

# 高效液相色谱法测定蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖 麦芽糖、乳糖的含量

张佳佳, 王惠玉

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 250104)

**摘要:** 本文使用 Wooking K2025 高效液相色谱仪测定蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的含量。色谱条件: 氨基色谱柱 (4.6×250mm, 5 $\mu$ m), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}$ C, 进样量为 20 $\mu$ L, 检测器为示差折光检测器。实验结果: 用 Wooking K2025 测定蜂蜜中糖的含量, 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖之间的分离度均大于 1.60; 重复性测试中, 糖混合标准溶液连续进样 7 针, 各糖保留时间的 RSD 为 0.036%~0.065%, 峰面积的 RSD 为 0.439%~0.920%; 灵敏度测试中, 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的仪器检出限范围是 2.094 $\mu$ g/mL~8.299 $\mu$ g/mL; 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的仪器定量限范围是 6.980 $\mu$ g/mL~27.663 $\mu$ g/mL; 在测定浓度范围内, 五种糖均具有良好的线性关系, 确定系数  $R^2$  均大于 0.999。因此, Wooking K2025 满足《GB/T 5009.8-2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定 (第一法)》中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖含量测定的需求。

**关键词:** 蜂蜜; 果糖; 葡萄糖; 蔗糖; 麦芽糖; 乳糖; 含量

葡萄糖是活细胞的主要的能量来源和新陈代谢中间产物, 是生物的主要供能物质。在自然界, 植物可以通过光合作用产生葡萄糖, 在医疗领域也有着广泛的应用。

果糖也是一种单糖, 作为葡萄糖的同分异构体, 以游离的状态存在于水果的浆汁中, 果糖还能够与葡萄糖相结合生成蔗糖。纯净的果糖是一种无色的晶体, 但是它不易结晶, 通常为黏稠状液体, 易溶于水、乙醇和乙醚。

乳糖仅仅存在于哺乳动物的乳汁中, 它可以分解为葡萄糖和半乳糖, 半乳糖会促进幼儿智力发育。乳糖的甜度约为蔗糖的六分之一, 成年动物包括多数人体内的乳糖酶的活性大大降低。

麦芽糖是糖水化合物的一种, 用来当作营养剂, 因为是由含淀粉酶的麦芽作用于淀粉制出来的, 它属于双糖类。

蔗糖, 是食糖的主要成分, 是双糖的一种, 由一分子葡萄糖的半缩醛羟基与一分子果糖的半缩醛羟基彼此缩合脱水而成。

蜂蜜中主要成分是糖类,其中以单糖如葡萄糖和果糖为主,还有双糖如蔗糖和麦芽糖以及含量很少的多糖如糊精、松三糖等。葡萄糖、果糖这些糖类都具有还原性,它们在一定条件下容易被氧化,所以测定蜂蜜中还原糖含量可以了解蜂蜜的品质状况。

## 1 试剂与材料

水:符合 GB/T6682 的一级水;

乙腈:色谱纯;

果糖: CAS 号为: 57-48-7, 纯度为 99.9%;

葡萄糖: CAS 号为: 50-99-7, 纯度为 98.7%;

蔗糖: CAS 号为: 57-50-1, 纯度为 99.7%;

麦芽糖: CAS 号为: 69-79-4, 纯度为 99.1%;

乳糖: CAS 号为: 63-42-3, 纯度为 99.2%;

糖混合标准储备液: 分别称取适量的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖标准品于同一容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,配制成果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖浓度分别为 9.64mg/mL、9.24mg/mL、10.11mg/mL、8.69mg/mL、9.76mg/mL 的混合标准储备液;

糖混合标准工作液: 将上述糖混合标准储备液用水稀释并定量配制成混合标准工作液,其中果糖系列浓度为 385 $\mu$ g/mL、578 $\mu$ g/mL、770 $\mu$ g/mL、963 $\mu$ g/mL、1348 $\mu$ g/mL、1733 $\mu$ g/mL 和 1926 $\mu$ g/mL;葡萄糖系列浓度为 365 $\mu$ g/mL、547 $\mu$ g/mL、730 $\mu$ g/mL、912 $\mu$ g/mL、1277 $\mu$ g/mL、1642 $\mu$ g/mL 和 1824 $\mu$ g/mL;蔗糖系列浓度为 403 $\mu$ g/mL、605 $\mu$ g/mL、806 $\mu$ g/mL、1008 $\mu$ g/mL、1411 $\mu$ g/mL、1814 $\mu$ g/mL 和 2016 $\mu$ g/mL;麦芽糖系列浓度为 344 $\mu$ g/mL、517 $\mu$ g/mL、689 $\mu$ g/mL、861 $\mu$ g/mL、1206 $\mu$ g/mL、1550 $\mu$ g/mL 和 1722 $\mu$ g/mL;乳糖系列浓度为 387 $\mu$ g/mL、581 $\mu$ g/mL、775 $\mu$ g/mL、968 $\mu$ g/mL、1355 $\mu$ g/mL、1743 $\mu$ g/mL 和 1936 $\mu$ g/mL;

微孔滤膜: 0.22 $\mu$ m, 水相。

## 2 仪器与设备

高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、RI-201H 示差折光检测器、K2025 ATD 模数转换器、Wookinglab 色谱工作站;

分析天平: 精确到 0.0001g;

涡旋振荡器;

容量瓶: 10mL、100mL, 棕色带刻度。

## 3 测定步骤

### 3.1 样品处理

称取混匀后的试样1g（精确到0.0001g）于50mL容量瓶，加水溶解并定容至刻度，充分摇匀，用0.22 $\mu$ m滤膜过滤。根据样品含量进行稀释后上机测定。

### 3.2 色谱条件

- a) 色谱柱：氨基色谱柱，4.6 $\times$ 250mm，5 $\mu$ m 或者相当的色谱柱；
- b) 流动相：乙腈：水=78:22；
- c) 柱温：35 $^{\circ}$ C；
- d) 进样量：20 $\mu$ L；
- e) 流速：1.0mL/min；
- f) 检测器：示差折光检测器，温度为35 $^{\circ}$ C。

## 4 结果

### 4.1 重复性测试

按照上述色谱条件（5.2）进行采集，糖混合标准溶液的色谱图如图1所示，积分结果如表1所示。

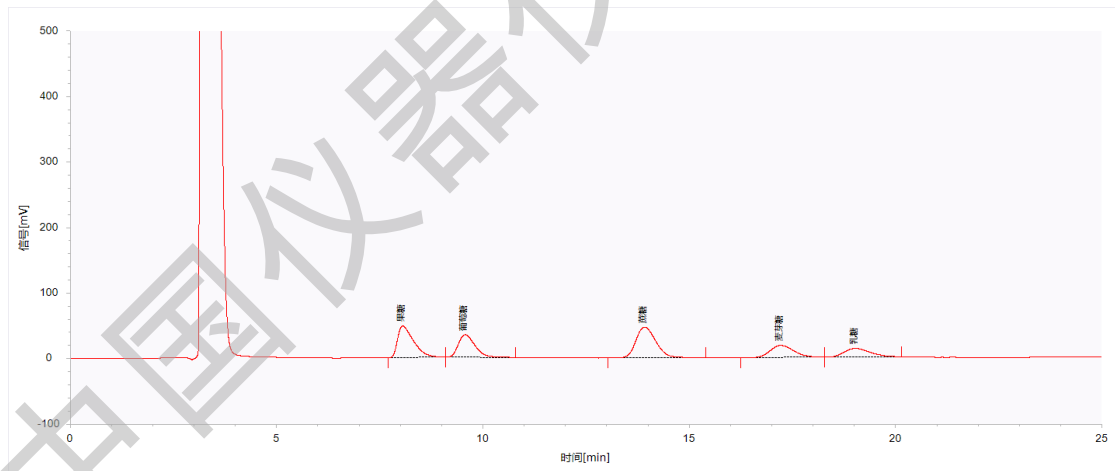


图1 糖混合标准溶液的色谱图

表1 糖混合标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔 板数	分离度	对称/拖尾因子
果糖	8.068	1314.149	48.742	2093	-	2.00
葡萄糖	9.580	962.645	34.445	2754	2.11	1.34
蔗糖	13.925	1553.463	46.838	4039	5.41	1.25
麦芽糖	17.227	737.200	18.471	4305	3.43	1.30
乳糖	19.042	583.244	13.107	4193	1.63	1.41

由表 1 中数据可以看出：果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖之间的分离度均大于 1.60，完全满足《GB/T 5009.8-2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定（第一法）》中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖之间的分离度应大于 1.5 的要求。

将糖混合标准溶液连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

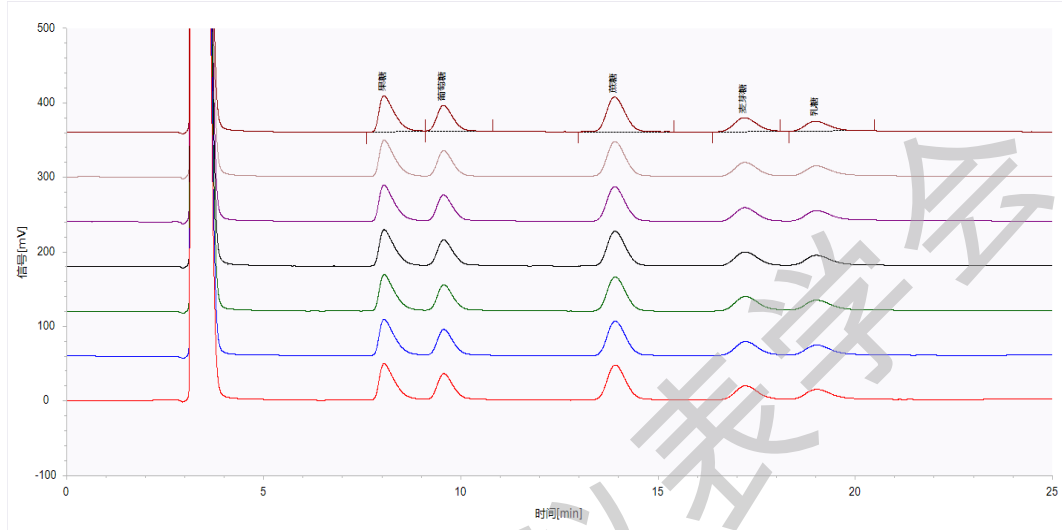


图 2 糖混合标准溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 糖混合标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物		1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
果糖	保留时间	8.068	8.068	8.068	8.068	8.062	8.068	8.062	8.066	0.036
	峰面积	1314.149	1306.161	1307.897	1301.170	1314.116	1317.838	1307.500	1309.833	0.439
葡萄糖	保留时间	9.580	9.580	9.582	9.580	9.573	9.578	9.573	9.578	0.038
	峰面积	962.645	966.177	952.877	968.703	958.773	950.834	968.159	961.167	0.753
蔗糖	保留时间	13.925	13.927	13.925	13.923	13.913	13.923	13.912	13.921	0.044
	峰面积	1553.463	1534.721	1517.108	1538.495	1547.594	1516.055	1532.247	1534.240	0.920
麦芽糖	保留时间	17.227	17.233	17.232	17.225	17.213	17.218	17.202	17.221	0.065
	峰面积	737.200	742.960	737.668	742.462	748.322	738.674	736.683	740.567	0.573
乳糖	保留时间	19.042	19.037	19.027	19.033	19.032	19.037	19.013	19.032	0.050
	峰面积	583.244	582.952	577.865	583.687	585.819	575.668	579.225	581.209	0.630

由表 2 中数据可知：糖混合标准溶液连续进样 7 针，各糖保留时间的 RSD 为 0.036%~0.065%，峰面积的 RSD 为 0.439%~0.920%。

## 4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图 3 所示，计算结果见表 3。

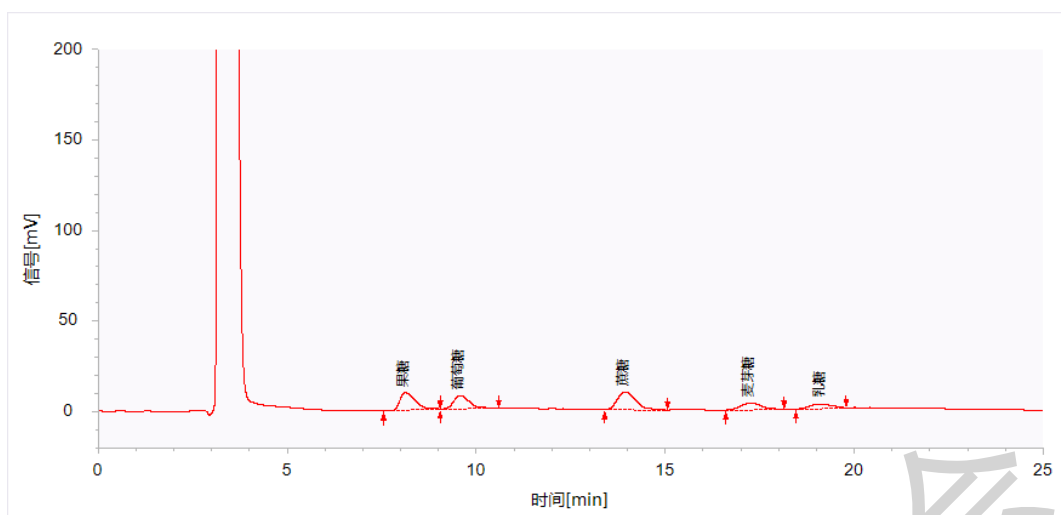


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

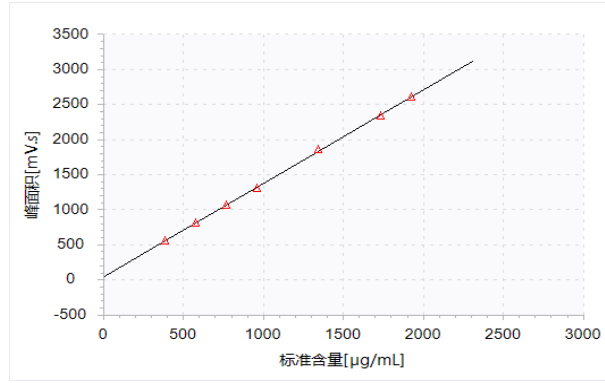
目标物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
果糖	193	9.658	0.035	275.9	2.094	6.980
葡萄糖	182	7.243	0.035	206.9	2.644	8.814
蔗糖	202	9.858	0.035	281.7	2.147	7.157
麦芽糖	172	3.680	0.035	105.1	4.914	16.381
乳糖	194	2.450	0.035	70.0	8.299	27.663

由表 3 中数据可知：果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的仪器检出限范围是  $2.094\mu\text{g/mL}\sim 8.299\mu\text{g/mL}$ ；果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的仪器定量限范围是  $6.980\mu\text{g/mL}\sim 27.663\mu\text{g/mL}$ 。

### 4.3 含量测定

#### 4.3.1 校准曲线

将配制好的糖混合标准工作液在 HPLC 上进行测定，以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及相关系数见图 4-图 8，叠加色谱图见图 9。各糖在测定浓度范围内，曲线的相关系数  $R^2$  均大于 0.999，线性关系均良好。

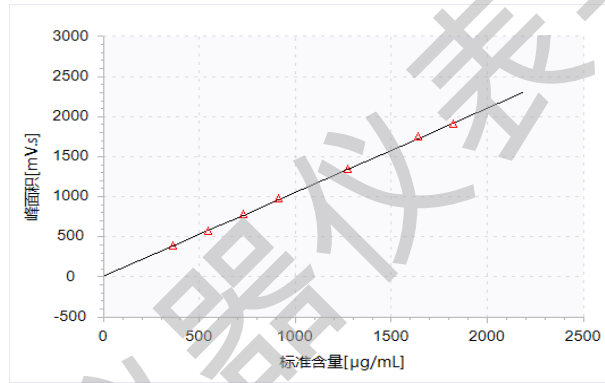


方程式  $y=1.33715*x+27.36109$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9998

图 4 果糖标准溶液的校准曲线

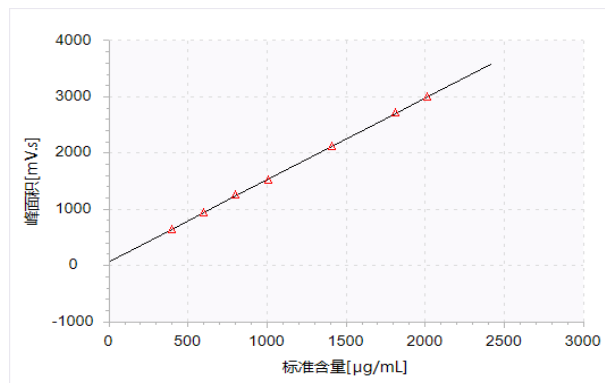


方程式  $y=1.04919*x-1.28870$

相关系数(R) 0.9998

确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9996

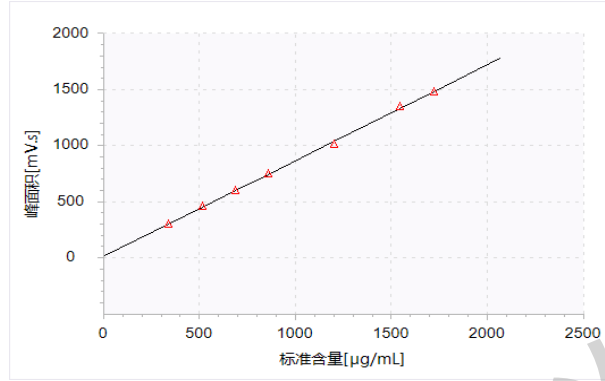
图 5 葡萄糖标准溶液的校准曲线



方程式  $y=1.45673*x+51.13697$

相关系数(R)	0.9999
确定系数(R <sup>2</sup> )	0.9998

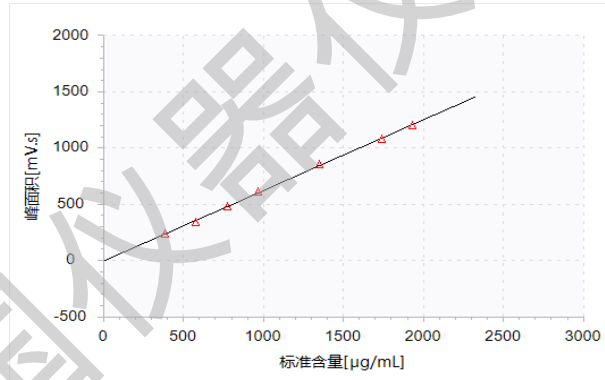
图 6 蔗糖标准溶液的校准曲线



方程式	$y=0.85482*x+4.51916$
-----	-----------------------

相关系数(R)	0.9996
确定系数(R <sup>2</sup> )	0.9991

图 7 麦芽糖标准溶液的校准曲线



方程式	$y=0.62864*x-15.03496$
-----	------------------------

相关系数(R)	0.9997
确定系数(R <sup>2</sup> )	0.9993

图 8 乳糖标准溶液的校准曲线

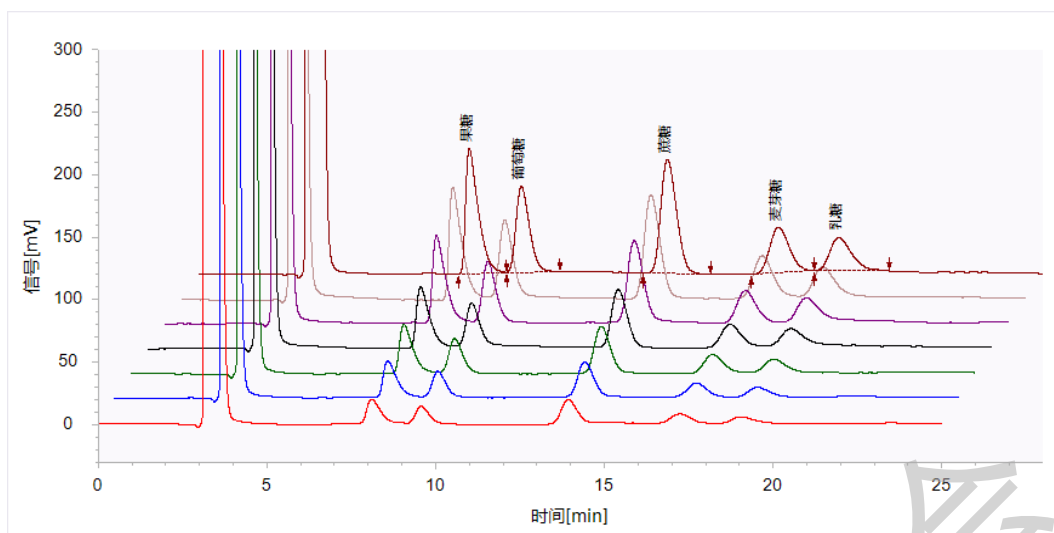


图9 糖混合标准溶液浓度系列曲线叠加色谱图

#### 4.3.2 样品含量测定

购买市售蜂蜜作为样品，按照 5.1 的流程对样品进行处理。按照公式（1）进行计算，同时做平行实验。蜂蜜样品的色谱图如图 10 所示。

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times f}{m \times 1000 \times 1000} \times 100 \text{---公式 (1)}$$

式中：X----试样中果糖/葡萄糖/蔗糖/麦芽糖/乳糖的含量，单位为克每百克（g/100g）；

C----为通过校准曲线计算的样液中果糖/葡萄糖/蔗糖/麦芽糖/乳糖的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$C_0$ ----为通过校准曲线计算的空白样液中果糖/葡萄糖/蔗糖/麦芽糖/乳糖的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V----为样品的定容体积，单位为毫升（mL）；

m----为样品质量，单位为克（g）；

f----为稀释倍数；

100、1000-----为换算系数。



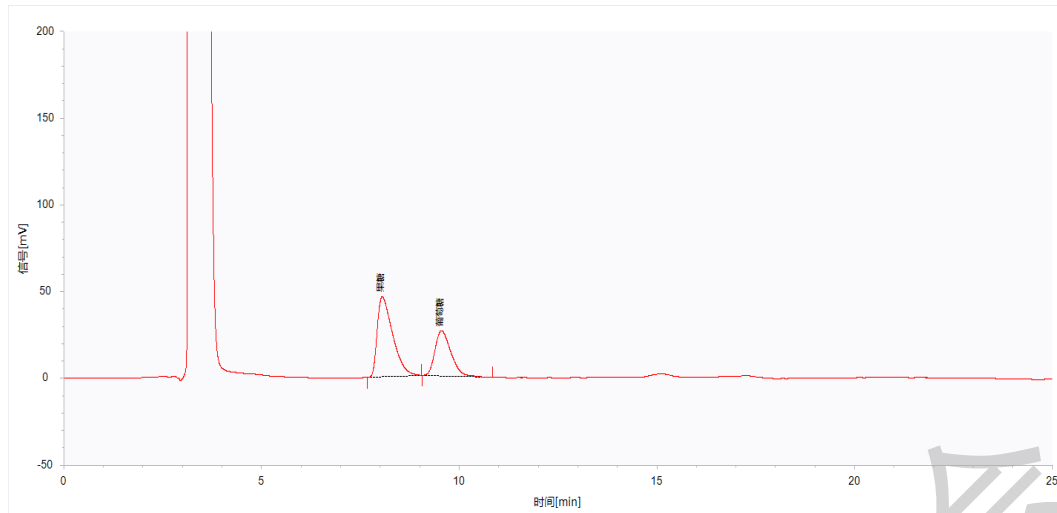


图 10 蜂蜜样品的色谱图

经计算，蜂蜜样品中果糖的含量为 39.5g/100g，葡萄糖的含量为 30.7g/100g。

## 5 结论

通过对糖的分离度、重复性、灵敏度、线性的测试以及对蜂蜜样品中糖的含量进行测定，实验结果表明：用 K2025 测定蜂蜜中糖的含量，果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖之间的分离度均大于 1.60，完全满足《GB/T 5009.8-2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定（第一法）》中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖之间的分离度大于 1.5 的要求；重复性测试中，糖混合标准溶液连续进样 7 针，各糖保留时间的 RSD 为 0.036%~0.065%，峰面积的 RSD 为 0.439%~0.920%，具有良好的重复性；灵敏度测试中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的仪器检出限范围是 2.094 $\mu$ g/mL~8.299 $\mu$ g/mL；果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的仪器定量限范围是 6.980 $\mu$ g/mL~27.663 $\mu$ g/mL；在测定浓度范围内，糖具有良好的线性关系，确定系数  $R^2$  均为 0.999；蜂蜜样品中果糖的含量为 39.5g/100g，葡萄糖的含量为 30.7g/100g。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《GB/T 5009.8-2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定（第一法）》中各糖含量测定的需求。