

林立, 孙海波, 邱云, 等. 基于滴定法与色谱法测定糖的干扰因素分析[J]. 环境化学, 2024, 43(7): 2512-2516.

LIN Li, SUN Haibo, QIU Yun, et al. The interference factors were analyzed based on the principle of titration and instrumental determination of sugar[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (7): 2512-2516.

基于滴定法与色谱法测定糖的干扰因素分析^{*}

林 立^{1,2} ** 孙海波^{1,2} 邱 云^{1,2} 刘 莉^{1,2} 齐云肖^{1,2} 杨彦丽^{1,2} 曹 瑀^{1,2}

(1. 北京市食品检验研究院(北京市食品安全监控与风险评估中心), 北京, 100085; 2. 国家市场监管重点实验室
(食品安全重大综合保障关键技术), 北京, 100085)

摘 要 采用高效液相色谱法、离子色谱法和滴定法对乳粉、黄豆和花生等 18 种含有果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的食品基质样品进行检测, 并对各方法的检测数据进行总体均值检验分析, 发现离子色法和液相色谱法之间的检测结果无显著性差异, 而滴定法与色谱法部分基质的差异显著. 基于滴定法测定还原糖与非还原糖的原理, 设计验证实验进行干扰因素分析, 结果表明, 含有棉子糖、水苏糖、低聚半乳糖、果聚糖、聚葡萄糖和抗性糊精的等非还原性糖的食品样品会干扰蔗糖的滴定结果; 果糖、葡萄糖、麦芽糖和低聚半乳糖等还原性糖会干扰乳糖的滴定结果.

关键词 离子色谱法, 高效液相色谱法, 滴定法, 还原糖, 非还原糖, 干扰.

中图分类号 O652.7; X-1 **文献标识码** A

The interference factors were analyzed based on the principle of titration and instrumental determination of sugar

LIN Li^{1,2} ** SUN Haibo^{1,2} QIU Yun^{1,2} LIU Li^{1,2} QI Yunxiao^{1,2}
YANG Yanli^{1,2} CAO Yu^{1,2}

(1. Beijing Institute of Food Inspection and Research (Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment), Beijing, 100085, China; 2. Key Laboratory of Key Technologies of Major Comprehensive Guarantee of Food Safety for State Market Regulation, Beijing, 100085, China)

Abstract The High-performance liquid chromatography, ion chromatography and titration methods were used for the determination of fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose in 18 kinds of food, such as milk powder, soybean and peanut. It was found that there was no significant difference between the results of ion chromatography and High-performance liquid chromatography, but there was significant difference between the results of titration and chromatography. Based on the principle of titrimetric determination of reducing sugar and non-reducing sugar, a verification experiment was designed to analyze the interference factors, the results showed that food samples containing non-reducing sugars such as raffinose, stachyose, galactooligosaccharides, fructose, Glucan and resistant dextrin would interfere with the titration results of sucrose; Reducing sugars such as fructose, glucose, maltose and galactooligosaccharides may interfere with the titration results of lactose.

Keywords ion chromatography, high-performance liquid chromatography, titration, reducing sugars, non-reducing sugars, interference.

2024 年 4 月 6 日收稿(Received: April 6, 2024).

* 国家市场监管总局科技计划项目(2022MK008)资助.

Supported by Science and Technology Program of the State Administration of Market Supervision (2022MK008).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: linli77422@aliyun.com

糖类是自然界最多的有机化合物,是食品中的重要风味和营养成分,其种类和含量是评价食品品质的重要质量指标。其中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖是常见的单双糖,我国 GB 28050《食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则》征求意见稿中新增糖为强制性标注的营养成分。因此,准确测定食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量具有重要意义。

目前国际国内糖含量的测定方法^[1-6]主要有高效液相色谱法、离子色谱法和滴定法,其中高效液相色谱法^[7-10]采用示差和蒸发光散射检测器对于高含量糖的检测稳定性更好。离子色谱法^[11-13]采用电化学检测器进行测定,选择性好、灵敏度高;滴定法^[14-15]是基于糖分子结构的还原性和非还原性进行定量,含有游离醛基或酮基的糖都具有还原性,能与费林试剂发生反应,常见的还原性糖有葡萄糖、果糖、乳糖和麦芽糖,而蔗糖的定量则是利用其非还原性机理。国家标准方法 GB 5009.8-2023《食品安全国家标准食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》^[16]第三法采用滴定法测定蔗糖和第四法采用滴定法测定乳糖均基于上述原理。而食品基质极为复杂,含有其他糖的种类繁多,如棉子糖、海藻糖、水苏糖、松二糖等;且近年来,低聚果糖、多聚果糖、低聚半乳糖和聚葡萄糖等也作为营养强化剂添加到食品中,从原理上看这些糖类对滴定法测蔗糖或乳糖存在干扰,且干扰的程度各不相同,对检测数据造成了较大偏差。本文选用乳粉、黄豆和花生等 18 种含糖的食品基质为研究对象,比较色谱法和滴定法间的检测结果,对存在显著差异的数据,从可能含有的干扰物入手,进一步设计海藻糖、棉子糖、水苏糖和低聚糖等其他糖的干扰验证实验,探求其抗干扰能力与方法机理之间的关系,为科研和检测机构对于糖检测结果的准确性提供科学理论支持。

1 实验部分(Experimental section)

1.1 材料与试剂

氢氧化钠(色谱纯)、果糖(CAS 57-48-7)、葡萄糖(CAS 50-99-7)、蔗糖(CAS 57-50-1)、麦芽糖一水合物, CAS 号: 6363-53-7;乳糖一水合物, CAS 号: 64044-51-5, 纯度均大于 98% Sigma 公司;乙酸锌、亚铁氰化钾、冰乙酸、盐酸、硫酸铜、酒石酸钾钠、乙酸铅、草酸钾、磷酸氢二钠,均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司;甲基红、亚甲基蓝指示剂 西陇化工股份有限公司;乙腈(色谱纯)、乙醇(95%)、浓硫酸(98%) Merck 公司。

酸奶、面包片、蜂蜜、胡萝卜、苹果、黄豆、鸡蛋、液态乳、特医乳粉、脱脂乳粉、全脂乳粉、中老年奶粉、婴幼儿配方乳粉、虾、花生、大米和茶饮料均购于超市。

1.2 仪器与设备

安捷伦 1260 液相色谱仪(示差折光检测器, NH₂ 色谱柱)美国 Agilent 公司;赛默飞 ICS 5000+ 离子色谱仪(梯度泵, 脉冲安培检测器, 金工作电极, PA1 色谱柱)美国 Thermo 公司;超声波清洗器 昆山洁力美超声仪器有限公司;电子分析天平 赛多利斯公司;台式高速冷冻离心机 湖南可成仪器设备有限公司;旋涡混合器 上海利闻科学仪器有限公司;恒温干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的制备

酸奶、液体乳、饮料、蜂蜜和乳粉样品混匀;胡萝卜、苹果、虾和面包片在 80 ℃ 下烘干脱水后粉碎均匀,花生、大米和黄豆直接粉碎均匀。

1.3.2 标准曲线配制

高效液相色谱法:质量浓度为 20 mg·mL⁻¹ 的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖混合标准溶液(5% 乙腈水配制),用水稀释,配制质量浓度为 0.2、2、4、6、10 mg·mL⁻¹ 的标准曲线。

离子色谱法:质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖混合标准溶液(0.06% 乙酸溶液配制),用水稀释,配制质量浓度为 2.5、5、10、20、25 mg·L⁻¹ 的标准曲线。

滴定法测蔗糖:称取葡萄糖标准品 1 g,加水溶解后转移至 1000 mL 的容量瓶中,加入 5 mL 盐酸,并用水定容至刻度,配制质量浓度为 1.00 mg·mL⁻¹ 的葡萄糖。

滴定法测乳糖:称取乳糖标准品 0.7875 g,加水溶解后转移至 250 mL 的容量瓶中,并用水定容至刻度,待滴定。

1.3.3 样品前处理

样品用水进行提取,液相色谱法采用乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀蛋白,离子色谱法采用乙酸沉淀蛋白,滴定法测蔗糖采用乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀蛋白,滴定法测乳糖采用乙酸铅和草酸钾—磷酸氢二钠沉淀蛋白。具体前处理方法与标准 GB 5009.8-2023《食品安全国家标准食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》^[16]保持一致。

1.3.4 样品的检测

采用液相色谱法和离子色谱法对 18 个不同基质样品中的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量进行分析,对检出蔗糖的样品同时采用第三法滴定蔗糖的含量,乳及乳制品同时采用第四法滴定乳糖的含量,具体色谱条件及样品检测步骤同样与标准 GB 5009.8-2023 保持一致。

1.3.5 数据分析

每个样品重复检测 4 个平行,根据总体均值检验(t 检验法)对各种方法的检测数据进行显著性检验。t 检验是用于两个样本平均值差异程度的检验方法。它是用 t 分布理论来推断差异发生的概率,从而判定两个平均数的差异是否显著,当置信区间为 95% 时,重复 4 个平行,t 查表为 2.45。当 t 值大于 2.45 时,检测数据有显著性差异。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 显著性分析

对 18 个基质样品中糖的检出数据汇总进行 t 检验分析,其中果糖、麦芽糖、葡萄糖的数据来源于高效液相色谱法和离子色谱法,两个方法间数据无显著性差异.乳糖的结果来源于高效液相色谱法、离子色谱法和滴定法,色谱法间数据无显著性差异;滴定法与色谱法的乳糖结果对比,部分样品有显著性差异.蔗糖的高效液相色谱法、离子色谱法和滴定法的分析结果见表 1,色谱法间的检测数据无显著性差异,滴定法与色谱法之间黄豆和花生的数据有显著性的差异.

表 1 蔗糖不同方法数据的显著性分析($n=4, t=2.45$)

Table 1 Significance analysis of sucrose data by different methods ($n=4, t=2.45$)

样品	液相色谱法(g/100 g)	离子色谱法(g/100 g)	滴定法(g/100 g)	t检验A	显著性差异	t检验B	显著性差异
酸奶	4.9±0.3	4.5±0.2	4.8±0.2	2.42	否	2.20	否
饮料	14.1±0.7	13.5±0.4	12.9±0.7	1.53	否	1.50	否
大米	<0.5	0.42±0.02	0.44±0.01	—	否	2.15	否
黄豆	6.7±0.4	6.2±0.4	9.2±0.8	1.74	否	6.67	是
特医	11.6±0.6	12.3±0.9	10.8±0.9	1.30	否	2.34	否
胡萝卜	28.8±1.2	27.8±0.9	26.9±1.0	1.32	否	1.34	否
苹果	10.5±0.7	11.1±0.4	11.9±0.9	1.47	否	1.56	否
虾	1.0±0.04	1.0±0.04	0.95±0.06	0.35	否	2.23	否
花生	1.4±0.1	1.2±0.1	3.2±0.2	2.28	否	16.3	是

t检验A,液相色谱法和离子色谱法的比较. t检验B为离子色谱法和滴定法的比较.

2.2 显著性差异结果的干扰因素分析

数据有显著性差异的样品基质中除了含有常规的单双糖外,还含有其他糖,如海藻糖、棉子糖、水苏糖等天然存在的糖类,低聚果糖、多聚果糖、低聚半乳糖、聚葡萄糖和抗性糊精等作为营养强化剂添加到食品中的多糖.其中海藻糖是非还原性二糖,由两个葡萄糖分子以 1,1-糖苷键构成,是最稳定的二糖,不容易酸水解,能被糖苷酶水解.棉子糖为非还原性三糖,由半乳糖、果糖和葡萄糖结合而成,是不可消化的短链寡糖.水苏糖为非还原性四糖,其分子结构为半乳糖-半乳糖-葡萄糖-果糖.低聚半乳糖是一种功能性低聚糖,其分子结构一般是在半乳糖或葡萄糖分子上连接 1—7 个半乳糖基.聚葡萄糖是一种水溶性膳食纤维,含有还原性糖.低聚果糖是由 1—3 个果糖基通过 $\beta(2-1)$ 糖苷键与蔗糖中的果糖基结合生成的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖等的混合物.抗性糊精以食用淀粉为原料,在酸性条件下经糊精化反应制得.

对色谱法与滴定法之间存在显著差异的数据,依据滴定法的检测原理,从可能含有的干扰物入手,设计果糖、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、低聚半乳糖、低聚果糖、聚葡萄糖和抗性糊精的还原性糖和非还原性糖滴定实验,探求其抗干扰能力与方法机理之间的关系.

2.2.1 滴定法的干扰实验

实验选取还原性糖(果糖、葡萄糖和麦芽糖)、非还原性糖(海藻糖、棉子糖、水苏糖)和功能性低聚糖(低聚半乳糖、低聚果糖、聚葡萄糖和抗性糊精)按照 GB 5009.8-2023 的第三法(蔗糖)和第四法(乳糖)进行滴定,考察采用此方法对于并不含有乳糖和蔗糖的上述糖类进行检测会得到怎样的结果,分析其可能带来的数据干扰.

从表 2 可以看出,果糖、葡萄糖和麦芽糖等还原性糖干扰乳糖的滴定;海藻糖虽具有非还原性,但因其不易水解,既不干扰蔗糖又不干扰乳糖的滴定;水苏糖和棉子糖等非还原性糖干扰蔗糖的滴定,但干扰的程度不同;低聚半乳糖、聚葡萄糖、低聚果糖和抗性糊精等聚糖,因其结构复杂,对蔗糖和乳糖均有不同程度的干扰.6 个不同生产厂家或批号的低聚半乳糖样品因聚合度和结构不同,对乳糖和蔗糖的干扰程度差异较大.

表 2 还原糖、非还原糖和低聚糖的干扰数据

Table 2 Interference data of reducing sugars, non-reducing sugars and oligosaccharides

项目	乳糖滴定结果/(g/100 g)	蔗糖滴定结果/(g/100 g)	项目	乳糖滴定结果/(g/100 g)	蔗糖滴定结果/(g/100 g)
果糖	129	未检出	低聚半乳糖	42.9	4.4
麦芽糖	102	未检出	低聚半乳糖	34.5	1.6
葡萄糖	129	未检出	低聚半乳糖	30.9	15.5
海藻糖	未检出	未检出	聚葡萄糖	6.9	16.0
棉子糖	未检出	64.9	聚葡萄糖	7.1	17.0

续表 2

项目	乳糖滴定结果/(g/100 g)	蔗糖滴定结果/(g/100 g)	项目	乳糖滴定结果/(g/100 g)	蔗糖滴定结果/(g/100 g)
水苏糖	未检出	43.5	低聚果糖	1.9	91.4
低聚半乳糖	42.8	4.2	低聚果糖	1.8	92.0
低聚半乳糖	42.7	4.6	抗性糊精	1.2	7.3
低聚半乳糖	43.2	1.9			

乳糖的滴定原理是直接采用菲林试剂对还原性糖进行滴定;蔗糖经盐酸水解转化为还原性糖,按还原性糖滴定,水解前后的差值乘以相应的系数即为蔗糖含量.其机理主要是利用糖的还原性和非还原性,选择性较差.同时实验结果也证实其他还原性糖会干扰乳糖的滴定,其他非还原性糖可能会干扰蔗糖的滴定.若样品中含有的其他还原性糖或非还原性糖的种类和含量是确定的,可以尝试采用表 2 中不同种类糖带来的干扰系数对滴定结果进行校正.

2.2.2 滴定法干扰的机理分析

滴定法利用糖游离端的还原性进行分析和定量.根据实验结果,在本文考察的 18 种基质中,脱脂乳粉、全脂乳粉和配方乳粉基质样品中的乳糖,酸奶、饮料、大米、胡萝卜、苹果和虾等基质样品中的蔗糖可以采用滴定法测定.但含有其他可能干扰的糖类时,数据结果会有较大的偏差,实际样品中具有显著差异数据的干扰因素分析见表 3.从机理上分析,含有游离醛基或酮基的糖都具有还原性,能与费林试剂发生反应,葡萄糖的还原性主要来自醛基;果糖是酮糖,在碱性条件下,酮糖发生差向异构化而变成醛糖;而乳糖等其他多糖的还原能力则大多因为半缩醛羟基的存在,还原后均生成糖酸.

表 3 显著性差异结果的干扰因素分析

Table 3 Analysis of interference factors in the results of significant lactose difference

样品	项目	色谱法/(g/100 g)	滴定法/(g/100 g)	干扰因素
中老年奶粉		48.1	50.2	低聚异麦芽糖
特医乳粉	乳糖	29.1	39.9	葡萄糖浆粉5.9%,低聚半乳糖2.8%
婴幼儿乳粉		54.3	55.8	低聚半乳糖1.7%
黄豆	蔗糖	6.8	9.2	棉子糖2.8%
花生		1.4	3.2	棉子糖0.7%

结合标签标识,婴幼儿乳粉添加了 1.7% 的低聚半乳糖,特医乳粉添加了 5.9% 的葡萄糖浆粉和 2.8% 的低聚半乳糖,中老年奶粉添加了低聚异麦芽糖但未明确添加量,从表 3 可以看出这些还原性糖的标示添加量越大对乳糖滴定结果的干扰越大,证实葡萄糖浆、低聚半乳糖和低聚异麦芽糖干扰了乳糖的滴定.

对于食用农产品,通过离子色谱法测得花生和黄豆中均含有非还原性棉子糖(图 1),黄豆中含量为 2.8%,花生中含量为 0.7%.对蔗糖进行测定时,色谱法和滴定法数据确实存在较大偏差,证实棉子糖干扰了蔗糖的滴定,且棉子糖的含量越大对蔗糖的滴定结果影响越大.

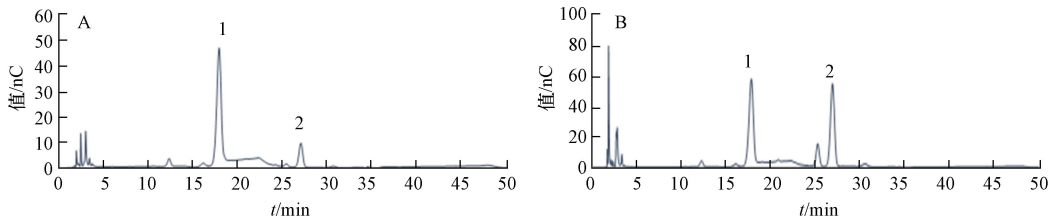


图 1 黄豆(A)和花生(B)的离子色谱图

Fig.1 Ion chromatogram of soybean and peanut

3 结论(Conclusion)

本研究通过设计可能干扰滴定结果的还原性糖、非还原性糖和低聚糖的滴定实验,对滴定法与色谱法存在显著差异的基质样品的标签和其他糖含量进行干扰因素分析.发现棉子糖干扰了黄豆和花生中蔗糖的滴定,葡萄糖浆、低聚半乳糖和低聚异麦芽糖干扰了乳粉中乳糖的滴定,同时结合其他常见的还原糖、非还原性糖和低聚糖的干扰滴定实验结果,得到以下结论:含有棉子糖、水苏糖、低聚半乳糖、果聚糖、聚葡萄糖和抗性糊精等非还原性糖的食品样品会干扰蔗糖的滴定结果;果糖、葡萄糖、麦芽糖和低聚半乳糖等还原性糖会干扰乳糖的滴定结果.

参考文献 (References)

[1] 吴彦蕾. 蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖含量测定方法比较研究 [J]. 现代食品, 2020, 26(4): 156-157,160.

[2] 张弛, 刘坤, 刘荣光, 等. 食品中还原糖测定方法的比较综述 [J]. 吉林农业, 2018(10): 93.

[3] Association of Official Agricultural Chemists. AOAC Official Method 2000.17. Determination of Trace Glucose and Fructose in Raw Cane Sugar High-Performance Anion-Exchange Chromatography First Action[S]. USA, AOAC, 2000.

[4] 苏骏敏, 沈昌莹, 张树权. 食品中糖的检测方法研究进展 [J]. 现代食品, 2022, 28(6): 43-47.

[5] 李卓, 张建雄, 张彩华, 等. 乳制品中乳糖测定方法研究进展 [J]. 现代食品, 2023, 29(7): 32-34.

[6] 管艺同, 朱渊, 陆益红. 药品、生物制品及相关样品中蔗糖含量分析方法的研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2023, 31(5): 434-440.

[7] 王栩璐, 林宏, 任仕云, 等. 高效液相色谱法测定蜂王浆中 6 种糖的含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4474-4479.

[8] 贾茹, 黄学者, 贾光群, 等. 超高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定蜂蜜中 12 种糖组分 [J]. 分析测试学报, 2022, 41(6): 851-857.

[9] 马舒翼, 梁佳欣, 许春平, 等. HPLC-ELSD 法测定梅子提取物中糖和糖醇的含量 [J]. 湖北农业科学, 2023, 62(12): 158-162.

[10] 崔宇擎, 张华伟, 王喜生, 等. 5-HMF 高效液相色谱检测方法的建立及功能糖与不同产地党参、何首乌和熟地中 5-HMF 含量分析 [J]. 中兽医医药杂志, 2024, 43(1): 13-17.

[11] 徐诺, 姚哲渊, 车金水, 等. 离子色谱-积分脉冲安培法检测黄酒中的阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖、核糖、乳糖 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 254-259.

[12] 牟世芬, 于泓, 蔡亚岐. 糖的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析 [J]. 色谱, 2009, 27(5): 667-674.

[13] 唐坤甜, 林立, 梁立娜, 等. 无糖和低糖食品中的糖和糖醇同时分析的阴离子交换色谱-脉冲安培检测法研究 [J]. 食品科学, 2008, 6: 327-331

[14] 刘烨, 潘秀霞, 张家训, 等. 直接滴定法测定葡萄酒中还原糖的研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2180-2184.

[15] 胡秀智. 食品中总糖与还原糖检测分析研究进展 [J]. 山东化工, 2021, 50(19): 99-100,103.

[16] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定: GB 5009.8-2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.