

干海参外源性总糖的测定方法

王联珠¹, 李晓庆^{1,2}, 顾晓慧^{1,2}, 李 焯³, 朱文嘉¹, 宋春丽¹, 殷邦忠^{1,*}

(1.中国水产科学院黄海水产研究所, 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071;

2.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 3.安捷伦科技(中国)有限公司, 山东 青岛 266071)

摘 要: 建立市场中掺糖干海参(糖干海参)的检测方法。对提取出的外源性总糖进行测定, 从而判定干海参在加工过程中是否添加了糖类物质。比较提取溶剂、乙醇体积分数、提取温度、提取时间和料液比对提取条件的影响。最终确定最佳的干海参总糖提取条件为: 称取1g样品, 加入50mL 80%的乙醇溶液, 40℃水浴振荡提取1h。利用苯酚-硫酸法进行测定。该外源性总糖的检测方法线性范围为0~80mg/L; 测试液在1h以内稳定性良好; 方法精密度满足实验需求, 相对标准偏差在2%以内; 以淡干和盐干海参为本底, 样品加标回收率在82.97%~98.68%之间, 相对标准偏差为1.38%~3.45%。本方法操作简单、快速、稳定性好且准确度高, 可保留参体结构性多糖。应用于市售样品进行测定, 可以有效甄别出掺糖干海参。

关键词: 干海参; 总糖; 测定; 外源性; 苯酚-硫酸法

A Method for Determination of Exogenous Total Sugar in Dried Sea Cucumber

WANG Lian-zhu¹, LI Xiao-qing^{1,2}, GU Xiao-hui^{1,2}, LI Ye³, ZHU Wen-jia¹, SONG Chun-li¹, YIN Bang-zhong^{1,*}

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. Agilent Technologies (China) Co. Ltd., Qingdao 266071, China)

Abstract: An analytical method was established for identifying exogenous sugar in dried sea cucumber. An easy and feasible method was applied to extract total sugar from dried sea cucumber, and then the total sugar was determined to discriminate if exogenous sugar was added. In the present study, the optimal concentration of extraction solvent, extraction time, temperature, and solid-liquid ratio were explored. The results showed that the optimal conditions for extracting sugar from dried sea cucumber were determined as extraction at 40 °C for 60 min with shaking using 80% ethanol as the extraction at a solid/solvent ratio of 1:50 (g/mL). Phenol-sulfuric acid method was used to measure the extracted exogenous total sugar. The linear range of this method was 0–80 mg/L. The tested sample had good stability within 1 h and the precision of the method met the analytical requirements with RSD less than 2%. Average recoveries from spiked samples of unsalted and salted dried sea cucumber ranged from 82.97% to 98.68%, with standard deviation between 1.38% and 3.45%. This method is simple, stable and precise, and can be used to identify exogenous sugar in dried sea cucumber without affecting endogenous polysaccharides.

Key words: dried sea cucumber; total sugar; determination; exogenous; phenol-sulfuric acid method

中图分类号: TS254.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0293-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314061

海参(sea cucumber)属于棘皮动物门海参纲(Holothuroidea)^[1], 不但营养丰富, 而且具有重要的保健功能。随着人们生活水平的提高和保健意识的增强, 海参已经成为众多消费者滋补强身、馈赠亲朋的上佳选择。因活海参有自溶现象, 不利于保存和销售, 海参多

被加工成各种海参制品在市场流通, 其中干海参是最常见的海参制品^[2-3]。干海参主要分为淡干海参和盐干海参。淡干海参盐分含量低, 售价较高; 盐干海参盐分含量较高, 外观呈灰白色, 较易同淡干海参区分。而目前市场上出现一种掺糖干海参(糖干海参), 是一些企业在

收稿日期: 2012-04-23

作者简介: 王联珠(1963—), 女, 研究员, 研究方向为水产品标准制定。E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

*通信作者: 殷邦忠(1961—), 男, 研究员, 研究方向为水产品加工和标准化。E-mail: yinbz@ysfri.ac.cn

制作干海参的过程中为了达到塑形、增质量等目的,添加成分不明的糖类物质而制成的^[4-7]。其售卖过程中不加标识,一般消费者很难将掺糖干海参同淡干海参区分开来。掺糖干海参经过高温反复熬制,品质严重降低,长期食用存在安全隐患^[8-11]。但目前掺糖干海参中外源性总糖的测定方法还不成熟,仅靠感官则很难鉴定出干海参是否掺糖。目前,食品中测定总糖含量的方法较多,但并不适合干海参中掺如的外加糖的测定。根据干海参的产品特点,如何将干海参外源性糖类物质快速、方便、准确的提取出来,并加以测定,是鉴定干海参是否掺入外加糖的关键^[12-13]。实验借鉴多种测定总糖、还原糖、蔗糖的提取方法,对干海参外源性总糖的提取方法进行了优化^[14-16]。所以亟需研究一套操作简单、精确度高的干海参的总糖测定方法,为海参市场的监督管理提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

干海参(包括淡干海参、盐干海参、掺糖干海参)、冻干海参(实验室自制),购于青岛、大连、海南等地。样品装入塑料密封袋密封保存,防止吸潮及被污染。

1.2 仪器与设备

Specord S100型紫外-可见分光光度计 德国Analytic Jean公司;分析天平(感量0.0001g) 北京赛名利斯公司;电热恒温鼓风干燥箱 杭州奥科环境试验设备有限公司;超声波发生器 上海捷普恩公司;旋涡混合器 上海沪西分析仪器厂;恒温水浴锅 上海精宏实验设备有新公司;恒温水浴振荡器 常州澳华仪器有限公司;粉碎机(20目分子筛) 温岭林大机械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 试剂配制

80%苯酚溶液:将苯酚(白色晶体)置于50~60℃水浴中,约15min后苯酚溶解,再取80g苯酚加20mL水摇匀后,倒入棕色瓶中,于4℃冰箱贮存备用,有效期一个月。5%苯酚溶液:将80%苯酚,加水稀释至5%,现用现配。100mg/L葡萄糖标准溶液:将葡萄糖于105℃烘干至恒质量,称取0.1g(精确至0.0001g),用水溶解于1000mL容量瓶中,定容至刻度摇匀,置4℃冰箱避光放置,2周有效。100mg/L蔗糖标准溶液:称取烘干后的蔗糖0.1g,用水溶解于1000mL容量瓶中,定容至刻度,摇匀。

1.3.2 实验原理

干海参中的多糖与蛋白结合且不溶于高体积分数的乙醇,海参加工中添加的糖类物质可溶于高体积分数的乙醇,经乙醇提取后,糖类物质在硫酸的作用下先水解成单糖,再迅速脱水生成糖醛或糖醛衍生物,与苯酚反应生成橙黄色衍生物,在490nm波长处有最大吸收,比色法测定。

1.3.3 外源性总糖含量的选择

食品中糖类物质的检测,主要有总糖、蔗糖和还原糖三类。判定干海参中是否掺入外加糖,可以从以上3个角度考察。食品中的总糖主要指具有还原性的葡萄糖、果糖、戊糖、乳糖和在测定条件下能水解为还原性的单糖的蔗糖、麦芽糖以及可能部分水解的淀粉。而总糖含量的测定,一般是将提取出的全部糖类物质,还原为单糖,进行测定,经过分析换算,从而得出总糖含量。而若以蔗糖或还原糖作为判定指标,均不能涵盖加工中用到的所有糖类物质,会造成判定结果不准确^[17-20]。

1.3.4 显色波长的选择

葡萄糖标准液与硫酸迅速脱水生成糖醛或糖醛衍生物,其再与苯酚反应生成橙黄色衍生物,利用Specord型紫外-可见分光光度计在350~700nm波长处进行全波长扫描,记录不同波长处溶液的吸光度。结果显示在490nm波长处有最大吸收,故本实验采用490nm为检测波长。

1.3.5 标准曲线的制备

分别吸取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL葡萄糖标准溶液置于10mL具塞比色管中,用蒸馏水补至1mL,涡旋混匀。向试液中加入1mL 5%苯酚溶液,混匀,然后快速垂直加入5mL浓硫酸,摇匀。静置10min后,40℃水浴中保温20min,反应液在490nm波长处测定吸光度,未加标准液的溶液作为空白对照。以葡萄糖质量浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.6 样品前处理

取至少3只干海参,放入高速粉碎机粉碎(25000r/min,10~15s/次,至少粉碎3次)。将试样过20目筛,大块样品可多次粉碎,处理后的试样应密封、备用。

1.3.7 试样处理

试样约1.000g,于100mL锥形瓶中,再加入50mL 80%的乙醇溶液,40℃水浴振荡提取1h,冷却至室温后将样品和提取液全部转移到100mL容量瓶,冲洗2~3次,定容,过滤,取滤液备用(根据滤液糖含量不同,可再进行稀释,测试液以30~70μg/mL糖含量为宜)。

1.3.8 样品检测

准确吸取测试液1mL置于10mL具塞比色管中,加入1mL 5%苯酚溶液,混匀后,快速垂直加入5mL浓硫酸,摇匀,静置10min,40℃水浴中保温20min后,反应液在490nm波长处测定吸光度。通过标准曲线得出测试液中的总糖含量,做空白对照。

1.3.9 样品中外源性总糖含量计算

$$X/(g/100g) = \frac{m_1 \times V_0 \times 10^{-6}}{m_0 \times V_1} \times K \times 100$$

式中: X为试样中总糖的含量/(g/100g,以葡萄糖计); m_0 为试样质量/g; m_1 为从标准曲线上查得葡萄糖的

含量/ μg ; V_0 为试样经前处理后定容的体积/mL; V_1 为测定时移取滤液的体积/mL; K 为试液定容后稀释的倍数(不需稀释, 则 $K=1$)。

2 结果与分析

2.1 总糖提取溶剂的选择

乙醇和水是糖类常用的提取剂。糖类在高体积分数的乙醇中具有溶解度, 当提取液中的乙醇体积分数足够高时, 蛋白质淀粉糊精都不能溶解, 用高体积分数乙醇作提取剂, 提取液不需要除蛋白, 因为蛋白质不会溶解出来。用水作提取剂, 对温度需要一定的控制, 但温度过高可溶解出相当量的淀粉和糊精, 此外除了糖类, 还可能含有色素、蛋白质、有机酸、可溶性淀粉, 干扰成分较多。在实际操作中, 水提取的溶液较浑浊, 不宜过滤, 一定加热提取后需要除蛋白, 操作较繁琐, 用乙醇提取更为方便简捷^[27]。

2.2 乙醇体积分数的选择

称取1g海参样品, 分别以60%、70%、80%、90%乙醇作为提取剂进行实验。经过单因素方差分析, 不同体积分数的乙醇对总糖提取量的测定影响极显著($P<0.05$)。从图1看出, 随着乙醇体积分数的增加, 总糖含量增加, 当乙醇体积分数达到80%时, 总糖含量最高。而乙醇体积分数再增加时, 总糖含量降低。因此确定80%的乙醇为最佳提取溶剂。

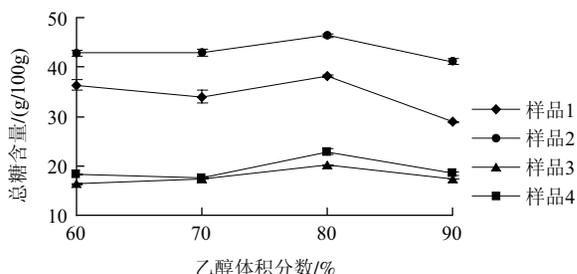


图1 乙醇体积分数对测定外源性总糖含量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the determination of exogenous sugar

2.3 提取温度的确定

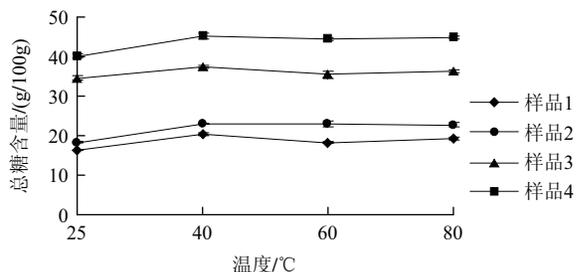


图2 提取温度对测定外源性总糖含量的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the determination of exogenous sugar

称取1g海参样品, 乙醇体积分数80%条件下, 分别选取25、40、60、80°C不同条件进行提取实验。经过单因素方差分析, 提取温度对总糖提取量影响极显著($P<0.01$)。从图2可以看出, 随着提取温度的升高, 总糖提取量升高, 但变化不大。在温度40°C, 就能很好的提取出样品中的糖, 所以实验选取提取温度为40°C为最佳提取温度。

2.4 提取时间的确定

实验先以1、2、4、6、8、12h提取总糖, 发现2h之后总糖含量变化不大, 再以30、45、60、90min做更为细化的研究。经过单因素方差分析, 提取温度对总糖提取量影响极显著($P<0.01$)。由图3可以看出, 随着时间的延长, 总糖含量呈上升的趋势, 在60min时达到最大值, 再提取到90min时, 总糖含量变化不大, 因此提取60min, 可以将干海参中的总糖提取较彻底, 所以实验确定60min为最佳提取时间。

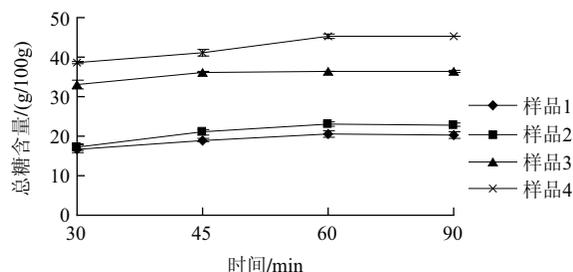


图3 提取时间对测定外源性总糖含量的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the determination of exogenous sugar

2.5 料液比的确定

选取1:25、1:50、1:75和1:100四种条件进行实验。经单因素方差分析, 料液比对总糖提取量影响不显著。因此, 从实验的可操作性出发, 同时为了避免不必要的浪费, 选取1:50的料液比最为合适。

2.6 线性范围

在本实验条件下, 配制0~80mg/L的系列标准曲线, 以吸光度为纵坐标, 葡萄糖质量浓度为横坐标绘制标准曲线: $y=0.0091x-0.006$, $R^2=0.9994$, 大于0.99, 线性良好, 满足实验要求。

2.7 稳定性实验

在分光光度法的方法评价中, 呈色反应的时间很有可能是影响测定结果的关键因素, 本实验通过对干海参样品总糖的吸光度随时间变化情况进行测定, 如图4所示。可以看出, 该显色反应在60min内吸光度的变化范围在0.00~0.05之间, 没有明显的下降趋势, 这说明60min内该显色反应稳定性持续良好; 延长反应时间, 溶液的吸光度呈现明显的下降趋势, 且随着时间的延长, 溶液的吸光度明显降低, 此时显色反应已经发生质的变化, 不再适宜进行吸光度测定。考虑到显色反应的稳定性, 本实验考虑在40min内, 对样品进行检测。

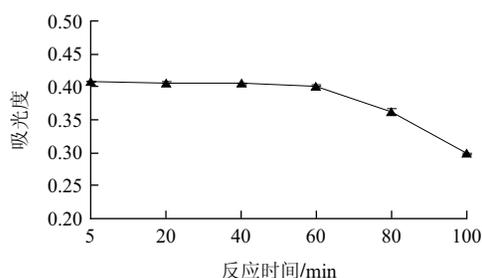


图4 总糖吸光度与反应时间的关系

Fig.4 Relationship between total sugar absorption and response time

2.8 精密度实验

以3种糖分含量不同的海参为样品,进行6次重复实验,结果如表1所示。可以看出,样品的相对标准偏差均小于2%,说明该方法的精密度符合实验要求。

表1 干海参总糖测定精密度

Table 1 Precision of the method for total sugar determination

序号	总糖含量/(g/100g)						RSD/%	
	1	2	3	4	5	6		
样品1	8.46	8.40	8.63	8.35	8.59	8.37	8.47	1.41
样品2	38.23	37.20	36.38	37.41	38.02	37.16	37.40	1.78
样品3	47.41	46.51	46.13	46.81	48.06	46.80	46.95	1.46

2.9 回收率实验

表2 干海参总糖测定回收率

Table 2 Recovery of the method

处理方式	加标量/(g/100g)	平均回收率/%	RSD/%
添加葡萄糖、以淡干海参为本底	0.25	82.97	1.38
	2.50	98.64	1.59
	5.00	91.77	2.47
添加葡萄糖、以盐干海参为本底	0.25	86.79	3.45
	2.50	95.53	2.16
	5.00	97.68	2.05
添加蔗糖、以淡干海参为本底	0.25	82.08	2.00
	2.50	98.68	1.94
	5.00	88.26	1.23
添加蔗糖、以盐干海参为本底	0.25	87.01	2.42
	2.50	96.40	3.22
	5.00	97.20	3.27

分别以葡萄糖、蔗糖为标准物质,以淡干和盐干海参为本底进行回收率实验。葡萄糖蔗糖在称入淡干、盐干海参后随即加入。由表2可知,每个加标回收做6个平行实验,计算结果取平均值。当以葡萄糖为标准物质,添加量为0.25、2.5、5g/100g时,回收率在82.97%~92.64%,RSD为1.38%~3.45%,满足实验要求。当以蔗糖为标准物质,添加量为0.25、2.5、5g/100g时,回收率在82.08%~92.68%,RSD为1.23%~3.27%,满足实验需求。从表2还能看出,以淡干海参和盐干海参为本底均能满足实验要求。

2.10 样品测定

实验按上述提取方法和检测方法对实验室样品进行了测定,结果如图5所示。通过实验数据可以得出,

1~13号样品均为淡干海参和盐干海参,总糖含量在1g/100g以内。其中,13号样品为实验室自制冻干海参。以鲜参为原料,未加入任何糖类物质,总糖含量为0.4g/100g。其余14~27号样品的总糖含量均在5g/100g以上,可以肯定添加了外源性糖。

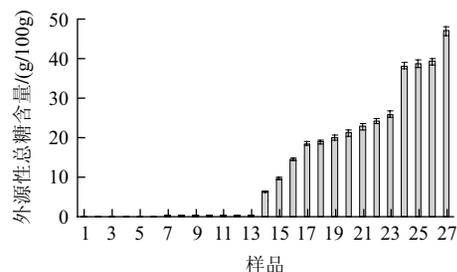


图5 干海参样品外源性总糖测定结果

Fig.5 Exogenous sugar in dried sea cucumber determined by the method

3 讨论

目前已有的标准中测定糖含量方法有GB 5009.8—2010《食品中蔗糖的测定》^[21]、GB 5009.7—2010《食品中还原糖的测定》^[22]、GB/T 9695.31—2008《肉制品总糖含量测定》^[23]、GB/T 15672—2009《食用菌中总糖含量的测定》^[24]、和GB 5413.5—2010《婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定》^[25]5项国家标准。GB 5009.8—2010在样品前处理中,只是加水溶解,对干海参的外掺糖提取不充分,会造成检测结果不准确,而只检测蔗糖太单一,不能包含所有外加的糖类物质。SC/T 3206—2009《干海参》^[26]中主要应用GB 5009.7—2008《食品中还原糖的测定》,对水溶性还原糖进行了规定。但水溶性还原糖只能鉴定掺入具有还原性的单糖及二糖的干海参产品,不能对加入非还原糖(如蔗糖)的干海参产品进行鉴别测定。而GB 5009.7—2008主要针对样品中含有的所有的单糖(绝大多数是葡萄糖)和大部分的二糖,但不包括蔗糖。所以,一旦“掺糖干海参”添加的是蔗糖或含有蔗糖的糖浆,则不能根据该标准的测定结果确定外加糖的含量。其他的3项标准分别分别针对食用菌、肉制品、婴幼儿食品和乳品中总糖含量的测定,食用菌中总糖含量的测定会将干海参自身多糖水解,以外加糖的形式测出,造成对测定结果的误判。而肉制品中总糖含量的测定和婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定,提取效果不充分,且以水作为提取溶剂,其中的可溶性蛋白会对结果造成干扰。不适用于海参中外源性总糖含量分析,不能满足鉴定掺糖海参的要求。所以,“掺糖干海参”中外源性总糖的提取条件是很关键的步骤,必须建立适合掺糖干海参的总糖提取方法。

4 结论

4.1 本实验对干海参总糖的提取条件进行考察, 确定最佳提取条件为: 称取1g样品, 以80%的乙醇溶液为提取剂, 提取剂用量为50mL, 在40℃水浴振荡条件下提取1h。

4.2 本实验依据干海参的外加糖经乙醇提取后, 提取液中的单糖迅速脱水生成糖醛或糖醛衍生物, 其再与苯酚反应生成橙黄色衍生物的特异性反应的特性, 建立了海参总糖含量测定的分光光度法, 实验中对该方法的线性范围、检测限、稳定性、精密性及回收率都进行了测定, 使该方法更科学完善。

4.3 本方法可以有效区分正常干海参和掺糖干海参。以实验室自制冻干海参为参照, 对现有样品进行测定。实验结果可以很好地区分正常淡干、盐干参及添加外源性糖类物质的干海参。考虑到实验误差和加工方式不同, 建议将外源性总糖含量大于3%的干海参判定为掺糖干海参。

参考文献:

[1] 廖玉麟. 中国动物志[M]. 第1卷. 北京: 科学出版社, 1997: 61.
[2] 姜健, 杨宝玲, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究[J]. 生物技术通讯, 2004, 5(15): 537-540.
[3] 谭国福, 梁陈长生, 刘佳仔, 等. 海参的加工及产品质量[J]. 食品与药品, 2007, 9(10): 69-71.
[4] 朱文嘉, 王联珠. 优劣干海参的鉴别[J]. 科学养鱼, 2011(5): 68-69.
[5] 朱文嘉, 荣小军, 林洪, 等. 我国海参标准体系的现状与发展方向[J]. 水产科技情报, 2011, 38(1): 52-54.
[6] 朱启忠, 孙迅, 孙宝聚, 等. 3,5-二硝基水杨酸光谱定糖法的比较研究[J]. 菏泽师专学报, 1999, 21(2): 31-32.
[7] 王琳, 刘国生, 王林嵩, 等. DNS法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报, 1998, 26(3): 66-69.
[8] 管斌, 丁有防, 谢来苏, 等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 74-79.
[9] 董群. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996(31): 550-553.
[10] IMANARI T, WASHIO Y, HUARY Y. Oral absorption and clearance

of partially depolymerized fucosyl chondroitin-sulfate from sea cucumber[J]. Thromb Res, 1999, 93(3): 129-135.

[11] 李燕妮, 车业娜. 分光光度法测定海参多糖含量方法的改进[J]. 云南化工, 2008, 35(4): 27-28.
[12] 李桂芝, 刘永明, 秦华伟. 亚甲基蓝褪色分光光度法测定藻酸双酯钠[J]. 分析化学研究简报, 2005, 33(9): 1324-1326.
[13] 顾英, 韩凤丽, 王洪洋. 响应面法优化红薯叶类黄酮提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011(8): 286-333.
[14] 张涤. 异戊烷中痕量羰基化合物分析方法研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
[15] 杨柳, 王建立, 王淑英, 等. 糖类物质测定方法评价[J]. 北京农学院学报, 2009(4): 68-71.
[16] 王泽文, 冷凯良, 翟毓秀, 等. 亚甲基蓝比色法测定海参不同组织酸性黏多糖含量[J]. 海洋科学, 2011, 35(3): 77-82.
[17] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28: 350-356.
[18] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
[19] GAO M, SONG B I, LIU C Z. Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from saussurea medusa maxim cultured cells[J]. Biochem Eng J, 2006, 32(2): 79-83.
[20] LONDONO-LONDONO J, LIMA V R, LARA Q, et al. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: optimizing an aqueous ultra-sound-assisted extraction method[J]. Food Chem, 2010, 119: 81-87.
[21] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.8—2008 食品中蔗糖的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
[22] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.7—2008 食品中还原糖的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
[23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 9695.31—2008 肉制品总糖含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
[24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 15672—2009 食用菌中总糖含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
[25] 中华人民共和国卫生部. GB 5413.5—2010 婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
[26] 中华人民共和国农业部. SC/T 3206—2009 干海参[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.