

示差折光-液相色谱法测定蜂蜜中 β -呋喃果糖苷酶残留量

王 艳* 吴 斌 张晓燕 沈崇钰 张 睿 李丽花 费晓庆 赵增运

(江苏出入境检验检疫局食品实验室, 南京 210001)

摘 要 基于 β -呋喃果糖苷酶与棉子糖在柠檬酸-氢氧化钠缓冲介质 (pH 4.50) 中 50 °C 下反应 16 h 后的酶解产物蜜二糖含量的变化, 建立了高效液相色谱示差折光检测 (HPLC-RID) 技术测定蜂蜜中 β -呋喃果糖苷酶残留量的新方法。以 Agilent Carbohydrate 柱为分离柱, 乙腈-水 (78: 22, V/V) 为流动相, 流速为 1.4 mL/min, 检测器为示差折光检测器, 柱温和检测器温度均为 35 °C。结果表明, 蜂蜜样品经过聚丙烯酰胺凝胶柱分离后, 样品峰形得到简化, 灵敏度提高了 1.3 倍; 方法的线性范围为 10 ~ 200 U/kg; 测出限为 10 U/kg; 回收率为 81.3% ~ 112.4%; 相对标准偏差为 3.7% ~ 9.7% ($n=6$)。当蜂蜜样品中 β -呋喃果糖苷酶含量 > 20 U/kg 时, 判定为阳性样品, 即掺假蜂蜜。

关键词 β -呋喃果糖苷酶; 蜂蜜; 示差折光; 液相色谱; 掺假

1 引 言

天然纯正蜂蜜因其具有较高的营养价值^[1-2], 受到众多消费者的青睐。但一些不法商贩, 为了谋取利润, 在蜂蜜中加入糖浆、白砂糖、蜂蜜香精等物质, 不仅影响了蜂蜜原有的营养价值, 也损害了我国蜂产品在国内外市场上的信誉。

目前, 测定蜂蜜掺假的方法主要有 C-稳定同位素分析法^[3-5]、高效液相色谱法^[6]、薄层色谱法 (TLC 法)^[7] 和红外光谱法^[8] 等。C-稳定同位素分析法主要包括元素分析同位素比值质谱法 (EA-IRMS) 和液相同位素比值质谱法 (LC-IRMS)^[9-12]。EA-IRMS 法只能测定掺杂 C4 植物糖含量较高的蜂蜜样品, 对于鉴别掺杂少量 C3 植物糖的蜂蜜样品存在缺陷。针对这一问题, 费晓庆等^[13] 提出了液相色谱/元素分析-同位素比值质谱联用技术, 进一步提高了鉴别蜂蜜掺假的能力。TLC 法测定掺入甜菜糖浆的蜂蜜有局限性。

在加工掺有甜菜糖浆的蜂蜜过程中, 人为添加了 β -呋喃果糖苷酶, 该酶非蜂蜜本身所具有, 用于酶解甜菜糖浆, 可以催化水解其 β -D-果糖苷键, 将其转化为一分子葡萄糖和一分子果糖。借助以上方法无法鉴定真蜂蜜与这种掺有甜菜糖浆的蜂蜜的成分区别。针对这种情况, 本研究建立了一种检测蜂蜜中 β -呋喃果糖苷酶方法, 为蜂蜜打假鉴别提供了一种新的监控手段, 具有重要的现实意义。

本方法对蜂蜜样品进行了净化, 去除了样品中的果糖, 促进反应的正向进行, 灵敏度提高了 1.3 倍。由于本方法根据酶解产物蜜二糖的含量进行定量分析, 而非果糖和葡萄糖的含量, 因此, 大大提高了方法的准确性。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂及样品

1200 高效液相色谱仪, 配示差折光检测器 (Agilent 公司); Carbohydrate 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Agilent 公司); 恒温水浴振荡器 (太仓实验仪器厂); pH 计 (Mettler-Toledo 公司); 涡旋混合器 (上海医科大学仪器厂); 0.45 μ m 水相滤膜和 0.22 μ m 有机相滤膜 (上海百赛生物科技有限公司)。

Bio-Gel® P-2 聚丙烯酰胺凝胶 (0.45 ~ 0.16 mm 粒径, BIO-RAD Laboratories 公司); NaOH、一水合柠檬酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 五水棉子糖 (纯度为 98%, 北京中棉紫光生物科技有限公

2012-02-10 收稿; 2012-04-18 接受

* E-mail: wangyan6064@126.com

司);蜜二糖(纯度为 99.8%) β -呋喃果糖苷酶(CAS 号:9001-57-4 332.8 U/mg) 购于美国 Sigma 公司;乙腈(色谱纯 德国 Merck 公司)。实验用水均为 18.2 M Ω 超纯水。

天然蜂蜜样品:油菜蜜、洋槐蜜、荆条蜜、椴树蜜;实际蜂蜜样品:来自日常检测样(由国内不同地区的蜂农或者蜂蜜供应商提供)。

2.2 溶液配制

20% 棉子糖溶液:准确称取 20.0 g 五水棉子糖,用超纯水溶解并定容至 100 mL,摇匀备用(临用现配)。 β -呋喃果糖苷酶储备液 1.0 g/L(333 U/mL):准确称取 β -呋喃果糖苷酶标准品 0.01 g(精确到 0.0001 g),用水溶解并定容至 10 mL,摇匀备用。此储备液稀释 300 倍后作为工作溶液使用,于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。柠檬酸缓冲溶液:称取 21.01 g 柠檬酸于 1000 mL 烧杯中,加 800 mL 水溶解后,用 1 mol/L NaOH 溶液调节至 pH 4.50,以水定容至 1000 mL。

2.3 填料处理和装柱

填料处理:称取适量填料于烧杯中,加水溶解,轻轻晃动烧杯(勿用玻棒等搅拌)使其溶解,室温下静置过夜,使其充分溶胀。用倾倒法除去表面悬浮的小颗粒,再加水放置 4 h 后,用吸管吸去上层悬浮液,此步骤重复 4 次。最后将溶胀后的凝胶采用减压抽气的方式除去凝胶悬浮液中的气泡,准备装柱。倒去悬浮物,所得填料待用。

装柱:将溶胀脱气后的聚丙烯酰胺凝胶装入 1.5 cm $\times$ 15 cm 空柱管中,高度为 10 cm,上端保持 1.0 cm 以上的水层,避免干涸。

2.4 色谱条件

Agilent Carbohydrate 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-水(78:22,V/V),流速 1.4 mL/min;柱温和检测器温度均为 35 $^{\circ}\text{C}$ 检测器为示差折光检测器。

3 结果与讨论

称取(1.00 $\pm$ 0.02) g 蜂蜜样品,加 4.0 mL 水涡旋溶解后,加 3.0 mL 柠檬酸缓冲液及 2.0 mL 棉子糖溶液,用水定容至 10 mL;于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡器中反应 16 h,将此溶液过 0.22 μm 有机相滤膜,在 2.4 节的色谱条件下进行检测,色谱图见图 1。出峰顺序分别为果糖、葡萄糖、蜜二糖和棉子糖。蜜二糖为 β -呋喃果糖苷酶与底物棉子糖的反应产物,非蜂蜜自身所有。因此,选用蜜二糖的含量进行定量分析可保证数据的准确性。从图 1 可见,蜜二糖的峰面积响应较小。这是由于蜂蜜本身含有大量果糖,抑制反应向正方向进行。另外,产物蜜二糖附近有杂峰干扰,不利于系统积分,因此应进一步纯化处理样品。

3.1 样品净化方法的优化

称取(2.00 $\pm$ 0.05) g 蜂蜜样品,加水涡旋溶解后定容至 10 mL,过 0.45 μm 水相滤膜,滤液收集于 10 mL 试管中。将装填好的聚丙烯酰胺凝胶层析柱中的水放尽,待下端无水珠滴下时,将 5.0 mL 样品滤液沿柱壁缓慢加入层析柱中;恰好流至凝胶上方无液体时,加入 3.0 mL 超纯水洗脱;待凝胶柱上方无液体时,加入 5.0 mL 超纯水洗脱,同时收集流出液于 50 mL 具塞塑料离心管中。向接收液中加入 2.0 mL 棉子糖溶液,用柠檬酸缓冲液定容至 10 mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中反应 16 h 后过 0.22 μm 的有机相滤膜,进行液相色谱检测(图 1b)。由图 1b 可见,经过净化后,既可以除去样品中的果糖和葡萄糖,又可避免 β -呋喃果糖苷酶的流失;样品峰简单明了,蜜二糖信号得到较好响应,灵敏度提高了约 1.3 倍。

3.2 缓冲溶液及反应酸度的选择

比较了 pH = 5.0 的柠檬酸缓冲液、醋酸铵-醋酸缓冲液和 KH_2PO_4 -磷酸缓冲液缓冲体系发现,体系在柠檬酸缓冲介质中响应信号最大。 β -呋喃果糖苷酶在 pH 4.0~6.5 之间有较好的稳定性^[14],对 pH 值分别为 4.0,4.5,5.0 和 5.5 柠檬酸缓冲液进行考察发现, pH = 4.5 时反应产物峰面积最大。因此选定 pH = 4.50 作为最佳反应酸度。

3.3 反应温度和时间的选择

对反应温度进行考察发现,蜜二糖峰面积随温度变化显著。当温度在 45~50 $^{\circ}\text{C}$ 之间时,蜜二糖峰面积迅速增大;当温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,响应信号最大;当温度高于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,峰面积急剧下降;当温度为 70 $^{\circ}\text{C}$

时,酶基本失去活性。本研究选择 50 ℃ 作为最佳反应温度。

在 50 ℃ 下反应,每隔 4 h 取点,检测 β -呋喃果糖苷酶浓度在 10 ~ 200 U/kg 范围内产物蜜二糖的含量。结果表明,蜜二糖的峰面积随反应时间的延长而增加。当反应时间 ≤ 20 h 时,蜜二糖的浓度与酶浓度呈线性增加关系,相关系数大于 0.99。当反应时间 > 20 h 时,高浓度点线性较差,相关系数 < 0.99 。这是由于随着反应时间的延长,产物果糖的含量逐渐增加,抑制了反应向正反应方向进行,导致酶解速率降低。考虑到仪器的灵敏度、方法的检测限因素,本研究中反应时间选择为 16 h。

3.4 方法的线性范围、精密度和回收率

3.4.1 线性范围和检出限 以不同浓度的蜜二

糖对峰面积作图,浓度在 10 ~ 200 U/kg 范围内,线性关系良好,相关系数 $R^2 > 0.99$ 。采用标准加入法进行实际测定得到的检出限为 10 U/kg。

3.4.2 精密度和回收率 分别以不含 β -呋喃果糖苷酶的阴性蜂蜜样品(荆条蜜、洋槐蜜、油菜蜜和椴树蜜)为基质,进行添加回收实验,添加水平分别为 20, 50 和 100 U/kg,回收率在 81.3% ~ 112.4% 之间,方法的相对标准偏差为 3.7% ~ 9.7% (表 1)。

表 1 蜂蜜中 β -呋喃果糖苷酶的回收率和精密度实验

Table 1 Precision and recovery for determination of β -fructofuranosidase in four categories of honey

蜜种 Honey	添加水平 Added (U/kg)	测定值 Found (U/kg)						平均值 Average (U/kg)	相对标准偏差 RSD (%)	回收率 Recovery (%)
荆条蜜 Vitex honey	20	20.9	21.5	18.6	22.2	21.7	18.7	20.6	6.8	103.0
	50	53.6	57.7	52.1	55.8	50.5	56.5	54.4	5.3	108.7
	100	103.3	102.1	107.2	111.2	111.0	104.7	106.6	4.0	106.6
洋槐蜜 Acacia honey	20	14.7	17.5	15.6	17.9	15.3	16.5	16.3	8.7	81.3
	50	43.4	39.6	45.1	46.9	47.6	47.0	44.9	7.1	89.9
	100	99.8	97.4	92.4	99.1	102.3	102.9	99.0	3.7	99.0
油菜蜜 Rape honey	20	20.9	22.7	24.4	23.7	21.5	18.8	22.0	6.6	110.0
	50	49.7	44.8	52.6	58.2	52.1	51.6	51.5	9.4	103.0
	100	113.3	118.2	111.9	116.0	107.7	100.5	111.3	5.7	111.3
椴树蜜 Loincloth honey	20	21.2	24.6	20.7	21.9	22.5	18.4	21.6	9.5	107.8
	50	48.7	57.8	58	55.4	6.2	45.6	53.6	9.7	107.2
	100	108.4	105.3	111.6	118.4	110.3	120.4	112.4	5.2	112.4

经上海出入境检验检疫局、福建出入境检验检疫局、深圳出入境检验检疫局、南京大学现代分析测试中心、江苏省疾病预防控制中心 5 家单位验证,方法的实验室间精密度在 4.8% ~ 13.8% 之间(表 2)。

3.5 方法的应用

考虑到仪器基线波动造成的误差以及国内进出口蜂蜜交易市场的现状,最终判定当蜂蜜中 β -呋喃果糖苷酶含量 > 20 U/kg 时为阳性样品,即掺假蜂蜜。但若在蜂蜜生产工艺中对酶进行灭活,本方法具有一定局限性,只能测得残留的酶含量。

将本方法用于洋槐蜜、荆条蜜、椴树蜜、油菜蜜、枣花蜜、野桂花蜜、枇杷蜜、薰衣草蜜、枸杞蜜、野藿香蜜、山花蜜、苕条蜜和黄柏蜜共 13 种蜂蜜的检测,样品数量为 3924 个,阳性检出率为 15.8%。

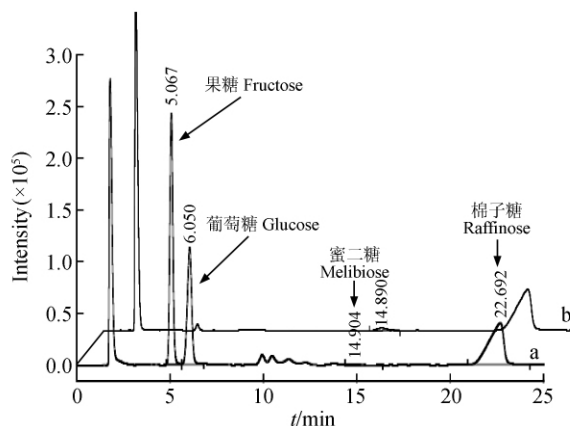


图 1 未过柱处理(a)和过柱处理(b)的蜂蜜样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of honey sample before (a) and after (b) treated by gel column

表 2 实验室间 3 个水平的回收率和精密度实验
Table 2 Precision and recovery among different labs

蜜种 Honey	添加水平 Added (U/kg)	上海出入境 检验检疫局 Shanghai CIQ (U/kg)		福建出入境 检验检疫局 Fujian CIQ (U/kg)		深圳出入境 检验检疫局 Shenzhen CIQ (U/kg)		南京大学分 析测试中心 Modern analysis center of Nanjing University (U/kg)		江苏省 疾病预防 控制中心 Jiangsu CDC (U/kg)		平均值 Average (U/kg)	平均回 收率 Average (%)	相对标准 偏差 RSD (%)
荆条蜜 Vitex honey	20	20.8	21.7	16.8	17.6	20.2	22.5	18.7	17.3	18.4	16.5	19.1	95.3	11.1
	50	56.3	53.9	41.8	43.7	57.2	55.4	45.6	47.4	50.6	53.5	50.5	101.1	11.0
	100	101.1	106.6	100.4	92.1	115.8	117.6	85.2	83.3	94.6	90.2	98.7	98.7	12.0
洋槐蜜 Acacia honey	20	16.8	18.2	15.5	16.3	19.6	20.7	15.4	17.5	14.2	15.6	17.0	84.9	12.0
	50	48.8	46.6	41.3	40.4	51.0	53.4	45.7	42.5	34.8	36.6	44.1	88.2	13.8
	100	95.6	100.1	86.7	83.3	93.4	99.0	87.4	90.1	80.2	85.8	90.2	90.2	7.4
油菜蜜 Rape honey	20	24.5	26.7	20.4	18.2	22.9	25.1	19.4	21.5	24.0	22.7	22.5	112.7	11.9
	50	51.2	53.0	45.6	47.3	56.3	54.2	45.3	48.4	54.6	52.2	50.8	101.6	7.7
	100	110.7	115.8	98.4	95.3	126.6	129.2	122.6	124.8	107.1	109.5	114.0	114.0	10.4
椴树蜜 Loincloth honey	20	23.9	24.8	20.6	19.7	24.0	22.4	25.7	24.8	23.5	25.4	23.5	117.4	8.6
	50	58.4	56.3	61.6	59.1	62.0	58.7	62.5	64.7	57.3	55.2	59.6	119.2	5.1
	100	127.7	125.3	117.2	118.7	129.1	126.5	130.3	129.9	115.2	117.6	123.8	123.8	4.8

CIQ: Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People’s Republic of China; CDC: Center for Disease Control and Prevention.

References

1 TU Zhen-Hua , ZHU Da-Zhou , JI Bao-Ping , MENG Chao-Ying , WANG Lin-Ke , QING Zhao-Kun. *Spectroscopy and Spectral Analysis* , **2010** , 30(11) : 2971 – 2975
屠振华 , 朱大洲 , 籍保平 , 孟超英 , 王林舸 , 庆兆坤. 光谱学与光谱分析 , **2010** , 30(11) : 2971 – 2975

2 YI Song-Qiang. *Research on β -glucosidase (BGL) in Honey* , Paper of Master Degree of Zhejiang University. **2011**
易松强. 蜂蜜中 β -葡萄糖苷酶的研究 , 浙江大学硕士学位论文 , **2011**

3 AOAC Official Method 998. 12 , *C-4 Plant sugars in Honey Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method* Fist Action 1998 , AOAC standard

4 AOAC Official Method 991. 41 , *C-4 Plant Sugars in Honey Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method* Fist Action 1991 Final Action **1996** , AOAC Standard

5 GB/T 18932. 1-2002. *Method for the Determination of C-4 Plant Sugars in Honey-Stable Carbon Isotope Ratio Method*. National Standards of the People’s Republic of China

6 GB/T 18932. 22-2003 , *Method for the Determination of Fructose , Glucose , Sucrose , Maltose Contents in Honey—Liquid Chromatography Refractive Index Detection Method* , National Standards of the People’s Republic of China
GB/T 18932. 22-2003 , 蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测定方法 液相色谱示差折光检测法 , 中华人民共和国国家标准

7 GB/T 18932. 2-2002 , *Method for the Determination of High Fructose Starch Syrup in Honey-Thin-Layer Chromatographic Method* , National Standards of the People’s Republic of China.
GB/T 18932. 2-2002 , 蜂蜜中高果淀粉糖浆测定方法 薄层色谱法 , 中华人民共和国国家标准

8 Irudayaraj J , Xu F , Tewar J. *Journal of Food Science* , **2003** , 68(6) : 2040 – 2045

9 Krummen M , Hilkert A W , Juchelka D , Duhr A , Schlüter H J , Pesch R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , **2004** , 18(19) : 2260 – 2266

10 Cabañero Ana I , Recio Jose L , Rupérez M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , **2006** , 54(26) : 9719 – 9727

11 Elflein L , Raezke K P. *Apidologie* , **2008** , 39(5) : 574 – 587

12 Boschker H T S , Moerdijk-Poortvliet T C W , van Breugel P , Houtekamer M , Middelburg J. *J. Rapid Communications in Mass Spectrom* , **2008** , 22(23) : 3902 – 3908

