



# 生物化学实验

## 生物大分子定量测定技术

### 3.3 单糖定量测定：3, 5-二硝基水杨酸法

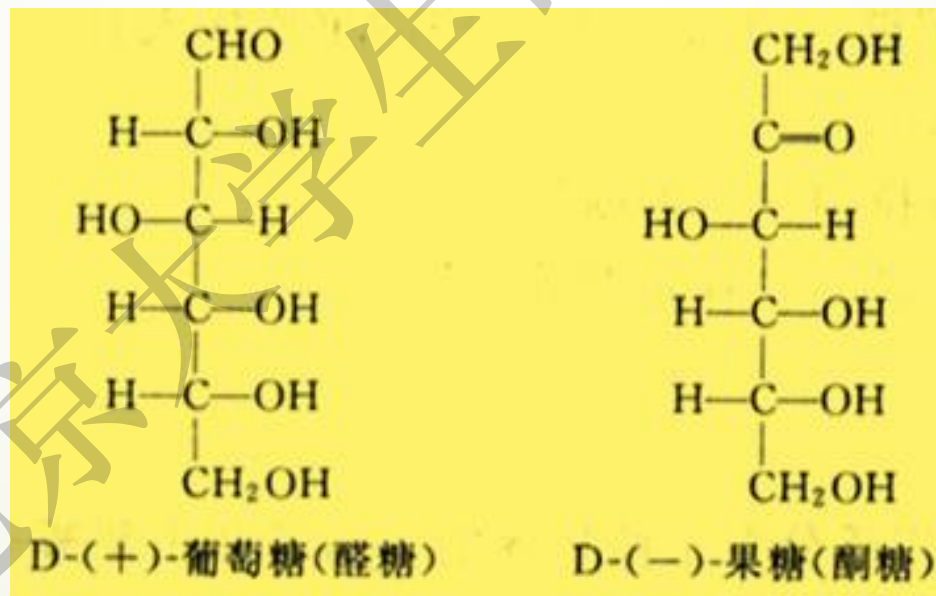
北京大学 王青松 胡晓倩

# 概述

- 糖的测定方法有多种，根据糖的物理性质和化学性质可以快速分析鉴定。
- **单糖的化学结构决定了它具有还原性**，利用化学试剂如费林试剂、蒽酮、3，5-二硝基水杨酸等与还原糖进行化学反应，然后**通过比色法来定量测定**。
- 本实验以3，5-二硝基水杨酸（3，5-Dinitrosalicylic acid，简称DNS）法测定还原糖浓度。

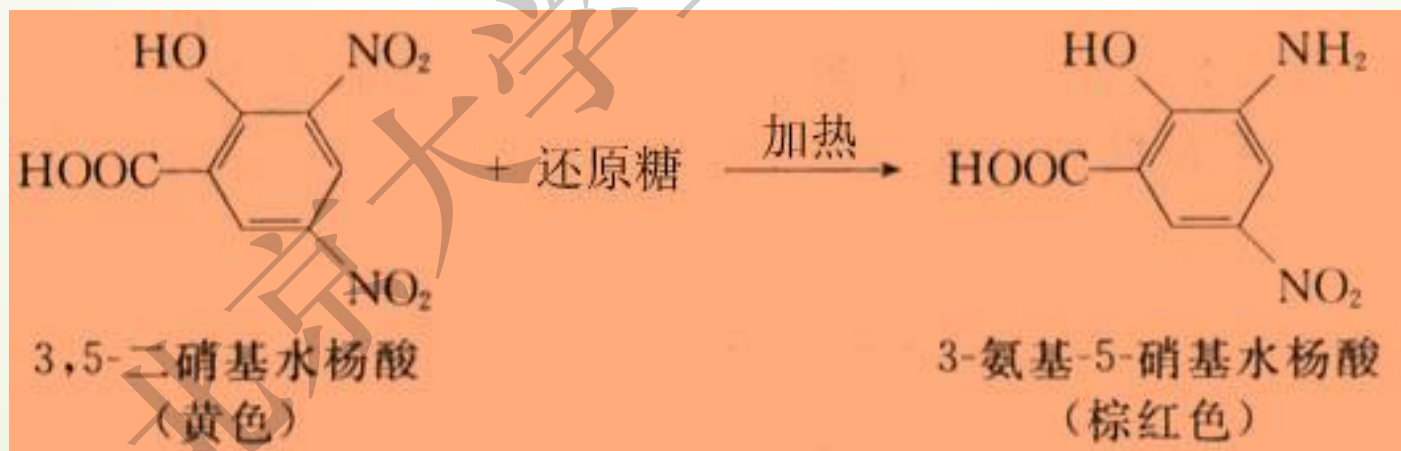
# 单糖的还原性

- 单糖的化学结构是多羟基的醛或酮，醛糖含有游离的醛基，具有很好的还原性；许多酮糖也是还原糖。
- 单糖的测定就是利用单糖功能基团的还原性来进行的。



# 实验原理

- 本实验利用单糖的还原性，使用3,5-二硝基水杨酸（3,5-dinitrosalicylic acid, DNS）测定还原糖的含量。碱性条件下，DNS与还原糖一起加热后被还原为棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸，还原糖则被氧化成糖酸及其他产物。在一定浓度范围内，还原糖的含量与棕红色产物颜色深浅程度成正比，在540 nm波长下测定反应溶液的吸光值，查标准曲线可求出样品中还原糖的含量。**该方法操作简便，杂质少。**



# 实验目的

1. 了解还原糖的结构与性质

2. 掌握3, 5-二硝基水杨酸定量测定单糖的方法

# 实验试剂、材料

## ● 实验试剂

1 mg/mL葡萄糖标准溶液

6 mol/L HCl溶液

100 g/L NaOH溶液

碘-碘化钾溶液

酚酞指示剂

3,5-二硝基水杨酸试剂  
(DNS试剂)

## ● 实验材料：小麦粉

# 实验仪器

分光光度计

玻璃比色皿 (光程为1 cm)

精密电子天平

电热恒温鼓风干燥箱

电热恒温水浴

电磁炉 (沸水浴)

可调式移液器

漩涡混合器

试管及试管架

容量瓶

# 实验内容

1. 小麦粉样品中还原糖的提取



2. 小麦粉样品中总糖的水解及提取



3. 葡萄糖标准曲线的制作及样品浓度测定



# 1. 小麦粉样品中还原糖的提取

1) 准确称取小麦粉2 g, 置于100 mL烧杯

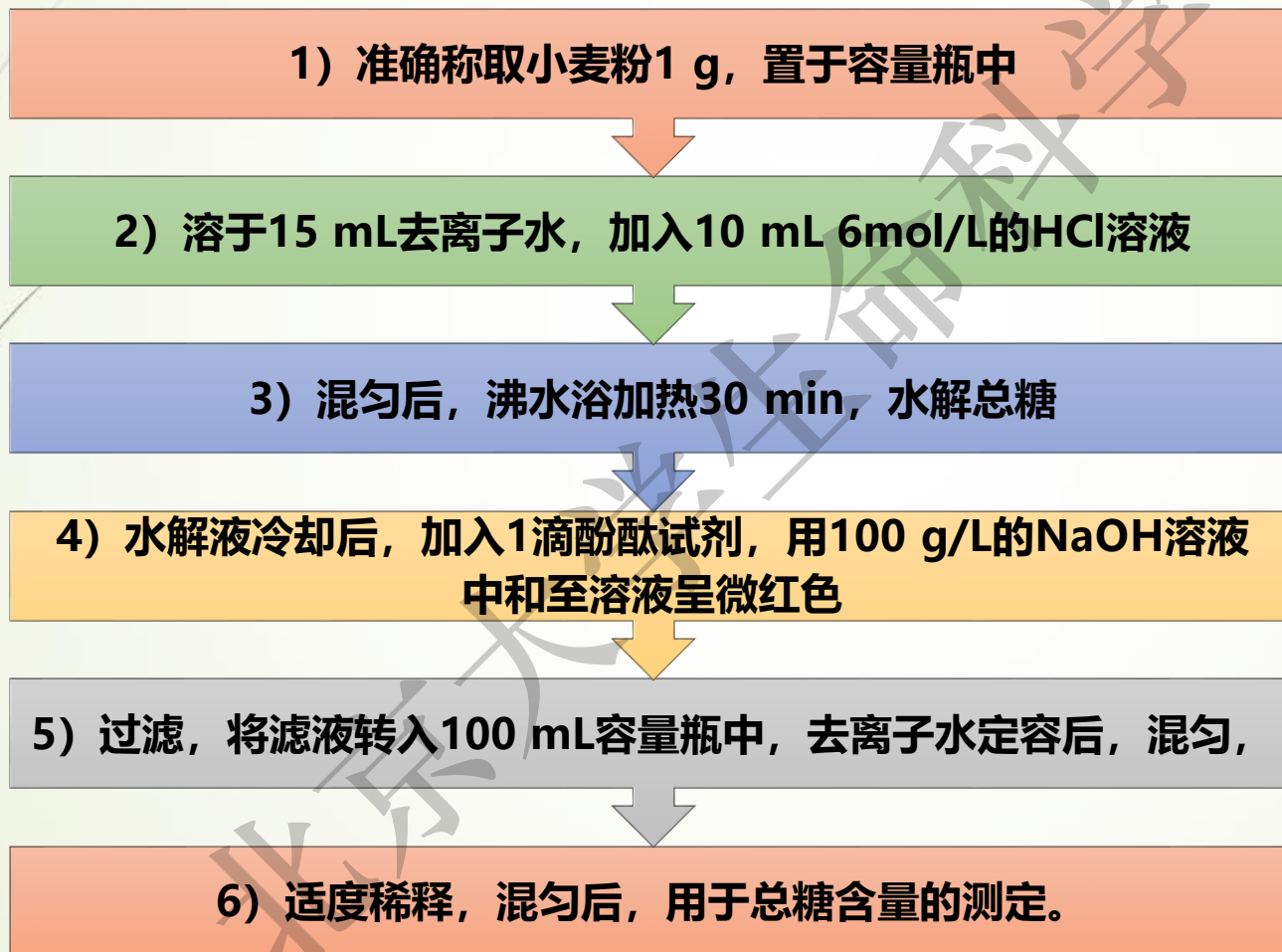
2) 以少量水调成糊状, 加入50~60 mL去离子水, 搅拌均匀

3) 50°C电热恒温水浴中孵育30 min

4) 过滤, 将滤液转入100 mL容量瓶中, 加去离子水定容

5) 定容后的滤液用于测定还原糖含量

## 2. 小麦粉样品中总糖的水解及提取



取1~2滴水解液, 加1滴碘-碘化钾溶液检查水解是否完全 (不呈蓝色表示水解完全)。

### 3. 葡萄糖标准曲线的制作及样品浓度测定

- 取16支洁净干燥的试管，按照下面的加样表，每个浓度做2个平行管。

| 试剂处理<br>试管编号                                                                             | 标准曲线 |     |     |     |     |     | 还原糖     | 总糖      |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
|                                                                                          | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7       | 8       |
| 葡萄糖标准溶液/mL                                                                               | 0    | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | -       | -       |
| 待测单糖溶液/mL                                                                                | -    | -   | -   | -   | -   | -   | x       | y       |
| 去离子水/mL                                                                                  | 0.5  | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0   | 0.5 - x | 0.5 - y |
| DNS试剂/mL                                                                                 | 0.5  |     |     |     |     |     |         |         |
| 每管溶液用漩涡混合器混匀，沸水浴中加热5 min，取出迅速用冷水冷却至室温，<br>分别向各试管中加入去离子水5 mL，混匀。以去离子水作为空白，在波长540 nm测定吸光值。 |      |     |     |     |     |     |         |         |
| A <sub>540nm</sub> (1)                                                                   |      |     |     |     |     |     |         |         |
| A <sub>540nm</sub> (2)                                                                   |      |     |     |     |     |     |         |         |
| A <sub>540nm</sub> 平均值                                                                   |      |     |     |     |     |     |         |         |

# 实验数据处理

1. 绘制标准曲线

2. 计算样品中还原糖的浓度 (7号试管)

3. 计算样品水解后还原糖的浓度 (8号试管)

4. 计算小麦粉样品中还原糖与总糖的质量分数

# 实验数据处理

- 1. 绘制标准曲线

计算出每个标准葡萄糖浓度 $A_{540\text{nm}}$ 的平均值，扣除空白管的吸光值，以其为纵坐标，每管标准葡萄糖的含量（mg）为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

- 2. 计算样品中还原糖的浓度（7号试管）

用待测单糖溶液的 $A_{540\text{nm}}$ 在标准曲线上查出其对应的葡萄糖含量，根据实验中所加入待测单糖溶液的体积，计算样品中还原糖的质量浓度（mg/mL）。

# 实验数据处理

- 3. 计算样品水解后还原糖的浓度（8号试管）

用待测总糖溶液的A540nm在标准曲线上查出其对应的葡萄糖含量，根据实验中所加入待测总糖溶液的体积，计算样品中总糖的质量浓度（mg/mL）。

- 4. 计算小麦粉样品中还原糖与总糖的质量分数

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{样品中还原糖质量浓度} \times \text{样品总体积}}{\text{样品重量}} \times 100\%$$

$$\text{总糖}\% = \frac{\text{样品水解后还原糖质量浓度} \times \text{样品总体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品重量}} \times 100\%$$

# 注意事项

- 1. DNS试剂中含有苯酚，保存时需避光，使用过程尽量减少与空气接触。
- 2. 测定过程中，要想得到精确度高的实验结果，需对同一样品进行多次重复测定（平行测定），所得到的结果取平均值。
- 3. 测定还原糖和总糖量所加入样品体积应使其吸光值在标准曲线范围之内。