

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250304002

引用格式: 冯嘉雯, 于惠莉, 杨惠雯, 等. 2种酸水解法测定淀粉含量的优化与一致性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(10): 262–271.

FENG JW, YU HL, YANG HW, *et al.* Optimization and consistency study of starch content determination by 2 kinds of acid hydrolysis method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(10): 262–271. (in Chinese with English abstract).

2种酸水解法测定淀粉含量的优化与一致性研究

冯嘉雯^{1,2}, 于惠莉³, 杨惠雯^{1,2}, 路湫丹^{1,2}, 陈安琪¹, 孙霄霄¹, 王瑾⁴, 刘亚轩^{1,2*}

(1. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300392; 2. 天津市主要农作物智能育种重点实验室, 天津 300392; 3. 国家海洋标准计量中心, 天津 300112; 4. 天津天和计量检测有限公司, 天津 300382)

摘要: **目的** 优化酸水解-斐林试剂滴定法和酸水解-3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)比色法, 对比粮食作物样品中淀粉含量不同测定方法的一致性。**方法** 通过对乙醇洗涤量、加酸量、酸解时间、样液 pH、检测波长、显色剂加入量、显色时间、显色温度等实验条件的优化, 确定测定该产品淀粉含量的最佳条件。**结果** 酸水解-斐林试剂滴定法最优条件为称取样品后用适量石油醚、乙醇洗去脂肪及可溶性糖, 加入 25 mL 盐酸, 冷凝回流 120 min, 用氢氧化钠校正试样水解液至中性, 过滤后取滤液以 2 s/滴的速度滴定碱性酒石酸铜甲乙液。酸水解-DNS 比色法最优条件为脱脂除糖酸解后, 校正试样 pH 为 8~9, 有颜色且蛋白质含量高的样品加入 10 mL 乙酸铅沉淀蛋白以减少或消除色素干扰, 过滤后取滤液加入 2.0 mL DNS, 90~100 °C水浴 12 min 进行显色, 分光光度计 540 nm 波长下进行比色, 4 h 内完成测定。两种方法相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 2%, 相对误差(relative error, RE)均小于 4%, 测定结果通过平均值一致性检验与配对样本 *t* 检验, 具有一致性。**结论** 优化的两种方法相较国标法更加高效、准确, 方法正确度、精密度良好, 可适用于粮食作物中淀粉含量的检测。

关键词: 酸水解-斐林试剂滴定法; 酸水解-3,5-二硝基水杨酸比色法; 淀粉测定; 方法优化; 一致性

Optimization and consistency study of starch content determination by 2 kinds of acid hydrolysis method

FENG Jia-Wen^{1,2}, YU Hui-Li³, YANG Hui-Wen^{1,2}, LU Hao-Dan^{1,2}, CHEN An-Qi¹, SUN Xiao-Xiao¹, WANG Jin⁴, LIU Ya-Xuan^{1,2*}

(1. College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Intelligent Breeding of Major Crops, Tianjin 300392, China; 3. National Center of Ocean Standards and Metrology, Tianjin 300112, China; 4. Tianjin Tianhe Metrological Testing Co., Ltd., Tianjin 300382, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the acid hydrolysis-Fehling reagent titration method and the acid hydrolysis-3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) colorimetric method to compare the consistency of different methods for measuring starch content in grain crop samples. **Methods** Experimental conditions, including ethanol washing

收稿日期: 2025-03-04

基金项目: 农产品质量安全监管专项(204001/LH007505)

第一作者: 冯嘉雯(1999—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品分析技术研究。E-mail: fjw77882023@126.com

*通信作者: 刘亚轩(1978—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品分析技术研究。E-mail: oilandfat@163.com

volume, acid addition volume, acid hydrolysis time, sample solution pH, detection wavelength, chromogenic agent volume, color development time and color development temperature, were optimized to determine the optimal processing conditions for determining the starch content in such products. **Results** The optimal conditions for the acid hydrolysis-Fehling reagent titration method were as follows: After weighing the sample, fats and soluble sugars were removed using an appropriate amount of petroleum ether and ethanol; 25 mL of hydrochloric acid was added, followed by condensation reflux for 120 minutes; the hydrolyzed sample solution was neutralized with sodium hydroxide, filtered, and the filtrate was titrated with alkaline copper tartrate methyl and ethyl solution at a rate of one drop every 2 seconds. The optimal conditions for the acid hydrolysis-DNS colorimetric method were as follows: After removing fat, sugar and acid hydrolysis, the sample solution pH was adjusted to 8–9; for samples with color and high protein content, 10 mL of lead acetate was added to reduce or eliminate pigment interference; after filtration, 2 mL of DNS was added to the filtrate, followed by color development in a water bath at 90–100 °C for 12 minutes; the absorbance was measured at 540 nm using a spectrophotometer, and the determination was completed within 4 hours. Both methods had a relative standard deviation (RSD) of less than 2% and a relative error (RE) of less than 4%. The measurement results had passed mean consistency test and paired samples *t*-test. **Conclusion** The 2 kinds of optimized methods are more efficient and accurate compared to the national standard method, with good accuracy and precision making them suitable for starch content determination in grain crops.

KEY WORDS: acid hydrolysis-Fehling reagent titration method; acid hydrolysis-3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric method; starch determination; method optimization; consistency

0 引言

淀粉是葡萄糖分子通过 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键聚合而成的多糖, 由直链淀粉和支链淀粉组成, 广泛存在于谷类、豆类、根茎类等粮食作物中, 如小麦、大米、板栗、土豆等^[1], 是植物中最关键的贮藏多糖^[2]。淀粉一般储存在果实、种子和根中, 是人类饮食中主要的碳水化合物成分^[3], 其消化和水解后产生的麦芽糊精、葡萄糖和其他物质是人体能量来源的主要途径^[4]。

国内外淀粉含量的前处理与测定方法有酸水解法^[5]、酶水解法^[6]、滴定法^[7–8]、比色法^[9]和旋光法^[10–13]等。在实际应用中, 不同前处理与测定方法因其原理和操作步骤不同, 在测定相同样品时, 其淀粉含量存在较大差异^[14–15]。实验室检测淀粉的主要方法为 GB/T 5009.9—2023《食品安全国家标准 食品中淀粉的测定》, 但该标准所涉及的方法所用试剂较多^[16]、实验过程烦琐, 实验操作复杂, 而且对实验结果的影响因素较多, 易导致结果不准确, 亟需通过优化实验条件加以改进^[17]。近年来, 还原糖相关测定方法的优化研究取得显著进展。如 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 比色法通过优化 DNS 试剂配方, 添加脱色试剂提高该方法的稳定性与灵敏度, 并使其适用于测定颜色样品^[18–19]。电位滴定法通过采用自动电位滴定仪代替传统手工滴定提高该方法的分析效率和准确度^[20]。本研究参考 GB/T 5009.9—2023 标准第二法, 通过对酸水解-斐林试剂滴定法存在的问题进行分析探讨, 确定了适合于粮食作物的最佳前处理与测定条件, 旨在提高

该方法的准确性、稳定性和实用性; 同时探索采用酸水解法联合 DNS 比色法测定淀粉含量, 缩短检测时间, 提高检测灵敏度^[21–22]。为淀粉含量的准确测定提供了可靠的多方法一致性验证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所选小麦、大米、玉米、小米、高粱、土豆、板栗样品为研制标准物质的候选物样品, 原料经过大型球磨机粉碎后混匀, Co^{60} 辐照灭菌, 样品粒度为 80 目 (0.198 mm) 左右, 已经过均匀性检验确认其均匀性良好。

D-无水葡萄糖纯度标准物质 (标准号 GBW10062, 中国计量科学研究院); 石油醚、乙醇、氢氧化钠、 α -萘酚、乙酸铅、硫酸钠、酒石酸钾钠、苯酚、DNS (分析纯, 上海迈瑞尔生化科技有限公司); 盐酸、浓硫酸 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 甲基红、亚甲蓝、硫酸铜 (分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 亚铁氰化钾、无水亚硫酸钠 (分析纯, 天津渤化化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

ME204E 电子天平 (精度 0.0001 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司); HH-S6A 型电热恒温水浴锅 (北京科伟仪器有限公司); DK-II 型电子调温万用电炉 (天津天泰仪器有限公司); UV1901PCS 型双光束紫外可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司); SC-6 型高精度恒温槽 (河南百年仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 酸水解-斐林试剂滴定法

参考 GB/T 5009.9—2023 标准第二法酸水解法与赵甲慧等^[13]的方法并加以改进: (1)脱脂。称取 2 g 试样(精确至 0.0001 g), 置于放有慢速滤纸的漏斗中, 用适量石油醚少量多次洗涤样品, 脱去脂肪; (2)洗糖。用适量乙醇溶液(85%, V/V)分次洗去可溶性糖至微糖检验结果为阴性, 通过莫利施反应确认无可溶性糖残留; (3)酸解。样品残渣用 100 mL 左右蒸馏水转移至 250 mL 锥形瓶中, 加入 25 mL 盐酸(1:1=V:V), 沸水浴中冷凝回流 2 h; (4)除杂。回流完毕将试样水解液迅速放进凉水冷却, 待样液冷却后, 加入 1 滴甲基红指示剂, 用氢氧化钠溶液(400 g/L)调至黄色, 试样水解液颜色较深的样品用精密 pH 试纸调至试样水解液的 pH 为中性, 然后加 10 mL 乙酸铅溶液(200 g/L), 摇匀, 放置 10 min 后加入 10 mL 硫酸钠溶液(100 g/L), 以除去过多的铅, 摇匀后将全部溶液及残渣转入 500 mL 容量瓶中, 用蒸馏水润洗锥形瓶, 洗液合并入容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 混匀, 过滤, 弃去初滤液; (5)滤液按直接滴定法滴定, 试剂空白按反滴定法滴定。

1.3.2 酸水解-DNS 比色法

称取 0.3 g 试样(精确至 0.0001 g), 脱脂、洗糖、酸解操作步骤同斐林试剂滴定法的酸水解前处理。试样水解液冷却后, 不加甲基红, 用精密 pH 试纸调至试样水解液的 pH 约为 8~9 后, 加 10 mL 乙酸铅溶液(200 g/L), 摇匀, 放置 10 min 后加入 10 mL 硫酸钠溶液(100 g/L), 以除去过多的铅。摇匀后将全部溶液及残渣转入 250 mL 容量瓶中, 用蒸馏水润洗锥形瓶, 洗液合并入容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度。过滤, 弃去初滤液, 滤液供测定用。

用移液管准确吸取 0.00、0.40、0.80、1.00、1.20、1.60、2.00 mL 葡萄糖标准溶液(1.0 mg/mL)于 25 mL 比色管中, 加蒸馏水补足至 2.0 mL, 加入 DNS 试剂 2.0 mL, 沸水中加热 12 min, 凉水冷却, 加蒸馏水定容至 25 mL; 在 2.0 mL 去离子水中加入 2.0 mL DNS 试剂作相同加热处理后用于分光光度计的调零。540 nm 处测定葡萄糖标准溶液吸光度。以葡萄糖含量(X, mg)为横坐标, 吸光度为纵坐标(Y)绘出标准曲线。吸取 1.0 mL 样液与 1.0 mL 蒸馏水, 加 2.0 mL DNS 试剂, 按上述处理方法测吸光度, 由葡萄糖含量折算出淀粉含量。

1.4 数据处理

实验数据采用 Excel 2021 进行处理; 采用 Origin 2019 软件绘制图形。

2 结果与分析

2.1 酸水解-斐林试剂滴定法条件优化

2.1.1 乙醇洗涤量的优化分析

通过莫利施反应得出小麦粉、大米粉、玉米粉、小米

粉、高粱粉乙醇洗涤量为 100 mL 时出现黄绿色环; 土豆粉、板栗粉乙醇洗涤量为 150 mL 时出现黄绿色环。选取大米粉和板栗粉, 其他条件不变, 将乙醇洗涤量选定为 0、50、100、150、200、250 mL 分别洗涤样品, 测得的淀粉含量如图 1、2 所示。实验结果表明, 不同乙醇体积对不同样品洗涤效果不同, 大米粉洗涤量由 0 mL 增加至 100 mL 时, 测得的淀粉含量显著下降; 洗涤量为 100 mL 时, 洗去可溶性糖的效果最好; 洗涤量超过 100 mL 后, 洗涤效果基本无差别。板栗粉洗涤量由 0 mL 增加至 150 mL 时, 测得的淀粉含量显著下降; 洗涤量为 150 mL 时, 洗去可溶性糖的效果最好; 洗涤量超过 150 mL 后, 洗涤效果基本无差别。因此, 在其他条件不变的情况下, 同时考虑到节约成本及减少试剂对环境的污染, 小麦粉、大米粉、玉米粉、小米粉、高粱粉用 100 mL 乙醇洗涤; 土豆粉、板栗粉用 150 mL 乙醇洗涤, 与莫利施反应验证出的洗涤量相符合。

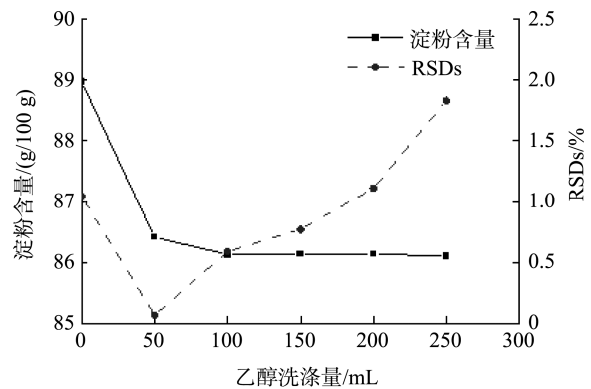
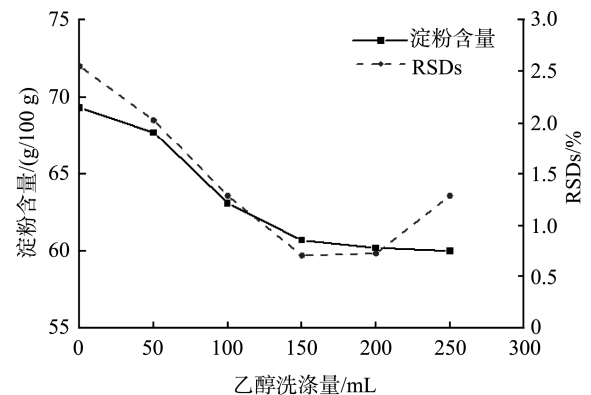


图 1 乙醇洗涤量对大米淀粉含量的影响

Fig.1 Effects of ethanol washing amount on rice starch content



注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

图 2 乙醇洗涤量对板栗淀粉含量的影响

Fig.2 Effects of ethanol washing amount on chestnut starch content

2.1.2 盐酸加入量的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 分别以同一浓度(1:1=V:V)不同体积(5、10、15、20、25、30、35、40、50、60 mL)盐酸对大米粉进行水解, 每个体积下平行 3 次, 所得淀粉含量如图 3 所示。实验结果表明, 盐酸用量由 5 mL

增加至 15 mL 时, 测得淀粉含量逐渐增加, RSD 均大于 2%; 由 20 mL 增加至 30 mL 时, 淀粉含量几乎不变, RSD 均在 1% 左右; 由 30 mL 增加至 50 mL 时, 淀粉含量呈下降趋势, RSD 逐渐增高且超过 2%。其原因可能是盐酸用量小于 20 mL 时, 样品不能充分被酸解, 形成不稳定的糊状物和凝胶^[23-24], 造成淀粉含量偏低; 盐酸用量大于 30 mL 时, 水解液色泽随着盐酸用量的增加而逐渐加深, 不利于 pH 调节, 造成 RSD 逐渐增加; 盐酸用量为 20~30 mL 时, 盐酸用量适中, 水解完全, 水解液色泽较浅, 便于 pH 调节时观察终点^[25]。当盐酸用量为 25 mL 时, RSD 最小, 故盐酸用量 25 mL 为最佳。

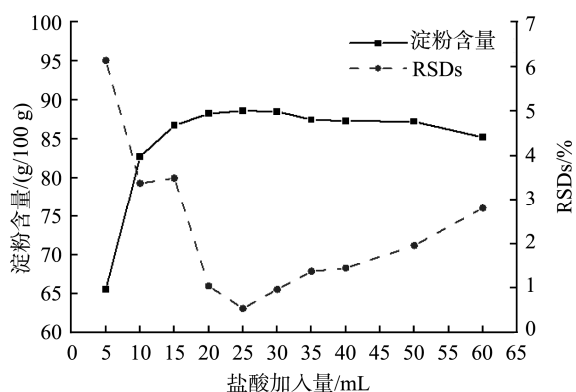


图 3 盐酸加入量对大米淀粉含量的影响
Fig.3 Effects of hydrochloric acid addition on rice starch content

2.1.3 冷凝回流时间的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 将冷凝回流时间选定为 0、30、60、90、120、180、210 min, 每个时间下平行 3 次, 所得淀粉含量如图 4 所示。实验结果表明, 冷凝回流时间由 0 min 增加至 120 min 时, 测得淀粉含量逐渐增加, RSD 逐渐降低; 由 120 min 增加至 210 min 时, 测得淀粉含量逐渐下降, RSD 逐渐增高。其原因可能是冷凝回流时间小于 120 min 时, 酸水解时间过短, 淀粉可能刚只水解成糊精和麦芽糖, 还未完全水解成葡萄糖, 造成淀粉含量较

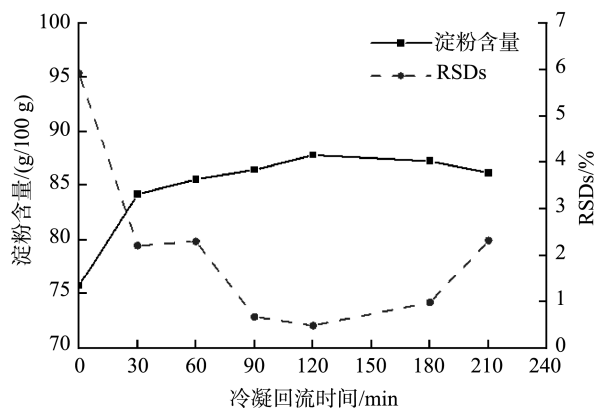


图 4 冷凝回流时间对大米淀粉含量的影响
Fig.4 Effects of condensation reflux time on rice starch content

低; 冷凝回流时间大于 120 min 时, 酸水解时间过长, 可能会发生副反应消耗掉部分葡萄糖, 造成淀粉含量持续减少。当冷凝回流时间为 120 min 时, 淀粉含量最高, RSD 最小, 故冷凝回流时间 120 min 为最佳。

2.1.4 酸水解-斐林试剂滴定法样液 pH 的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 将试样水解液的 pH 调至为 1~2、3~4、5~6、7~8、9~10、11~12, 每个 pH 下平行 3 次, 所得淀粉含量如图 5 所示。实验结果表明, 过酸过碱都会导致测得淀粉含量降低, pH 为 7~8 时, 测得淀粉含量达到最大值, RSD 较低, 故 pH 7~8 为最佳。

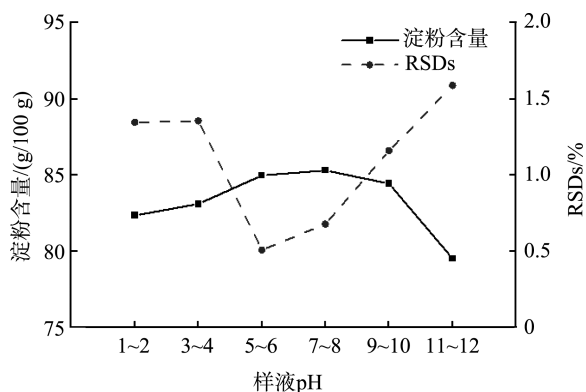


图 5 样液 pH 对大米淀粉含量的影响(酸水解-斐林试剂滴定法)
Fig.5 Effects of sample pH on rice starch content (acid hydrolysis-Fehling reagent titration method)

2.1.5 沸腾时间的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 将碱性酒石酸铜溶液沸腾时间控制在 1~2、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7 min, 每个沸腾时间下平行 3 次。所得淀粉含量如图 6 所示。实验结果表明, 沸腾时间超过 2 min, 随着沸腾时间的延长, 淀粉含量逐渐降低且 RSD 逐渐升高。其原因可能是滴定过程中稍过量的还原糖把次甲基蓝还原, 使蓝色的氧化型次甲基蓝还原为无色的还原型次甲基蓝, 即达滴定终点^[26]。沸腾时间过长, 次甲基蓝、葡萄糖可能会与空气发生氧化还原反应, 此时就需要更大量的葡萄糖去还原次甲基蓝, 导致淀粉含量降低。因此在使用斐林试剂滴定法测定淀粉含量

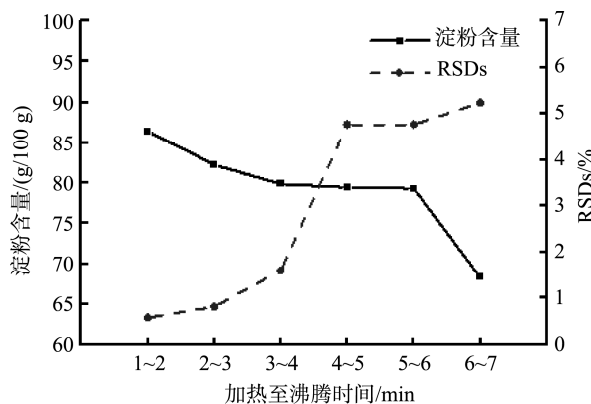


图 6 沸腾时间对大米淀粉含量的影响
Fig.6 Effects of boiling time on rice starch content

时,要严格控制酒石酸铜溶液在 2 min 内加热至沸。

2.1.6 滴定速度的优化分析

选取大米粉,其他条件不变,将滴定速度控制在每滴 0~1、1~2、2~3、3~4、4~5 s,每个滴定速度下平行 3 次。所得淀粉含量如表 1 所示。实验结果表明,滴定速度过慢会导致测得淀粉含量偏低,RSD 高于 3%;滴定速度过快会导致测得淀粉含量偏高,RSD 高于 2%;滴定速度在 2 s/滴左右时,淀粉含量平稳,且 RSD 低于 1%。其原因可能是滴定速度过慢,次甲基蓝、葡萄糖可能会与空气发生氧化还原反应,此时就需要更大量的葡萄糖去还原次甲基蓝,导致淀粉含量降低;滴定速度过快,次甲基蓝快速变成无色,但一段时间后,又会慢慢变回蓝色,说明次甲基蓝没有完全被葡萄糖还原。因此在滴定过程中用秒表计时,严格控制以 2 s/滴的速度滴定。

表 1 滴定速度对大米淀粉含量的影响
Table 1 Effects of titration speed on rice starch content

滴定速度/s	淀粉含量/(g/100 g)	RSDs/%
0~1	93.48	3.43
1~2	86.01	0.00
2~3	86.27	0.29
3~4	78.75	2.63
4~5	78.48	4.46

2.2 酸水解-DNS 比色法

2.2.1 酸水解-DNS 比色法样液 pH 的优化分析

选取大米粉,其他条件不变,将试样水解液的 pH 调至为 5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、11~12、12~13、13~14,每个 pH 下平行 3 次,所得淀粉含量如图 7 所示。实验结果表明,样液 pH 为 5~8 时,测得淀粉含量逐渐增加;样液 pH 为 8~10 时,测得淀粉含量趋势保持平稳;样液 pH 为 10~14 时,测得淀粉含量逐渐降低。其原因是还原糖与 DNS 的反应需要碱性条件,在氢氧化钠存在下,还原糖能

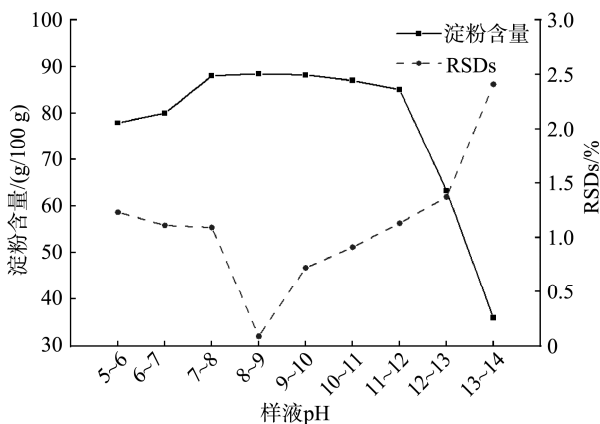


图 7 样液 pH 对大米淀粉含量的影响(酸水解-DNS 比色法)
Fig.7 Effects of sample pH on rice starch content (acid hydrolysis-DNS colorimetric method)

将 DNS 中的硝基还原为氨基,生成氨基化合物,此化合物在碱性溶液中呈橘红色,在 540 nm 波长处有最大吸收^[27]。当样液 pH 为 8~9 时,测得淀粉含量最大,RSD 最低,故 pH 8~9 最佳。

2.2.2 乙酸铅用量的优化分析

选取大米粉、板栗粉,其他条件不变,将乙酸铅用量选定为 0、5、10、15、20、30、50 mL,每个体积下平行 3 次。所得淀粉含量如图 8、9 所示。结果表明,不同体积的乙酸铅用量对不同样品作用效果不同。大米粉乙酸铅用量由 0 mL 增加至 15 mL 时,测得淀粉含量基本没有变化;由 15 mL 增加至 50 mL 时,测得淀粉含量逐渐降低。板栗粉乙酸铅用量由 0 mL 增加至 10 mL 时,测得淀粉含量逐渐增加;由 10 mL 增加至 50 mL 时,测得淀粉含量逐渐降低。其原因可能是乙酸铅可以吸附颜色,沉淀蛋白质、果胶等杂质。大米粉本身没有颜色且蛋白质含量较低,故是否加入乙酸铅对淀粉含量没有影响,相反加入过多乙酸铅,沉淀较多,后续无法过滤全部滤液,造成淀粉含量降低。板栗粉本身有颜色且蛋白质含量较高,加入 10 mL 乙酸铅溶液时,板栗粉中蛋白质的沉淀效果较好,得到的样品溶液透明澄清,淀粉含量最高,RSD 值最小;少于 10 mL 时,板栗粉样液色泽较深,蛋白质沉淀不完全,造成淀粉含量偏低;

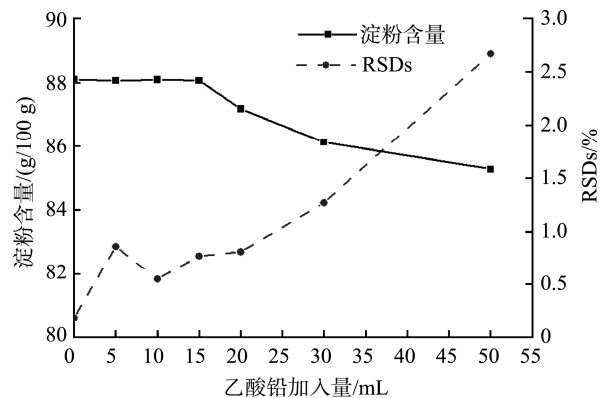


图 8 乙酸铅用量对大米淀粉含量的影响
Fig.8 Effects of lead acetate dosage on rice starch content

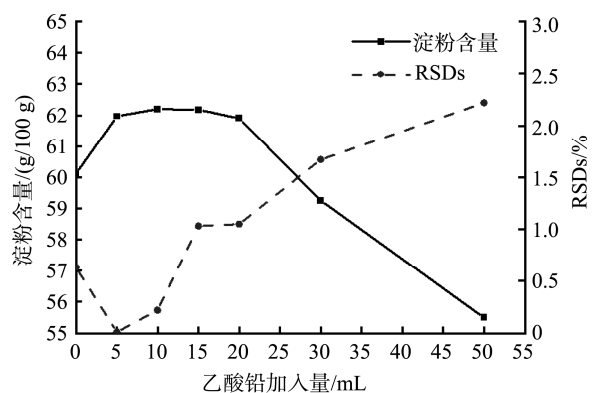


图 9 乙酸铅用量对板栗淀粉含量的影响
Fig.9 Effects of lead acetate dosage on chestnut starch content

大于 10 mL 时, 沉淀较多, 后续无法过滤, 造成淀粉含量降低。因此, 在其他条件不变的情况下, 同时考虑到节约成本及减少试剂对环境的污染, 大米粉不添加乙酸铅、板栗粉加入 10 mL 乙酸铅为最佳。

2.2.3 检测波长的优化分析

在碱性条件下, DNS 与还原糖沸水浴中共热后生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸^[28]。在一定波长范围内, 棕红色物质颜色深浅与还原糖含量成正比。DNS 比色法测定波长多集中在 400~800 nm^[29-32], 其最佳波长的确定受到仪器性能、实验样品和 DNS 试剂等因素的影响^[33]。为了确定测定淀粉的最佳检测波长, 其他条件不变, 改变吸收波长, 在 400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600 nm 波长处进行测定, 结果如图 10 所示。实验结果表明, 尽管葡萄糖显色液在 440~480 nm 达到吸收最大值, 但是由于 DNS 试剂本身对该波段具有较高的吸收, 因此会干扰样品的检测结果。根据“吸收最大, 干扰最小”原则, 选择 DNS 本底吸收最小, DNS 加葡萄糖吸收较高的波长作为最适吸收波长。当波长不短于 540 nm 时, DNS 试剂自身的吸收对葡萄糖显色液的干扰可忽略, 同时 DNS 加葡萄糖的吸收强度较 540 nm 后高, 因此将 540 nm 作为检测波长。

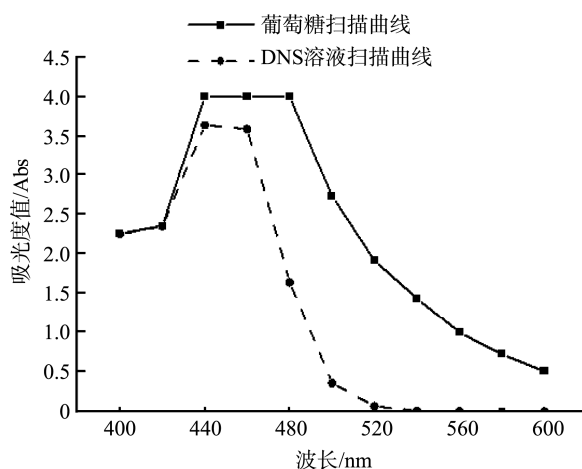


图 10 吸收波长对吸光度值的影响
Fig.10 Effects of absorption wavelength on absorbance value

2.2.4 环境温度的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 将显色好的样液放入高精度恒温槽, 将温度分别设置成 20、30、40 °C, 模拟环境温度, 每个温度下平行 3 次。所得淀粉含量如表 2 所示。实验结果表明, 当温度为 20 °C 或 30 °C 时, 测得淀粉含量稳定, 但 30 °C 下的 RSD 高于 20 °C; 当温度上升到 40 °C 时, 吸光度值剧增且极不稳定。可以看出, 环境温度对 DNS 比色法测定淀粉含量具有较大的影响。因此, 在其他条件不变的情况下, 同时考虑到显色液稳定性与检测精密度, 选择环境温度为 20 °C 最佳。

表 2 环境温度对大米淀粉含量的影响

Table2 Effects of environmental temperature on rice starch content

环境温度/°C	淀粉含量/(g/100 g)	RSDs/%
20	87.07	0.59
30	87.26	1.39
40	93.27	2.60

2.2.5 DNS 试剂加入量的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 将 DNS 试剂加入量选定为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL, 每个加入量下平行 3 次。所得淀粉含量如图 11 所示。实验结果表明, 当加入量少于 1.5 mL 时, 测得淀粉含量超过 100%; 当加入量为 1.5~2.5 mL 时, 测得淀粉含量趋于平稳; 当加入量多于 2.5 mL 时, 测得淀粉含量随着加入量的增加而逐渐降低。其原因可能是当 DNS 试剂加入量过少, 标准曲线灵敏度低, RSD 高; 当加入量多于 2.5 mL 时, 样品中的葡萄糖已全部与 DNS 发生氧化还原反应生成 3-氨基-5-硝基水杨酸, 吸光度值趋于平稳, 但过量的 DNS 导致灵敏度降低, 造成测得淀粉含量逐渐降低。因此, 在其他条件不变的情况下, 同时考虑到节约试剂与方法精密度, 选择 DNS 试剂加入量为 2.0 mL 最佳。

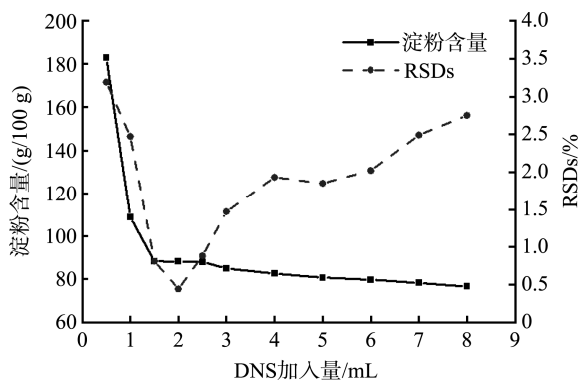


图 11 DNS 加入量对大米淀粉含量的影响
Fig.11 Effects of DNS addition on rice starch content

2.2.6 煮沸反应时间的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 分别测定了加入 DNS 试剂摇匀待测液放进沸水浴后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20 min 的淀粉含量, 每个时间下平行 3 次。所得淀粉含量如图 12 所示。实验结果表明, 淀粉含量随着煮沸反应时间的延长先增加后趋于平稳, 在显色时间大于 10 min 后, 淀粉含量趋于稳定, 表明在 10 min 后 DNS 与样液中的葡萄糖完全反应, 但在 12 min 下 RSD 值最低。因此, 在其他条件不变的情况下, 同时考虑到淀粉含量稳定性与检测精密度, 选择显色时间 12 min 为最佳。

2.2.7 显色温度的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 分别在 50、60、70、80、85、90、95、100 °C 水浴中加热 12 min, 每个温度下平行 3 次。所得淀粉含量如图 13 所示。实验结果表明, 显色温度

达 90~100 °C 时, 淀粉含量趋于稳定。因此, 在其他条件不变的情况下, 选择显色温度 90~100 °C 为最佳。

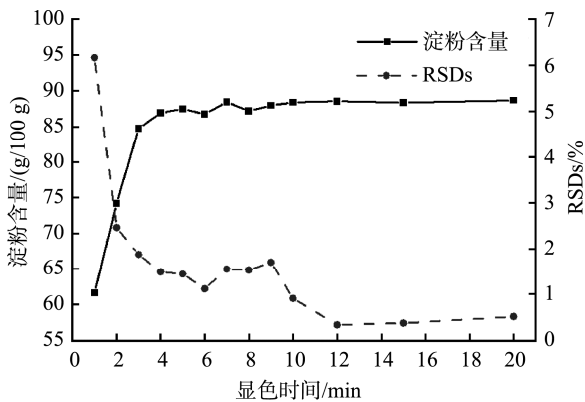


图 12 显色时间对大米淀粉含量的影响

Fig.12 Effects of color development time on rice starch content

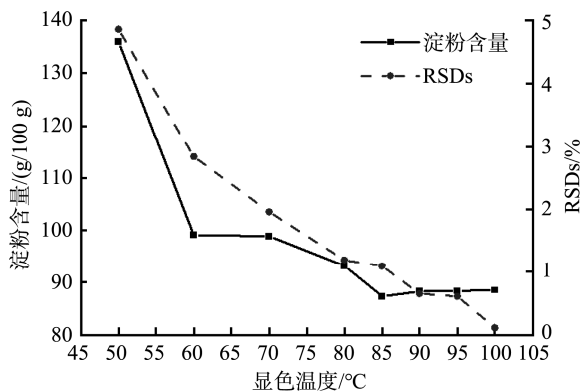


图 13 显色温度对大米淀粉含量的影响

Fig.13 Effects of color development temperature on rice starch content

2.2.8 阻断显色反应条件的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 试样水解液经显色反应后, 立即放置于自然环境、冷水、冰水中阻断反应, 每个条件下平行 3 次。所得淀粉含量如表 3 所示。实验结果表明, 自然凉或者凉水阻断显色反应, 测得淀粉含量基本没有变化且 RSD 值低于 1%; 冰水阻断反应, 测得淀粉含量降低且 RSD 高于 1%。其原因可能是冰水使反应温度突然骤降, 破坏反应体系, 造成淀粉含量降低, RSD 提高。因此, 样品经 DNS 试剂显色完全后, 可放在通风橱中自然冷却或用流动自来水浸泡冷却。

表 3 阻断显色反应条件对大米淀粉含量的影响

Table 3 Effects of blocking color reaction conditions on rice starch content

条件	淀粉含量/(g/100 g)	RSDs/%
自然凉	87.47	0.98
凉水	87.40	0.54
冰水	83.65	1.87

2.2.9 样液稳定时间的优化分析

选取大米粉, 其他条件不变, 分别将煮沸后的样液放置 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、8 h 后测其淀粉含量, 每个时间下平行 3 次。所得淀粉含量如图 14 所示。实验结果表明, 葡萄糖与 DNS 试剂反应生成的棕红色溶液在 4 h 内保持稳定。因此, 样品经 DNS 试剂显色后需在 4 h 内完成测定。

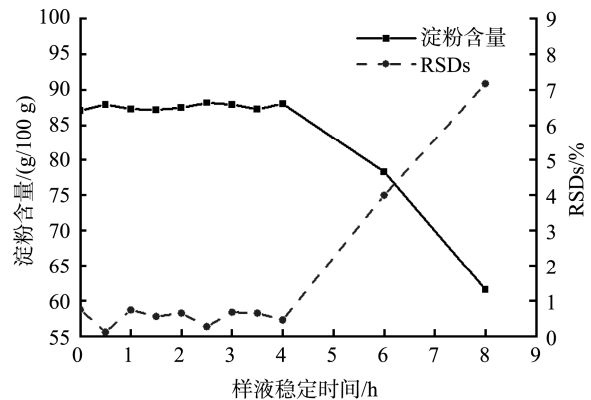


图 14 样液稳定时间对大米淀粉含量的影响

Fig.14 Effects of sample stability time on rice starch content

2.3 方法学验证

2.3.1 酸水解-DNS 比色法标准曲线

按照样品处理步骤, 进行标准曲线的绘制, 曲线回归方程为: $Y=0.5911X-0.0003$, $r^2=0.9998$, 线性相关性良好。

2.3.2 方法检出限

按照优化后的条件制备空白样液 12 组并进行滴定, 以 3 倍标准偏差计算检出限。酸水解-斐林试剂滴定法检出限为 1.31%, 酸水解-DNS 比色法检出限为 0.08%。

2.3.3 方法精密度和正确度

参照优化后的酸水解-斐林试剂滴定法和酸水解-DNS 比色法, 每个样品平行测定 6 次。测定结果如表 4 所示, RSDs 小于 2%, 相对误差小于 4%(该 7 个样品作为标准物质候选物已进行了多家实验室协作定值并经统计分析得到了标准值与不确定度, 相对误差是与定值所得标准值比较所得), 表明两种方法的精密度和正确度均良好。

2.3.4 酸水解-斐林试剂滴定法、酸水解-DNS 比色法结果一致性评价

参照优化后的酸水解-斐林试剂滴定法和酸水解-DNS 比色法, 将 7 个样品每个方法平行测定 6 次, 计算平均值。将数据进行平均值一致性检验— t 检验, 两种方法所测结果与 $|t|$ 值见表 5。结果表明 $|t|$ 值小于 $t_{0.05}$, 证明两种测定方法的结果具有一致性。

将酸水解-斐林试剂滴定法与酸水解-DNS 比色法测定 7 个样品数据进行配对样本 t 检验, 结果见表 6, 所得 t 值均小于 $t_{0.95(5)}$, 故滴定法与比色法测定结果之间无显著性差异。

表 4 两种方法测定结果精密度和正确度
Table 4 Precision and accuracy of measurement results by 2 kinds of methods

样品	方法	平均值 (g/100 g)	RSDs/%	标准值及不 确定度/%	相对 误差/%
小麦粉	滴定法	75.95	1.25	76.4±0.9	0.61
	比色法	77.21	1.69		1.04
大米粉	滴定法	86.31	0.99	86.9±1.0	0.82
	比色法	88.30	1.15		2.81
玉米粉	滴定法	82.34	1.63	82.2±0.9	0.14
	比色法	83.41	1.04		1.97
小米粉	滴定法	83.57	0.66	82.0±1.2	1.55
	比色法	83.01	1.12		3.02
高粱粉	滴定法	83.82	0.80	82.6±1.6	1.06
	比色法	84.52	1.93		1.90
土豆粉	滴定法	72.54	1.05	71.2±1.9	1.31
	比色法	73.61	1.29		2.80
板栗粉	滴定法	61.06	1.83	62.8±1.3	2.70
	比色法	62.82	1.99		0.10

表 5 两种方法平均值一致性检验结果
Table 5 Consistency test results of the average values obtained by 2 kinds of methods

样品	斐林试剂滴定法 (g/100 g)	DNS 比色法 (g/100 g)	自由度 n_1+n_2-2	$ t $	$t_{0.05}$
小麦粉	75.95	77.21	10	0.08	2.23
大米粉	86.31	89.47		0.24	
玉米粉	82.34	83.84		0.06	
小米粉	83.57	84.78		0.08	
高粱粉	83.82	84.52		0.04	
土豆粉	72.54	75.78		0.20	
板栗粉	61.06	62.82		0.10	

注: n_1 为斐林试剂滴定法测定次数; n_2 为 DNS 比色法测定次数。

表 6 配对样本 t 检验结果
Table 6 Results of paired samples t -test

样品	t 值	$t_{0.95(5)}$
小麦粉	2.26	2.57
大米粉	2.20	
玉米粉	1.45	
小米粉	1.23	
高粱粉	1.50	
土豆粉	1.66	
板栗粉	2.47	

3 讨论与结论

通过对 GB/T 5009.9—2023 标准方法第二法酸水解法测定淀粉含量的实验研究, 本研究确定了影响测定准确性的关键条件并进行了有效优化。结果表明, 将样品用 100 mL 乙醇溶液(85%, V/V)洗除可溶性糖(土豆粉和板栗粉 150 mL), 加入 25 mL 盐酸溶液于沸水浴中冷凝回流 2 h, 于样液中滴 1 滴甲基红指示液, 利用氢氧化钠溶液(400 g/L)调至水解液刚好变成黄色, 定容至 500 mL, 混匀, 过滤。将碱性酒石酸铜溶液在 2 min 内加热至沸, 保持沸腾状态以 2 s/滴的速度滴定。该条件下的酸水解-斐林试剂滴定法检出限为 1.31%, 方法相对标准偏差小于 2%, 相对误差小于 3%。本方法因所测结果 RSD 较低且检测过程中不易受各种因素影响使数据重现性好、稳定性高, 故从准确、精确、稳定等方面考虑, 该方法具有较强优势。但该方法操作较为复杂, 大批量测定样品时效率低, 人力物力耗费大, 而且该方法对实验人员操作水平要求较高, 滴定速度和反应液起沸时间需要操作人员严格控制, 滴定终点的判断依赖操作人员的丰富经验。

将 DNS 比色法和传统化学方法酸水解法相结合, 建立了采用 DNS 比色法测定粮食作物中淀粉含量的方法。结果表明: 洗糖、酸解条件同酸水解-斐林试剂滴定法, 回流完毕, 利用精密 pH 试纸调至水解液 pH 8~9, 于土豆、板栗粉试样水解液中加入 10 mL 乙酸铅溶液和 10 mL 硫酸钠溶液, 定容至 250 mL, 混匀, 过滤。加入 DNS 显色剂 2.0 mL, 于 90~100 °C 水浴加热 12 min 进行显色, 凉水阻断显色反应, 在吸收波长为 540 nm 处, 于 20 °C 环境中, 在 4 h 内完成上机测定, 以葡萄糖标准溶液为溶剂制作标准曲线, 标曲线线性相关性良好, 检出限为 0.08%, 方法相对标准偏差小于 2%, 相对误差小于 4%。本方法适用范围广泛, 检出限低, 操作步骤简单, 反应快速, 适用于大规模样品的检测。但该方法测定结果容易被样品中的复杂基质干扰, 某些样品中天然存在的色素成分可能与显色剂发生竞争性反应, 从而影响测定结果的准确性和可靠性。因此, 结合具体样品优化检测条件是研究的重点。

斐林试剂滴定法属于常量分析法, DNS 比色法属于微量分析法。通过平均值一致性检验与配对样本 t 检验, 得出优化后的两种方法测定结果之间没有显著性差异。本研究通过多方法一致性验证, 为淀粉含量检测工作提供了科学、可靠的技术方法。

参考文献

- 董慧娜, 陈洁, 汪磊, 等. 不同蒸煮方式下不同链长脂肪酸对板栗淀粉特性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 6009-6016.
DONG HN, CHEN J, WANG L, et al. The effects of different chain-length fatty acids on the properties of chestnut starch under different cooking methods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(18): 6009-6016.

- [2] MIAO M, BEMILLERE JN. Enzymatic approaches for structuring starch to improve functionality [J]. *Annual Review Food Science and Technology*, 2023, 14: 271–295.
- [3] 刘梦遥, 罗克. 抗性淀粉及其纳米颗粒的制备与应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(22): 1–10.
LIU MY, LUO K. Preparation and application of resistant starch and its nanoparticles [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(22): 1–10.
- [4] MACNEILL GJ, MEHRPOUYAN S, MAA M, *et al.* Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(16): 4433–4453.
- [5] 丁映, 陈鹰, 乐俊明, 等. 利用酸水解法测定烟叶中淀粉的含量[J]. *贵州农业科学*, 2005, 32(6): 72–72.
DING Y, CHEN Y, LE JM, *et al.* Determination of starch content in tobacco leaves by acid hydrolysis method [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2005, 32(6): 72–72.
- [6] 陈鹰, 乐俊明, 丁映. 酶水解法测定马铃薯中的淀粉含量[J]. *食品工业科技*, 2000(2): 64–65.
CHEN Y, LE JM, DING Y. Determination of starch content in potatoes by enzymatic hydrolysis method [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2000(2): 64–65.
- [7] 张越, 付莉. 酸水解-斐林试剂滴定法测定大米淀粉含量的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(20): 256–265.
ZHANG Y, FU L. Study on the determination of rice starch content by acid hydrolysis Ficin reagent titration method [J]. *Science Technology of Food Industry*, 2017, 38(20): 256–265.
- [8] 王海英, 王慧, 严伟, 等. 浅析样品前处理和酸化操作方式对大曲淀粉检测结果的影响[J]. *酿酒*, 2024, 51(2): 88–92.
WANG HY, WANG H, YAN W, *et al.* Analysis of the influence of sample pretreatment and acidification operation methods on the detection results of Daqu starch [J]. *Journal of Brewing Science*, 2024, 51(2): 88–92.
- [9] 郭有辉, 周娟, 胡露, 等. DNS 光度法测定风味鱿鱼中淀粉、还原糖和蔗糖的含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2019, 55(4): 463–466.
GUO YH, ZHOU J, HU L, *et al.* Determination of starch, reducing sugar, and sucrose content in flavored squid by DNS photometry [J]. *Physical Testing Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, 2019, 55(4): 463–466.
- [10] 连会. 旋光法测定蜂蜜中蔗糖、果糖和葡萄糖的含量[J]. *北京农业*, 2011(6): 7–8.
LIAN H. Determination of sucrose, fructose, and glucose content in honey by polarimetry [J]. *Beijing Agricultural*, 2011(6): 7–8.
- [11] WANG S, COPELAAND L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(8): 1081–1097.
- [12] SUN L, MENG Y, SUN J, *et al.* Characterization, antioxidant activities and hepatoprotective effects of polysaccharides from pre-pressing separation Fuji apple peel [J]. *CyTA - Journal of Food*, 2017, 15(2): 307–319.
- [13] 赵甲慧, 谭亚军, 李莹, 等. 烤鱼片类水产制品中淀粉含量测定方法的优化[J]. *职业与健康*, 2022, 38(20): 2758–2761.
ZHAO JH, TAN YJ, LI Y, *et al.* Optimization of starch content determination method in grilled fish slices aquatic products [J]. *Occupation and Health*, 2022, 38(20): 2758–2761.
- [14] 王娟, 王帆, 张鸽, 等. 烤烟烟叶淀粉含量 5 种测定方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(5): 1673–1678.
WANG J, WANG F, ZHANG G, *et al.* Comparison of five methods for measuring starch content in tobacco leaves [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(5): 1673–1678.
- [15] 孔德超, 赵仁勇, 王新伟, 等. 采用不同标准方法测定玉米样品中淀粉含量的对比研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2016, 37(4): 23–27.
KONG DC, ZHAO RY, WANG XW, *et al.* Comparative study on the determination of starch content in corn samples using different standard methods [J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 37(4): 23–27.
- [16] 孙玲玉, 路兴花, 成纪予, 等. 甘薯中淀粉测定方法的比较与优化[J]. *中国粮油学报*, 2023, 38(7): 199–204.
SUN LY, LU XH, CHENG JY, *et al.* Comparison and optimization of starch determination methods in sweet potatoes [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2023, 38(7): 199–204.
- [17] 李兵, 肖香兰, 杨永红, 等. 国内外淀粉含量的检测标准现状及检测方法研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2021, 12(9): 3830–3839.
LI B, XIAO XL, YANG YH, *et al.* The current status and research progress of starch content detection standards and detection methods at home and abroad [J]. *China Food Safety Guide*, 2021, 12(9): 3830–3839.
- [18] 杨章宇, 俞俊竹, 周文亚, 等. 深色果酒酿造中还原糖监测方法改进研究[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 3(23): 1–13.
YANG ZY, YU JZ, ZHOU WY, *et al.* Improvement of monitoring method for reducing sugar in dark fruit wine brewing [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 3(23): 1–13.
- [19] 刘彩华, 曾嘉童, 包竹君, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定芒果的可溶性糖含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(9): 2892–2900.
LIU CH, ZENG JT, BAO ZJ, *et al.* Determination of soluble sugar content in *Mangifera indica* linn by 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(9): 2892–2900.
- [20] 林庆宇, 张志, 魏小平, 等. 自动电位滴定法测定马蹄中的总还原糖[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(26): 16450–16451.
LIN QY, ZHANG Z, WEI XP, *et al.* Determination of reducing sugar in *Eleocharis dulcis* by automatic potentiometric titration [J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(26): 16450–16451.
- [21] 李志霞, 聂继云, 闫震, 等. 响应面法对 3,5-二硝基水杨酸比色法测定水果中还原糖含量条件的优化[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(10): 1283–1288.
LI ZX, NIE JY, YAN Z, *et al.* Optimization of response surface methodology for colorimetric determination of reducing sugar content in fruits using 3,5-dinitrosalicylic acid [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2016, 35(10): 1283–1288.
- [22] 王莉丽, 梅文泉, 陈兴连, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定大米中水溶性糖含量[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(9): 168–173.

- WANG LL, MEI WQ, CHEN XL, *et al.* Determination of water-soluble sugar content in rice by 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric method [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2020, 35(9): 168–173.
- [23] 张光, 李保霏, 马春敏, 等. 小麦淀粉改性技术及应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(22): 39–47.
- ZHANG G, LI BF, MA CM, *et al.* Research progress on wheat starch modification technology and application [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(22): 39–47.
- [24] LIU G, GU Z, HONG Y, *et al.* Effects of molecular interactions in debranched high amylose starch on digestibility and hydrogel properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105498.
- [25] 赵艳萍. 高温·高压酸水解法测食品中淀粉含量的研究[J]. *中国酿造*, 2008(16): 87–89.
- ZHAO YP. Study on the determination of starch content in food by high temperature and high pressure acid hydrolysis method [J]. *China Brewing*, 2008(16): 87–89.
- [26] 高贯威, 匡立学, 李银萍, 等. 基于 3,5-二硝基水杨酸比色法探究苹果中可溶性糖测定方法及其含量[J]. *中国果树*, 2021(7): 74–77.
- GAO GW, KUANG LX, LI YP, *et al.* Exploring the determination method and content of soluble sugars in apples based on 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric method [J]. *The Journal of Pomology*, 2021(7): 74–77.
- [27] 吕小兰, 彭邹君, 芮嘉晗, 等. 基于斐林试剂检测柿霜中还原糖含量的实验设计[J]. *化学教育(中英文)*, 2022, 43(20): 62–66.
- LV XL, PENG ZJ, RUI JH, *et al.* Experimental design for detecting reducing sugar content in persimmon cream based on Fehling reagent [J]. *Chemical Education*, 2022, 43(20): 62–66.
- [28] 朱凯杰, 陆国权, 张迟. 响应面法优化水杨酸比色测定还原糖的研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(8): 107–113.
- ZHU KJ, LU GQ, ZHANG C. Optimization of salicylic acid colorimetric determination of reducing sugars using response surface methodology [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(8): 107–113.
- [29] 黄广民, 姚伯元, 刘仁成. 椰壳中木聚糖含量的测定[J]. *食品科学*, 2007(6): 271–274.
- HUANG GM, YAO BY, LIU RC. Determination of xylan content in coconut shell [J]. *Food Science*, 2007(6): 271–274.
- [30] 廖祥兵, 陈晓明, 肖伟, 等. DNS 法定量测定还原糖的波长选择[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(15): 144–149.
- LIAO XB, CHEN XM, XIAO W, *et al.* Wavelength selection for quantitative determination of reducing sugars using DNS method [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(15): 144–149.
- [31] 曾志恒, 曾辉, 程翊, 等. 双孢蘑菇发酵液还原糖和总糖的含量测定[J]. *中国食用菌*, 2018, 37(6): 40–43, 49.
- ZENG ZH, ZENG H, CHENG Y, *et al.* Determination of reducing sugar and total sugar content in fermentation broth of *Agaricus bisporus* [J]. *China Edible Fungi*, 2018, 37(6): 40–43, 49.
- [32] WOOD PI, ELLISTON A, RYDEN P, *et al.* Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay [J]. *Biomass Bioenergy*, 2012, 1: 44117–44121.
- [33] 冉淦侨, 殷红, 韩姗姗, 等. 含酶饲料中 DNS 法测定还原糖的影响因素统计分析[J]. *饲料研究*, 2019, 42(7): 61–63.
- RAN GQ, YIN H, HAN SS, *et al.* Statistical analysis of the influencing factors on the determination of reducing sugars in enzyme-containing feed by DNS method [J]. *Feed Research*, 2019, 42(7): 61–63.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)