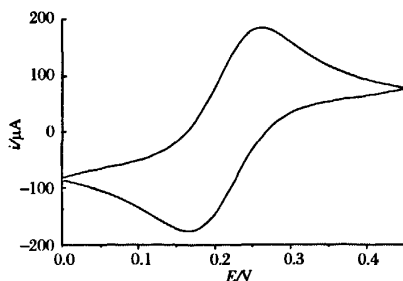


图 2 玻碳工作电极在待测液中的循环伏安曲线

### 2.2 水浴加热温度和反应时间

目前国家标准中“铁氰化钾滴定法”<sup>[8]</sup>检测还原糖要求溶液在微沸状态下进行滴定,而“铁氰化钾分光光度法”<sup>[7]</sup>也需要还原糖与铁氰化钾在沸水浴中反应 20 min,对反应温度和时间都有较高的要求。本实验只须保证还原糖含量与  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流有良好的线性关系,不必使反应完全进行,可以适当降低反应温度、缩短反应时间。图 3 是葡萄糖标准溶液与  $K_3Fe(CN)_6$  在 100℃ 水浴中反应不同时间后测得的  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流  $i$ ,可见 0.5~1.0 min 电流大幅增加,1.0 min 后电流增大幅度变小。图 4 是葡萄糖溶液在不同温度下反应 1.0 min 所测得的电流,由图 4 可见,60~80℃ 电流增加迅速,在 80~100℃ 电流增加趋缓。通过实验还发现在不同反应温度和时间条件下,葡萄糖浓度(1.00~8.00 mg/20 mL)与  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流均有很好的线性关系。综合以上结果,选择还原糖与  $K_3Fe(CN)_6$  反应的水浴温度为 80℃,时间控制在 1.0 min。

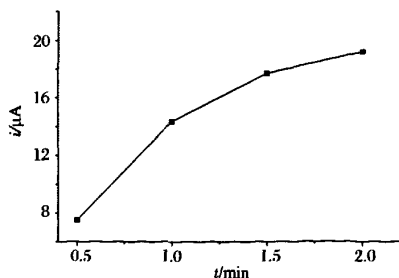


图 3  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流与反应时间的关系

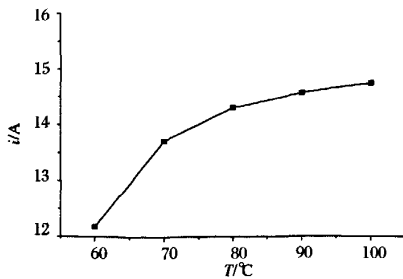


图4  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流与反应温度的关系

葡萄糖溶液浓度: 3.00 mg/20 mL; 反应温度: 100℃; 反应时间: 0.5、1.0、1.5、2.0 min。

葡萄糖溶液浓度: 3.00 mg/20 mL; 反应时间: 1.0 min; 反应温度: 60、70、80、90、100℃。

### 2.3 线性范围

图5是由0~20.0 mg/20 mL葡萄糖标准溶液绘制的标准工作曲线,线性回归方程为:  $i = 1.1641 + 4.388C$ 。  $i$  为  $K_4Fe(CN)_6$  的稳定氧化电流(A),  $C$  为还原糖浓度(mg/20 mL), 相关系数  $r = 0.9999$ 。

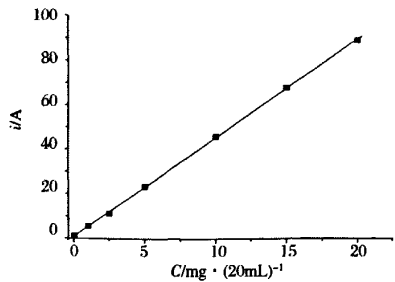


图5 葡萄糖溶液标准工作曲线

可见此体系还原糖浓度在0~20.0 mg/20 mL范围内,与  $K_4Fe(CN)_6$  的氧化电流之间有良好的线性关系。该方法的最低检出限为 2.00  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.4 精密度试验

取 5.00 mg/mL 葡萄糖标准溶液 1.0 mL 连续测定 9 次,方法同“1.3.3 样品的测定”,由所测得的  $K_4Fe(CN)_6$  氧化电流  $i$  计算出对应的葡萄糖浓度,结果见表 1。

表 1 精密度试验 ( $n=9$ )

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
电流 $i/\mu\text{A}$	23.37	23.19	23.15	23.28	22.88	23.02	23.37	22.88	23.19
浓度 $C/\text{mg} \cdot (20\text{ mL})^{-1}$	5.06	5.02	5.01	5.04	4.95	4.98	5.06	4.95	5.02
浓度/ $\text{mg} \cdot (20\text{ mL})^{-1}$	5.01								

由表 1 计算可得相对标准偏差(RSD)为 0.841%,可见此方法的精密度良好。

### 2.5 加样回收率

按照 1.3.3 的方法检测 3 种待测样,并在被测样品中加入已知含量的葡萄糖溶液,进行不同样品的回收试验,结果见表 2。

表 2 加样回收试验 ( $n=3$ )

样品	样品量 / $\text{mg} \cdot (20\text{ mL})^{-1}$	加入量 / $\text{mg} \cdot (20\text{ mL})^{-1}$	测得量 / $\text{mg} \cdot (20\text{ mL})^{-1}$	回收率 /%	平均回收率 /%
橙汁	10.08 *	9.00	8.96 *	99.6	101.0
发酵液	4.47 *	5.00	5.07 *	101.4	(RSD=
糖化液 1#	3.98 *	4.00	4.08 *	102.0	1.24%)

注: \* 为 3 次测定结果的均值。

结果表明,该方法检测样品的回收率在 99.6%~102.0%,说明此种分析方法抗干扰性能良好,能满足测定不同类型样品的需要。

### 2.6 对照实验

对按照 1.2 方法配制的山东鲁洲集团提供的 1#~7# 糖化液的稀释待测液进行电化学安培法测定,并同时用常规斐林氏法进行对比,结果见表 3。

表 3 对比试验测定结果 ( $n=3$ ) mg/20 mL

样品	电化学法	斐林氏法
糖化液 1#	3.98	3.47
糖化液 2#	9.68	9.64
糖化液 3#	12.44	12.28
糖化液 4#	12.00	11.32
糖化液 5#	12.28	13.16
糖化液 6#	11.04	10.26
糖化液 7#	12.20	11.41

$t$  检验,  $P > 0.05$ , 表明 2 种分析方法无显著差异。

## 3 结 论

实验中建立了 1 种电化学安培技术检测还原糖含量的新方法。该方法具有以下优点:

(1) 降低了还原糖与  $K_3Fe(CN)_6$  的反应温度(从 100℃ 沸腾降为 80℃ 保温),使得反应更加温和,易于控制;同时缩短了反应时间(从反应 20 min 减为 1.0 min),提高了还原糖的分析速度,适用于大量样品的分析检测。

(2)方法的线性范围宽,还原糖浓度 0~20.0 mg/20 mL 范围内有良好的线性关系。对于还原糖含量高的样品,可以减小待测样的稀释倍数,降低了因稀释倍数太大导致的误差。

(3)最低检出限为 2.00 $\mu$ g/mL,分析灵敏度较高。

(4)与光度法相比,电化学安培技术不受溶液颜色、浊度的影响,抗干扰力较强。

#### 参 考 文 献

- 1 中国光学学会光谱专业委员会译. AOAC 分析方法手册[M],1986
- 2 四川医学院卫生系,上海食品卫生监督检验所. GB 5009.7-1985,食品中还原糖的测定方法[Q]. 北京:中国标准出版社,1988
- 3 胡嗣明. 酒精生产分析检测[M]. 北京:轻工业出版社,1983
- 4 Yamauchi S, Nakai C, Nimura N, et al. Development of a highly sensitive fluorescence reaction detection system for liquid chromatographic analysis of reducing carbohydrates[J]. Analyst, 1993, 118(7): 773~776
- 5 Bradley D C, Kaslow H R. Radiometric assays for glycerol, glucose, and glycogen[J]. Anal Biochem, 1989, 180(1): 11~16
- 6 许汉英,王柯敏. 流动注射一分光光度法测定蜂蜜中还原糖的研究[J]. 高等学校化学学报,1998, 19(12): 1 925~1 928
- 7 赵志明,许汉英. 分光光度法测定出口蜂蜜中的还原糖[J]. 现代商检科技,1997,7(2):37~38
- 8 中华人民共和国专业标准.《出口蜂蜜检验方法》ZB10-1983,1984.7

## Determination of Reducing Sugar by Electrochemical Amperometric Method

Li Xuemei<sup>1,2</sup>, Sun Shiqing<sup>1</sup>, Ma Yaohong<sup>1</sup>, Yang Yan<sup>1</sup>  
Zhao Yubin<sup>3</sup>, Shi Jianguo<sup>1,2</sup>

1(Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

2(Key Laboratory for Biosensors of Shandong Province, Jinan 250014, China)

3(Technology center of Shandong Luzhou Food Group, Yishui 276400, China)

**ABSTRACT** Electrochemical amperometric was used to determine sugar reduction. Compared with the known methods, redox reaction could be controlled more easily and analysis was faster. The method indicated linear relationship with sugar recovery concentration ranged from 0 to 20.0mg/20mL and value of 0.9999 of the linear correlation coefficient  $r$ . The detection limit of concentration is 2.00 $\mu$ g/mL. Using this method, three samples were measured and the recovery is between 99.6% and 102.0%.

**Key words** reducing sugar, electrochemical amperometric method, potassium ferrous cyanide

#### 政策法规标准

### 加拿大公布有关 L-亮氨酸的法规

2008 年 5 月 20 日,加拿大公布有关使用 L-亮氨酸作为含三氯蔗糖的食用甜菊糖片内润滑剂或粘合剂的临时营销许可。加拿大卫生部收到一份申请,要求准许使用 L-亮氨酸作为含三氯蔗糖食用甜菊糖片内的润滑剂或粘合剂。对现有数据的评估支持用 L-亮氨酸作为含三氯蔗糖食用甜菊糖片内润滑剂或粘合剂的安全及有效性。

使用 L-亮氨酸会使消费者获益,获得高质量的甜菊糖片,也会通过更加有效及改进的生产条件使企业受益。因此,加拿大建议修改食品药物法规,准许按符合良好生产规范,使用 L-亮氨酸作为含三氯蔗糖的食用甜菊糖片内的润滑剂或粘合剂。

作为提高法规系统反应效率的一种手段,在正式启动法律程序修改法规的同时,特签发临时营销许可(IMA),准许按良好生产规范规定的标准,直接使用 L-亮氨酸作为含三氯蔗糖的食用甜菊糖片内的润滑剂或粘合剂。

本拟定法规修订将使销售用 L-亮氨酸作为含三氯蔗糖食用甜菊糖片内的润滑剂或粘合剂的措施得以执行。本修改建议得到安全评估的支持,且对经济及环境没有多大的影响。

因此,本法法规修改可直接获得最终批准,并公布于加拿大官方公报第 II 部分。