上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

还原糖检测试剂盒(斐林微板法)

产品简介：

斐林试剂(Fehling's Reagent)又称菲林试剂或裴林试剂，是德国化学家 Hermann von Fehling 1849 年所发明，斐林试剂与班氏试剂(Benedict's Reagent)相似，均是用来检测还原糖的存在，其原理是与可溶性的还原性糖(葡萄糖、果糖和麦芽糖)在加热的条件下，能够生成砖红色的氧化亚铜沉淀。

Yuanye 还原糖检测试剂盒(斐林微板法)主要由酒石酸钠钾、硫酸铜等组成，其测定原理是还原糖具有醛基和酮基，在碱性溶液中煮沸，能把斐林试剂中的 Cu^{2+}还原成 Cu^{+}，使蓝色的斐林试剂脱色，脱色程度与溶液中还原糖含量成正比，在 590nm 下可用比色法测定吸光度，查标准曲线即可计算出样品中还原糖的含量，主要用于含淀粉食品、酒精饮料、碳酸饮料、肉制品、蜜饯等食品和植物等样品中还原糖的定量检测；总糖的含量也可以测定，但需要提前水解后才能检测，也可用于还原糖的定性试验。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

编号 / 名称	R24142 50T	R24142 200T	Storage
试剂(A): Glu 标准(1mg/ml)	5ml	10ml	4℃
试剂(B): Fehling's Reagent A	10ml	40ml	RT
试剂(C): Fehling's Reagent B	10ml	40ml	RT
试剂(D): 甲基红指示剂	5ml	20ml	RT
试剂(E): pH 中和液(10×)	25ml	100ml	RT
使用说明书		1 份	

自备材料：

1、试管或离心管、锥形瓶、容量瓶、玻璃珠、水浴锅或酒精灯、酶标仪、96 孔板

2、果糖、转化糖等还原糖标准(1mg/ml)、盐酸水溶液、氢氧化钠溶液、10%乙酸铅溶液、饱和硫酸钠溶液、蒸馏水、碘液

操作步骤(仅供参考)：

1、配置斐林试剂：Fehling's Reagent A 液和 B 液等比例混合即成，不可久置。

2、配制 pH 中和液(1×)：pH 中和液(10×)和水按 1:9 比例混合即成。

3、样品中还原糖的提取：

1)固体样品(如含淀粉食品、植物样品等)：称取粉碎或混匀后的试样 10~20g（精确到 0.01g)，置 250ml 容量瓶中，当体积接近 150ml 时，滴加 1~3 滴甲基红指示剂，如呈红色，可用 pH 中和液调至微黄色；若用风干样品，可称取 3g，直接加入容量瓶，加入少量水湿润后，再加水至 150ml 左右加入指示剂和中和液；将容量瓶置于 80℃的恒温水浴中保温 30min，期间摇动数次，以便将还原糖充分提取出来。对于含蛋白质较多的样品，此时可加入乙酸铅溶液除去蛋白质，至不再产生白色絮状沉淀时，加入饱和的硫酸钠溶液除去多余的铅离子。30min 后取出冷却并定容至刻度，摇匀后取滤液备用。

2)酒精饮料：称取混匀后的试样 100g（精确到 0.1g)，置于蒸发皿上，滴加 1~3 滴甲基红指示剂，用 pH 中和液调至微黄色，在水浴上蒸发至原体积的 1/4 后，移入 250ml 容量瓶中，置于 80℃的恒温水浴中保温 30min，期间摇动数次，含蛋白质较多的样品参考上述方法，滤液备用。

3)碳酸饮料：称取混匀后的试样 100g（精确到 0.1g)，置于蒸发皿上，在水浴上微微搅拌除去二氧化碳后，移入 250 容量瓶中，用水洗涤蒸发皿，并入容量瓶，加水至刻度，混匀后备用。

4)总糖的水解和提取：称取植物样品 0.5~3g，剪碎，加入蒸馏水约 3ml 匀浆，转移至三角烧瓶中，用 12ml 蒸馏水冲洗研磨器 2~3 次，冲洗液也转移至烧瓶中；向三角烧瓶中加入 10ml　6M 盐酸溶液，摇匀，煮沸 30min，并不时搅拌；取 2 滴加于小离心管中，再滴加 1 滴碘液，检查水解是否完全，如已经水解完全，则不显示蓝色；水解完毕后，冷却至室温，滴加 6M 氢氧化钠溶液，使溶液 pH 接近中性；含蛋白质较多的样品参考上述方法；滤液或上清液用蒸馏水定容至 100ml，混匀，取 10ml，用蒸馏水定容至 100ml，摇匀备用。

4、制作还原糖标准曲线：按下表设置空白管(0 号)、梯度标准管(1~6 号)，按顺序依次加入。

加入物质(ul)	0	1	2	3	4	5	6
Glu 标准(1mg/ml)	0	100	200	300	400	500	600
蒸馏水	600	500	400	300	200	100	0
葡萄糖含量(mg)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
斐林试剂	400						

将各管混匀后，沸水浴加热 15min。冷水或自来水冷却，2500r/min 离心 5~10min。取上清 280ul，按顺序依次加入到 96 孔板中，酶标仪测定 590nm 的吸光度。以各空白

管吸光度减去标准管吸光度的差值为纵坐标、对应葡萄糖含量为横坐标，绘制标准曲线。

5、样品还原糖的测定：吸取准备好的还原糖提取液 3ml，加入 2ml 斐林试剂，混匀。沸水浴加热、冷却、离心、取上清、测定等操作方法同标准曲线。用空白管的吸光度减去样品管吸光度的差值带入回归方程即可计算出样品中还原糖的含量。

结果计算：样品还原糖含量(%)=$m\times V_T\times N/(m_0\times V_S\times 1000)\times 100$

式中：m=样品中还原糖的含量(mg)

V_T=提取液总体积(ml)

N=稀释倍数

m_0=样品质量(g)

V_S=测定时取用的提取液体积(ml)

1000=单位换算系数。

附录：还原糖的定性试验

1、配制斐林试剂工作液：临用前，取适量 Fehling's Reagent A 和 B 等量混合即成，即配即用。

2、向洁净试管中加入 1~2ml 待测样品。

3、向该试管中加入 1ml 斐林试剂工作液，充分摇匀。

4、将上述混合液置于沸水浴中，并持续 1～3min。

5、观察试管内混合液颜色是否发生变化，其颜色变化顺序应为浅蓝色-棕色-砖红色(沉淀)。

鉴定结果：

还原性糖(如核糖、葡萄糖、果糖等)	砖红色沉淀
非还原性糖(蔗糖、淀粉等)	无颜色变化

注意事项：

1、样品提取液中还原糖浓度过高时，应适当稀释后再行测定。

2、样品提取液中还原糖浓度过低时，可提高样品的浓度或增加提取液的用量。

3、可合理减少或增加提取液和斐林试剂的用量。

4、斐林试剂的 A、B 液须分开储存，临用前按要求混合使用。

5、斐林试剂 B 液呈强碱性，需小心操作。

6、6M 盐酸配制：用市售盐酸和蒸馏水或去离子水等比例混合即成 6M 盐酸，该过程会放热，应小心操作，避免伤人。

7、6M 氢氧化钠配制：称取氢氧化钠 24g 溶解于蒸馏水，补至 100ml 即成；氢氧化钠溶于水会放热，应小心操作，避免伤人。

8、色素对糖类的测定存在干扰，当提取液颜色较深时，应事先脱色后再进行测定；不同样品脱色方法和脱色剂用量不同，需自行查找文献资料，5%活性炭可用于红葡萄酒的脱色。

9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

10、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：12 个月有效。按要求保存。