

全自动分析仪酶法检测葡萄酒中还原糖的含量

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

摘要：本实验使用 Thermo Scientific Arena 全自动分立式生化分析仪，采用还原糖酶法检测试剂盒，建立了快速检测葡萄酒中还原糖含量的分析方法。实验表明还原糖含量在 0.02~2.00g/L 浓度范围内线性关系良好，相关系数为 0.9994；加标回收率(n=3)在 97.56%~107.66%之间；精密度和重复性(n=10)的 RSD%分别为 1.26%和 2.14%。该法具有无需样品前处理、特异性好、灵敏度高、测定速度快等优点，适用于葡萄酒企业对葡萄酒酿造过程控制和葡萄酒产品质量检测。

关键词：还原糖；葡萄酒；酶法试剂盒；Arena 自动分立式分析技术

Enzymatic Determination of Reducing Sugar in Wine by Automatic Discrete Analyzer

¹China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, 100027, Beijing

²Thermo Fisher Scientific (China) Inc., 100007, Beijing

Abstract: Applying Thermo Scientific Arena Automated Discrete Analyzer, using Reducing sugar enzymatic kits, a method was developed for rapidly analyzing the concentration of reducing sugar in wines. A suitable linear relationship was obtained between the concentrations of Reducing sugar (0.02~2.00g/L) and the correlation coefficient was 0.9994; the Recovery ratio (n=3) were between 97.56%~107.66%,the RSD% of precision and repeatability (n=10) were 1.26% and 2.14% respectively. This method is simple, specific, sensitive, rapid, and good for determination of Reducing sugar in wines, suitable for monitoring samples during wine-making and brewing process and quality control for the finished wine in winery.

Keywords: Reducing sugar, Wine, Enzymatic kits, Arena Automatic Discrete Technology

前言

羰基碳（异头碳）没有参与形成糖苷键，能够还原斐林(H.von Fehling)试剂或托伦斯(B.Tollens)试剂的糖称为还原糖，如葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖等。一般情况下，单糖的还原能力主要来自它的醛基，如葡萄糖，而多糖则大多是因为半缩醛羟基的存在。还原后会变成糖酸，如葡萄糖会变成葡萄糖酸。所有的单糖（除二羟丙酮），不论醛糖、酮糖都是还原糖。除蔗糖外，大部分双糖也是还原糖。

在蒸馏酒和酿造酒的生产中均有对还原糖的测定要求。其中，白酒生产中，采用固体发酵时，对酒醅的质量指标分析中要求对还原糖含量进行测定；啤酒生产中，糖及糖浆的质量检测、糖化麦汁的质量控制及对半成品的分析中要求对还原糖含量进行测定；葡萄酒生产中，生产过程分析、成品分析要求对还原糖含量进行测定；酒精生产中，还原糖含量是整个工艺控制的重要指标，酒母醪、发酵罐、成熟醪均要求对还原糖含量进行测定，以确定生产状况并适时调整工艺条件^[1]。

还原糖的测定方法很多，主要包括直接滴定法^[2]、菲林试剂法^[3]、高锰酸钾氧化法^[4]和 DNS 法^[5]等，这些方法存在前处理复杂、分析时间长及滴定终点判断误差大等缺点^[6]。生产化验人员若因理论不足或者常年习惯性的不准确操作以及企业监管不到位等因素使得还原糖测定不能得到足够准确的数据，就会影响生产和工艺的调整，造成企业经济损失。特别是，在葡萄酒行业中，若采用手工滴定法检测还原糖含量，特别是干红葡萄酒酒体颜色严重影响滴定终点的判断，由于人为因素的存在，检测结果存在极大误差。近年来，也有报道采用高效液相色谱法、气相色谱法、流动注射分光光度方法^[7-8]等进行检测，但是由于成本过高，很难被普遍应用。另外，市场上也出现一些基于斐林试剂滴定法原理的全自动还原糖测定仪^[9]，在谷氨酸发酵、淀粉制糖、酿酒、烟草、食品等行业得到了广泛应用。但是此类单指标的检测仪器对于企业来说操作繁琐，很难满足全面快速检测和过程质量控制的要求。

酶法分析具有操作简单、灵敏、快速、准确、可靠的优点，而且更重要的是容易形成自动化，在国外

葡萄酒和果汁生产企业已经被广泛采用，并且纳入了许多国际标准和行业法规中。而在国内一直缺乏一种能够快速、准确应用酶法试剂盒的检测工具，目前赛默飞世尔科技有限公司提供的 Arena 全自动工业生化分析仪解决了这一难题，可以实现葡萄酒和果汁样品中多个指标的酶法分析和快速检测，有望改变葡萄酒企业的工作模式。本文建立了采用 Arena 全自动工业生化分析仪对成品葡萄酒中还原糖含量的快速检测方法，该技术可用于葡萄酒和果汁企业的生产过程控制和产品质量检验。

1. 材料与方法

1.1 主要仪器

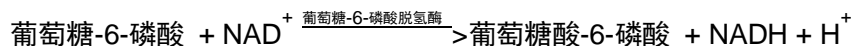
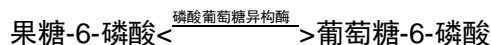
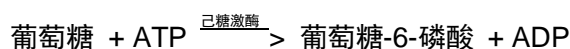
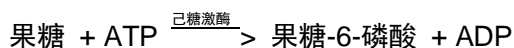
Arena 20XT 全自动分立式工业生化分析仪，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；

1.2 试剂与耗材

葡萄糖、果糖试剂盒、糖类混合标准液，赛默飞世尔科技（中国）有限公司提供；
干红、干白葡萄酒样品，葡萄酒公司提供；
实验用水为高纯水。

1.3 检测原理

在从葡萄汁到葡萄酒的发酵过程中，还原糖浓度的变化是指示发酵进程的一个重要指标。葡萄酒中主要的还原糖是葡萄糖和果糖，占到总还原糖量的大部分，所以完全可以把葡萄糖和果糖含量之和作为还原糖含量的指标来进行评价，在工业上也具有重要意义。使用 Arena 全自动工业生化分析仪测定还原糖时可以通过方法设定，直接得到葡萄酒样品中葡萄糖和果糖含量之和。



1.4 实验方法

1.4.1 定标

取 1mL 超纯水、1mL 含总葡萄糖 0.744g/L、D-葡萄糖 0.504g/L、D-果糖 0.502g/L、蔗糖 0.456g/L 的混合糖类标准液置于样品架上，按仪器设定参数定标。

1.4.2 样品测定

取待测样品各约 1mL，置于样品架各个样品位上，按照仪器的使用规程和参数设定进行检测。

2. 结果与讨论

2.1 定标

用高纯水和含还原糖 1.006g/L 的糖标准液对还原糖进行定标，定标结果如下：因子 (Factor) = 1.093，偏差 (Bias) = 0.016，相关系数 (R²) = 0.999943。

2.2 标准曲线和检出限

配制 6 个浓度梯度的还原糖标准溶液 (0.002~2.000g/L)，按照 Arena20XT 仪器设定的参数进行测定，以测定响应值 (y) 对浓度 (x) 作标准曲线，所得线性回归方程为：y = 0.992x + 0.024，相关系数

$R^2=0.9994$ ，葡萄糖在 0.002~2.000g/L 浓度范围内与仪器响应值线性关系良好，可用于定量检测葡萄酒样品中还原糖的含量。

把空白对照样品用以上检测方法连续测定 10 次，根据 AOAC 推荐的检出限和定量限计算公式[3]，计算出仪器对还原糖的检出限和定量限分别为 0.006g/L 和 0.015g/L。

$$A_L = A_b + K S_b \quad [3]$$

式中 A_L (Average of low lever) 是分析试样在检出限水平时测得的分析信号的平均值，即最小检测信号值 (响应值)； A_b (Average of blank) 和 S_b (SD of blank) 分别为在测定试样相同条件下，对空白试样进行足够多次 (比如 20 次) 测量所得的空白信号 (噪声) 的平均值和测定的标准偏差； K 是由置信水平决定的系数，IUPAC 推荐 $K=3$ ，在误差正态分布条件下，其置信度为 99.7%。 A_L 值所对应的被测元素的量或浓度即为最小检出量 Q_L 和最小检出浓度 C_L ，即检出限 (Limit of Detection, LOD)； $K=10$ 时计算的 A_L 值为定量限 (Limit of Quantitation, LOQ)。

2.3 加标回收率

分别向干红葡萄酒和干白葡萄酒中加入高、中、低三个不同浓度梯度的还原糖标准液，按照 Arena 仪器设定参数测定并计算回收率，干红回收率在 97.56%~99.53% 之间，干白回收率在 99.50%~107.66% 之间，见表 1。表明该方法检出效果好，测定结果稳定、可靠，能够满足对葡萄酒中还原糖含量的定量检测。

表 1 酶法测定葡萄酒中还原糖的加标回收率(n=3)

Table 1 Recovery test of Reducing sugar in wine by Enzymatic method (n=3)

名称	原始浓度(g/L)	加入浓度(g/L)	测定浓度(g/L)	平均回收率%
干红葡萄酒	0.131	0.070	0.070±0.005	99.53
	0.131	0.140	0.137±0.002	97.77
	0.131	0.210	0.205±0.001	97.56
干白葡萄酒	0.350	0.165	0.178±0.003	107.66
	0.350	0.330	0.335±0.004	101.44
	0.350	0.5500	0.547±0.001	99.50

2.4 精密度、重复性测定

分别选择干红葡萄酒和干白葡萄酒做精密度、重复性的实验。对同一样品按本方法进行 10 次重复测定，计算对干红葡萄酒和干白葡萄酒样品的精密度检测结果 (RSD%) 分别为 1.264% 和 1.239%；对同一样品取 10 份按本方法分别测定，计算对干红葡萄酒和干白葡萄酒的重复性检测结果 (RSD%) 分别为 1.378% 和 2.141%；结果分别见表 2 和表 3。

表 2 酶法测定葡萄酒中还原糖含量的精密度结果 (n=10)

Table 2 Precision test of Reducing sugar in wine by Enzymatic method (n=10)

测定次数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	RSD%
还原糖含量 (g/L)	干红	0.141	0.144	0.143	0.145	0.147	0.143	0.143	0.143	0.141	0.141	0.143	1.264
	干白	0.403	0.396	0.391	0.393	0.391	0.389	0.392	0.387	0.389	0.387	0.392	1.239

表 3 酶法测定葡萄酒中还原糖含量的重复性结果 (n=10)

Table 3 Repeatability test of Reducing sugar in wine by Enzymatic method (n=10)

测定次数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	RSD%
还原糖含量 (g/L)	干红	0.130	0.133	0.131	0.132	0.130	0.127	0.131	0.130	0.131	0.133	0.131	1.378
	干白	0.345	0.343	0.351	0.346	0.342	0.342	0.364	0.359	0.353	0.353	0.350	2.141

2.5 样品测定

分别对 19 种干红、干白葡萄酒样品按照同样方法进行测定，还原糖含量的结果见下表：

编号	葡萄酒	还原糖 (g/L)
1	干红 1	1.220
2	干红 2	0.476
3	干红 3	0.498
4	干红 4	0.138
5	干红 5	0.054
6	干红 6	0.148
7	干红 7	0.074
8	干红 8	0.132
9	干红 9	0.378
10	干红 10	0.125
11	干红 11	0.428
12	干红 12	0.415
13	干红 13	0.797
14	干红 14	0.023
15	干红 15	0.437
16	干白 1	1.784
17	干白 2	2.375
18	干白 3	0.782
19	干白 4	0.431

3. 结论

本文建立了使用全自动工业生化分析仪，采用还原糖酶法分析试剂盒测定葡萄酒中还原糖含量的方法，该方法的加标回收率介于 97.56%~107.66%之间，精密度和重复性分别是 1.26%和 2.14%，检测方便、快速，结果精确度高。此外，该方法使用 Arena 全自动工业生化分析仪，具有快速、方便、经济、可靠等优点，实现了检测过程的自动化，能够满足酒类企业对产品的快速检验和葡萄酒生产过程质量控制的要求。

参考文献

- [1] GB/T S009.7—2003.食品中还原糖的测定[S].
- [2] 倪德翱. 电位滴定法测定葡萄酒中还原糖含量的研究[J].食品工程, 2007, (3): 61-63.
- [3] 赵二红,王艳荣. 浅谈斐林氏法测定还原糖含量的误差[J].发酵科技通讯, 2003, (02) .
- [4] 崔辉梅, 石国亮, 安君和.马铃薯还原糖含量测定方法的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (19): 4821-4823.
- [5] 尹建雄, 卢红, 谢强等. 3, 5-二硝基水杨酸比色法 (DNS) 快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22 (6): 829-833.
- [6] 熊江波, 陈文芳, 吴建富. 烟叶中还原糖测定方法的改进[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28 (4): 637-640.
- [7] 许汉英,王柯敏.流动注射-分光光度法测定蜂蜜中还原糖的研究[J]. 高等学校化学学报, 1998,19 (12): 1925-1928.
- [8] 陈婷,黄志勇,徐秋云. 蜂蜜和饮料中还原糖含量的流动注射分光光度测定法[J].中国食品学报, 2009, (06) .
- [9] 楚杰, 王德源, 杨艳, 张利群.还原糖测定仪的应用.山东食品发酵.2003,(4):42-43.
- [10] 史建国, 微生物发酵过程还原糖光度传感器的研究[D],山东大学,2006 年.