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(斐林比色法)

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。

源叶生物 还原糖检测试剂盒(斐林比色法)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。

组成：

编号 / 名称	R24143 50T	R24143 100T	Storage
试剂(A): Glu 标准(1mg/ml)	30ml	50ml	4℃
试剂(B): Fehling's Reagent A	50ml	100ml	RT
试剂(C): Fehling's Reagent B	50ml	100ml	RT 避光
试剂(D): 甲基红指示剂	10ml	20ml	RT
试剂(E): pH 中和液(10×)	50ml	100ml	RT
使用说明书	1 份		

自备材料：

1、试管或离心管

2、锥形瓶、容量瓶、玻璃珠

3、水浴锅或酒精灯

4、果糖、转化糖等还原糖标准(1mg/ml)

5、盐酸水溶液、氢氧化钠溶液

6、10%乙酸铅溶液、饱和硫酸钠溶液

7、蒸馏水、碘液

8、分光光度计、比色皿

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、配置 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），置于 250ml 容量瓶，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，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，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，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，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。

3、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(ml)	0	1	2	3	4	5	6
Glu 标准(1mg/ml)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
蒸馏水	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0
葡萄糖含量(mg)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
斐林试剂	2						

将各管混匀后，用沸水浴加热 15min，冷水或自来水冷却，2500r/min 离心 5~10min，取上清，1cm 比色皿，用分光光度计测 590nm 的吸光度值，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。

4、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 15min，冷却、离心、取上清、测定等操作同标准曲线，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。

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 液和 B 液等量混合即成，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 液必须分开储存，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。

有效期：6 个月有效。