

柱前衍生-高效液相色谱-质谱联用法鉴定糖浆 掺假蜂蜜

邱志超¹, 官咏仪^{2*}

(1. 广州质量监督检测研究院, 广州 511447; 2. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要: **目的** 建立蜂蜜中掺假的快速鉴定方法。 **方法** 将蜂蜜样品溶解后进行真空干燥, 然后对样品中的低聚糖进行荧光标记, 以氨基柱为分析柱, 采用乙腈和甲酸铵为流动相, 对标记低聚糖进行高效液相色谱分离, 采用 ESI-MS 的 SIR 模式对标记低聚糖进行定性测定。 **结果** 基于荧光标记试剂 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)和毒性较低的还原剂 2-甲基吡啶-N-甲硼烷(2-PB)的还原氨化反应能有效地对蜂蜜中的带还原端的低聚糖进行荧光标记。天然蜂蜜含有单糖(DP1)、双糖(DP2)和少量三糖(DP3), 掺假蜂蜜除此以外还含有少量四糖(DP4)、五糖(DP5)和六糖(DP6)。 **结论** 采用此法对蜂蜜样品进行蜂蜜掺假判定与国标方法测试结果基本吻合, 而且不需对样品进行净化处理即可上机分析, 为建立蜂蜜掺假的快速筛查方法提供参考。

关键词: 掺假蜂蜜; 带还原端低聚糖; 柱前衍生; 高效液相色谱-质谱联用法

Identification of adulterated honey by precolumn derivatization-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

QIU Zhi-Chao¹, GUAN Yong-Yi^{2*}

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China; 2. Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of adulterated honey. **Methods** Honey samples were dissolved and treated by vacuum drying, and then they were fluorescent labeled before separated by high performance liquid chromatography (HPLC) using NH₂ column with acetonitrile and ammonium formate as mobile phase, and qualitatively analyzed by ESI-MS under SIR mode. **Results** It was shown that the fluorescent labeling of oligosaccharides with reducing end in honey were effectively achieved when using 2-aminobenzamide and 2-picoline-borane following by reductive amination reaction. It was also shown that natural honey contained monosaccharide (DP1), disaccharide (DP2) and trisaccharide (DP3); in addition, adulterated honey contained tetrasaccharide (DP4), pentasaccharide (DP5) and hexasaccharide (DP6). **Conclusion** The results of the established method are basically consistent with those of the national standard method, and the established method do not need to purify the samples before HPLC analysis, which provide references for the rapid screening method of adulterated honey.

KEY WORDS: adulterated honey; oligosaccharides with reducing end; precolumn derivatization; high performance

基金项目: 广东省质监局科技项目 (2016PZ18)

Fund: Supported by Science and technology project of administration of Quality and Technology Supervision of Guangdong Province (2016PZ18)

*通讯作者: 官咏仪, 食品检验工程师, 主要研究方向为食品营养与添加剂检测。E-mail: stupid625@qq.com

*Corresponding author: GUAN Yong-Yi, Food Inspection Engineer, Inspection and Quarantine Technology Center, No.66, Huachengdadao Road, Tianhe District, Guangzhou 510623, China. E-mail: stupid625@qq.com

liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

蜂蜜常见掺假物有蔗糖、人工转化糖、淀粉、食盐、饴糖、羧甲基纤维素钠、色素和香精^[1,2]。蜂蜜掺假鉴别方法一般是针对掺假物的特征来制定分析策略的。鉴定蜂蜜是否掺入糖浆或人工转化糖,主要是通过分析糖浆中特征性物质在待测蜂蜜中的含量来实现^[3-5]。对于天然蜂蜜,一般含有60%~70%的果糖和葡萄糖,10%以下的蔗糖以及少量三糖,不存在五糖以上的低聚糖^[6,7]。对于糖浆,由于生产工艺和酶解过程,其成品不可避免存在少量未被彻底酶解的五糖以上的低聚糖。因此低聚糖可作为糖浆中特征性物质。通过测定待测蜂蜜中的上述特征性物质,以区分天然蜂蜜和糖浆掺假蜂蜜。目前以上述原理作为蜂蜜掺假鉴定方法的标准方法主要有GB/T 18932.2-2002《蜂蜜中高果糖淀粉糖浆测定方法 薄层色谱法》和GB/T 21533-2008《蜂蜜中淀粉糖浆的测定 离子色谱法》^[8,9]。2种方法都需要繁琐的过柱净化操作,不利于多个样品同时测定,且薄层色谱分离效果不理想,影响结果判断。这对短时间内完成大量蜂蜜样品的掺假分析任务造成困难,亟待寻找高通量分析方法以满足检测任务的要求。

蜂蜜掺假快速检测方法已有报道^[10],但普遍存在准确性不足和误判率高等问题。有报道采用HPLC指纹谱图对蜂蜜成分进行分析^[11],但只针对某一种特定蜂蜜为研究对象,面对市面上蜂蜜品种琳琅满目的现状,该方法的可操作性有限。目前,在糖类分析技术中,还原氨化反应技术已经越趋成熟。特别是低毒还原剂2-甲基吡啶-N-甲硼烷的发现,有效替代了毒性较强的还原剂氰基硼氢化钠,使该方法的安全性和可操作性大幅提高^[12,13]。通过还原氨化反应生成标记糖类物质经HPLC分离,再以色谱检测器或质谱检测器进行分析,正成为高分辨率和高灵敏度糖类分析技术的风向标^[14]。这为糖浆掺假蜂蜜鉴定方法带来了新思路。糖浆中的低聚糖是在生产过程中由于酶解不完全而产生的,因此低聚糖末端一般带有还原性糖醛基(还原端)。将蜂蜜中的糖类分子进行柱前衍生,利用含还原端糖类可与亲核试剂进行还原氨化反应生成标记糖类分子,而非还原性糖(如蔗糖)不参与反应的特点,可检测蜂蜜中含还原端糖类物质的分布情况,并作为蜂蜜掺假的特征性指标。但采用还原氨化反应标记蜂蜜中的糖类物质的研究鲜有报道。

本研究将掺假蜂蜜中含还原端的低聚糖进行还原氨化反应,使糖类分子接上标记基团以增强MS检测信号,以高效液相色谱-质谱联用法对标记糖类物质进行定性分析,为建立高通量糖浆掺假蜂蜜定性鉴定方法提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

2-氨基苯甲酰胺(2-AB)、二甲基亚砷、冰乙酸、2-甲基吡啶-N-甲硼烷(2-PB)(德国Sigma公司);乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸铵(色谱纯,天津科密欧公司);氨水(分析纯,广州试剂厂)。

市售广东从化冬蜜。

2.2 仪器与设备

WATERS Xevo® TQ-S 质谱仪,配Acquity® UPLC液相色谱仪(H-class 四元低压梯度泵,FTN自动进样器,柱温箱),电喷雾离子源(ESI),Masslynx®软件,美国WATERS公司

2.3 样品处理

参考文献12和15,具体参数稍作优化,如下所示:

取1g蜂蜜,加水溶解定容至100mL,取100μL置于离心管中,65℃真空干燥1~2h至完全干燥,加入衍生剂60μL(含乙酸18μL,二甲基亚砷42μL,2-AB3mg,2-PB6.42mg),涡旋振荡溶解,65℃水浴2h,加入3%氨水溶液800μL静置1min,继续加入2mL超纯水,用乙腈定容至10mL,摇匀,经0.22μm有机膜过滤,待上机分析。

2.4 色谱条件

色谱柱:CNW Athena NH2柱(4.6mm×200mm,3μm);柱温为25℃;流动相为A(50mmol/L甲酸铵,pH4.4)和B(乙腈)梯度洗脱,具体程序见表1;流速为0.5mL/min;进样量为10μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient program of mobile phase

时间/min	A/%	B/%
0.00	20.0	80.0
10.00	30.0	70.0
30.00	80.0	20.0
35.00	20.0	80.0
50.00	20.0	80.0

2.5 质谱条件^[16]

电喷雾离子源(ESI),负离子化模式;毛细管电压:2.50kV;脱溶剂气温度:300℃;脱溶剂气流速:650L/h;离子源温度:150℃;锥孔气流速:150L/h;碰撞气流速:

0.15 mL/min; 选择离子扫描(SIR); 7 种标记糖分析物的质谱分析参数见表 2。

3 结果与分析

3.1 2-氨基苯甲酰胺和低聚糖的反应原理及注意事项

糖类物质由于很难电离, 在质谱中响应信号不强, 难以直接采用质谱进行检测。对糖类物质进行标记, 在糖类物质的还原端接上带电荷的基团, 可以增强其在质谱中的相应信号, 从而有利于糖类物质在质谱中的微量分析。还原胺化反应对糖类物质进行标记, 反应关键在于溶剂需为极性非质子溶剂(如二甲基亚砜)。如图 1 所示, 该反应机制为 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)的胺基亲核加成低聚糖末端糖醛基然后失水缩合成亚胺(薛夫碱)。极性非质子溶剂有利于该亲核反应, 而极性质子溶剂(如水)则会降低 2-氨基苯甲酰胺亲核性, 影响反应效率。因此, 标记反应前, 试样需进行真空干燥处理去除水分, 并且标记反应所用全部试剂应尽量无水。标记反应后, 不能直接加入去离子水稀释, 否则会影响产物的稳定性, 应先用稍过量碱(氨水)进行中和, 使溶液偏碱性再作后续处理, 这样可保证产物的稳定性。

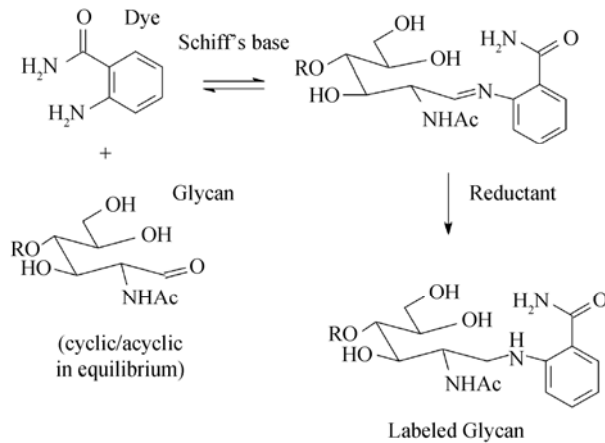


图 1 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)和低聚糖还原端的还原胺化反应过程

Fig. 1 The process of reductive amination between 2-aminobenzamide (2-AB) and oligosaccharides reducing end

3.2 天然蜂蜜和掺假蜂蜜的质谱结果分析

依据 GB/T 18932.2-2002 进行检测, 选取 2 个结果为疑似阳性的蜂蜜样品和 1 个阴性样品按照本实验方法进行测试。结果表明, 阴性样品含有 DP1、DP2 和少量的 DP3, 而阳性样品除此之外还含有 DP4、DP5 和 DP6。其中, 阴性样品中 DP2 和 DP3 所占百分比远低于阳性样品。阴性蜂蜜和阳性蜂蜜表现出明显的低聚糖所占百分比分布差异。表 3 中 DP2 的所占百分比差异是值得注意的, 天然蜂蜜中的蔗糖不含还原端, 不会被本实验的标记试剂作用, 因此, 在 $m/z=461.15$ 处(标记 DP2 特征离子)不会有标记蔗糖的响应信号, 此处有响应的 DP2 为带还原端的 DP2。天然蜂蜜中带还原端的 DP2 较少(小于 1%)。经酶解工艺生产的糖浆原料, 含有带还原端的 DP2。当蜂蜜掺入糖浆后, 可能会增加带还原端 DP2 的所占百分比, 从而导致标记 DP2 信号增加。

如图 2 所示, 样品经标记后, 以负离子模式扫描标记低聚糖特征离子。标记低聚糖在氨基柱中的出峰保留时间随聚合度的增加而增长。其中, DP1 到 DP4 实现了基本的分离, DP5 和 DP6 的保留时间稍有重叠, 但通过质谱的选择离子扫描模式(SIR)可分别得到两者特征离子的峰信号。

4 结论

采用本研究的标记程序得到稳定性良好的标记低聚糖, 可在室温下放置一个月, 色谱峰型保持基本不变。衍生过程可实现高通量操作(一般可实现每批 30~50 个样品), 样品无需逐一过柱净化处理。有文献报道采用柱切换技术去除过量衍生反应试剂后, 再接入色谱分析柱, 以防分析柱受污染^[17]。但试验采用的氨基柱经过 200 次直接进样分析(进样量为 10 μ L)仍然保持稳定的柱分离效能和稳定的柱压, 未见产生不良情况。另外, 为避免大量衍生剂进入质谱系统, 若未采用柱切换方式去除衍生剂^[17], 应将保留时间前 8 min 的组分切往废液, 只取 8 min 以后的组分进入质谱分析。基于荧光标记试剂 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)和毒性较低的还原剂 2-甲基吡啶-N-甲硼烷(2-PB)的还原胺化反应能有效地对蜂蜜中的带还原端的低聚糖进行荧光标

表 2 7 种标记糖分析物的质谱分析参数
Table 2 MS parameters for the analysis of 7 labeled oligosaccharides

序号	分析物	标记低聚糖特征离子	锥孔电压/V	碰撞气电压/V	驻留时间/s
1	单糖(DP1)	299.15	4	4	0.051
2	双糖(DP2)	461.15	4	4	0.051
3	三糖(DP3)	623.15	4	4	0.051
4	四糖(DP4)	785.15	4	4	0.051
5	五糖(DP5)	947.15	4	4	0.051
6	六糖(DP6)	1109.15	4	4	0.051
7	七糖(DP7)	1271.15	4	4	0.051

表3 掺假蜂蜜和天然蜂蜜中各糖分析物所占百分比
Table 3 Percentage of oligosaccharides with various degrees of polymerization in natural honey and adulterated honey

样品	项目	聚合度						
		DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
样品1 (天然蜂蜜)	保留时间/min	9.12	11.74	14.58	未出峰	未出峰	未出峰	未出峰
	峰面积	3.5×10^7	3.4×10^5	8.4×10^3	未出峰	未出峰	未出峰	未出峰
	百分比/%	98.99	0.99	0.02	-	-	-	-
样品2 (掺假蜂蜜)	保留时间/min	9.12	11.74	14.58	16.94	18.65	19.62	未出峰
	峰面积	2.4×10^7	2.5×10^5	2.3×10^5	1.1×10^4	6.1×10^3	4.0×10^3	未出峰
	百分比/%	90.04	9.00	0.87	0.04	0.02	0.01	-
样品3 (掺假蜂蜜)	保留时间/min	9.12	11.74	14.58	16.94	18.65	19.62	未出峰
	峰面积	2.6×10^7	2.5×10^5	2.7×10^5	1.2×10^4	6.0×10^3	4.0×10^3	未出峰
	百分比/%	89.99	9.00	0.93	0.04	0.02	0.01	-

注: 所占百分比为糖分析物峰面积归一法计算所得

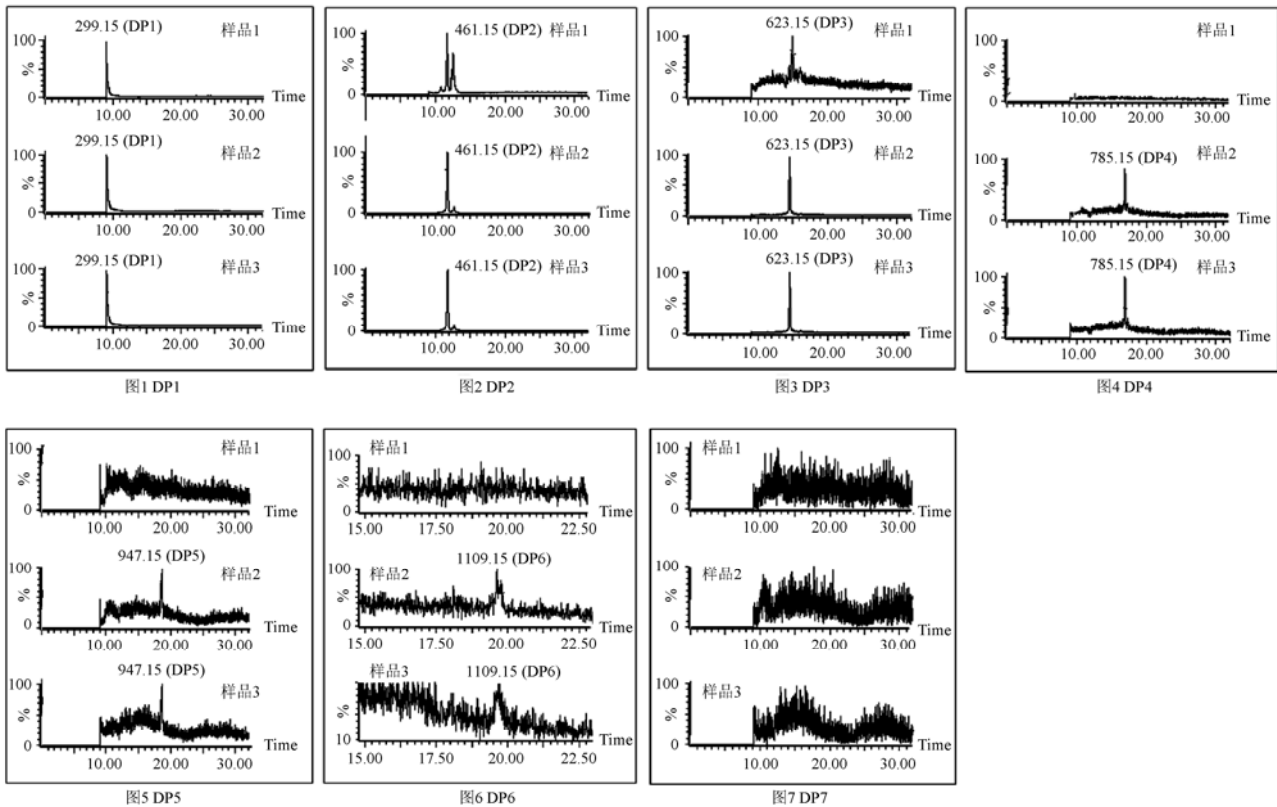


图2 天然蜂蜜和掺假蜂蜜的标记低聚糖质谱图

注: 样品1为天然蜂蜜样品(阴性样品); 样品2和样品3为糖浆掺假蜂蜜(阳性样品)

Fig. 2 Mass spectrums of natural honey and adulterated honey

Note: sample 1 is natural honey (negative sample); Sample 2 and 3 are adulterated honey (positive sample)

记。通过低聚糖的液相质谱指纹图特征可进行蜂蜜掺假鉴定。天然蜂蜜含有带还原端的单糖(DP1)、双糖(DP2)和少量三糖(DP3), 掺假蜂蜜除此以外还含有少量带还原端的四糖(DP4)、五糖(DP5)和六糖(DP6)。掺假(阳性)蜂蜜样品标记 DP2 和 DP3 所占百分比高于天然(阴性)蜂蜜样品。本研究采用的色谱条件能实现 DP1 到 DP4 的基本分离。采用此法对蜂蜜样品进行掺假判定可同时检测大批量蜂蜜样品, 而且判定结果与国标方法测试结果基本吻合。

参考文献

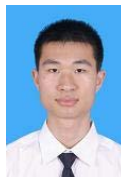
- [1] 胡方园, 杨方, 黄诚, 等. 蜂蜜掺假检测技术研究进展[J]. 轻工科技, 2014, 2: 3-5.
Hu FY, Yang F, Huang C, *et al.* Research progress of adulteration test for honey [J]. Light Ind Sci Technol, 2014, 2: 3-5.
- [2] 裴高璞, 史波林, 赵镭, 等. 蜂蜜质量市场动态及掺假检测方法现状分析[J]. 食品科学, 2013, 15: 329-336.
Pei GP, Shi BL, Zhao L, *et al.* Analysis of the current situation of market dynamics and quality detection of honey adulteration [J]. Food Sci, 2013, 15: 329-336.
- [3] 雷鸣. 六种单花种蜂蜜掺假情况的分析检测研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
Lei M. Study on six kinds of single flower honey adulteration detection and analysis [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.
- [4] 沈崇钰, 吴斌, 费晓庆, 等. 蜂蜜掺假鉴定技术进展[J]. 中国蜂业, 2011, Z7: 61-64.
Shen CY, Wu B, Fei XQ, *et al.* Progress of honey adulteration identification technology [J]. Apicult China, 2011, Z7: 61-64.
- [5] 隋丽敏. 检测蜂蜜中掺入外源植物糖浆的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
Sui LM. Study on the detection of honey syrup mixed with exogenous plant [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2011.
- [6] 赵立夫, 姜宇懋, 张清清, 等. 掺假蜂蜜识别技术的研究进展[J]. 经济动物学报, 2012, 2: 115-118.
Zhao LF, Jiang YM, Zhang QQ, *et al.* Research progress of honey adulteration identification technology [J]. J Econ Anim, 2012, 2: 115-118.
- [7] 雷鸣, 何晋浙, 孙培龙. 掺假蜂蜜检测技术的研究综述[J]. 食品科技, 2012, 7: 283-287.
Lei M, He JZ, Sun PL. Review of research on honey adulteration detection technology [J]. Food Sci Technol, 2012, 7: 283-287.
- [8] GB/T 21533-2008 蜂蜜中淀粉糖浆的测定 离子色谱法[S].

GB/T 21533-2008 Determination of starch syrup in honey by ion chromatography [S].

- [9] GB/T 18932.2-2002 蜂蜜中高果糖淀粉糖浆测定方法 薄层色谱法[S].
GB/T 18932.2-2002 Method for the determination of high fructose starch syrup in honey by TLC [S].
- [10] 章定生, 章琦. 蜂蜜掺假快速检测方法的试验研究[J]. 中国蜂业, 2010, 3: 38-39.
Zhang DS, Zhang Q. Experimental study on rapid detection of honey adulteration [J]. Apicult China, 2010, 3: 38-39.
- [11] 王文静. 洋槐蜂蜜 HPLC 指纹图谱的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
Wang WJ. Study on HPLC fingerprint of acacia honey [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [12] Ruhaak LR, Steenvoorden E, Koeleman CAM, *et al.* 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination [J]. Proteomics, 2010, 10(12): 2330-2336.
- [13] Dalpathado DS, Jiang H, Kater MA, *et al.* Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃ [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(6): 1130.
- [14] Shilova NV, Bovin NV. Fluorescent labels for analysis of mono- and oligosaccharides [J]. Russian J Bioorg Chem, 2003, 29(4): 339-355.
- [15] Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, *et al.* Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid [J]. Anal Biochem, 1995, 230(2): 229-238.
- [16] Unterrieser I, Mischnick P. Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry [J]. Carbohydr Res, 2011, 346(1): 68-75.
- [17] Bénét T, Austin S. On-line cleanup for 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides [J]. Anal Biochem, 2011, 414(1): 166-168.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



邱志超, 质量工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。
E-mail: 392479231@qq.com



官咏仪, 食品检验工程师, 主要研究方向为食品营养成分和添加剂检测。
E-mail: stupid625@qq.com