



中华人民共和国国家标准

GB/T 16285—2008
代替 GB/T 16285—1996

食品中葡萄糖的测定 酶-比色法和酶-电极法

Determination of glucose in food—
Enzyme-colorimetric method and enzyme-electrode method

2008-06-25 发布

2009-01-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB/T 16285—1996《食品中葡萄糖的测定方法 酶-比色法和酶-电极法》。

本标准与 GB/T 16285—1996 相比主要变化如下：

——标准名称改为：食品中葡萄糖的测定 酶-比色法和酶-电极法；

——按 GB/T 1.1—2000 和 GB/T 20001.4—2001 的规定，修改了文本格式。

本标准的酶-比色法为仲裁法；酶-电极法为快速法。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国农垦北方食品监测中心（酶-比色法）、山东省科学院生物研究所（酶-电极法）。

本标准主要起草人：张宗城、刘宁、冯德荣、孙士青、宋家华。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 16285—1996。

食品中葡萄糖的测定

酶-比色法和酶-电极法

1 范围

本标准规定了酶-比色法和酶-电极法测定食品中葡萄糖的分析步骤。

本标准适用于各类食品中葡萄糖的测定；亦适用于食品中其他组分转化为葡萄糖的测定。

本标准的酶-比色法的最低检出限量为 0.01 μg/mL；酶-电极法的最低检出限量为 1.0 mg/100 mL。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

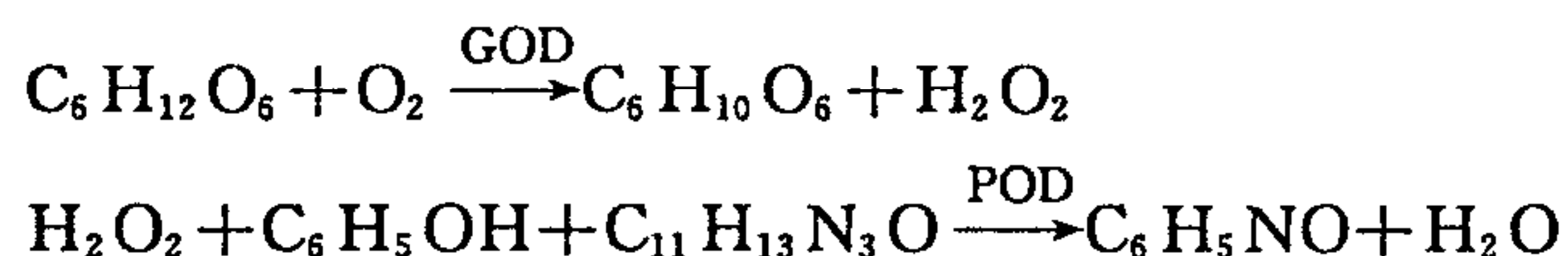
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—1992，neq ISO 3696:1987）

3 酶-比色法

3.1 方法提要

葡萄糖氧化酶（GOD）在有氧条件下，催化 β-D-葡萄糖（葡萄糖水溶液）的氧化反应，生成 D-葡萄糖酸-δ-内酯和过氧化氢。受过氧化物酶（POD）催化，过氧化氢与 4-氨基安替比林和苯酚生成红色醌亚胺。在波长 505 nm 处测定醌亚胺的吸光度，计算食品中葡萄糖的含量。

3.2 反应式



3.3 试剂和溶液

3.3.1 试剂和分析用水

所有试剂均使用分析纯试剂，或生化试剂；分析用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水规格，或重蒸馏水。

3.3.2 组合试剂盒

1 号瓶：内含磷酸盐缓冲溶液（0.2 mol/L，pH=7.0）100 mL，其中 4-氨基安替比林为 0.001 54 mol/L。

2 号瓶：内含苯酚溶液（0.022 mol/L）100 mL。

3 号瓶：内含葡萄糖氧化酶（glucose oxidase）400 U（活力单位）、过氧化物酶（辣根，peroxidase）1 000 U（活力单位）。

葡萄糖氧化酶和过氧化物酶的活力要求和判定见附录 A。

1、2、3 号瓶应在约 4℃ 保存。

3.3.3 酶试剂溶液

将 1 号瓶（3.3.2）和 2 号瓶（3.3.2）的内容物充分混合均匀，再将 3 号瓶（3.3.2）的内容物溶解其中，轻轻摇动（勿剧烈摇动），使葡萄糖氧化酶和过氧化物酶完全溶解。此溶液应在约 4℃ 保存，有效期 1 个月。

3.3.4 亚铁氰化钾溶液（0.085 mol/L）

称取 3.7 g 亚铁氰化钾，溶于 100 mL 水中，摇匀。

3.3.5 硫酸锌溶液(0.25 mol/L)

称取 7.7 g 硫酸锌,溶于 100 mL 水中,摇匀。

3.3.6 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)

称取 4 g 氢氧化钠,溶于 1 000 mL 水中,摇匀。

3.3.7 葡萄糖标准溶液

称取经 $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 h 的葡萄糖 1.000 0 g,溶于水中,定容至 100 mL,摇匀。用水稀释此溶液 2.00 mL→100 mL,浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4 仪器和设备

3.4.1 研钵或粉碎机。

3.4.2 分析筛。

3.4.3 组织捣碎机。

3.4.4 恒温水浴锅。

3.4.5 可见分光光度计。

3.4.6 微量移液管:1.00 mL,精度 0.01 mL。

3.5 试样的制备

3.5.1 固体样品

粉末状样品:取有代表性的样品至少 200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

颗粒状样品:取有代表性的样品至少 200 g,用粉碎机粉碎,或用研钵研细,通过 100 目分析筛,置于密闭的玻璃容器内。

新鲜水果、蔬菜等固体样品:取有代表性的可食部分至少 200 g,用组织捣碎机捣碎,置于密闭的玻璃容器内。

3.5.2 糊状样品

取有代表性的样品至少 200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

3.5.3 固、液体样品

取有代表性的样品至少 200 g,用组织捣碎机捣碎,置于密闭的玻璃容器内。

3.5.4 液体样品

取有代表性的样品至少 200 mL,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。如样品中含二氧化碳,应用三角瓶取 200 mL,旋摇至基本无气泡,安装冷凝管,置沸水浴中加热 10 min,取出冷却至室温。

3.6 试液的制备

3.6.1 不含蛋白质的试样:用 100 mL 烧杯称取试样(3.5)1 g~10 g(精确至 0.000 1 g),加少量水,转移到 250 mL 容量瓶中,稀释至刻度。摇匀后用快速滤纸过滤。弃去最初滤液 30 mL。

试液中葡萄糖含量大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,应适当增加定容体积。

3.6.2 含蛋白质的试样:用 100 mL 烧杯称取试样(3.5)1 g~10 g(精确至 0.000 1 g),加少量水,转移到 250 mL 容量瓶中。加入亚铁氰化钾溶液(3.3.4)5 mL、硫酸锌溶液(3.3.5)5 mL 和氢氧化钠溶液(3.3.6)10 mL,用水定容至刻度。摇匀后用快速滤纸过滤。弃去最初滤液 30 mL。

试液中葡萄糖含量大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,应适当增加定容体积。

3.7 分析步骤

3.7.1 标准曲线的绘制

用微量移液管取 0.00 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL 葡萄糖标准溶液(3.3.7),分别置于 10 mL 比色管中,各加入 3 mL 酶试剂溶液(3.3.3),摇匀,在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中恒温 40 min。冷却至室温,用水定容至 10 mL,摇匀。用 1 cm 比色皿,以葡萄糖标准溶液含量为 0.00 $\mu\text{g/mL}$ 的试液调整分光光度计的零点,在波长 505 nm 处,测定各比色管中溶液的吸光度。

以葡萄糖含量为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制标准曲线。

3.7.2 试液吸光度的测定

用微量移液管取 0.50 mL~5.00 mL 试液(3.6)(依试液中葡萄糖的含量而定),置于 10 mL 比色管中。以下按 3.7.1 步骤操作。

测定试液吸光度后,在标准曲线上查出相应的葡萄糖含量。

3.8 结果计算

食品中葡萄糖的含量,以质量分数 X_1 计,数值以%表示,按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{m_1 \times V_1}{m \times V_2 \times 10\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

m_1 ——标准曲线上查出的试液中葡萄糖的质量的数值,单位为微克(μg);

m ——试样的质量的数值,单位为克(g);

V_1 ——试液的定容体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 ——测定时吸取试液的体积的数值,单位为毫升(mL)。

计算结果表示到小数点后两位。

3.9 允许差

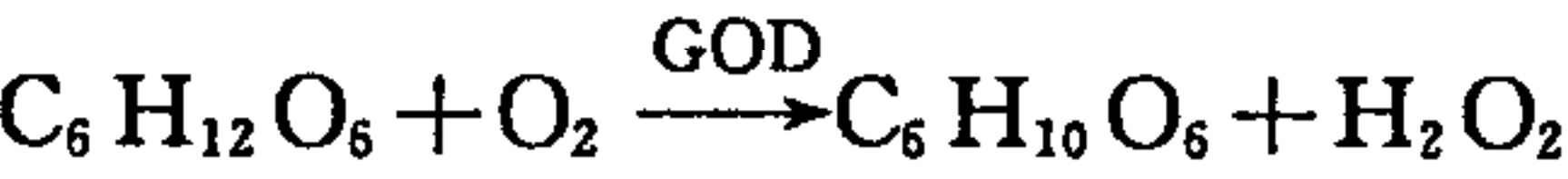
同一样品两次平行测定结果之差不得超过两次测定平均值的 5.0%。

4 酶-电极法

4.1 方法提要

葡萄糖氧化酶(GOD)在有氧条件下,催化 β -D-葡萄糖(葡萄糖水溶液)的氧化反应,生成 D-葡萄糖酸- δ -内酯和过氧化氢。过氧化氢与过氧化氢型电极接触产生电流。该电流值与 β -D-葡萄糖的浓度呈线性比例,在酶电极葡萄糖分析仪上直接显示葡萄糖含量。

4.2 反应式



4.3 试剂和溶液

4.3.1 试剂和分析用水

所有试剂均使用分析纯试剂或生化试剂;分析用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水规格。

4.3.2 组合试剂盒

4.3.2.1 葡萄糖氧化酶膜:含葡萄糖氧化酶(GOD)15 U(活力单位);应在 0℃~4℃保存,有效期 12 个月。

葡萄糖氧化酶膜的活性和抗干扰性的判定,见附录 B。

4.3.2.2 复合试剂:含磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸二钠、氯化钠、苯甲酸钠、庆大霉素硫酸盐;常温保存,有效期 24 个月。

4.3.2.3 β -D-葡萄糖标准溶液:浓度为 100.0 mg/100 mL;密封保存,有效期 12 个月。

4.3.3 缓冲溶液

将一袋复合试剂(4.3.2.2)溶解在 1 000 mL 水中,摇匀。pH:7.2 \pm 0.1。

4.4 仪器和设备

4.4.1 研钵或粉碎机。

4.4.2 分析筛。

4.4.3 组织捣碎机。

4.4.4 酶电极葡萄糖分析仪:直接读数式;测量范围 0 mg/100 mL~100.0 mg/100 mL (β -D-葡萄糖);测量精度 \pm 1.0 mg/100 mL(β -D-葡萄糖)。

4.4.5 微量进样器:容量 50 μL ,精度 1 μL 。

4.5 试样的制备

同 3.5。

4.6 试液的制备

4.6.1 固体试样和固液体试样

4.6.1.1 一般固体试样和固、液体试样:称取试样(4.5)1 g~10 g(使之定容后葡萄糖含量为 1 mg/mL~200 mg/mL)于 100 mL 烧杯内,精确至 0.000 1 g,用水移入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,放置 30 min(摇动 2 次~3 次)。用快速滤纸或脱脂棉过滤。弃去最初滤液,收集 1 mL~2 mL 滤液于带盖小试管中。

4.6.1.2 水果、蔬菜试样:称取试样(4.5) 1 g~10 g 于 100 mL 烧杯内(使之定容后葡萄糖含量为 1 mg/mL~200 mg/mL),精确至 0.000 1 g。加入煮沸的水 30 mL~50 mL 和 5 mL 缓冲溶液(4.3.3),继续煮沸 3 min~5 min,冷却至室温后用研钵研细或用组织捣碎机捣碎。用水移入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。用快速滤纸或脱脂棉过滤。弃去最初滤液,收集 1 mL~2 mL 滤液于带盖小试管中。

4.6.1.3 食用葡萄糖试样:称取试样(4.5) 1 g~10 g 于 100 mL 烧杯内,精确至 0.000 1 g。加入约 50 mL 水,溶解后煮沸 2 min。冷却后用水移入 1 000 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。

4.6.2 糊状和液体试样

称取试样(4.5) 1 g~10 g(使定容后葡萄糖含量为 1 mg/mL~200 mg/mL)于 100 mL 烧杯内,精确至 0.000 1 g。用水移入 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。用快速滤纸或脱脂棉过滤(如溶液呈透明状,可不过滤)。弃去最初滤液,收集 1 mL~2 mL 滤液于带盖小试管中。

4.7 分析步骤

4.7.1 校正仪器

从组合试剂盒中取出电极,将其表面清理干净,吸取缓冲溶液(4.3.3)滴在电极表面。用小镊子取一片酶膜圈,安装在电极表面,使酶膜圈中心和电极中心的白金完全贴紧,形成无气泡的薄层液体,然后将电极安装在反应池内。

仪器开机后,缓冲溶液即自动进入反应池,并自行冲洗。当仪器出现进样指令后,用微量进样器准确吸取 25 μL $\beta\text{-D}$ -葡萄糖标准溶液(4.3.2.3)(用滤纸擦净针尖外部)注入进样口内。20 s~40 s 后仪器自动显示标准溶液(4.3.2.3)的指示值。再等 30 s~60 s,仪器自行完成冲洗过程,即可重复注入标准溶液(4.3.2.3)数次,直至仪器显示允许开始测定样品。当连续两次标准溶液(4.3.2.3)显示值的相对偏差小于 2.0%时,即完成校正步骤。

4.7.2 测定样品

用试液(4.6)冲洗微量进样器,至少两次。准确吸取 25 μL 试液(4.6),用滤纸擦干针尖外部,注入进样口。20 s~40 s 后读取显示值。

4.8 结果计算

食品中葡萄糖的含量,以质量分数 X_2 计,数值以%表示,按式(2)计算:

$$X_2 = \frac{R \times V_3}{1\,000 \times m_1} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

R ——仪器测定的数值,单位为毫克每百毫升(mg/100 mL);

V_3 ——试液的定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m_1 ——试样的质量的数值,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位。

4.9 允许差

同一样品的两次测定值之差：

食品中葡萄糖含量小于 1.0% 时，不得超过两次测定平均值的 5.0%；

食品中葡萄糖含量大于或等于 1.0% 时，不得超过两次测定平均值的 2.0%。

附 录 A
(规范性附录)

葡萄糖氧化酶和过氧化物酶的活力与判定

A.1 活力要求

A.1.1 葡萄糖氧化酶的活力:不低于 20 U/mg;不得含有纤维素酶、淀粉葡萄糖苷酶、β-果糖苷酶、半乳糖苷酶、过氧化氢酶等干扰酶。

A.1.2 过氧化物酶活力:不低于 50 U/mg;不得含纤维素酶、淀粉葡萄糖苷酶、β-果糖苷酶、半乳糖苷酶、过氧化氢酶等干扰酶。

A.2 试验方法

用移液管吸取 0.50 mL 葡萄糖标准溶液(3.3.7),置于 10 mL 比色管中,加入 100 μg 可溶性淀粉(分析纯)、100 μg 纤维二糖(生化试剂)、100 μg 乳糖(分析纯)和 100 μg 蔗糖(分析纯),再加入 3 mL 酶试剂溶液(3.3.3)。以下按 3.7.1 步骤操作。

测定吸光度后,在标准曲线(3.7.1)上查出相应的葡萄糖含量,按式(A.1)计算葡萄糖的回收率:

$$F = \frac{m_2}{0.5 \times 200} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

F ——葡萄糖的回收率,%;

m_2 ——葡萄糖的实测数值,单位为微克(μg)。

A.3 判定

测定的葡萄糖回收率,如在 95%~105%范围内,则判定葡萄糖氧化酶和过氧化物酶符合要求。

附 录 B
(规范性附录)
葡萄糖氧化酶膜的判定

B.1 酶膜活性的判定

校正仪器时,注入 25 μL $\beta\text{-D}$ -葡萄糖标准溶液(4.3.2.3),仪器显示指示数值后,按下酶膜响应键,则显示出酶膜活性的相应数值。如相应数值大于 10.0,则表示酶膜活性符合要求;相应数值小于 10.0 时,应更换新酶膜。

B.2 酶膜线性的判定

校正仪器操作步骤完成后,仪器显示酶膜线性检查指令。用微量进样器注入 50 μL $\beta\text{-D}$ -葡萄糖标准溶液(4.3.2.3),如显示值大于 184.0,表示酶膜线性良好;小于 184.0 时,应按下仪器线性校正键,进行线性校正,或更换新酶膜。

B.3 酶膜抗干扰性的判定

校正仪器操作步骤完成后,用微量进样器吸取 25 μL 新配制的 1%亚铁氰化钾溶液,注入反应池进样口。当仪器显示值为 $-2.0 \sim +6.0$ 时,表示酶膜抗干扰符合要求;否则应更换新酶膜。

1%亚铁氰化钾溶液的配制:用 100 mL 烧杯准确称取 1.15 g 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$,分析纯],加入少量水使之溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。