

高效液相-示差折光法比较新疆地产8种蜂蜜中4种糖的含量

赵文惠¹, 曾 诚¹, 丛媛媛^{2*}

(1. 新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 研究比较新疆地区8种蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的含量, 以评价其质量。 **方法** 依据国标检测方法(GB/T18932.22-2003)并依据文献加以改进。采用 Waters carbohydrate high performance(4.6 mm×250 mm, 4 μm)色谱柱, 乙腈:水(75:25, V:V)为流动相, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 35 °C, 检测器为示差折光检测器, 进样量为 10 μL。 **结果** 混标及蜂蜜样品中的果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖在 10 min 内均达到基线分离, 加样回收率为 98.6%~102.6%, 相对标准偏差(RSD)为 1.5%~2.6%, 有 7 种蜂蜜中果糖、葡萄糖含量均大于 30%, 蔗糖含量低于 2%。 **结论** 该方法与国标检测方法相比具有灵敏度高, 分析时间短, 结果准确可靠, 适用于蜂蜜中单糖的快速分析和质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 示差折光检测器; 蜂蜜; 果糖; 葡萄糖; 蔗糖; 麦芽糖

Determination of fructose, glucose, sucrose, and maltose in honey by high performance liquid chromatography with refractive index detector

ZHAO Wen-Hui¹, ZENG Cheng¹, CONG Yuan-Yuan^{2*}

(1. Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To study the determination of content of fructose, glucose, sucrose and maltose in honey to judge whether the sugar amount in honey is accord with the national standards. **Methods** Based on GB/T18932.22-2003 and literature, the separation was carried out on waters carbohydrate chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 4μm), mobile phase was acetonitrile-water (75:25, V:V), and the flow rate was 1 mL/min. The column temperature was 35 °C, and the detector was RID with an injection volume of 10 μL. **Results** The fructose, glucose, sucrose, and maltose were separated under the optimized conditions within 10 min. The average recoveries ($n=6$) were 98.6%~102.6% with RSD of 1.5%~2.6%. The result showed that the content of fructose and glucose were more than 30% and sucrose was lower than 2% in 7 kinds of honey. **Conclusion** The method is simple rapid, sensitive and cheap for directly determining honey without any complicated and time-consuming separation process. It can be applied for the rapid analysis and quality control of sugar in honey.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; refractive index detector; honey; fructose; glucose;

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2013I23)

Fund: Supported by Key Projects of Scientific Research Project of the Xinjiang Uygur Autonomous Region University (XJEDU2013I23)

*通讯作者: 丛媛媛, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药、民族药药效物质基础研究。E-mail: congyyxj@126.com

*Corresponding author: CONG Yuan-Yuan, Professor, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: congyyxj@126.com

sucrose; maltose

1 引言

蜂蜜是一种营养价值较高的天然保健佳品,其保健功效越来越受到人们的重视^[1]。据报道,经常食用蜂蜜能提高人体的消化功能,止咳润肺,增强机体免疫能力^[2]。其中,果糖的升糖指数远远低于其他传统糖品,果糖在人体内的代谢速度比葡萄糖和蔗糖等都要慢,在代谢中也不依赖胰岛素,而是直接进入人体肠道内被人体所消化利用,因此,果糖及其相关制品被广泛应用于糖尿病患者^[3]。根据美国《糖尿病护理》杂志报道,中等量的果糖可显著改善胰岛素敏感性和血脂代谢,与同等摄入量的葡萄糖相比,果糖更适合糖尿病患者食用^[4]。

国家出台的《蜂蜜》标准(GB 18796-2005)^[5]、《无公害食品 蜂蜜》(NY 5134-2008)^[6]、《食品安全国家标准 蜂蜜》(GB 14963-2011)^[7]都要求蜂蜜中葡萄糖和果糖总糖量应达到60%以上,蔗糖含量要求在5%以下,麦芽糖含量在2%以下。但由于利益的驱使,许多不法商贩将价格低廉的白糖掺入蜂蜜中,降低了蜂蜜中果糖和葡萄糖的含量^[8]。近年来,我国食品安全抽检发现国内蜂蜜不合格的情况中,其主要原因是果糖和葡萄糖含量不合格^[9],目前,虽然真假蜂蜜的检测方法很多,但每一种方法多多少少都有一些不足。

本研究根据国家标准(GB/T18932.22-2003)^[10],采用液相色谱示差折光检测法(high performance liquid chromatography refractive index detector, HPLC-RID),并依据文献对其改进,研究购于本地超市的8种市售蜂蜜和农家自养蜜蜂采集的蜂蜜,进行葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖含量测定,以期在市售蜂蜜商品的质量标准制定提供依据。

2 材料和方法

2.1 试剂与仪器

葡萄糖(纯度>99%, Sigma 公司,批号 G8207);果糖(纯度>99%,天津市福晨化学试剂厂,批号 20131222);蔗糖(纯度>99%,天津永晟精细化工有限公司,批号:20140416);麦芽糖(纯度>99%,北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20140102)。

供试品为不同种类的蜂蜜:向日葵蜂蜜(阿勒泰地区沙吾尔原生态蜂业科技有限公司,批号 20140906);红枣蜂蜜(阿勒泰地区沙吾尔原生态蜂业科技有限公司,批号:20140508);热合迈蜂蜜(乌鲁木齐真境食品有限责任公司,批号:20131112);薰衣草蜂蜜(伊犁百信草原蜂业有限责任公司,批号:20130523);山花原蜜(新疆尼勒克县天汇开发有限责任公司,批号:20131028);黑蜂蜜(乌鲁木齐博隆新技术开发有限公司,批号:20140110);枸杞蜂蜜(伊犁山水源蜂业食品有限公司,批号:20150106);水为 Mill-Q 超纯水;乙腈为色谱纯级(Fisher Scientific 公司,批号:122070)。

高效液相色谱仪(美国 Water Alliance E2695, 2414 示差折光检测器, Empower3 工作站)。

2.2 实验方法

2.2.1 RID 色谱条件

色谱柱(Waters carbohydrate high performance, 4.6mm×250mm, 4 μm);检测器:示差折光检测器;柱温 35℃;流动相为乙腈-水=75:25 (V:V);流速:1 mL/min;检测器池温度:35℃;进样量:10 μL。

2.2.2 对照品储备液的制备

精密称取 2.5 g 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的标准物质,用蒸馏水:乙腈(60:40, V:V)溶解定容至 50 mL,摇匀,备用。

分别吸取 10、8、6、4、2、1 mL 的上述果糖、葡萄糖标准储备液,用蒸馏水:乙腈(60:40)定容至 10 mL,摇匀并作标准曲线,标准曲线方程,见表 1。同时,进空白样,以信噪比等于 3 为标准,测得果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖的检出限为 5 mg/mL、5 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.5 mg/mL。

表 1 果糖和葡萄糖的标准曲线方程

Table 1 Linear equation for fructose and glucose

标样种类	回归方程	线性范围 (mg/mL)	相关系数 (r)
果糖	$Y=61440X+97093$	5~50	0.9992
葡萄糖	$Y=62109X+64718$	5~50	0.9981

2.2.3 供试品溶液的制备

准确称取 5 g 样品蜂蜜置于 100 mL 烧杯中, 加入适量水, 微量超声使样品完全溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中, 然后用蒸馏水:乙腈(60: 40)润洗定容, 混匀, 作为供试品, 备用。

3 结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度实验

从“2.2”项下标准储备溶液取果糖($C=50$ mg/mL)、葡萄糖($C=50$ mg/mL)、蔗糖($C=50$ mg/mL)和麦芽糖($C=50$ mg/mL)溶液测定 6 次, 此测定结果的峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.68%、0.72%、1.3%、0.86%, 证明本方法的精密度良好。

3.1.2 稳定性实验

从“2.2.3”项下制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、16 h, 精密吸取 10 μ L, 注入液相色谱仪, 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖峰面积的 RSD 分别为 0.46%、0.62%、1.2%、0.38%, 证明供试品溶液在配

制后 16 h 内基本稳定。

3.1.3 重复性实验

从“2.2.3”项下制备供试品溶液 6 份, 测定并计算, 结果 6 份样品中均没有测出含蔗糖、麦芽糖 2 种限量成分, 6 份样品中果糖测定值标准差为 1.4%、葡萄糖测定值标准差为 0.84%, 证明本方法重复性较好。

3.1.4 加标回收率实验

精密量取不同蜂蜜的 9 份已知含量的同批样品作为本底, 分别加入不同的果糖(由于果糖在蜂蜜含量最高, 并且最具药用价值, 故以果糖为代表)对照品溶液高中低浓度各 3 份, 用 HPLC-RID 测定, 记录峰面积, 计算回收率, 均获得来了较理想的回收率, 结果见表 2。

3.2 样品测定

按“2.2.3”项下方法制备样品溶液并测定, 7 种不同品种的蜂蜜和 1 种自制蜂蜜样品的测定结果见表 3 和图 1(采用外标一点法计算蔗糖的含量)。

表 2 各蜂蜜中果糖加标物实测结果($n=3$)
Table 2 Results of recovery for determination of fructose in honey ($n=3$)

样品名	样品量(mg)	加入量(mg)	平均回收率(%)	RSD(%)
热合迈蜂蜜	105	10	101.7	1.28
		50		
		200		
山花原蜜	116	40	99.2	1.76
		160		
		400		
黑蜂蜜	137	10	102.2	1.61
		60		
		200		
薰衣草蜂蜜	126	10	99.8	1.19
		60		
		200		
自制蜂蜜	118	10	99.7	2.16
		60		
		200		
向日葵蜂蜜	146	10	100.3	1.52
		60		
		200		
红枣蜂蜜	152	10	100.7	1.07
		60		
		200		
枸杞蜂蜜	133	10	99.8	1.25
		60		
		200		

表3 各蜂蜜样品的测定结果(mg/g)(n=3)
Table 3 Results of sample determination (mg/g) (n=3)

样品	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
热合迈蜂蜜	280.4±9.4	267.2±13.2	-	-
山花原蜜	432.2±7	333.6±15.6	-	-
黑蜂蜜	365.4±11.6	348.2±10.6	-	-
薰衣草蜂蜜	414±12.8	345±13.4	24.2±4.2	-
自制蜂蜜	346.2±12.4	291.8±8.8	34.2±6.8	-
向日葵蜂蜜	410.6±14.6	402±11.6	22.6±5.2	-
红枣蜂蜜	383.2±6.2	265±14.6	29.4±7.4	-
枸杞蜂蜜	388.8±9.2	405.2±16.6	23.2±5.4	-

注: - 表示未检出

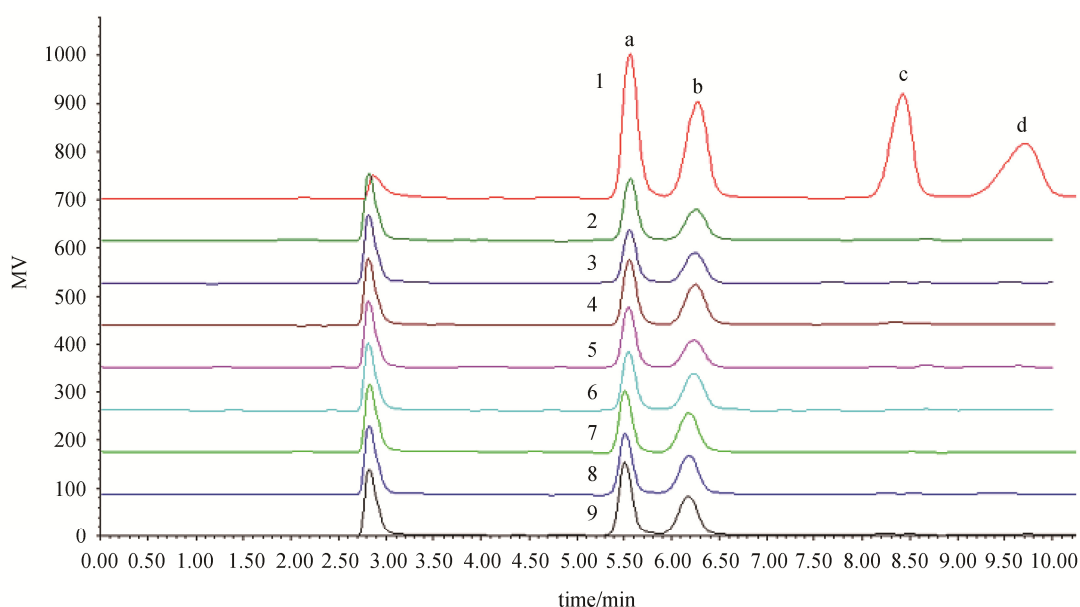


图1 RID-HPLC 色谱图

Fig. 1 RID-HPLC chromatogram of soluble sugar standards and samples

1. 混合对照品(a: 果糖, b: 葡萄糖, c: 蔗糖, d: 麦芽糖); 2. 薰衣草蜂蜜; 3. 自制蜂蜜; 4. 向日葵蜂蜜; 5. 红枣蜂蜜; 6. 枸杞蜂蜜; 7. 黑蜂蜜; 8. 热合迈蜜; 9. 山花原蜜

4 讨论

示差检测器是一种稳定、灵敏的通用性检测器,这一系统弥补了紫外检测器的不足^[11-12],在测定聚合物、糖类、有机酸、高分子化合物等物质方面具有独特优势,该系统操作简单,结果准确可靠,糖类化合物的检测大多使用此检测系统^[13-15]。

依据国家标准 GB/T18932.22-2003 液相色谱法

对蜂蜜进行检测,在样品前处理的时候用一定量水溶解样品,再用乙腈定容,经常发现分层现象,特别是在实验环境温度较低的时候,分层更为严重,从而影响检测^[16-17]。现用乙腈+水(40+60)直接溶解样品并摇匀,能有效地解决分层现象^[18]。

国家标准 GB/T18932.22-2003 采用流动相为乙腈:水(77:23),本文降低乙腈的使用量,流动相:乙腈+水(75+25),测定结果与国家标准方法的结果一致

[18]. 可以降低企业成本, 减少环境的污染。

经检测市售 8 种蜂蜜有 7 种果糖、葡萄糖总含量均大于 60%, 蔗糖含量低于 2%, 其余 1 种(热合迈蜂蜜)不符合标准。8 种蜂蜜中山花蜂蜜果糖含量最高, 枸杞蜂蜜葡萄糖含量最高。本方法操作简单快速, 重复性好, 灵敏度高, 准确性好, 回收率高。

参考文献

- [1] 孙彩霞, 戚亚梅, 王钢军, 等. 国内外蜂蜜等级规格标准研究[J]. 中国蜂业, 2014, 65(13): 60-64.
Sun CX, Qi YM, Wang GJ, *et al.* Honey grade specifications and standards at home and abroad [J]. *Apic China*, 2014, 65(13): 60-64.
- [2] 王琳琳, 郑凌玉, 张磊, 等. 高果糖诱导大鼠胰岛素抵抗模型的胰腺组织代谢组学研究[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(9): 1301-1304.
Wang LL, Zheng LY, Zhang L, *et al.* 1H NMR metabonomics study of pancreatic extracts from insulin-resistant rats induced by fructose feeding [J]. *J South Med Univ*, 2014, 34 (9): 1301-1304.
- [3] MM. Cavia, MA Fernandez-Muinoa, E. Gomez-Alonso, *et al.* Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation [J]. *Food Chem*, 2002, 78: 157-161.
- [4] 赵荫涛, 邵莉, 杨海波, 等. Ghrelin 对果糖诱导大鼠高血压伴胰岛素抵抗的影响[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(12): 935-938.
Zhao YT, Shao L, Yang HB, *et al.* Effects of Ghrelin on hypertension and insulin resistance in fructose-fed rats [J]. *Natl Med J China*, 2013, 93 (12): 935-938.
- [5] GB 18796-2005 蜂蜜[S].
GB 18796-2005 Honey [S].
- [6] GB/T22221-2008 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定高效液相色谱法[S].
GB/T22221-2008 Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose in food by high-performance liquid chromatography (HPLC) [S].
- [7] Mustafa TY, Nevruz BT, Omer ST, *et al.* Steady, dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups: Correlations with HPLC-RID results [J]. *Food Res Int*, 2014, 64: 634-646.
- [8] Ma CM, Sun Z, Chen CB, *et al.* Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD[J]. *Food Chem*, 2014, 145: 784-788.
- [9] 汤小芳, 张海波, 祁贵国. 市售蜂蜜中糖类成分含量的快速测定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 270-271.
Tang XF, Zhang HB, Qi GG. Rapid determination of sugars in Commercial honey [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2013, 41(10): 270-271.
- [10] GB/T18932. 22-2003 蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测定方法相色谱示差折光检测法[S].
GB/T18932. 22-2003 Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose in Honey by HPLC-RID [S].
- [11] 魏锋, 吴朝阳, 马玲云, 等. RP-HPLC-RID 测定中药和保健食品中低聚果糖的含量[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(9): 20-22.
Wei F, Wu ZY, Ma LY, *et al.* Determination of Fructooligosaccharides in Chinese medicine and functional Foods by RP-HPLC-RID [J]. *Asia-Pacific Tradit Med*, 2009, 5(9): 20-22.
- [12] 田艳铃, 王浩, 刘艳琴, 等. HPLC 示差折光分析法测定饮料中果糖、葡萄糖、蔗糖含量[J]. 中国食品添加剂, 2006, 6(1): 187-189.
Tian YL, Wang H, Liu YQ, *et al.* Determination of fructose, glucose, sucrose' components in beverage by HPLC with refractive index detector [J]. *China Food Add*, 2006, 6(1): 187-189.
- [13] 余娟, 莫海涛, 武金良, 等. HPLC-ELSD 法测定蜂蜜中的糖分[J]. 广西轻工业, 2006, 1(6): 20-21.
Yu J, Mo HT, Wu JL, *et al.* Determination of sugars in honey by HPLC-ELSD [J]. *Guangxi J Light Ind*, 2006, 1(6): 20-21.
- [14] 朱玉新, 韩松林, 陈再容, 等. 高效液相-示差折光法同时测定 3 种洋葱中 4 种糖的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(2): 196-199.
Zhu YX, Han SL, Chen ZR, *et al.* Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose in different onions by HPLC-RID method [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2013, 36(2): 196-199.
- [15] 蔡佳梓. 蜂蜜中果糖、葡萄糖含量测定方法的改进 [J]. 化学工程与装备, 2012, 4(1): 131-133.
Cai JX. Improved determination of fructose, glucose in honey [J]. *Chem Eng Equip*, 2012, 4(1): 131-133.
- [16] 林长钦, 李颖怡, 刘垚, 等. 高效液相色谱示差法测定蜂蜜中的果糖、葡萄糖、蔗糖[J]. 广东农业科学, 2010, 37(4): 254-256.
Lin CQ, Li YY, Liu Y, *et al.* Determination of fructose, glucose and sucrose in honey by liquid chromatography refractive index detector [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2010, 37(4): 254-256.
- [17] 袁梦, 马玉晨. 高效液相色谱-示差折光法测定蜂蜜中三种还原糖含量[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(1): 87-90.
Yuan M, Ma YC. The determination of three kinds of reducing

sugar content in honey [J]. Food Ferment Technol, 2015, 51(1): 87-90.

- [18] 汪良清, 胡桂标. 液相色谱-示差折光法测定蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的改进研究 [J]. 中国酿造, 2013, 32(6): 154-156.

Wang LQ, Hu GB. Improvement of the liquid chromatography-refractive index determination method for fructose, glucose, sucrose and maltose in honey [J]. China Brewing, 2013, 32(6): 154-156.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



赵文惠, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为分析测试技术与新药研发。

E-mail: whzhao2006@163.com



丛媛媛, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药、民族药药效物质基础研究。

E-mail: congyyxj@126.com