

卡尔费休容量法测定蜂花粉水分含量

杨 健^{1,2}, 马跃龙^{1,2*}, 葛淑丽^{1,2}, 侯 超^{1,2}, 邢朝宏^{1,2}, 王育信^{1,2}

(1. 上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233; 2. 国家食品质量监督检验中心(上海), 上海 200233)

摘 要: **目的** 建立卡尔费休容量法测定蜂花粉水分含量。**方法** 蜂花粉经机械粉碎并研磨后过 30 目筛, 选用甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)作为反应溶剂, 采用卡尔费休容量法测定蜂花粉的水分含量, 并同时与 65 °C 减压干燥法及 105 °C 直接干燥法进行比较。**结果** 卡尔费休容量法测得的蜂花粉水分含量更能代表蜂花粉中的真实水分, 加标回收率在 84.36%~98.45% 之间, 相对标准偏差小于 2%($n=7$)。**结论** 该方法操作简单方便、重现性好, 可以用于蜂花粉中水分含量的测定工作。

关键词: 蜂花粉; 卡尔费休容量法; 水分含量

Research on the determination of water content in bee pollen samples by volumetric Karl Fischer method

YANG Jian^{1,2}, MA Yue-Long^{1,2*}, GE Shu-Li^{1,2}, HOU Chao^{1,2}, XING Chao-Hong^{1,2}, WANG Yu-Xin^{1,2}

(1. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China;
2. National Food Quality Supervision and Inspection Center (Shanghai), Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of water content in bee pollen by volumetric Karl Fischer (KF) method. **Methods** Bee pollen was mechanically crushed and ground to 30 mesh sieve. The water content of bee pollen was determined by volumetric KF method with methanol-formamide-n-octanol (1:1:1, V/V/V) as the reaction solvent, and compared with vacuum drying method at 65 °C and direct drying method at 105 °C. **Results** The water content of bee pollen determined by volumetric KF method was more representative of the real water content in bee pollen. The recovery rate ranged from 84.36% to 98.45%, and the relative standard deviation was less than 2% ($n=7$). **Conclusion** The volumetric KF method is easy to operate and has good reproducibility, which can be used for the determination of water content in bee pollen.

KEY WORDS: bee pollen; volumetric Karl Fisher method; water content

1 引 言

根据 GB 31636-2016《食品安全国家标准 花粉》^[1]及 GB/T 30359-2013《蜂花粉》^[2]中的定义, 蜂花粉主要是指由工蜂采集的一种或多种植物的花粉细胞并用唾液分泌物和花蜜混合后形成的团状物质。蜂花粉营养成分丰富,

主要含有蛋白质、脂类、糖类以及具有一定生理活性功能的氨基酸、维生素 C、维生素 E、黄酮类化合物等, 这使得蜂花粉具有一定的抗氧化、预防衰老、降血脂等保健功能^[3-8]。

目前, 蜂花粉的水分含量主要采用 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》^[9]中规定的减压

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(18DZ2292400)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Shanghai Science and Committee (18DZ2292400)

*通讯作者: 马跃龙, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: mayl@sqi.org.cn

*Corresponding author: MA Yue-Long, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, No. 381, Cangwu Road, Xuhui District, Shanghai 200233, China. E-mail: mayl@sqi.org.cn

干燥法进行测定,但是检测时试样达到重量恒定的时间较长,耗能高,而且当密闭干燥箱中空气的水分和试样中的水分达到平衡时,将有部分水分不能够完全烘干,因而造成水分的测定值偏低^[10,11]。此外,105℃直接干燥法和蒸馏法也可用于蜂花粉中水分含量的检测,但105℃直接干燥法则存在试样无法达到恒重的问题,无法有效去除试样中结合力较强的结合水,且试样经过长时间105℃干燥后可能会出现焦化的现象,导致试样中的挥发性物质的形成与释放,采用该法测定的水分偏高^[12-14];蒸馏法则需要使用具有一定神经毒性的甲苯作为共沸溶剂将试样中的水分蒸馏出来,且无法实现批量样品的快速检测^[11,15]。卡尔费休容量法是利用化学反应原理进行水分含量测量,即水与二氧化硫、碘的专一性反应($C_5H_5N \cdot I_2 + C_5H_5N \cdot SO_2 + C_5H_5N + H_2O + CH_3OH \rightarrow 2C_5H_5N \cdot HI + C_5H_6N[SO_4CH_3]$),因此可以准确地测定试样中的水分含量,且多适用于含水量较低的产品中水分的测定,如乳粉、油脂、乳糖、蜂蜜等^[16-20]。

Gergen 等^[4]及 Morgano 等^[5]发现甲醇-正辛醇(1:1, V/V)作为反应溶剂时测得蜂花粉水分含量结果较好,但未进一步对更好的反应溶剂组合进行研究。本研究采用卡尔费休容量法测定蜂花粉水分含量,首次优化选用甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)作为反应溶剂,并与65℃减压干燥法、105℃直接干燥法进行比较,以期快速准确检测蜂花粉的水分含量提供参考依据。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

2.1.1 样品与试剂

蜂花粉(油菜花粉、荷花粉、茶花粉、玫瑰花粉)为市售。

卡尔费休试剂(无吡啶安全型,美国 Sigma 公司);正辛醇、无水甲醇、甲酰胺(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2.1.2 仪器与设备

852 卡尔费休水分测定仪(瑞士 Metrohm 公司);V0400 真空干燥箱(德国 Memmert 公司);UFE500 电热恒温干燥箱(法国 Binder 公司);MS204S 电子天平(感量为 0.1 mg, 美国 Mettler Toledo 公司);DC-500A 型高速多功能粉碎机(浙江武义鼎藏日用金属制品厂)。

2.1.3 仪器条件

卡尔费休水分测定仪采用双电压终点测定的极化电流为 50.0 μA, 停止电压为 250.0 mV, 测定温度为 25℃, 萃取时间为 60 s, 最小体积增加量为 2 μL, 最大加液速度为 2 mL/min, 同时将漂移考虑在内, 当漂移量小于 20 μL/min 时即滴定结束。在将蜂花粉加入到反应溶剂中之前, 先将反应池中的反应溶剂滴定至无水, 再进行蜂花粉水分含量的测定。此外, 通过测定 10.0 mg 的蒸馏水来确定卡尔费休试剂的滴定度。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

4 种蜂花粉经机械粉碎后采用研钵进行研磨, 再分别用 20 目筛(850 μm)、25 目筛(710 μm)、30 目筛(600 μm)过筛后备用。

2.2.2 卡尔费休容量法测定蜂花粉水分含量

称取 0.1 g 试样(精确至 0.001 g)溶解于 60 mL 新配制并滴定至无水的甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)混合液中, 采用卡尔费休试剂滴定至终点。

以质量分数 $X_1(\%)$ 表示蜂花粉水分含量, 按式(1)进行计算:

$$X_1 = \frac{T \times V \times 100}{W_1 \times 1000} \quad (1)$$

式中:

X_1 ——蜂花粉水分含量, %;

T ——卡尔费休试剂的滴定度, mg/mL;

V ——滴定蜂花粉所消耗卡尔费休试剂的体积, mL;

W_1 ——蜂花粉的质量, g;

100/1000——单位换算系数。

2.2.3 减压干燥法测定蜂花粉水分含量

称取 3 g 试样(精确至 0.001 g)置于已经恒重的扁形铝制称量皿中, 再放入 65℃、53 kPa 的真空干燥箱中干燥至恒重(前后 2 次重量差值不大于 2 mg)。

以质量分数 $X_2(\%)$ 表示蜂花粉水分含量, 按式(2)进行计算:

$$X_2 = \frac{m_1 - m_2}{W_2} \times 100 \quad (2)$$

式中:

X_2 ——蜂花粉水分含量, %;

m_1 ——称量皿和蜂花粉干燥前的质量, g;

m_2 ——称量皿和蜂花粉干燥后的质量, g;

W_2 ——蜂花粉的质量, g;

100——单位换算系数。

2.2.4 直接干燥法测定蜂花粉水分含量

称取 3 g 试样(精确至 0.001 g)置于已经恒重的扁形铝制称量皿中, 再放入 105℃的干燥箱中干燥至恒重(前后 2 次重量差值不大于 2 mg)。

以质量分数 $X_3(\%)$ 表示蜂花粉水分含量, 按式(3)进行计算:

$$X_3 = \frac{m_3 - m_4}{W_3} \times 100 \quad (3)$$

式中:

X_3 ——蜂花粉水分含量, %;

m_3 ——称量皿和蜂花粉干燥前的质量, g;

m_4 ——称量皿和蜂花粉干燥后的质量, g;

W_3 ——蜂花粉的质量, g;

100——单位换算系数。

3 结果与分析

3.1 卡尔费休容量法反应参数的确定

3.1.1 蜂花粉粒径的确定

采用卡尔费休容量法测定不同粒径(850、710、600 μm)蜂花粉样品的水分含量,反应溶剂选用甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)。从表 1 中可以看出,蜂花粉的粒径对水分含量测定存在影响,当粒径为 600 μm 时水分含量明显高于粒径为 850 和 710 μm 的试样($P < 0.05$),而且实验过程中观察到其到达反应终点的时间较短。由于蜂花粉粒径小于 600 μm 时会存在静电效应^[4],对反应结果有一定的影响,所以确定蜂花粉粒径为 600 μm 。

表 1 蜂花粉粒径对卡尔费休容量法测定水分含量的影响 (%) ($n=7$)

Table 1 Influence of the particle size of bee pollen on water content determined by volumetric Karl Fischer method (%) ($n=7$)

蜂花粉样品	水分含量		
	850 μm^*	710 μm^*	600 μm^*
油菜花粉	4.84 \pm 0.05	5.25 \pm 0.04	5.45 \pm 0.09
荷花粉	1.66 \pm 0.02	1.82 \pm 0.03	1.94 \pm 0.02
茶花粉	4.88 \pm 0.08	5.17 \pm 0.06	5.35 \pm 0.08
玫瑰花粉	2.39 \pm 0.04	2.61 \pm 0.04	2.78 \pm 0.05

注: *数值表示为平均值 \pm 标准偏差

3.1.2 反应溶剂的选择

当采用卡尔费休容量法测定蜂花粉的水分含量时,应确保蜂花粉能充分在反应溶剂中溶解,但实际上蜂花粉并不能完全溶解,因此可以通过改变反应溶剂的极性来增加蜂花粉在反应溶剂中的溶解度,比如加入使用丙醇、长链醇、甲酰胺、氯仿等^[4],从而能更加准确地测定蜂花粉的水分含量。本研究选用甲醇、甲醇-甲酰胺(2:1, V/V)、甲醇-正辛醇(1:1, V/V)、甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)作为反应溶剂,采用卡尔费休容量法测定粒径为 600 μm 的蜂花粉的水分含量,结果见表 2。

在实验过程发现,蜂花粉在甲醇-甲酰胺(2:1, V/V)中

的溶解性较差,在甲醇中的溶解性较好,在甲醇-正辛醇(1:1, V/V)中溶解速率快,分散性好,在甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)中表现出较好的溶解性且能快速分散。从表 2 中可以看出,不同的反应溶剂对蜂花粉中的水分的提取效果不同,从而对水分含量的测定表现出一定的影响,甲醇-甲酰胺(2:1, V/V)的使用不如甲醇-正辛醇(1:1, V/V)的效果好,并未表现出比单独使用甲醇更好的效果,这主要是由于蜂花粉在甲醇-甲酰胺(2:1, V/V)中的溶解性较差。选用甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)作为反应溶剂时,测得蜂花粉水分含量较高,这可能是由于正辛醇是长链醇,具有较强的疏水性,能够溶解蜂花粉中的脂肪,同时甲酰胺作为一种极性溶剂,能够争夺蛋白质和总糖中形成氢键的结合水,从而释放出其中的水,所以确定反应溶剂为甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)。

3.2 蜂花粉水分含量的测定比较

采用卡尔费休容量法测定粒径为 600 μm 的蜂花粉的水分含量,反应溶剂选用甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V),同时采用减压干燥法、直接干燥法分别测定 4 种蜂花粉的水分含量,结果见表 3。从表 3 可以看出,卡尔费休容量法测得蜂花粉的水分含量高于 65 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥法,高出 11.2%~17.9%,而 105 $^{\circ}\text{C}$ 直接干燥法测定的水分含量远高于卡尔费休容量法和 65 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥法。

蜂花粉中含有较多的总糖、蛋白质以及脂肪,而这 3 种物质由于其分子内存在大量的极性基团,极易与水形成氢键,从而形成较难去除的结合水,这些结合水在 65 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥法条件下无法有效去除,同时在密闭的干燥箱中,存在水分平衡现象也造成蜂花粉中的水分不能完全去除。而 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥法测得的结果完全脱离合理范围,这主要是由于在 105 $^{\circ}\text{C}$ 下长时间烘干造成蜂花粉中的易挥发风味物质的释放以及可能发生美拉德反应而产生新的水分^[10]。相比而言,卡尔费休容量法由于是水参与反应的专一性化学反应,不存在物理高温引起的偏差,因此测得的水分含量更能代表蜂花粉中的真实水分。此外,65 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥法需要 20~25 h,105 $^{\circ}\text{C}$ 直接干燥法需要 6~8 h,而卡尔费休容量法仅需 5 min 左右的时间就可以完成一次蜂花粉的水分含量测定,可以大大提高检测效率。

表 2 反应溶剂对卡尔费休容量法测定水分含量的影响 (%) ($n=7$)

Table 2 Influence of the solvent composition on water content determined by volumetric Karl Fischer method (%) ($n=7$)

蜂花粉样品	水分含量			
	甲醇*	甲醇+甲酰胺*	甲醇+正辛醇*	甲醇+甲酰胺+正辛醇*
油菜花粉	4.88 \pm 0.05	4.65 \pm 0.04	5.02 \pm 0.09	5.45 \pm 0.09
荷花粉	1.82 \pm 0.03	1.58 \pm 0.02	1.74 \pm 0.03	1.94 \pm 0.02
茶花粉	4.98 \pm 0.06	4.77 \pm 0.08	5.01 \pm 0.05	5.35 \pm 0.08
玫瑰花粉	2.47 \pm 0.04	2.32 \pm 0.03	2.51 \pm 0.03	2.78 \pm 0.05

注: *数值表示为平均值 \pm 标准偏差

表 3 蜂花粉采用 3 种检测水分含量方法的结果(%) $(n=7)$
Table 3 Results of 3 determination methods for water content of bee pollen (%) $(n=7)$

蜂花粉样品	水分含量		
	卡尔费休容量法*	65 °C减压干燥法*	105 °C直接干燥法*
油菜花粉	5.45±0.09	4.65±0.04	9.95±0.131
荷花粉	1.94±0.02	1.68±0.03	5.45±0.07
茶花粉	5.35±0.08	4.39±0.08	8.06±0.09
玫瑰花粉	2.78±0.05	2.47±0.05	6.94±0.10

注: *数值表示为平均值±标准偏差

表 4 加标回收和精密度实验结果(%) $(n=7)$
Table 4 Results of standard recovery and precision test (%) $(n=7)$

蜂花粉样品	本底值*	添加水平	平均实测值	平均回收率	RSD
油菜花粉	5.45±0.09	2.0	7.20±0.08	87.57±2.62	1.11
		4.0	9.24±0.10	94.57±2.59	1.08
		8.0	13.23±0.14	97.21±1.77	1.06
荷花粉	1.94±0.02	2.0	3.63±0.05	84.36±2.78	1.38
		4.0	5.63±0.07	92.07±1.95	1.24
		8.0	9.70±0.10	96.91±1.36	1.03
茶花粉	5.35±0.08	2.0	7.17±0.08	91.07±1.54	1.12
		4.0	9.09±0.09	93.61±2.80	0.99
		8.0	12.88±0.14	94.14±1.97	1.09
玫瑰花粉	2.78±0.05	2.0	4.50±0.03	86.07±3.22	0.67
		4.0	6.57±0.08	94.75±1.36	1.22
		8.0	10.66±0.11	98.45±1.30	1.03

注: *数值表示为平均值±标准偏差

3.3 回收率与精密度实验结果

在 4 种蜂花粉中分别加入 3 个不同水平(低、中、高)的蒸馏水,按照前述方法采用卡尔费休容量法测定其水分含量,每个水平平行测定 7 次,分别计算出水分含量的加标回收率,同时计算出相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。由表 4 可见,水分含量的加标回收率在 84.36%~98.45%,相对标准偏差在 0.67%~1.38%,这表明采用卡尔费休容量法测定蜂花粉中的水分含量准确度高,重复性良好,可以满足检测分析要求。

4 结论与讨论

本研究建立了一种可以用于快速检测蜂花粉水分含量的卡尔费休容量法,采用甲醇-甲酰胺-正辛醇(1:1:1, V/V/V)作为反应溶剂对蜂花粉进行萃取预处理,同时确定蜂花粉的粒径为 600 μm。通过与减压干燥法、直接干

燥法相比,实验结果显示卡尔费休容量法测定蜂花粉水分含量的结果更能表征蜂花粉的真实水分。此外,卡尔费休容量法具有操作简单、分析耗时短、灵敏度高、重复性好且能自动保存数据等,是用于测定蜂花粉水分含量的较优选择。

参考文献

- [1] GB 31636-2016 食品安全国家标准 花粉[S].
GB 31636-2016 National food safety standard-Pollen [S].
- [2] GB/T 30359-2013 蜂花粉[S].
GB/T 30359-2013 Been pollen [S].
- [3] 陈露. 泰州地区三种蜂花粉营养成分分析[J]. 泰州职业技术学院学报, 2012, 12(1): 58-59.
Chen L. Analysis of three kinds of bee pollen nutrients in Taizhou [J]. J Taizhou Polytechnol Coll, 2012, 12(1): 58-59.
- [4] Gergen I, Radu F, Bordean D, et al. Determination of water content in bee's pollen samples by Karl Fischer titration [J]. Food Control, 2004,

- 17(3): 176–179.
- [5] Morgano MA, Milani RF, Martins MCT, *et al.* Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration [J]. *Food Control*, 2011, 22(10): 1604–1608.
- [6] 胡潇文, 吕佳宁, 朴银子, 等. 椴树蜂花粉抗氧化性研究[J]. *食品科技*, 2017, 42(8): 95–100.
Hu XW, Lv JN, Piao YZ, *et al.* Antioxidation of linden bee pollen [J]. *Food Sci Technol*, 2017, 42(8): 95–100.
- [7] 赵丹. 速溶花粉的工艺及抗疲劳作用的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
Zhao D. Study on process and antifatigue function of instant pollen [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.
- [8] 何佳洁, 汪燕, 马振刚. 综述蜂花粉的广泛应用[J]. *蜜蜂杂志*, 2020, 40(1): 13–17.
He JJ, Wang Y, Ma ZG. Review on the widespread application of bee pollen [J]. *J Bee*, 2020, 40(1): 13–17.
- [9] GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定[S].
GB 5009.3-2016 National food safety standard-Determination of moisture in foods [S].
- [10] 骆华星, 范涯. 用减压干燥法测定花粉中的水分含量[J]. *中国蜂业*, 2007, (1): 36.
Luo HX, Fan Y. Determination of water content in pollen by vacuum drying method [J]. *Apicul China*, 2007, (1): 36.
- [11] 骆华星, 范涯. 几种蜂花粉中水分含量测定的方法比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(1): 214–215.
Luo HX, Fan Y. Comparison of several determination methods of water content in bee pollen [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(1): 214–215.
- [12] Ronkart SN, Paquot M, Fougnes C, *et al.* Determination of total water content in inulin using the volumetric Karl Fischer titration [J]. *Talanta*, 2006, 70(5): 1006–1010.
- [13] Sanchez V, Baeza R, Ciappini C, *et al.* Comparison between Karl Fischer and refract metric method for determination of water content in honey [J]. *Food Control*, 2008, 21(3): 339–341.
- [14] Isengard HD, Schultheiß D, Radović B, *et al.* Alternatives to official analytical methods used for the water determination in honey [J]. *Food Control*, 2001, 12(7): 459–466.
- [15] 范涯, 骆华星. 蒸馏法测定蜂花粉中的水分[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(3): 688–689.
Fan Y, Luo HX. Determination of water content in bee pollen by distillation [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(3): 688–689.
- [16] 马跃龙, 薛峰, 印杰, 等. 溶剂萃取-卡尔·费休法测定婴儿配方奶粉中的真实水分[J]. *食品工业*, 2018, 39(5): 159–161.
Ma YL, Xue F, Yin J, *et al.* Extraction-Karl Fisher method to determine the real water content of infant formula milk powder [J]. *Food Ind*, 2018, 39(5): 159–161.
- [17] 丁耀魁, 杜海波. 卡尔费休法在油脂水分测定中的应用[J]. *粮油食品科技*, 2007, (2): 29–30.
Ding YK, Du HB. The application of Karl Fischer method in the determination of oil moisture [J]. *Sci Technol Cere Oil Food*, 2007, (2): 29–30.
- [18] 俞淑, 王莹, 周晏, 等. 食品营养强化剂乳酸亚铁中水分含量测定方法探讨[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(3): 518–522.
Yu S, Wang Y, Zhou Y, *et al.* Investigation on moisture content determination methods of nutrient supplement ferrous lactate [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(3): 518–522.
- [19] Isengard HD, Haschka E, Merkh G. Development of a method for water determination in lactose [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 1660–1663.
- [20] Gallina A, Stocco N, Mutinelli F. Karl Fischer titration to determine moisture in honey: A new simplified approach [J]. *Food Control*, 2009, 21(6): 942–944.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



杨 健, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。
E-mail: yjian1989@163.com



马跃龙, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: mayl@sqi.org.cn