# 官能团保留指数鉴别掺淀粉糖浆蜂蜜的研究

陈梅兰[1]，梁世君[2]，雷鸣[3]，赵明霞[2]，吴捷[2]，何晋浙[3]
（1.浙江树人大学生物与环境工程学院，浙江杭州 310015）（2.桐庐县质量计量监测中心，浙江杭州 311500）
（3.浙江工业大学生物与环境工程学院，浙江杭州 310014）

**摘要：**研究了利用官能团保留指数法(Kovats index)鉴别掺淀粉糖浆的假蜂蜜。蜂蜜样品溶于水后用凝胶(Bio-Gel® P-2 Gel)体积排阻法去除样品中果糖、葡萄糖，将寡糖富集后直接经阴离子交换色谱电化学检测器检测。直链麦芽寡糖是由葡萄糖单体缩合而成的寡糖，类似正构烷烃，将麦芽寡糖（二糖~七糖）标准样品色谱峰作为对照峰，将麦芽四糖、五糖、六糖、七糖的保留指数分别设为400、500、600、700，根据样品获得的色谱峰的保留时间计算官能团保留指数值，结果表明，在添加果葡糖浆的麦芽糖混标样品、掺有果葡糖浆的纯蜂蜜及部分市售蜂蜜样品均出现相同的官能团保留指数值，而纯蜂蜜样品不存在此现象，据此可判断蜂蜜是否掺假，灵敏度可达 1%。利用该结果对已知掺假的蜂蜜进行验证，结论符合。

**关键词：**官能团保留指数；离子色谱；掺假蜂蜜；淀粉糖浆；麦芽寡糖
**文章篇号：**1673-9078(2015)5-272-277 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.043

# Detecting Starch Syrup in Adulterated Honey via Retention Index

**CHEN Mei-lan[1], LIANG Shi-jun[2], LEI Mingi[3], ZHAO Ming-xia[2], WU Jie[2], HE Jin-zhe[3]**
(1.Biological and Environmental Engineering School of Zhejiang Shuren University, Hangzhou, 310015, China)
(2.Tonglu County Municipal Supervision and Testing Center of Quality and Metrologgy, Hangzhou 311500, China)
(3.Biology and Environmental Engineering School of Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310014, China)

**Abstract:** The use of retention index (Kovats index) to detect adulteration of honey with starch syrup was studied. After dissolving the honey sample in water, fructose and glucose were removed by Gel (Bio-Gel ® Gel P-2) size-exclusion, oligosaccharides were concentrated, separated, and directly identified by anion-exchange chromatography using an electrochemical detector. Linear maltooligosaccharides are formed by condensation of glucose monomers, similar to *n*-alkanes. Using the chromatographic peaks of maltooligosaccharide (maltose to maltoheptaose) standards as reference, the retention indices of maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, and maltoheptaose were set at 400, 500, 600, and 700, respectively, while the retention index value of sample peak was calculated based on the retention time. The results showed similar functional retention index values for maltose standard samples as compared with fructose syrup, pure honey containing fructose syrup, and in some commercial honey samples, while they were not found in pure honey samples. This approach can be used to detect adulteration of honey with 1% sensitivity, and was validated using deliberately adulterated honey samples.

**Key words:** retention index; ion chromatography; adulterated honey; starch syrup; maltooligosaccharide

淀粉糖浆是淀粉经不完全水解，脱色后加工而成的无色、透明、粘稠液体。糖浆的主要成分是葡萄糖、麦芽糖、低聚糖、糊精等，因水解程度和采用糖化生产工艺的不同，各种糖分组成比例、种类不同，具有不同的物理和化学性质。蜂蜜的主要成分为葡萄糖和果糖，占总糖的 85%~95%。目前蜂蜜掺假手段很多，检测方法也很多，如采用薄层色谱法，稳定碳同位素法[1~2]，近红外光谱法[3]，应用 HPAEC-PAD 分析植物源蜂蜜的糖分特征，再利用化学计量法建立不同植物源的蜂蜜指纹图谱[4]，也有用反相固相萃取去除单糖和少量低聚糖，浓缩多聚糖后进行检测[5]及显微扫描分析法[6~7]，差示扫描量热法（DSC）[8]，其它还有蛋白印迹法[9]等，但这些方法有自身的缺陷[10]。常用的分析检测方法中，稳定碳同位素比率法无法鉴别掺有大米糖浆和甜菜转化糖浆这类 C3 植物糖的掺假蜂蜜；薄层色谱法依靠实验人员的直观经验来判断阳性结果，误差较大，且容易造成假阳性[11]；而 GB/T 21533-2008《蜂蜜中淀粉糖浆的测定 离子色谱法》[12]是依据蜂蜜中不含有五糖(DP5)以上的寡糖，人工水解淀粉糖浆中均存在五糖(DP5)以上的寡糖，因此在蜂密图谱中如果出现了五糖(DP5)以上的寡糖的指纹图谱，也就是在麦芽 5 糖和麦芽 6 糖及麦芽 6 糖和麦芽 7 糖之间各出现 1 个，就认定蜂蜜中掺有果葡糖浆，如在

收稿日期：2014-08-28
基金项目：浙江省自然科学重点基金（Z14B070002）
作者简介：陈梅兰（1964-），女，教授，研究方向：糖类分离分析

麦芽 5 糖和麦芽 6 糖，麦芽 6 糖和麦芽 7 糖及麦芽 7 糖以后各出现 1 个指纹峰，就认定该蜂蜜掺入了麦芽糖浆。但在实际蜂蜜样品掺假检测过程中我们发现在纯峰密样品中也存在五糖(DP5)以上的寡糖，而且实际样品往往有较多的其它杂寡糖，也就是在麦芽 5 糖和麦芽 6 糖，麦芽 6 糖和麦芽 7 糖及麦芽 7 糖以后往往出现较多的小峰，因此该方法要求在掺假为 5%以上时，也就是让指纹峰非常明显时才能判断蜂密掺假，这样不能满足实际市场上对蜂蜜掺假判断的需要。本方法是利用淀粉糖浆在水解时按一定的规律进行，最终果葡糖浆中一定含有 2 种寡糖物质，见图 1，麦芽糖浆中一定含有 3 种寡糖物质，见图 2，由于这些寡糖具有相同的官能团，因此它们的官能团保留指数值应该是相同的，据此相同的官能团保留指数值判断蜂蜜掺假，可提高判断的准确度。

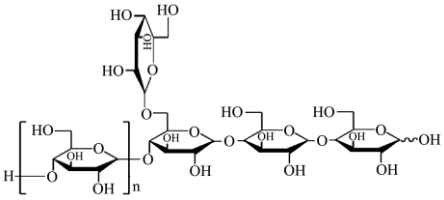


图 1 果葡糖浆中 2 种寡糖的结构式（其中 n=2 及 n=3 各 1 种）

**Fig.1 Structures of two kinds of oligosaccharide in high-fructose corn syrup (n = 2 or 3)**

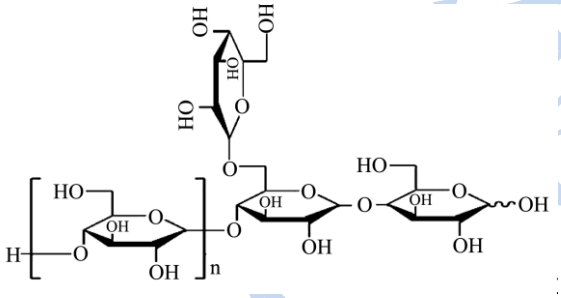


图 2 麦芽糖浆中存在的 3 种寡糖的结构式（其中 n=2, n=3 和 n=4 各 1 种）

**Fig.2 Structures of three kinds of oligosaccharide in malt syrup**

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖标准物质（SUPELCO）。色谱纯的氢氧化钠和无水乙酸钠（购自上海安谱科学仪器有限公司）。实验用水：18.2 MΩ/cm 去离子水（SYNERGY, MILLIPORE）。聚丙酰胺凝胶微球（Bio-Gel® P-2 Gel），粒径 45 μm~90 μm，分级分离的相对分子质量范围 100-1800。

### 1.2 主要仪器设备

戴安 ICS-5000 离子色谱仪，配电化学检测器；色谱柱，CarboPac PA200 3 mm×250 mm 分析柱和 CarboPac PA200 3 mm×50 mm 保护柱；凝胶层析柱，将水化好的聚丙酰胺凝胶湿法装入 1.5 cm×40 cm 空柱管中，装入高度为 10 cm，上端保持 1 cm 以上的水层，避免干涸。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 麦芽糖标准混合液的配制

分别称取麦芽糖、三糖、四糖、五糖、六糖、七糖标准物质各 10.0 mg 用水分别溶解定容至 10 mL，配制成浓度为 1.0 mg/mL 的储备液于棕色瓶中。吸取一定量的麦芽糖标准储备液按表 1 用水配制标准混合使用液，在 4 ℃保存不超过 30 d。

#### 1.3.2 样品前处理

样品前处理的方法按中华人民共和国国标 GB/T 21533-2008《中淀粉糖浆的测定-离子色谱法》[17]。

#### 1.3.3 色谱条件

淋洗液：A，100%水；B，200 mmol/L氢氧化钠和 200 mmol/L无水乙酸钠的混合液。流速0.40 mL/min，柱温30 ℃，检测池温度30 ℃，总分析时间60 min，进样量25 μL，脉冲安培检测，用Au作工作电极，Ag-AgCl作参比电极。梯度条件：等梯度（85%A+15%B）。

表 1 麦芽糖标准混合使用液

**Table 1 Preparation of maltose standard mixtures**

| 标准物质 | 麦芽糖 | 麦芽三糖 | 麦芽四糖 | 麦芽五糖 | 麦芽六糖 | 麦芽七糖 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 储备液吸取量/mL | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 | 1.00 |
| 定容体积/mL | | | | 10 | | |
| 混合使用液浓度/(μg/mL) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 100 |

#### 1.3.4 试验分组

Ⅰ组-添加5%果葡糖浆的麦芽糖混标溶液，吸取少量的麦芽糖标准混合液添加5%果葡糖浆加水稀释混匀成适宜浓度，按照1.3.2所述方法处理后按1.3.3的色谱条件进样分析；Ⅱ组-3种纯蜂蜜样品，样品处理方法和色谱分析方法同Ⅰ组；Ⅲ组-5种纯蜂蜜样品中加入5%果葡糖浆，样品处理方法和色谱分析方法同Ⅰ组；Ⅳ组-市售蜂蜜样品，样品处理方法和色谱分析方法同Ⅰ

组。

### 1.3.5 官能团保留指数值的计算[13~17]

在GC中，将正构烷烃的保留指数定为它的碳数的100倍。待测组分的保留指数是与其具有相同调整保留值的假想的正构烷烃的碳数的100倍。通常以色谱图上位于待测物质两侧的相邻正构烷烃的保留值为基准，用对数内插法求得其保留指数（*I*）。

$$I = 100[n + \frac{\lg t'_R - \lg t'_{R(n)}}{\lg t'_{R(n+1)} - \lg t'_{R(n)}}] \quad (1)$$

注：式（1）中，$t'_{R(n)} \leq t'_R \leq t'_{R(n+1)}$，$t'_{R(n)}$和$t'_{R(n+1)}$是碳数为 n 和 n+1 的正构烷烃的调整保留时间

由式（1）推出官能团保留指数（*SU*）为：

$$SU = \frac{100(\lg t'_R - \lg t'_{R(n)})}{\lg t'_{R(n+1)} - \lg t'_{R(n)}} \quad (2)$$

GC中保留指数定性是建立在应用于$-[-CH_2-]-$单碳增量同系物碳数规律。直链麦芽寡糖是由葡萄糖单体缩合而成的寡糖，类似正构烷烃，将麦芽四糖、五糖、六糖、七糖的保留指数分别设为400、500、600、700，计算出果葡糖浆、纯密样品和掺假样品的寡糖的官能团保留指数值。如果出现2个相同的官能团保留指数值，可判断是掺入了果葡糖浆，如出现了3个相同的官能团保留指数值，可判断是掺入麦芽糖浆。由于官能团保留指数是根据峰的保留时间计算，只要在麦芽四糖、五糖、六糖、七糖及七糖以上存在杂峰，据公式（2）可计算出官能团指数值，如出现相同的官能团保留指数值可判断掺假，因此灵敏度应优于GB/T 21533-2008的5%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 麦芽寡糖的色谱分析及官能团保留指数值计算

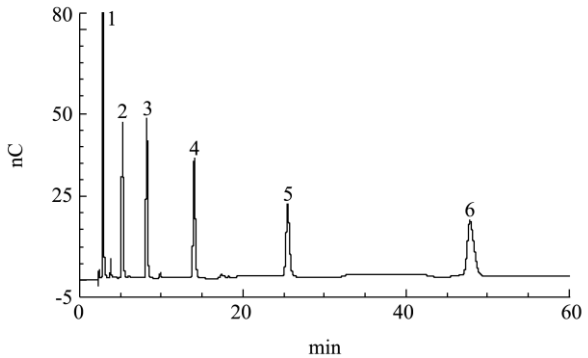



图 3 麦芽寡糖分离色谱图

**Fig.3 Chromatogram of separated maltooligosaccharides**

注：1~6峰依次为麦芽糖、麦芽三塘、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖。

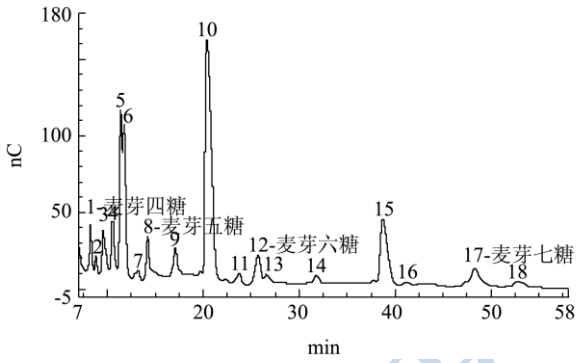



图 4 添加果葡糖浆的麦芽糖混标的色谱图（Ⅰ-A）

**Fig.4 Chromatogram of high-fructose corn syrup mixed with maltose standard mixture**

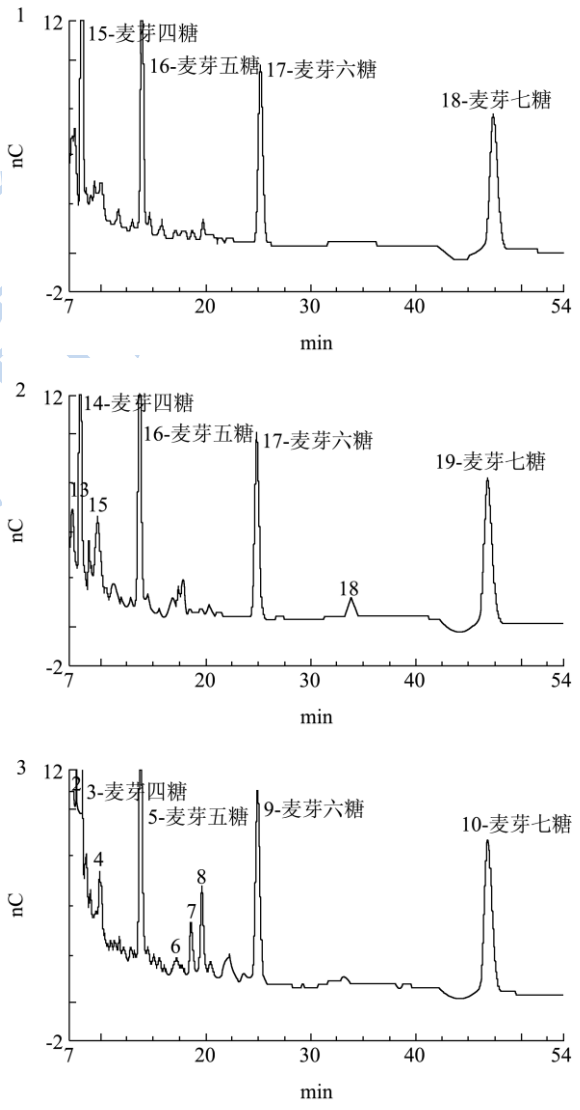



图 5 纯样品（Ⅱ-A、Ⅱ-B、Ⅱ-C）色谱图

**Fig.5 Chromatogram of representative pure honey (samples A, B, and C)**

对6种标准麦芽寡糖及添加果葡糖浆的麦芽寡糖混合标液、纯蜂蜜样品、人为掺入果葡糖浆的阳性样

品以及市售样品，在等度洗脱（85%A+15%B）条件下，得到5类色谱图，每类典型的色谱图见图3~7。以麦芽四糖保留时间为$t'_M$，计算各组分$t'_R$，根据公式(3)，计算麦芽五糖、六糖之间的寡糖官能团保留指数$SU_p$（$SU_p=100(lgt'-lgt'_5)/(lgt'_6-lgt'_5)$）及六糖与七糖之间寡糖$SU_q$（$SU_q=100(lgt'-lgt'_6)/(lgt'_7-lgt'_6)$），,计算结果见表3、表4和表5。

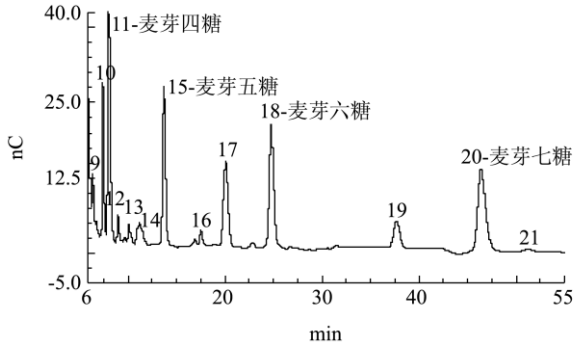



图 6 掺有果葡糖浆的纯（Ⅲ-A）色谱图

**Fig.6 Chromatogram of acacia honey mixed with high-fructose corn syrup (sample A)**

## 2.2 官能团保留指数值的分析

从第Ⅰ组数据可知，果葡糖浆明显存在五糖以上的寡糖，其中，SUp2和SUq2接近，且他们之间差值不大于1.0表明两者含相同的官能团。第Ⅱ组纯蜂蜜样品不出现相近官能团保留指数值。第Ⅲ组对不同种类纯蜂蜜样品添加果葡糖浆结果发现都出现接近的官能团保留指数值（SUp2和SUq2值），差值不大于1.0。第Ⅳ组是3种未知的市售样品。样品A、B出现接近的官能团保留指数值（SUp2和SUq2值），差值不大于1.0，判定为掺假，样品C只出现单个寡糖峰，无相近的SU值，判定该样品无掺假。

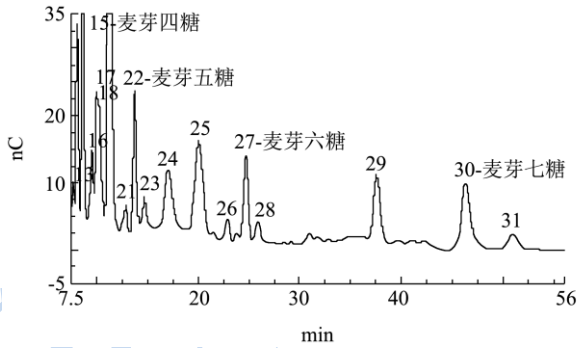



图 7 市售（Ⅳ-A）色谱图

**Fig.7 Chromatogram of commercial honey sample (sample A)**

表 3 Ⅰ和Ⅱ组官能团保留指数分析

**Table 3 Results from analysis of retention indices from groups I and II**

| 试验组 | 保留时间 $t_R$/min | | | | | | | | | | SU/iu | 关联性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 麦芽四糖 | 麦芽五糖 | $p_1$ | $p_2$ | $p_3$ | 麦芽六糖 | $q_1$ | $q_2$ | $q_3$ | 麦芽七糖 | | |
| Ⅰ | 8.284 | 14.234 | 17.134 | 20.400 | 23.750 | 25.734 | 31.817 | 38.734 | 41.200 | 48.360 | $SUp_1$=36.893<br>$SUp_2$=66.082<br>$SUp_3$=88.766<br>$SUq_1$=35.973<br>$SUq_2$=66.96<br>$SUq_3$=76.455 | $SUp_2$和$SUq_2$接近值表明两者含相同的官能团 |
| Ⅱ-A | 8.150 | 13.917 | / | / | / | 25.184 | / | / | / | 47.350 | | 不含五糖以上寡糖只出现一种寡糖 |
| Ⅱ-B | 8.067 | 13.734 | / | / | / | 24.884 | 33.900 | / | / | 46.850 | $SUq_1$=51.372 | |
| Ⅱ-C | 8.050 | 13.800 | 17.200 | 18.617 | 19.634 | 24.950 | / | / | / | 46.850 | $SUp_1$=43.039<br>$SUp_2$=56.400<br>$SUp_3$=64.927 | SU值表明不含相同的官能团 |

表 4 Ⅲ组官能团保留指数分析

**Table 4 Results from the analysis of retention indices from group III**

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ⅲ-A | 8.020 | 13.730 | 17.550 | 20.100 | / | 24.780 | / | 37.680 | / | 46.380 | $SUp_1$=47.532<br>$SUp_2$=69.561<br>$SUq_2$=68.9348 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团 |
| Ⅲ-B | 8.000 | 13.800 | / | 20.117 | 22.950 | 24.900 | / | 37.800 | 42.450 | 46.817 | $Sup_2$=68.890<br>$Sup_3$=88.536<br>$SUq_2$=68.210<br>$SUq_3$=85.647 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团 |

转下页

接上页

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ⅲ-C | 8.150 | 13.817 | 16.634 | 20.150 | 23.00 | 24.950 | / | 37.834 | 42.567 | 46.884 | $SUp_1$=37.203 $SUp_{2=}$69.04 $SUp_{3=}$88.713S $Uq_{2=}$68.188 $SUq_{3=}$85.88 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团 |
| Ⅲ-D | 8.017 | 13.734 | 17.500 | 20.217 | / | 24.734 | / | 37.984 | / | 46.100 | $SUp_1$=47.162 $SUp_{2=}$70.642S $Uq_{2=}$70.806 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团 |
| Ⅲ-E | 8.122 | 14.00 | / | 20.567 | / | 25.384 | / | 38.734 | / | 47.784 | $SUp_1$=69.657 $SUq_{1=}$68.945 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团 |
| Ⅲ-F | 8.034 | 13.767 | 17.600 | 20.167 | / | 24.850 | / | 37.834 | / | 46.467 | $SUp_1$=47.591 $SUp_{2=}$69.651 $SUq_{2=}$69.141 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团 |

表 5 Ⅳ组官能团保留指数分析

**Table 5 Results from the analysis of retention indices from group IV**

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ⅳ-A | 8.080 | 13.730 | 14.640 | 19.920 | / | 24.700 | 25.620 | 37.530 | / | 46.280 | $SUp_1$=13.935 $SUp_{2=}$68.551 $SUq_{1=}$6.450 $SUq_{2=}$68.747 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团，掺入果葡糖浆 |
| Ⅳ-B | 7.984 | 13.500 | / | 19.417 | / | 24.05 | | 37.417 | / | 46.367 | $SUp_2$=68.177 $SUq_{2=}$69.141 | $SUp_2$和$SUq_2$值接近表明两者含相同的官能团，掺入果葡糖浆 |
| Ⅳ-C | 8.067 | 13.717 | / | 20.520 | / | 25.234 | / | / | / | 47.484 | | 不出现相同的官能团指数值，没有掺入淀粉糖浆 |

注：$p_1$、$p_2$、$p_3$为位于麦芽 5 糖和麦芽 6 糖之间的寡糖峰；$q_1$、$q_2$、$q_3$为位于麦芽 6 糖和麦芽 7 糖之间的寡糖峰。

## 2.3 灵敏度

利用该方法对人为掺入1%的果葡糖浆纯蜂蜜样品按1.3的方法进行试验，发现在麦芽5糖和麦芽6糖及麦芽6糖和麦芽7糖之间存在寡糖峰，通过计算官能团指数发现也存在相近的SU值。可见，该方法灵敏度可达到1%。

## 3 结论

由此可推断，若蜂蜜中掺有淀粉糖浆，通过离子色谱分析，在直链麦芽五糖、六糖之间，麦芽六糖、七糖之间，应该会同时出现至少一对相同的特征峰，处于相同特定位置，具有相近的官能团保留指数，差值不大于1.0，可判断的掺假。通过该新方法可提高鉴别掺假的准确度，减少假阳性的错误判断。

## 参考文献


[1] Padovan G J, De Jong D, Rodrigues L P, et al. Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotopic ratio [J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 633-636

[2] Elflein L, Raezke K P. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between 13C/12 C stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (δ13C-EA/LC-IRMS) [J]. Apidologie, 2008, 39(5): 574-587

[3] Downey G, Fouratier V, Kelly J D. Detection of honey adulteration by addition of fructose and glucose using near infrared transflectance spectroscopy [J]. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2003, 11(6): 447-456

[4] Cordella C B Y, Militao J S L T, Clement M C, et al. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(11): 3234-3242

[5] Megherbi M, Herbreteau B, Faure R, et al. Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(6): 2105-2111.

[6] Kerkvliet J D, Shrestha M, Tuladha K, et al. Microscopic detection of adulteration of honey with cane sugar and cane sugar products [J]. Apidologie, 1995, 26(2): 131-139

[7] Kerkvliet J D, Meijer H A J. Adulteration of honey: relation between microscopic analysis and δ13C measurements [J]. Apidologie, 2000, 31: 717-726

[8] Cordella C, Antinelli J, Faurieres C, et al. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys.1.Study of adulteration effect on honey thermal behavior [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(1): 203-208

[9] Simuth J, Bilikova K, Kovacova E, et al. Immunochemicalapproach to detection of adulteration in honey: Physiologically active toyal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(8): 2154-2158

[10] 袁玉伟,张志恒,叶雪珠,等.掺假鉴别技术的研究进展与对策建议[J].食品科学,2010,31(09): 318-322
YUAN Yu-Wei, ZHANG Zhi-heng, YE Xue-zhu, et al. Research progress in the detection of honey adulteration al [J]. Food Chemistry, 2010, 31(9): 318-322

[11] 张颖璐,刘明刚,李琳.薄层色谱法测定中高果糖淀粉糖浆[J].食品研究与开发,2011,32(12):130-133
ZHANG Ying-lu, LIU Ming-gang, LI Lin. High fructose starch syrup in honey by thin-layer chromatography [J]. Food Research and Development, 2011, 32(12): 130-133

[12] 中华人民共和国国标 GB/T 21533-2008 中淀粉糖浆的测定 离子色谱法,2008
PRC National Standard GB/T 21533-2008 Determination of starch srupy in honey-Ion chromatography. Determination of starch srupy in honey - Ion chromatography, 2008

[13] Kovats E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone [J]. Helv Chim Acta, 1958, 41(7): 1915-32

[14] Alain Berthod, Samuel S C Chang, John P S Kullman, et al. Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase [J]. Talanta, 1998, 47: 1001- 1012

[15] 许国旺.现代实用气相色谱法[M].北京:化学工业出版社,2004
XU Guo-wang. Modern practical gas chromatography [M]. Beijing: 2004

[16] 赵晨曦,梁逸曾,胡黔楠,张泰铭.气相色谱保留指数定性方法研究进展[J].分析化学,2005,33(5):715-721
ZHAO Chen-xi, LIANG Yi-Zeng, HU Qian-Nan, Zhang Tai-Ming. Review on gas chromatographic retention index [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(5): 715-721

[17] 卢佩章,戴朝政,张祥民.色谱理论基础[M].北京:科学出版社,1998
LU Pei-zhang, DEI Chao-zhen, ZHANG Xiang-ming. Chromatographic theory basis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998