

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)05-0266-04

## 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定 马铃薯还原糖含量的研究

朱海霞, 石 瑛, 张庆娜, 陈伊里\*

(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 试验针对 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定马铃薯还原糖含量的吸收光谱及其对测定值可靠性的影响因素进行了研究。找到了分析马铃薯还原糖的最佳条件:  $\lambda$  射波长为 510 nm, 显色剂用量为 6 mL, 在沸水浴的显色时间范围为 12~15 min, 结果表明该方法的灵敏度得到了提高。由于该方法具有方便、安全、成本低等优点, 适合于常规实验室马铃薯还原糖批量和定量的测定。

**关键词:** 马铃薯; 还原糖; 比色法; 3,5-二硝基水杨酸

马铃薯薯片和薯条油炸色泽是评价马铃薯油炸食品质量优劣的重要指标, 还原糖含量则是影响油炸色泽的重要因素<sup>[1]</sup>。因此, 国内外马铃薯育种家把还原糖含量作为选育油炸加工型马铃薯品种或材料的重要品质指标。

测定马铃薯块茎还原糖含量的常规方法是容量分析法如铜还原-碘量法。近年来, 用比色法测定马铃薯块茎中的还原糖含量因具有方法简便、测定速度快等优点得到广泛应用, 如砷钼酸比色法和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法<sup>[2]</sup>。

DNS比色法的原理是<sup>[3]</sup>: 3,5-二硝基水杨酸在碱性溶液中被还原糖还原成氨基化合物, 在沸水浴中显色时间 5 min, 波长在 540 nm 下有最大吸收峰。试验过程中的诸多因素如吸收光谱、显色剂用量、显色时间等均对测定结果的准确性有直接影响。因此, 我们对用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定马铃薯块茎还原糖含量的反应条件进行了一系列的试验, 试图摸索最佳的试验条件以保证试验的精确度, 以期获得可靠的数据为马铃薯品质育种的实践提供参考。

收稿日期: 2005-08-12

作者简介: 朱海霞(1979-), 女, 东北农业大学硕士研究生, 从事马铃薯遗传育种研究。

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA241133)资助

\* 通讯作者: E-mail: potato@mail.neau.edu.cn

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

##### 1.1.1 马铃薯样品

马铃薯新型栽培种轮回选择群体后代材料 320 份, 收获后一个月内, 用脲糖试纸对块茎还原糖进行初步测定, 筛选还原糖含量有一定差异的材料 40 份。挑选中等大小的块茎清洗、烘干、粉碎待用。

##### 1.1.2 马铃薯提取液的制备

准确称取马铃薯样品粉末(称前烘干至恒重) 1 g 左右放入 50 mL 容量瓶中, 其它步骤见文献<sup>[3]</sup>。

##### 1.1.3 仪器

山东 752 型紫外光栅分光光度计。

##### 1.1.4 试剂

1 mg·mL<sup>-1</sup> 葡萄糖标准液: 准确称取 1 g 的无水葡萄糖, 待溶解后定容至 1000 mL。

DNS 显色液: 准确称取无水的 3,5-二硝基水杨酸 6.5 g 溶解待用。无水氢氧化钠 40 g 溶解后移入 500 mL 容量瓶, 冷却后定容。将水杨酸溶解液移入 1000 mL 容量瓶并加入 325 mL 的氢氧化钠, 再加入 15 mL 丙三醇溶解定容至 1000 mL 贮存于棕色试剂瓶中。以上试剂均为分析纯。水为蒸馏水。

#### 1.2 试验方法

##### 1.2.1 吸收光谱的测定

准确吸取 3、5、7 mL 的 DNS 于 50 mL 容量

瓶中并定容。取 1、3、5、7 mL 葡萄糖标准液于 50 mL 容量瓶中并加入 5 mL DNS, 加水至 25 mL 左右。在沸水浴中煮 5 min, 流水迅速冷却, 定容摇匀, 20 min 后在 400~560 nm 之间测吸光值。

### 1.2.2 标准曲线的测定

准确取 1、2、3、4、5、6、7、8 mL 的葡萄糖标准液分别加入到 50 mL 的容量瓶中, 各加 5 mL 的 DNS 在沸水浴中煮 5 min 后流水迅速冷却, 定容摇匀, 空白调零。20 min 后在所确定的吸收光谱波长下测定吸光值。

### 1.2.3 显色剂用量的选择

为了保证显色完全, 我们采用高浓度葡萄糖的标准液来进行 DNS 用量的选择。准确吸取 4 mL 的葡萄糖标准液加入 50 mL 容量瓶中, 并分别加入 3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 mL DNS 于容量瓶中加水约 25 mL, 步骤同上。

### 1.2.4 显色时间的确定

准确吸取 1、2、4 mL 葡萄糖标准液分别加入到 50 mL 的容量瓶中, 各加 5 mL DNS, 并在沸水浴中煮 2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20 min, 步骤同上。

### 1.2.5 稳定时间的确定

任意选择一个马铃薯样品提取液, 准确吸取葡萄糖标准液 2 mL 和样品提取液 4 mL 加入容量瓶, 步骤同上。显色后放置 20 min、1、2、3、4、5、6 h 后测定吸光值。

### 1.2.6 马铃薯样品 DNS 显色吸光度曲线

任意选取 5 个还原糖含量不同的马铃薯提取液(稀释倍数 12.5)进行重复扫描, 获得吸光值。

### 1.2.7 不同波长下马铃薯还原糖含量的比较

任意选取 12 个还原糖含量不同的马铃薯样品提取液, 在本文所确定的波长和相关文献报道的波长(540 nm)下进行扫描, 根据所获得的吸光值, 在不同波长下的标准曲线中分别查出相对应的浓度, 并计算总糖含量<sup>[4]</sup>。

$$\text{还原糖含量} = \frac{\text{还原糖 mg} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品质量 mg}} \times 100$$

### 1.2.8 数据处理

试验数据用 EXCEL2000 进行处理和作图, 并采用成对数据比较和 t 测验法进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 吸收光谱

波长在 400~600 nm 范围内对 DNS 液以及葡萄糖标准液反应生成的氨化合物(蒸馏水调零)的吸收光谱进行了扫描, 由于所使用的分光光度计灵敏度低, DNS 用量大等原因, 图 1 未能测得 400~480 nm 的吸光值, 图 2 未得到 510 nm 之前的吸光值, 所以均未得到二者的完整吸收峰度曲线, 但从图 1 可以看出, 3 mL、5 mL、7 mL 的 DNS 在 480~500 nm 有较高的吸光值, 由于显色剂本身具有颜色而获得的吸光值将会影响显色液吸光值的可靠性, 因此分析波长的选择应避免此范围可消除显色剂对分析的干扰, 从图 2 可以看出 510 nm 具有最大的吸光值, 在本实验仪器的基础上, 根据图 1、图 2 可确定  $\lambda_{\text{max}}=510 \text{ nm}$ 。

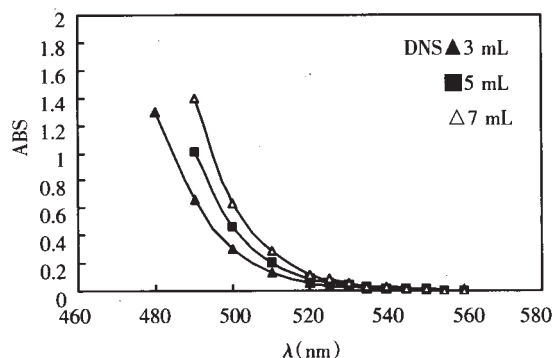


图 1 不同 DNS 显色剂用量的吸收光谱

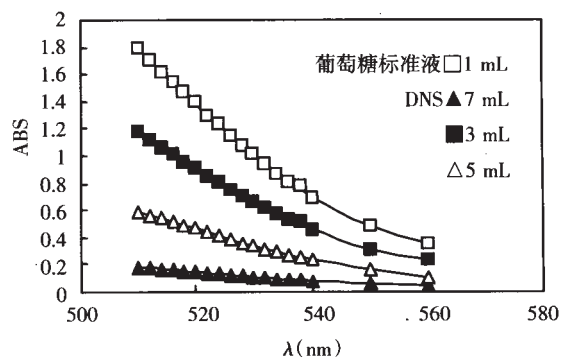


图 2 不同浓度糖显色液的吸收光谱

### 2.2 标准曲线

从图 3 中我们可以发现, 葡萄糖含量( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )与相应的吸光度(A)有一定的线性关系, 且其回归

方程为： $y=0.1795x-0.0971$ ， $R=0.9996$ 。

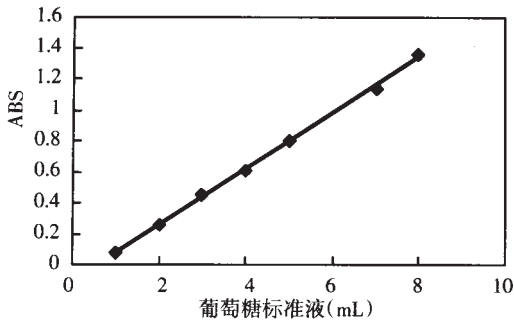


图 3 葡萄糖标准曲线

### 2.3 显色剂用量

为了确保显色完全进行，笔者选择最高浓度的葡萄糖标准液进行显色剂用量试验。由图 4 可知，吸光度随着显色剂用量的增加而增加，6~7 mL 趋于稳定，所以确定 DNS 的最佳用量是 6 mL。

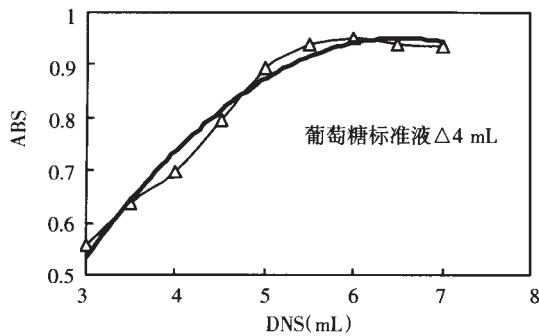


图 4 不同显色剂用量的吸光度变化及趋势

### 2.4 显色时间

由图 5 可以看出，还原糖含量不同的 3 个葡萄糖标准液在沸水浴中 12 min 后，显色基本完全，吸光度趋于稳定一致，因此本试验确定的最佳沸水浴显色时间范围是 12~15 min。

### 2.5 显色液放置时间

图 6 说明，无论是标准液的显色液还是马铃薯样品的显色液在显色之后的 6 h 内，其吸光度逐渐减小，可根据对还原糖含量精确度的要求选择测定时间，即精确度要求高应及早测定，若进行大批量样品的还原糖筛选，则可将显色液样品集中测定以提高工作效率。

### 2.6 样品 DNS 显色液吸光度曲线

把不同马铃薯样品的 DNS 吸光度绘成图 7。

对照图 2 可见，马铃薯样品的吸光度曲线与葡萄糖标准液的吸光度曲线相一致，不同的浓度可形成梯度间隔曲线，没有其它吸收峰，这表明马铃薯还原糖含量完全可采用 DNS 比色法测定。

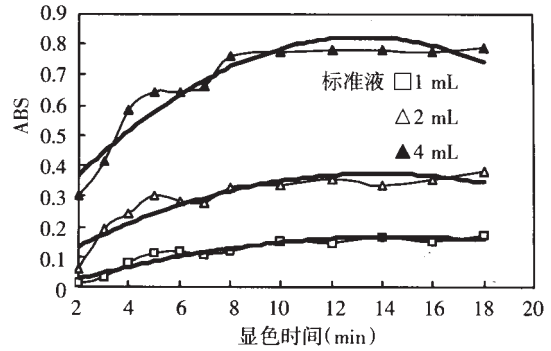


图 5 沸水浴显色时间的吸光度变化及趋势

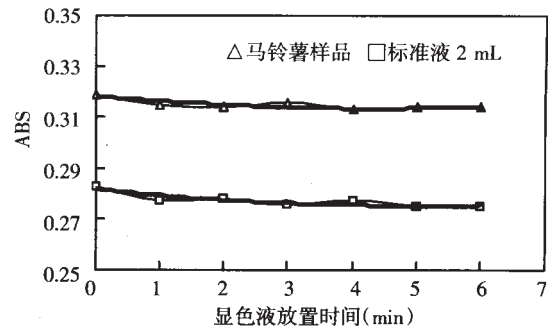


图 6 显色液放置时间与吸光度关系及趋势

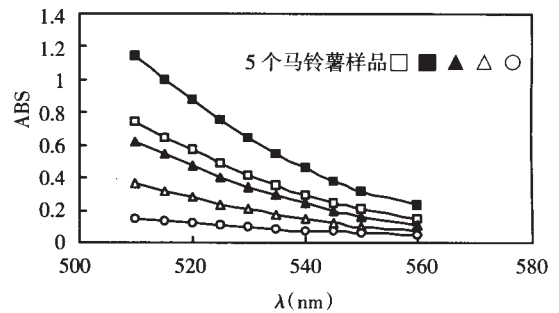


图 7 不同浓度的马铃薯样品 DNS 吸光度曲线

### 2.7 不同波长下的马铃薯还原糖含量

表 1 列出了不同块茎样品在 510 nm 和 540 nm 波长下测定的还原糖含量(干基)。其中  $\Delta$  为两波长下测得结果的差值， $\Delta^2$  为两波长下测得结果的差值的平方。

通过对表中数据进行计算，获得的结果可以看

出,由于 $|t|=5.408 > t_{0.01,11}$ ,说明在510 nm和540 nm两个波长下所测的马铃薯还原糖含量存在极显著差异。

表1 不同波长下测得的还原糖含量

样 品	510 nm	540 nm	X	X <sup>2</sup>
YP1	2.46	2.879	-0.419	0.176
YP2	4.527	5.532	-1.005	1.02
YP3	3.905	4.582	-0.677	0.458
YP4	6.746	8.149	-1.403	1.968
YP5	1.287	1.863	-0.576	0.331
YP6	1.745	3.039	-1.294	1.674
YP7	3.207	5.028	-1.821	3.316
YP8	3.572	4.582	-1.01	1.02
YP9	4.827	6.103	-1.276	1.628
YP10	1.533	2.005	-0.472	0.223
YP11	6.523	9.541	-3.018	9.108
YP12	2.214	2.897	-0.683	0.466
	42.546	56.2	-13.65	21.388

$$S=0.7299, S_x=0.2107, |t|=5.408, t_{0.01,11}=3.106$$

### 3 讨 论

应用3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量,对最佳吸收光谱的确定,不同的作物就有不同的选择。罗志刚等<sup>[3]</sup>在烟草还原糖测定中确定的 $\lambda_{\max}=474$  nm,齐香君等<sup>[4]</sup>在细菌纤维素发酵的还原糖测定中确定的 $\lambda_{\max}=483$  nm,范玲等<sup>[7]</sup>在棉花还原糖测定中确定的 $\lambda_{\max}=510$  nm,这些均与一般方法<sup>[5]</sup>中的 $\lambda_{\max}=540$  nm

有所不同。这可能由于最佳波长的确定受到仪器性能、灵敏度、试验对象中还原糖含量、可溶性物质种类及DNS用量等因素的影响,因此我们应根据自己的试验对象和仪器设备来确定试验所需的最佳条件。

通过对应用3,5-二硝基水杨酸比色法测定马铃薯还原糖含量的影响因素,如吸收光谱、显色剂用量及显色时间等条件进行试验筛选,确定马铃薯块茎还原糖含量测定的最佳波长为510 nm,DNS用量为6 mL,沸水浴时间12~15 min。这与540 nm下测定的还原糖含量存在极显著差异。方便快捷、安全、准确、低成本DNS比色法,适合于马铃薯块茎还原糖含量的批量和定量测定。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 王春英,陈伊里,石瑛.影响马铃薯油炸品质的研究进展[J].中国马铃薯,2003,4:232-236.
- [2] 梅文泉,隋启君,俱注,等.马铃薯块茎中还原糖测定的一种方法[J].云南农业科技,2003,3:23-24.
- [3] 宇正祥.食品分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [4] 许庆芬,吕文河,石瑛,等.马铃薯块茎还原糖的测定方法的比较[J].中国马铃薯,2004,6:337-33.
- [5] 罗志刚,曾满枝,凌晨,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定烟草中水溶性总糖.中国烟草科学,2000,2:34-36.
- [6] 齐香君,苟金霞,韩成语,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究.纤维素科学与技术,2004,3:17-20.
- [7] 范玲,闫建庆,郑春霞,等.3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法在分析棉花纤维还原糖含量中的应用研究[J].棉花学报,1996,3:151-154.

## Applying 3,5- dinitrosalicylic Acid (DNS) Method to Analyzing the Content of Potato Reducing Sugar

ZHU Hai-xia, SHI Ying, ZHANG Qing-na, CHEN Yi-li

(Northeast Agricultural University, Harbin150030, Heilongjiang, China)

Abstract: 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) method was used to analyze the content of reducing sugar by using spectrophotometry, and the wave-length and some relevant factors were researched in analyzing the content of potato reducing sugar with DNS method. The best conditions for analyzing the content of potato reducing sugar had been established. These were: wave-length: 510 nm; DNS solution: 6 mL; and duration for color development in water bath: 12~15 min. The sensitivity of the method had been improved. The experiment had confirmed that the improved DNS method was simple, safe and easy to conduct. The method can be used in common laboratories for quantitative analysis.

Key Words: potato; reducing sugar; spectrophotometry; 3,5- dinitrosalicylic acid