

方法开发报告 2017-APP-RLC-003

掺假蜂蜜中果葡糖浆分析 (LC-CAD)

检测项目	糖浆
样品基体	蜂蜜
仪器型号及配置	DGP-3400 WPS-3000RS Analytical TCC-3000RS Corona Veo RS
保护柱	无
色谱柱	Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 × 150 mm, 5 μm) (P/N F7630001, SN N1420016)
检测器条件	采集频率: 5Hz, 蒸发温度: 35 °C, Filter: 5 检测器阀切换条件: 进对照品时阀状态始终为 detect flow = on 进样品时, 由于蜂蜜中果糖和葡萄糖含量较高, 采用阀切换使这两个高浓度的糖不进入检测器检测, 条件如下: 0min, detect flow = on; 2min, detect flow = off; 9.4min, detect flow = on;
流动相	流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水 A: B = 65 : 35 流速: 1.2mL/min
柱温	30 °C
进样量	自动进样, 10μL

一、简介

蜂蜜作为一种天然保健食品, 一直深受消费者的青睐, 在药用方向它既是一味中药也可用作药用辅料, 具有悠久的历史。但一直以来蜂蜜品牌繁多, 市场鱼龙混杂, 掺假

手段层出不穷，近几年常用的蜂蜜掺假方式中，利用果葡糖浆掺假形式最为普遍。2015版药典中蜂蜜标准得到了大幅的提高，其中检查项下增加了寡糖项（薄层色谱法），5-羟甲基糠醛也由紫外可见分光光度法提高为高效液相色谱法，含量项下糖的分析由碱性酒石酸铜试液标定法提升为高效液相色谱法。对于5-羟甲基糠醛的测定在前两年的样品测试中已经涉及，这次的方法开发将药典中寡糖测定的薄层色谱法尝试采用高效液相色谱法来代替，取得了较好的效果。

蜂蜜中不含五糖(DP5)以上的寡糖，2015版药典检查项下对于寡糖要求如下：取麦芽五糖对照品，加30%乙醇制成每1ml含1mg的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（通则0512）试验，吸取蜂蜜供试品溶液与对照品溶液各3ml，分别点于同一高效硅胶G薄层板上，以正丙醇-水-三乙胺（60：30：0.7）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以苯胺-二苯胺-磷酸的混合溶液（取二苯胺1g，苯胺1ml，磷酸5ml，加丙醇至50ml，混匀），加热至斑点显色清晰，在日光下检视。供试品色谱中，在与对照品相应位置的下方，应不得显斑点。而蜂蜜掺假加入的果葡糖浆等含五糖(DP5)以上的寡糖，所以将五糖(DP5)以上寡糖的存在作为蜂蜜中果葡糖浆的判定指标，本方法采用氨基柱分析不同聚合度的麦芽糖，电雾式检测器（CAD）进行测定取得了较好的效果。

果葡糖浆是由植物淀粉水解而制得，如玉米或红薯淀粉，成本低廉，加工简单。

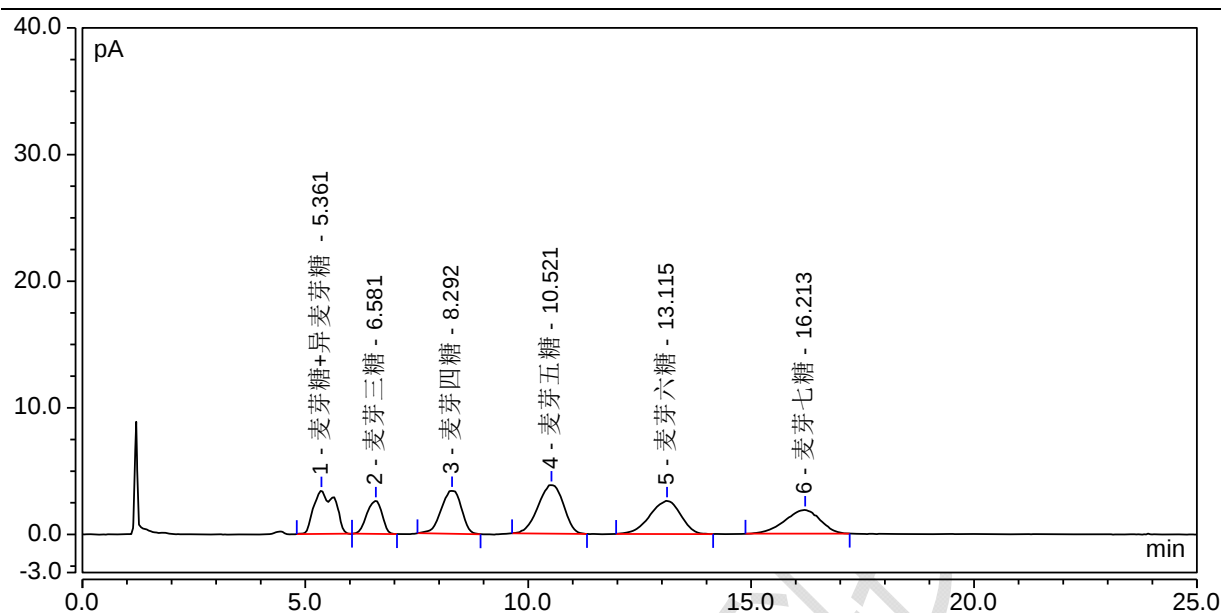
一、对照品与样品前处理

对照品溶液：精密称取麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖，水溶解制备成含麦芽糖、异麦芽糖 20.0mg/L，麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖 40.0mg/L 的对照品溶液，直接进液相色谱仪进行测定。

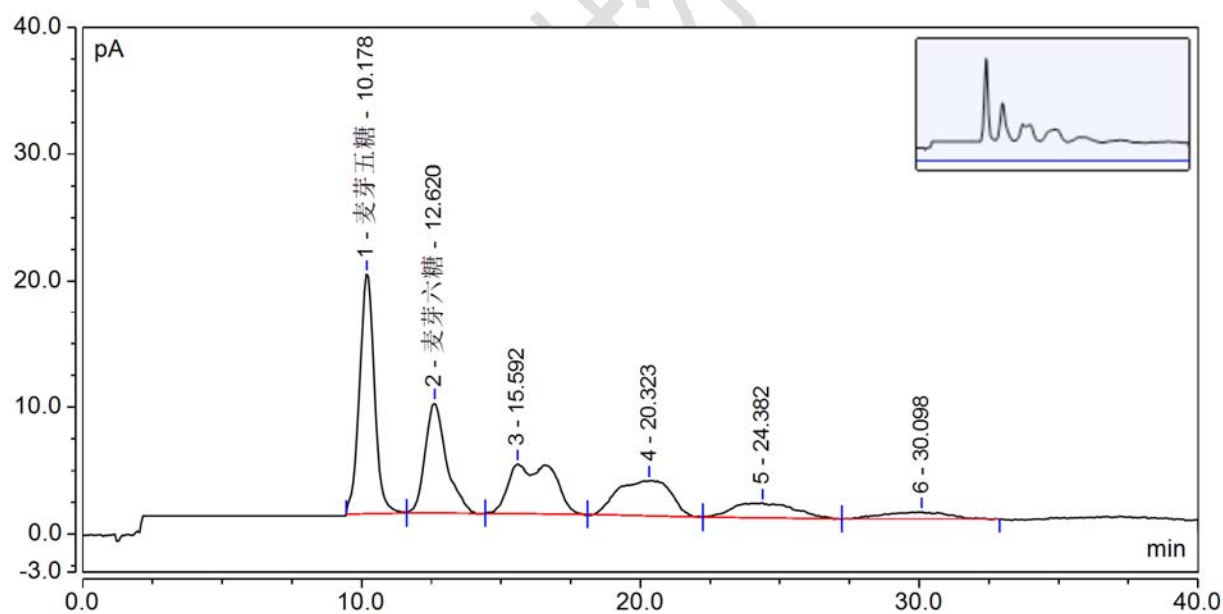
供试品溶液制备：精密称取样品 1.00g，用 10mL 水溶解，0.22μm 滤膜滤过，用液相色谱仪进行测定。

二、测试谱图

1、对照品溶液测定谱图

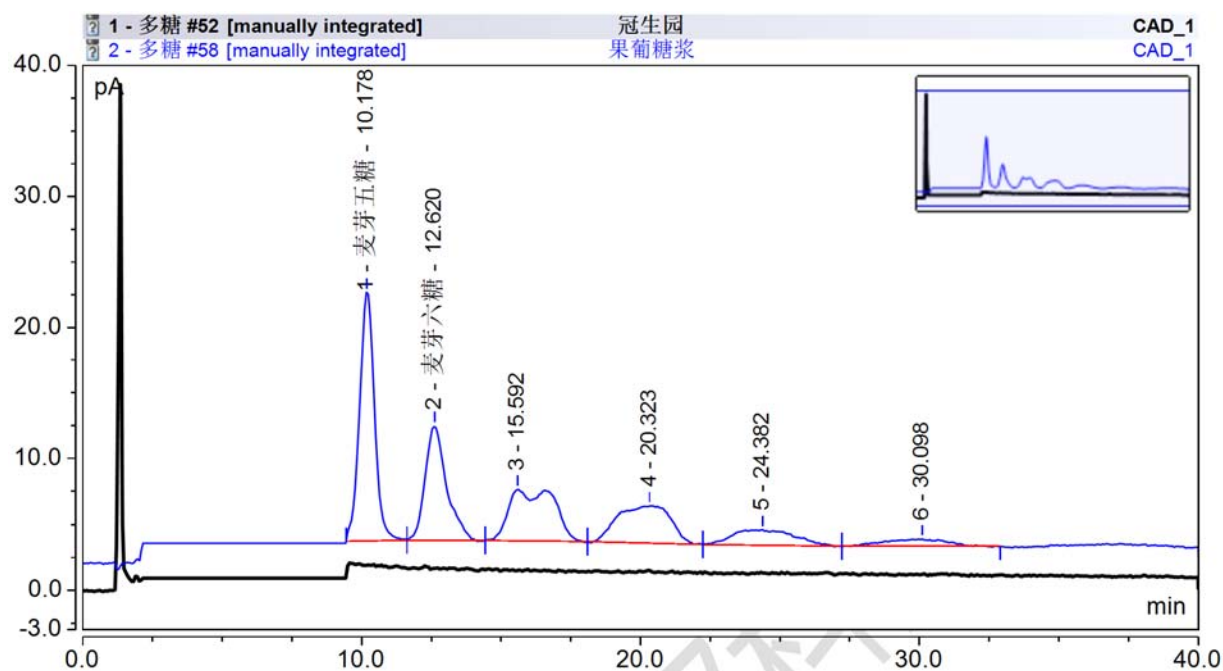


2、果葡糖浆测定谱图

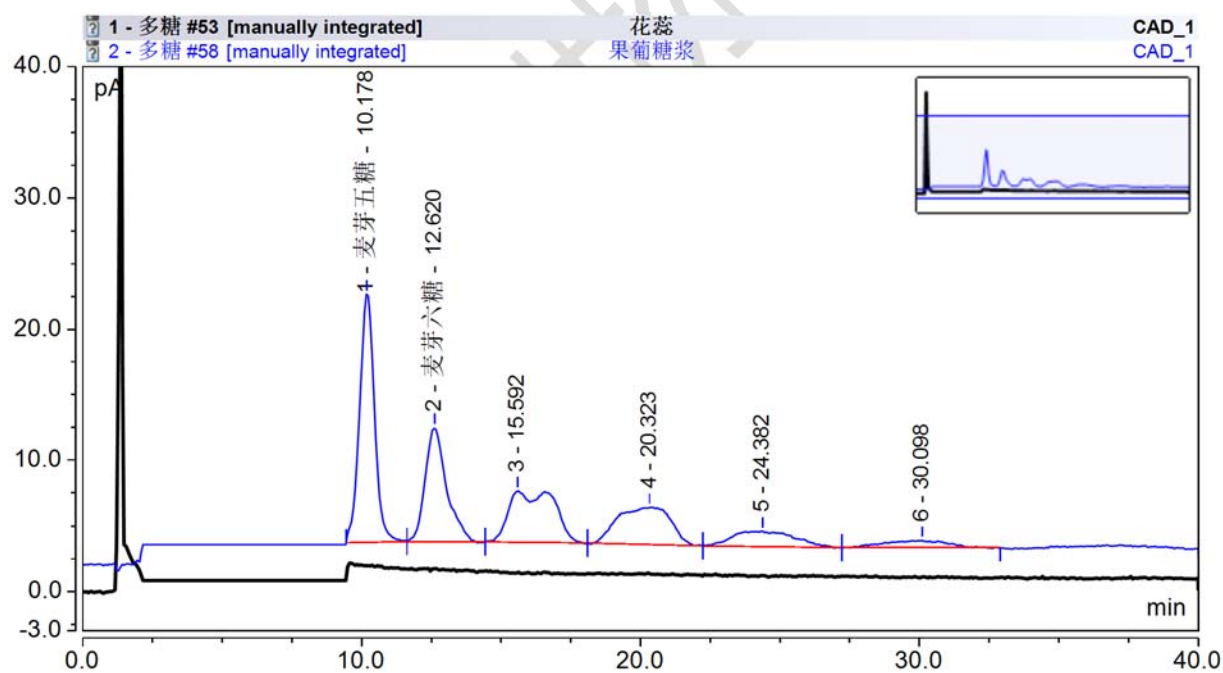


3、蜂蜜样品测定谱图（与果葡糖浆分析谱图叠加）

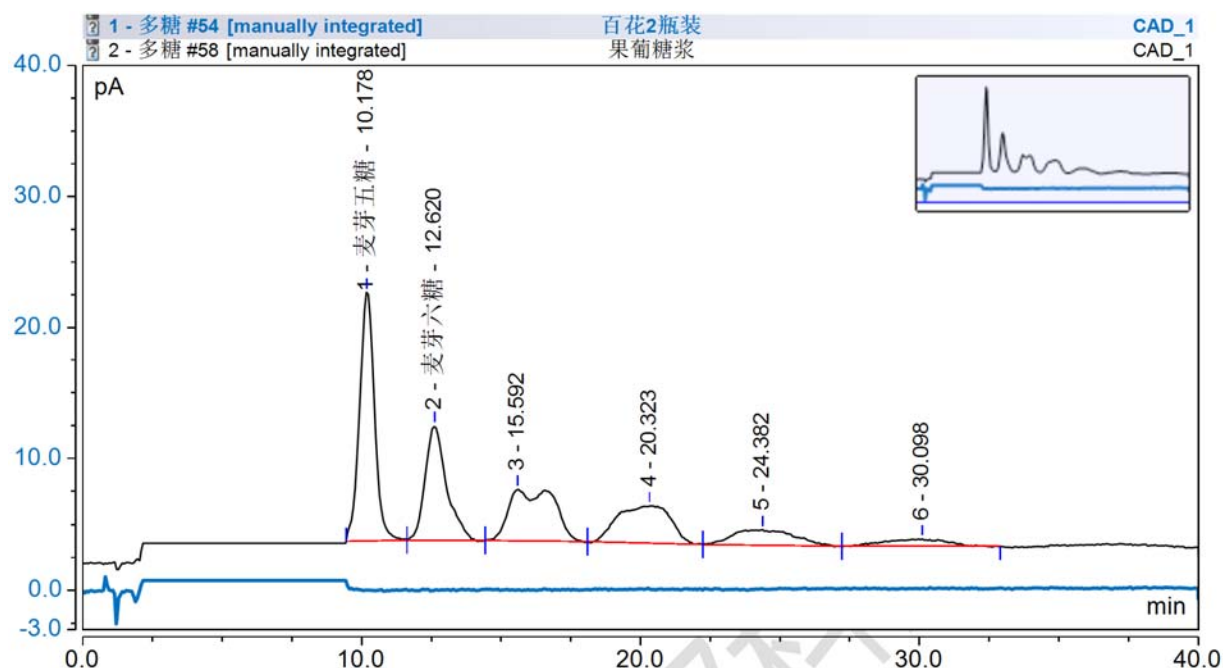
(1) 冠生园蜂蜜



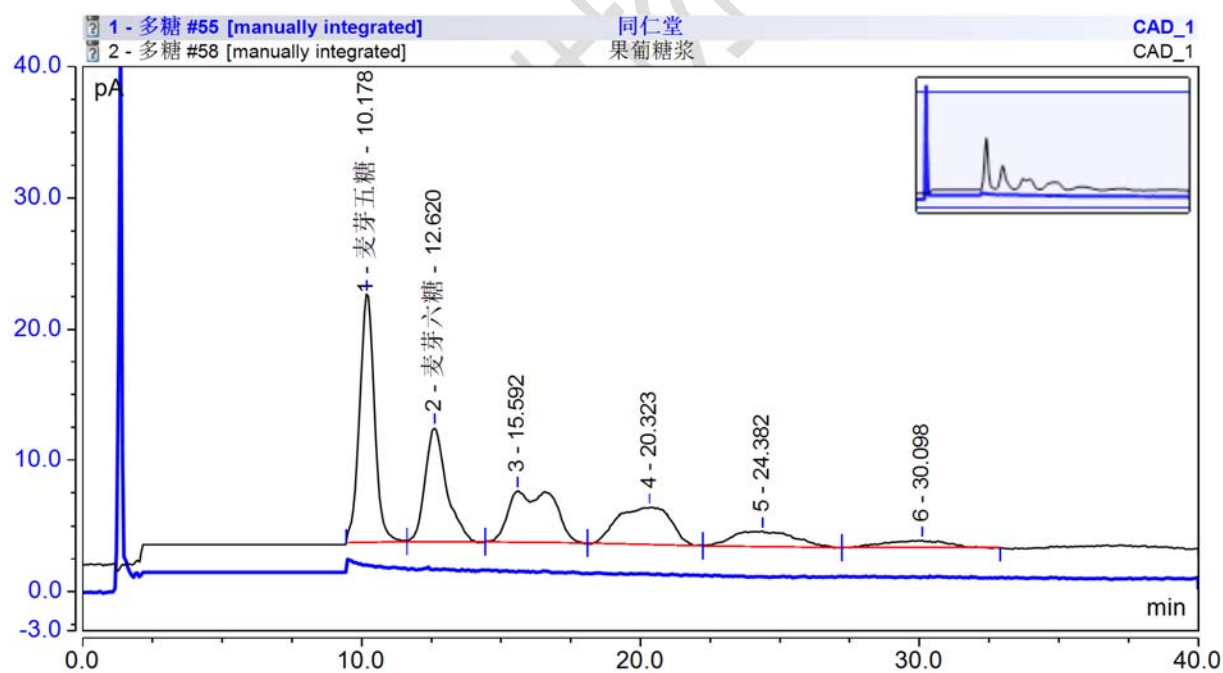
(2) 花蕊牌蜂蜜



(3) 百花牌蜂蜜

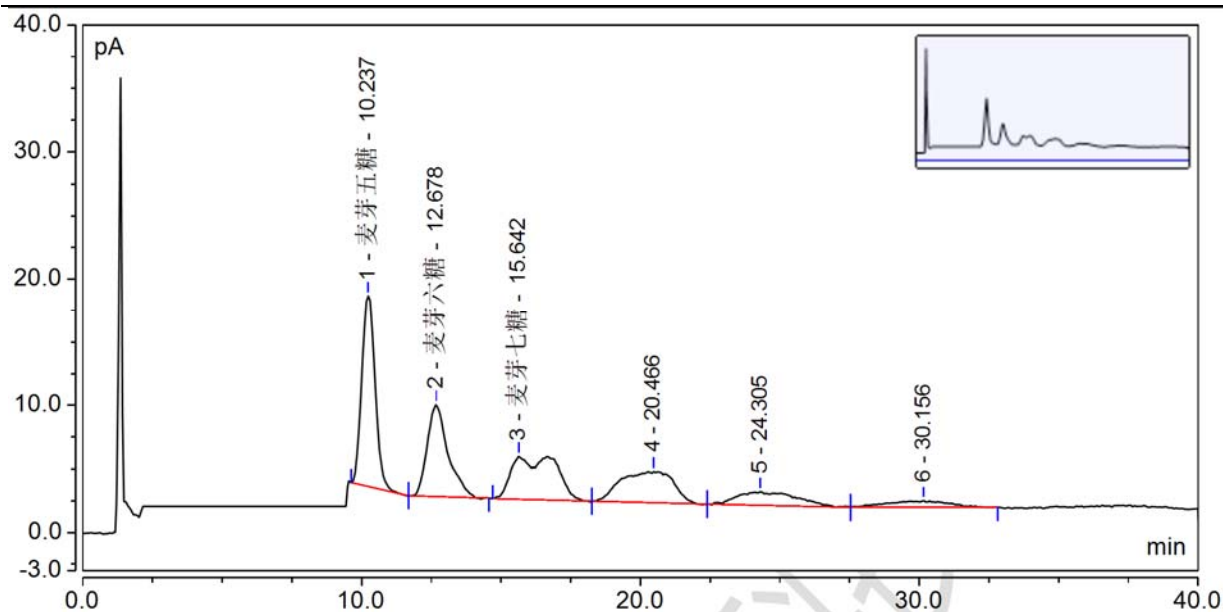


(4) 同仁堂蜂蜜

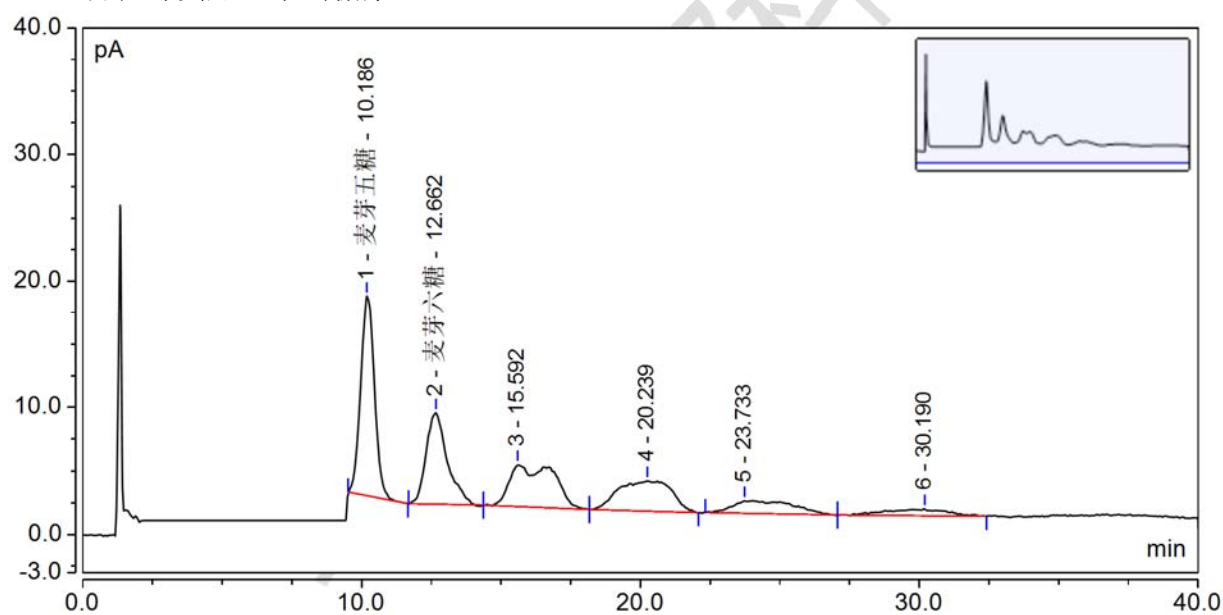


4、蜂蜜样品加入果葡糖浆测定谱图

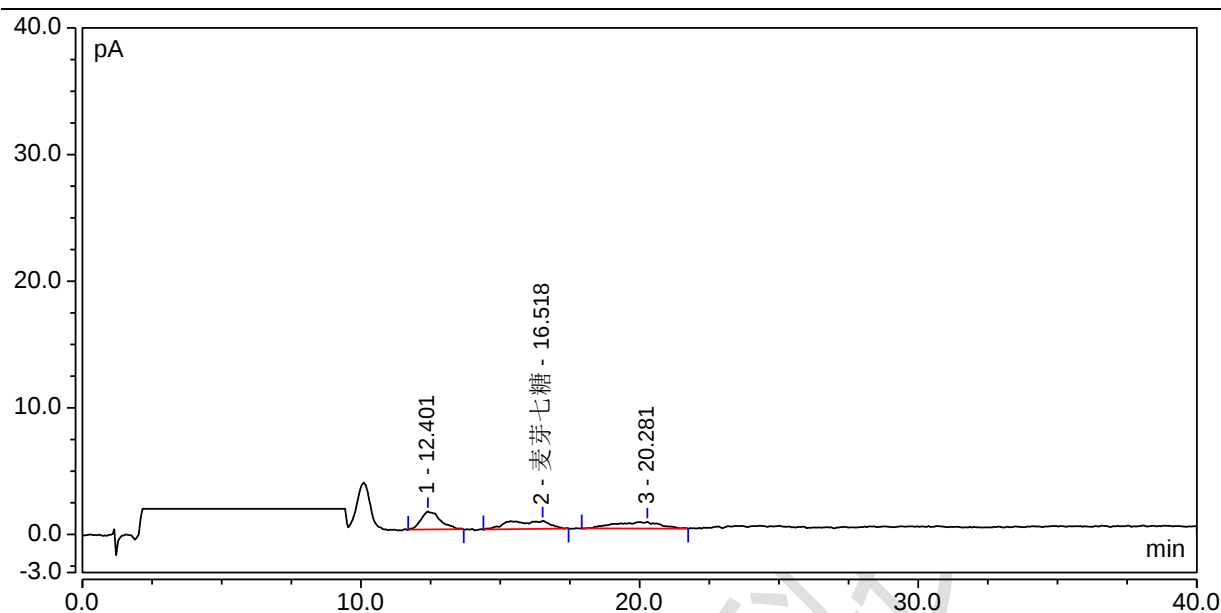
(1) 同仁堂蜂蜜加入果葡糖浆



(2) 百花蜂蜜加入果葡糖浆



5、方法灵敏度考察 (1%果葡糖浆测定谱图)



三、测定结果

1、配制不同浓度的麦芽糖混合对照品，测定其标准曲线：

	麦芽糖+异麦芽糖 (mg/L)	麦芽三糖 (mg/L)	麦芽四糖 (mg/L)	麦芽五糖 (mg/L)	麦芽六糖 (mg/L)	麦芽七糖 (mg/L)
1	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
2	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
3	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
4	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
5	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0
标准曲线	$y = 0.369x + 0.015$	$y = 0.201x + 0.028$	$y = 0.359x - 0.011$	$y = 0.497x + 0.022$	$y = 0.392x + 0.041$	$y = 0.329x + 0.035$
相关系数	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999

- 2、从超市购买的这几种蜂蜜都不含有果葡糖浆。本方法灵敏度较高 1%果葡糖浆具有明显检出，三个色谱峰信噪比分别为：出峰时间 12.401min，S/N = 22.2，出峰时间 16.518min，S/N = 9.7，出峰时间 20.281min，S/N = 8.3。

四、讨论

本方法将药典中寡糖测定的薄层色谱法提升为高效液相色谱，灵敏度更高，测定结果

更准确。实验采用通用型检测器 Corona Veo RS 进行测定，使用其阀切换功能将高浓度的单糖切换到废液，只测定聚合度大于等于 5 的寡糖，避免了高浓度的糖污染检测器。对于不带阀的常规 Corona Veo 检测器可以外置一个阀来实现该功能。CAD 操作简单，灵敏度高，稳定性好，适用于单糖和寡糖的检测。

附录：

本实验所用蜂蜜：同仁堂荆条蜂蜜，冠生园紫云英蜂蜜，百花牌蜂蜜，花蕊牌洋槐蜂蜜；

果葡糖浆：创实牌调味果葡糖浆