



中华人民共和国国家标准

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

2023-09-06 发布

2024-03-06 实施

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

发布

前 言

本标准代替 GB 5009.8—2016《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》和 GB 5413.5—2010《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定》。

本标准与 GB 5009.8—2016 相比,主要变化如下:

- 修改了第一法高效液相色谱法的适用范围;
- 增加了离子色谱法为第二法;
- 修改了酸水解-莱因-埃农氏法为第三法;
- 增加了莱因-埃农氏法为第四法。

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

1 范围

本标准规定了食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定方法。

第一法高效液相色谱法,适用于粮食及粮食制品、乳及乳制品、果蔬及果蔬制品、甜味料、糖果、饮料和婴幼儿食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定。

第二法离子色谱法,适用于食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定。

第三法酸水解-莱因-埃农氏法,适用于食品中蔗糖的测定。

第四法莱因-埃农氏法,适用于婴幼儿食品和乳品中乳糖的测定。

第一法 高效液相色谱法

2 原理

试样中的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖经提取后,高效液相色谱柱分离,示差折光检测器或蒸发光散射检测器检测,外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$):色谱纯。

3.1.2 乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 。

3.1.3 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。

3.1.4 冰乙酸(CH_3COOH)。

3.2 试剂配制

3.2.1 乙酸锌溶液(1 mol/L):称取乙酸锌 21.9 g,加入 3 mL 冰乙酸,溶于水并稀释至 100 mL,混匀。

3.2.2 亚铁氰化钾溶液(0.25 mol/L):称取亚铁氰化钾 10.6 g,溶于水并稀释至 100 mL,混匀。

3.3 标准品

3.3.1 果糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,CAS 号:57-48-7):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,CAS 号:50-99-7):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.3 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$,CAS 号:57-50-1):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.4 麦芽糖($C_{12}H_{22}O_{11}$, CAS 号:69-79-4):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.5 乳糖($C_{12}H_{22}O_{11}$, CAS 号:63-42-3):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 混合标准储备液(20.0 mg/mL):分别称取经过 $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 的果糖和 $96\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖各 1 g(精确至 0.001 g),用水溶解后转移至 50 mL 容量瓶中,加入 2.5 mL 乙腈,用水定容至刻度。置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封,保存期 3 个月。

3.4.2 混合标准工作液:吸取 0.100 mL、1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL 和 5.00 mL 混合标准储备液(20.0 mg/mL)于 10.0 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,配得果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的质量浓度为 0.200 mg/mL、2.00 mg/mL、4.00 mg/mL、6.00 mg/mL 和 10.0 mg/mL 的混合标准工作液,可根据实际样品溶液的浓度适当调整混合标准工作液浓度。临用现配。

3.5 材料

3.5.1 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 水性滤膜针头过滤器(纤维素滤膜除外)。

3.5.2 注射器。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪:配示差折光检测器或蒸发光散射检测器。

4.2 分析天平:感量为 1 mg 和 10 mg。

4.3 旋涡混合器。

4.4 离心机:转速 $\geq 4\text{ }000\text{ r/min}$ 。

4.5 超声波清洗器。

4.6 样品粉碎设备:高速粉碎机。

4.7 恒温干燥箱。

4.8 恒温水浴装置。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

5.1.1 试样制备

取适量有代表性的样品,饮料等液态均匀样品直接摇匀;非均匀的样品需匀浆或粉碎均匀;冷冻饮品室温融化后充分搅拌均匀,必要时可采用 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热搅拌;巧克力采用 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热熔融,并趁热充分搅拌均匀。

5.1.2 试样提取

5.1.2.1 胶基糖果和巧克力等难溶解试样

称取试样 2 g(精确至 0.001 g)于 100 mL 比色管中,加入约 50 mL $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热水,涡旋或搅拌,待样品充分溶解,再缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,涡旋混匀,超声 30 min,转移至 100 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置。

5.1.2.2 含气体和酒精试样

称取混匀后的试样 50 g(精确至 0.01 g)于蒸发皿中,在水浴上微热搅拌去除气体和酒精,待冷却后移至 100 mL 容量瓶中,缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,用水定容至刻度,混匀,静置。

5.1.2.3 糖浆和蜂蜜类试样

称取混匀后的试样 1 g~2 g(精确至 0.001 g)于 100 mL 比色管中,加入约 50 mL 水,涡旋混匀至充分溶解,转移至 100 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置。

5.1.2.4 其他试样

称取粉碎或混匀后的试样 1 g~10 g(精确至 0.001 g)(目标糖含量 $\leq 5\%$ 时称取 10 g;含量 $5\% \sim 10\%$ 时称取 5 g;含量 $10\% \sim 40\%$ 时称取 2 g;含量 $\geq 40\%$ 时称取 1 g)至 100 mL 比色管中,加入约 50 mL 水,再缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,涡旋混匀,超声 30 min,转移至 100 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置。

5.1.3 净化

上述试样提取液用滤纸过滤(弃去初滤液)或离心获取上清液后,用 0.45 μm 水性滤膜针头过滤器过滤至样品瓶,供高效液相色谱仪分析。

5.2 仪器参考条件

仪器参考条件如下:

- a) 色谱柱:氨基色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,粒径 5 μm ,氨基硅烷键合硅胶为填充剂),或性能相当者;
- b) 流动相:乙腈+水=70+30(体积比);
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:10 μL ;
- f) 示差折光检测器条件:温度 40 $^{\circ}\text{C}$;
- g) 蒸发光散射检测器条件:漂移管温度 80 $^{\circ}\text{C} \sim 90^{\circ}\text{C}$;氮气流速 2.5 L/min。

5.3 标准曲线的制作

将混合标准工作液按浓度从低到高依次注入高效液相色谱仪,测定果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖相应的峰面积或峰高。示差折光检测器以标准工作液的浓度为横坐标,以峰面积或峰高为纵坐标绘制标准曲线;蒸发光散射检测器以标准工作液浓度的幂函数为横坐标,以峰面积或峰高的幂函数为纵坐标绘制标准曲线。果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的高效液相色谱图参见附录 A。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中,根据保留时间定性,记录目标物的峰面积或峰高,根据标准曲线得到试样溶液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的浓度。

5.5 空白试验

除不加试样外,均按上述步骤进行。

6 分析结果的表述

试样中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量按公式(1)计算。

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f}{m \times 1\,000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量,单位为克每百克(g/100 g);

ρ ——根据标准曲线得到的试样溶液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

ρ_0 ——根据标准曲线得到的空白中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

f ——稀释倍数;

m ——试样的称样量,单位为克(g);

1 000 ——换算系数;

100 ——换算系数。

糖的含量 ≥ 10 g/100 g时,计算结果保留3位有效数字;糖的含量 < 10 g/100 g时,计算结果保留2位有效数字。

7 精密度

在重复条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

8 其他

当称样量为10 g、定容体积为100 mL时,果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的方法检出限均为0.2 g/100 g,定量限均为0.5 g/100 g。

第二法 离子色谱法

9 原理

试样中的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖经提取净化后,离子色谱柱分离,脉冲安培检测器检测,外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

10.1 试剂

10.1.1 氢氧化钠(NaOH):色谱纯。

10.1.2 冰乙酸(CH_3COOH)。

10.2 试剂配制

10.2.1 氢氧化钠溶液(200 mmol/L):称取 8.00 g 氢氧化钠,溶于水并稀释至 1 000 mL,混匀。

10.2.2 乙酸溶液(3%,体积分数):量取 3 mL 冰乙酸,用水稀释至 100 mL,混匀。

10.3 标准品

10.3.1 果糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,CAS 号:57-48-7):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.2 葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,CAS 号:50-99-7):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.3 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$,CAS 号:57-50-1):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.4 麦芽糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$,CAS 号:69-79-4):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.5 乳糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$,CAS 号:63-42-3):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.4 标准溶液的制备

10.4.1 混合标准储备液(10.0 mg/mL):分别称取经过 $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 的果糖和 $96\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖各 1 g(精确至 0.001 g),加水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,加入 2 mL 乙酸溶液,并用水定容至刻度。置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封,保存期 3 个月。

10.4.2 混合标准中间液(100 mg/L):吸取 1.00 mL 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖混合标准储备液(10.0 mg/mL)于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封,保存期 1 个月。

10.4.3 混合标准工作液:分别吸取 0.250 mL、0.500 mL、1.00 mL、2.00 mL 和 2.50 mL 混合标准中间液(100 mg/L)于 10 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,配得果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的质量浓度为 2.50 mg/L、5.00 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L 和 25.0 mg/L 的混合标准工作液,可根据实际样品溶液的浓度适当调整混合标准工作液浓度。临用现配。

10.5 材料

10.5.1 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 水性滤膜针头过滤器(纤维素滤膜除外)。

10.5.2 净化柱: C_{18} 固相萃取小柱(1.0 mL)或性能相当者。

10.5.3 注射器。

11 仪器和设备

11.1 离子色谱仪:配脉冲安培检测器。

11.2 样品粉碎设备:高速粉碎机。

11.3 超声波清洗器。

11.4 分析天平:感量为 1 mg。

11.5 旋涡混合器。

11.6 离心机:转速 $\geq 4\text{ }000\text{ r/min}$ 。

11.7 恒温干燥箱。

11.8 恒温水浴装置。

12 试验步骤

12.1 样品前处理

12.1.1 试样制备

取适量有代表性的样品,饮料等液态均匀样品直接摇匀;非均匀的样品需匀浆或粉碎均匀;冷冻饮品室温融化后充分搅拌均匀,必要时可采用 30℃~40℃ 水浴加热搅拌;酱类等可以采用研磨或者均质混匀;巧克力采用 50℃~60℃ 水浴中加热熔融,并趁热充分搅拌均匀。

12.1.2 试样提取

12.1.2.1 胶基糖果和巧克力等难溶解试样

准确称取试样 2 g(精确至 0.001 g)于 100 mL 比色管中,加入约 50 mL 50℃~60℃ 热水,涡旋或搅拌,待样品充分溶解,加入 2 mL 乙酸溶液,涡旋混匀,超声 30 min,转移至 100 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置 20 min。

12.1.2.2 糖浆和蜂蜜类试样

称取混匀后的试样 2 g(精确至 0.001 g)于 100 mL 比色管中,加入约 50 mL 水,涡旋混匀至充分溶解,转移至 100 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置 20 min。

12.1.2.3 含气体和酒精试样

准确称取试样 10 g(精确至 0.001 g)于蒸发皿中,在水浴上微热搅拌去除气体和酒精,待冷却后用水移至 100 mL 容量瓶中,加入 2 mL 乙酸溶液,用水定容至刻度,混匀,静置 20 min。

12.1.2.4 其他试样

称取固体试样 2 g(精确至 0.001 g),半固态或液态试样 5 g~10 g(精确至 0.001 g)于 100 mL 比色管中,加入约 50 mL 水,涡旋混匀,再加入 2 mL 乙酸溶液混匀后,超声 30 min,转移至 100 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置 20 min。

12.1.3 试样净化

试样提取溶液可根据试样中目标糖含量稀释适当的倍数,婴幼儿配方乳粉中的乳糖检测时,稀释 1 000 倍后净化;蜂蜜和糖果中高含量糖检测时,稀释 500 倍后净化。

上述试样提取溶液或稀释溶液采用滤纸过滤或离心获取上清液后,依次过 0.45 μm 水性滤膜针头过滤器和 C₁₈ 固相萃取小柱(1.0 mL),弃去前 3 mL,收集后续的洗脱液待测。

C₁₈ 固相萃取小柱(1.0 mL)使用前依次用 10 mL 甲醇、15 mL 水通过,静置活化 30 min。

12.2 仪器参考条件

仪器参考条件如下:

- 色谱柱:阴离子交换柱(4 mm×250 mm,粒径 10 μm,以季铵盐为功能基,聚苯乙烯/二乙烯基苯聚合物树脂作为填料)(带保护柱 4 mm×50 mm),或性能相当者;
- 流速:1.0 mL/min;
- 进样量:10 μL;

- d) 脉冲安培检测器: Au 工作电极; 糖检测波形参考条件见表 1;
 e) 淋洗液: 淋洗液 A: 水; 淋洗液 B: 氢氧化钠溶液 (200 mmol/L); 洗脱参考条件见表 2。

表 1 糖检测波形

时间 s	电压 V	积分	时间 s	电压 V	积分
0.00	+0.10	—	0.42	−2.00	—
0.20	+0.10	开始	0.43	+0.60	—
0.40	+0.10	结束	0.44	−0.10	—
0.41	−2.00	—	0.50	−0.10	—

表 2 梯度洗脱条件

时间 min	淋洗液 A %	淋洗液 B %
0	90	10
15.0	90	10
21.0	80	20
32.0	80	20
32.1	0	100
42.0	0	100
42.1	90	10
50.0	90	10

12.3 标准工作曲线绘制

将混合标准工作液按浓度从低到高依次注入离子色谱仪, 测定果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖相应的峰面积, 以标准工作液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 分别绘制标准曲线。果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的离子色谱图参见附录 B。

12.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入离子色谱仪中, 根据保留时间定性, 记录峰面积, 根据标准曲线得到试样溶液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的浓度。

12.5 空白试验

除不加试样外, 均按上述步骤进行。

13 分析结果的表述

试样中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量按公式(2)计算。

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f}{m \times 1\,000 \times 10} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量，单位为克每百克(g/100 g)；

ρ ——由标准曲线计算得到的试样溶液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的质量浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

ρ_0 ——由标准曲线计算得到的空白中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的质量浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

V ——定容的体积，单位为毫升(mL)；

f ——稀释倍数；

m ——试样的称样量，单位为克(g)；

1 000 ——换算系数；

10 ——换算系数。

糖的含量 ≥ 10 g/100 g时，计算结果保留3位有效数字；糖的含量 < 10 g/100 g时，计算结果保留2位有效数字。

14 精密度

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

15 其他

当称样量为2 g、定容体积为100 mL时，果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的方法检出限均为0.015 g/100 g，定量限均为0.050 g/100 g。

第三法 酸水解-莱因-埃农氏法

16 原理

试样除去蛋白质后，其中蔗糖经盐酸水解转化为还原糖，按还原糖测定，水解前后的差值乘以相应的系数即为蔗糖含量。棉子糖、水苏糖、低聚半乳糖、果聚糖、聚葡萄糖和抗性糊精等会对蔗糖的测定产生干扰。

17 试剂和溶液

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

17.1 试剂

17.1.1 乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 。

17.1.2 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。

17.1.3 盐酸(HCl)。

17.1.4 氢氧化钠(NaOH)。

17.1.5 甲基红($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$)：指示剂。

17.1.6 亚甲基蓝($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)：指示剂。

17.1.7 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。

17.1.8 酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。

17.1.9 冰乙酸(CH_3COOH)。

17.1.10 乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$):95%。

17.2 试剂配制

17.2.1 乙酸锌溶液(1 mol/L):称取乙酸锌 21.9 g,加 3 mL 冰乙酸,溶于水并稀释至 100 mL,混匀。

17.2.2 亚铁氰化钾溶液(0.25 mol/L):称取亚铁氰化钾 10.6 g,溶于水并稀释至 100 mL,混匀。

17.2.3 盐酸溶液(50%,体积分数):量取盐酸 50 mL,缓慢加入 50 mL 水中,冷却后混匀。

17.2.4 氢氧化钠溶液(40 g/L):称取氢氧化钠 4.0 g,加水溶解后,冷却,用水稀释至 100 mL,混匀。

17.2.5 甲基红指示液(1 g/L):称取甲基红 0.1 g,用 95%乙醇溶解并稀释至 100 mL,混匀。

17.2.6 氢氧化钠溶液(200 g/L):称取氢氧化钠 20.0 g,加水溶解后,冷却,用水稀释至 100 mL,混匀。

17.2.7 碱性酒石酸铜甲液:称取硫酸铜 15.0 g 和亚甲基蓝 0.05 g,溶于水并稀释至 1 000 mL,混匀。

17.2.8 碱性酒石酸铜乙液:称取酒石酸钾钠 50.0 g 和氢氧化钠 75.0 g,溶于水中,再加入亚铁氰化钾 4.0 g,完全溶解后,用水稀释至 1 000 mL,混匀,储存于橡胶塞玻璃瓶中。

17.3 标准品

葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,CAS 号:50-99-7):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

17.4 标准溶液配制

葡萄糖标准溶液(1.00 mg/mL):称取经过 $96\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥 2 h 的葡萄糖 1 g(精确至 0.001 g),加水溶解后转移至 1 000 mL 的容量瓶中,加入 5 mL 盐酸,并用水定容至刻度。置于 $0\text{ }^\circ\text{C} \sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存。

18 仪器和设备

18.1 分析天平:感量为 1 mg 和 10 mg。

18.2 恒温水浴装置。

18.3 可调温电炉。

18.4 酸式滴定管:25 mL。

18.5 样品粉碎设备:高速粉碎机。

18.6 恒温干燥箱。

19 分析步骤

19.1 样品前处理

19.1.1 试样制备

取适量有代表性的样品,饮料等液态均匀样品直接摇匀;非均匀的样品需匀浆或粉碎均匀;冷冻饮品室温融化后充分搅拌均匀,必要时可采用 $30\text{ }^\circ\text{C} \sim 40\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热搅拌;酱类等可以采用研磨或者均质混匀;巧克力采用 $50\text{ }^\circ\text{C} \sim 60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热熔融,并趁热充分搅拌均匀。

19.1.2 试样处理

19.1.2.1 胶基糖果和巧克力等难溶解试样

称取试样 2.5 g~5 g(精确至 0.001 g)于 100 mL 烧杯中,加入约 50 mL 50 °C~60 °C 热水搅拌溶解,再缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,混匀,放冷,转移至 250 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置 30 min,用滤纸过滤,弃去初滤液,取后续滤液备用。

19.1.2.2 含淀粉试样

称取粉碎或混匀后的试样 10 g~20 g(精确至 0.001 g),置于烧杯中,加入约 200 mL 水,在 45 °C 水浴中加热 1 h,并振摇,冷却后转移至 250 mL 容量瓶中并定容,混匀,静置,沉淀。吸取 200 mL 上清液于另一 250 mL 容量瓶中,缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,用水定容至刻度,混匀,静置 30 min,用滤纸过滤,弃去初滤液,取后续滤液备用。

19.1.2.3 含气体和酒精试样

称取混匀后的试样 100 g(精确至 0.01 g),置于蒸发皿中,用氢氧化钠溶液(40 g/L)中和至中性,在水浴上微热搅拌去除气体和酒精,待冷却后移至 250 mL 容量瓶中,缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,用水定容至刻度,混匀,静置 30 min,用滤纸过滤,弃去初滤液,取后续滤液备用。

19.1.2.4 其他试样

称取粉碎或混匀后的固体试样 2.5 g~5 g(精确至 0.001 g)或液体试样 5 g~25 g(精确至 0.001 g),置于烧杯中,加入约 50 mL 水,缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液和 5 mL 亚铁氰化钾溶液,搅拌混匀转移至 250 mL 容量瓶中并用水定容至刻度,混匀,静置 30 min,用滤纸过滤,弃去初滤液,取后续滤液备用。

19.2 酸水解

吸取 2 份试样处理液各 50.0 mL,分别置于 100 mL 容量瓶中。

19.2.1 转化前:1 份用水定容至刻度,混匀。

19.2.2 转化后:1 份加 5 mL 盐酸溶液,在 68 °C~70 °C 水浴中加热 15 min,冷却后加 2 滴甲基红指示液,用氢氧化钠溶液(200 g/L)中和至中性,用水定容至刻度,混匀。

19.3 标定碱性酒石酸铜溶液

吸取 5.0 mL 碱性酒石酸铜甲液和 5.0 mL 碱性酒石酸铜乙液于 150 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 水,加 2 粒~4 粒玻璃珠,从滴定管中加约 9 mL 葡萄糖标准溶液,控制在 2 min 内加热至沸,趁热以 1 滴/2 s 的速度滴加葡萄糖标准溶液,直至溶液蓝色刚好褪尽为终点,记录消耗葡萄糖标准溶液总体积,同时平行操作 3 份,取其平均值,计算每 10 mL 碱性酒石酸铜溶液(碱性酒石酸甲、乙液各 5 mL)相当于葡萄糖的质量 $A(\text{mg})$ 。

注:也可以按上述方法标定 4 mL~20 mL 碱性酒石酸铜溶液(甲、乙液各半)来适应试样中还原糖的浓度变化。

19.4 试样溶液的测定

19.4.1 预测滴定:吸取 5.0 mL 碱性酒石酸铜甲液和 5.0 mL 碱性酒石酸铜乙液于 150 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 蒸馏水,加 2 粒~4 粒玻璃珠,置于电炉上加热,使其在 2 min 内沸腾,保持沸腾状态 15 s,滴入转化前样液(19.2.1)或转化后样液(19.2.2)至溶液蓝色刚好褪尽为终点,读取所用样液的体积。

19.4.2 精确滴定:吸取 5.0 mL 碱性酒石酸铜甲液和 5.0 mL 碱性酒石酸铜乙液于 150 mL 锥形瓶中,

加入 10 mL 蒸馏水,加 2 粒~4 粒玻璃珠,从滴定管中放出比预测滴定(19.4.1)预测体积少 1 mL 的样液,置于电炉上,使其在 2 min 内沸腾,维持沸腾状态 2 min,以 1 滴/2 s 的速度徐徐滴入样液,至溶液蓝色刚好褪尽为终点,记录样液消耗的体积(V)。

注:当样液还原糖浓度过低时,可以采用反滴定的方式进行测定。吸取 5.00 mL 碱性酒石酸铜甲液及 5.00 mL 碱性酒石酸铜乙液至锥形瓶中,直接加入 10.0 mL 样液,免去加水 10 mL,再用葡萄糖标准溶液滴定至终点,记录消耗的体积。消耗体积与标定时消耗的葡萄糖标准溶液体积之差相当于 10 mL 样液中所含葡萄糖的量 A_1 (mg)。

20 分析结果的表述

20.1 还原糖的含量

试样中还原糖(以葡萄糖计)的含量按公式(3)计算。

$$R = \frac{A}{m \times \frac{50}{250} \times \frac{V}{100} \times 1\,000} \times F \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- R ——试样中还原糖(以葡萄糖计)的质量分数,单位为克每百克(g/100 g);
- A ——碱性酒石酸铜溶液(甲、乙液各半)相当于葡萄糖的质量,单位为毫克(mg);
- m ——试样的称样量,单位为克(g);
- 50 ——酸水解(19.2)中吸取样液体积,单位为毫升(mL);
- 250 ——试样处理(19.1)中定容体积,单位为毫升(mL);
- V ——滴定时消耗样液体积,单位为毫升(mL);
- 100 ——酸水解(19.2)中定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- F ——当使用 19.1.2.2 步骤时, $F=1.25$;其他步骤时, $F=1$;
- 100 ——换算系数。

采用反滴定方式测定时,试样中还原糖(以葡萄糖计)的含量按公式(4)计算。

$$R = \frac{A_1}{m \times \frac{50}{250} \times \frac{10}{100} \times 1\,000} \times F \times 100 \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- R ——试样中还原糖(以葡萄糖计)的质量分数,单位为克每百克(g/100 g);
- A_1 ——标定 10 mL 碱性酒石酸铜溶液(甲、乙液各半)时消耗的葡萄糖标准溶液的体积与加入 10 mL 样液后消耗的葡萄糖标准溶液体积之差相当于葡萄糖的质量,单位为毫克(mg);
- m ——试样的称样量,单位为克(g);
- 50 ——酸水解(19.2)中吸取样液体积,单位为毫升(mL);
- 250 ——试样处理(19.1)中定容体积,单位为毫升(mL);
- 10 ——直接加入的样液体积,单位为毫升(mL);
- 100 ——酸水解(19.2)中定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- F ——当使用 19.1.2.2 步骤时, $F=1.25$;其他步骤时, $F=1$;
- 100 ——换算系数。

20.2 蔗糖的含量

试样中蔗糖的含量按公式(5)计算。

$$X = (R_2 - R_1) \times 0.95 \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

X ——试样中蔗糖的质量分数,单位为克每百克(g/100 g);

R_2 ——转化后还原糖(以葡萄糖计)的质量分数,单位为克每百克(g/100 g);

R_1 ——转化前还原糖(以葡萄糖计)的质量分数,单位为克每百克(g/100 g);

0.95 ——还原糖(以葡萄糖计)换算为蔗糖的系数。

蔗糖含量 ≥ 10 g/100 g时,计算结果保留3位有效数字;蔗糖含量 < 10 g/100 g时,计算结果保留2位有效数字。

21 精密度

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

第四法 莱因-埃农氏法

22 原理

试样除去蛋白质后,在加热条件下,以亚甲基蓝为指示剂,直接滴定已标定过的费林氏液,根据样液消耗的体积,计算乳糖含量。果糖、葡萄糖、麦芽糖和低聚半乳糖等会对乳糖的测定产生干扰。

23 试剂和材料

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的三级水。

23.1 试剂

23.1.1 乙酸铅 $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。

23.1.2 草酸钾 $(\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 。

23.1.3 磷酸氢二钠 $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ 。

23.1.4 硫酸铜 $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ 。

23.1.5 浓硫酸 (H_2SO_4) :98%。

23.1.6 酒石酸钾钠 $(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ 。

23.1.7 氢氧化钠 (NaOH) 。

23.1.8 亚甲基蓝 $(\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$:指示剂。

23.2 试剂配制

23.2.1 乙酸铅溶液(200 g/L):称取200 g乙酸铅,用水稀释至1 000 mL,混匀。

23.2.2 草酸钾-磷酸氢二钠溶液:称取草酸钾30 g,磷酸氢二钠70 g,用水稀释至1 000 mL,混匀。

23.2.3 亚甲基蓝溶液(10 g/L):称取1 g亚甲基蓝于100 mL水中,混匀。

23.2.4 费林氏液(甲液和乙液)

23.2.4.1 甲液:称取 34.639 g 硫酸铜,溶于水中,加入 0.5 mL 浓硫酸,加水至 500 mL,混匀。

23.2.4.2 乙液:称取 173 g 酒石酸钾钠及 50 g 氢氧化钠溶解于水中,稀释至 500 mL,混匀,静置 2 d 后过滤。

23.3 标准品

23.3.1 乳糖($C_{12}H_{22}O_{11}$, CAS 号:63-42-3):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

24 仪器和设备

24.1 天平:感量为 0.1 mg。

24.2 可调温电炉。

24.3 酸式滴定管:50 mL。

24.4 恒温干燥箱。

25 分析步骤

25.1 费林氏液的标定

25.1.1 称取经过 $96\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 2 h 的乳糖约 0.75 g(精确至 0.1 mg),用水溶解并定容至 250 mL。将此乳糖溶液注入一个 50 mL 滴定管中,待滴定。

25.1.2 预测滴定:吸取 10 mL 费林氏液(甲、乙液各 5 mL)于 250 mL 三角烧瓶中。加入 20 mL 蒸馏水,放入几粒玻璃珠,从滴定管中放出 15 mL 样液于三角瓶中,置于电炉上加热,使其在 2 min 内沸腾,保持沸腾状态 15 s,加入 3 滴亚甲基蓝溶液,继续滴入样液至溶液蓝色完全褪尽为止,读取所用样液的体积。

25.1.3 精确滴定:另取 10 mL 费林氏液(甲、乙液各 5 mL)于 250 mL 三角烧瓶中,再加入 20 mL 蒸馏水,放入几粒玻璃珠,加入比预滴定量少 0.5 mL~1.0 mL 的样液,置于电炉上,使其在 2 min 内沸腾,维持沸腾状态 2 min,加入 3 滴亚甲基蓝溶液,以 1 滴/2 s 的速度徐徐滴入样液,溶液蓝色完全褪尽即为终点,记录消耗样液的体积。

25.1.4 费林氏液的乳糖校正值(f)按公式(6)和公式(7)计算。

$$A = \frac{V_1 \times m_1 \times 1\,000}{250} = 4 \times V_1 \times m_1 \quad \dots\dots\dots (6)$$

$$f = \frac{4 \times V_1 \times m_1}{AL} \quad \dots\dots\dots (7)$$

式中:

A ——实测乳糖数,单位为毫克(mg);

V_1 ——滴定时消耗乳糖溶液的体积,单位为毫升(mL);

m_1 ——称取乳糖的质量,单位为克(g);

f ——费林氏液的乳糖校正值;

AL ——由乳糖溶液滴定毫升数查表 3 所得的乳糖数,单位为毫克(mg)。

表 3 乳糖因数表(10 mL 费林氏液)

滴定量 mL	乳糖 mg	滴定量 mL	乳糖 mg	滴定量 mL	乳糖 mg
15	68.3	27	67.8	39	67.9
16	68.2	28	67.8	40	67.9
17	68.2	29	67.8	41	68.0
18	68.1	30	67.8	42	68.0
19	68.1	31	67.8	43	68.0
20	68.0	32	67.8	44	68.0
21	68.0	33	67.8	45	68.1
22	68.0	34	67.9	46	68.1
23	67.9	35	67.9	47	68.2
24	67.9	36	67.9	48	68.2
25	67.9	37	67.9	49	68.2
26	67.9	38	67.9	50	68.3

注：“因数”系指与滴定量相对应的数目，可自表 3 中查得。若试样中蔗糖与乳糖含量的比超过 3：1 时，则在滴定量中加表 4 的校正值数后计算。

表 4 乳糖滴定量校正值数(10 mL 费林氏液)

滴定终点时所用的糖液量 mL	蔗糖与乳糖含量的比	
	3：1	6：1
15	0.15	0.30
20	0.25	0.50
25	0.30	0.60
30	0.35	0.70
35	0.40	0.80
40	0.45	0.90
45	0.50	0.95
50	0.55	1.05

25.2 乳糖的测定

25.2.1 试样处理

称取婴幼儿食品或脱脂粉 2 g、全脂加糖粉或全脂粉 2.5 g、乳清粉 1 g，精确至 0.1 mg，置于烧杯中，用约 100 mL 水溶解并分数次洗入 250 mL 容量瓶中，徐徐加入 4 mL 乙酸铅溶液和 4 mL 草酸钾-磷酸氢二钠溶液，并摇动容量瓶，用水定容至刻度，混匀，静置数分钟，用干燥滤纸过滤，弃去最初 25 mL 滤液，取后续滤液待滴定。

25.2.2 滴定

25.2.2.1 预测滴定:操作同 25.1.2。

25.2.2.2 精确滴定:操作同 25.1.3。

26 分析结果的表述

试样中乳糖的含量 X 按公式(8)计算。

$$X = \frac{F \times f \times 0.25 \times 100}{V \times m} \dots\dots\dots (8)$$

式中:

X ——试样中乳糖的质量分数,单位为克每百克(g/100 g);

F ——由消耗样液的毫升数查表 3 所得乳糖数,单位为毫克(mg);

f ——费林氏液乳糖校正值;

V ——滴定消耗样液量,单位为毫升(mL);

m ——试样的质量,单位为克(g)。

结果保留 3 位有效数字。

注:若试样中蔗糖与乳糖之比超过 3:1 时,则计算乳糖时应在滴定量中加上表 4 中的校正值数后再查表 3。

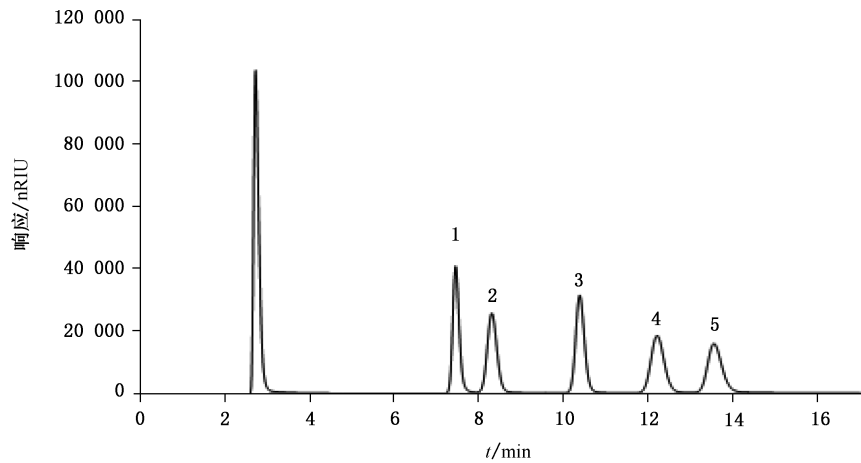
27 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 1.5%。

附 录 A

果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的高效液相色谱图

A.1 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的示差折光检测高效液相色谱图见图 A.1。

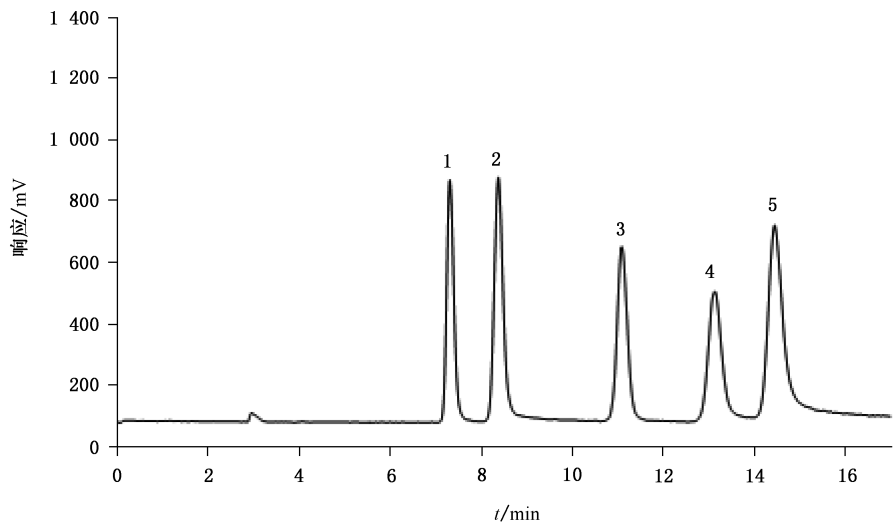


标引序号说明：

- | | |
|---------|---------|
| 1——果糖； | 4——麦芽糖； |
| 2——葡萄糖； | 5——乳糖。 |
| 3——蔗糖； | |

图 A.1 10.0 mg/mL 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的示差折光检测高效液相色谱图

A.2 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的蒸发光散射检测高效液相色谱图见图 A.2。



标引序号说明：

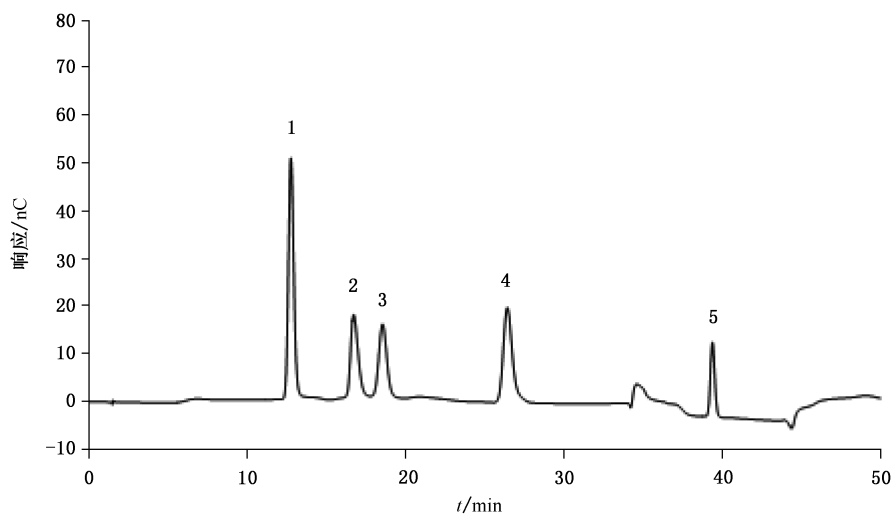
- | | |
|---------|---------|
| 1——果糖； | 4——麦芽糖； |
| 2——葡萄糖； | 5——乳糖。 |
| 3——蔗糖； | |

图 A.2 2.5 mg/mL 果糖和蔗糖、5.0 mg/mL 葡萄糖和麦芽糖、10.0 mg/mL 乳糖标准溶液的蒸发光散射检测高效液相色谱图

附录 B

果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的离子色谱图

果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的离子色谱图见图 B.1。



标引序号说明：

1——葡萄糖；

4——乳糖；

2——果糖；

5——麦芽糖。

3——蔗糖；

图 B.1 5 mg/L 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖标准溶液的离子色谱图