

蜂蜜酿造过程中糖分的变化规律

Changes on sugar profiles in honey during ripening

徐 贤^{1,2} 顾振宇^{1,2}

XU Xian^{1,2} GU Zhen-yu^{1,2}

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018; 2. 浙江省食品质量与安全重点实验室, 浙江 杭州 310018)

(1. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China;

2. Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

摘要:旨在通过分析不同酿造程度蜂蜜的理化指标和糖组分,找出蜂蜜在成熟过程中糖分的变化规律,从而获得评价蜂蜜品质的特征性指标。分别测定不同酿造程度蜂蜜的水分含量、锤度、酸度、pH 值、电导率,并采用 HPLC—ELSD 法定量分析在蜂巢内酿造不同时间的 5 种蜂蜜的糖组分。通过单因素方差分析(ANOVA)可知,不同酿造程度的蜂蜜存在显著性差异;而由主成分分析可知,果糖、海藻糖、葡萄糖、麦芽酮糖、吡喃葡萄糖基蔗糖是引起不同酿造程度蜂蜜差异性的主导因素。因此,海藻糖、麦芽酮糖、吡喃葡萄糖基蔗糖可以作为鉴别不同酿造程度蜂蜜的特征性指标。

关键词:蜂蜜;理化指标;特征性糖分;HPLC—ELSD;主成分分析 PCA

Abstract: To find the rules on honey during ripening and obtain the special indicators, the physicochemical parameters and sugar profiles were studied. Moisture, soluble solids, pH, acidity, and conductivity were detected according to national standards. Sugar profiles of different storage time in hive, one day, two days, four days, six days and which was completely ripened were isolated and identified by HPLC—ELSD. Analysis of variance (ANOVA) showed that there were significant differences in honey of different storage time in hive; while the principal component analysis(PCA) showed that fructose, trehalose, glucose, maltulose, erlose were the major factors causing this difference. So the trehalose, maltulose and erlose can be the special indicators of honey during ripening, which provides a reference and guidance for the evaluation of honey quality.

Keywords: honey; physicochemical parameters; special sugar profiles; HPLC—ELSD; principal component analysis

蜂蜜是蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露,与自身分泌物结合后,经充分酿造而成的天然甜物质^[1]。蜂蜜因其含有特殊的保健功能成分(如多酚类物质、蜂花粉、寡糖等)深受消费者的青睐^[2-3],但是其通常需要在蜂巢内酿造一个蜜源花期才能完全封盖并成熟^[4]。然而,由于中国蜂农“追花夺蜜”的养蜂方式^[5],以及蜂蜜加工厂商“低价统一收购”等原因导致蜂农生产天然成熟蜜的积极性不高^[6],出现“3 d 一取蜜”甚至“每天摇蜜”的普遍现象^[4]。这种不成熟的蜜水分含量高,易发酵变酸极不利于储存。因此,建立一种快速、有效的蜂蜜品质识别方法迫在眉睫。

蜂蜜在酿造过程中主要发生变化的是糖类物质。蜂蜜中糖分的检测主要有传统的化学分析法(包括滴定法和分光光度法)以及现代仪器分析技术^[7-12]。传统的分析方法由于每次只能测定一种糖分,且不能对体系中的各种糖进行分离而具有一定的局限性。

高效液相色谱仪可根据糖的含量、纯度、种类来选择合适的检测器,对单糖、寡糖的分离效果较好。若将样品进行柱前衍生化处理,可用紫外(UV)、荧光检测器(FLD);不然,由于乙腈的截止波长接近糖的吸收波长,在低波长时,乙腈的纯度因达不到要求而无法检测。示差折光检测器(RID)是通用型检测器,对所有物质均有响应;但是,其灵敏度低,且不能在梯度洗脱下检测。脉冲安培检测器(PAD)灵敏度高,适合微量分析,但必须与阴离子交换柱洗脱液相匹配。蒸发光散射检测器(ELSD)是通用型检测器,具有高灵敏度、稳定性好等特点,能进行梯度洗脱,可对各种糖组分作全分析,二糖、三糖的异构体分离效果较好,四糖以上出峰完全,且定量准确。本试验在参考前人^[13-16]使用的各种方法基础上采用 HPLC—ELSD 法对不同采收时间的蜂蜜样品进行色谱分析,旨在研究不同酿造程度蜂蜜糖组分的变化规律。本研究将结合蜂蜜的常规理化指标的变化,通过化学计量学方法来获得评价高品质成熟蜜的特征性指标。

基金项目:杭州市科技计划(编号:20091832b15)

作者简介:徐贤(1989—),女,硕士。E-mail: xuyan0105@126.com

通讯作者:顾振宇

收稿日期:2015—09—05

1 材料与方法

1.1 样品采集

蜂蜜样品:采集于山东省济南章丘市七星台风景区的养蜂场。采样期间,主要的蜜源植物是野生荆条和酸枣。因蜜源植物流量量大,不对蜜蜂进行人工饲喂;而且蜜蜂群势强,采集期间未使用任何兽药。在每块巢脾上编号,每天下午 3 点半取出对应一块巢脾摇蜜。本试验共采用 8 种不同酿造程度的蜂蜜,见表 1 (其中 8 号只取封盖部分)。所有样品在分析前储存于-20 ℃低温冰箱中。

表 1 蜂蜜样品			
Table 1 Honey samples			
编号	日期	采样量/g	巢脾情况描述
1	2013 年 6 月 30 日	500	巢脾上有几个孔已封盖
2	2013 年 7 月 1 日	1 000	巢脾上有 1~2 排孔已封盖
3	2013 年 7 月 2 日	1 000	巢脾上有 3~4 排孔已封盖
4	2013 年 7 月 3 日	1 000	巢脾上有 5~6 排孔已封盖
5	2013 年 7 月 4 日	1 000	巢脾上有 7~8 排孔已封盖
6	2013 年 7 月 5 日	1 000	巢脾上大约有 10 排孔已封盖
7	2013 年 7 月 6 日	1 000	巢脾上有 10 排以上的孔已封盖
8	2013 年 7 月 7 日	500	大约 1/3 的巢脾已封盖

1.2 试剂与仪器

果糖、葡萄糖、棉籽糖:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

麦芽糖、蔗糖、异麦芽糖、曲二糖、黑曲霉糖、麦芽酮糖、 α 、 β -海藻糖、吡喃葡萄糖基蔗糖:色谱纯,美国 sigma 公司;

异麦芽酮糖、槐糖、松二糖、蜜二糖、海藻糖、松三糖:色谱纯,上海品纯生化科技股份有限公司;

乙腈:色谱纯,美国 tedia 公司;
滤膜:0.45 μ m,上海兴亚净化材料厂;
高纯氮气:杭州今工特种气体有限公司;
数字阿贝折射仪:WAY-2S 型,上海精密科学仪器有限公司;

台式酸度计:pH 510 型,新加坡优特仪器有限公司;
电导率仪:DDS-307 型,上海精密科学仪器有限公司;
高效液相色谱仪:2695 型,美国 Waters 公司;
蒸发光散射检测器:2424 型,美国 Waters 公司;
色谱柱:Carbohydrate Analysis, 3.9 mm $\times$ 300 mm, 10 μ m(货号:WAT 084038),美国 Waters 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品准备 所有蜂蜜样品在试验前,旋紧瓶盖,置于 50 ℃的水浴中温热,待完全融化后,迅速冷却至室温,搅匀,备用。

1.3.2 常规理化指标的测定

(1) 水分含量:按 SN/T 0852—2000 中 3.4 规定的方法,采用阿贝折光仪在室温下进行测定,用 g/100 g 表示。

(2) 可溶性固形物含量:即锤度,在用阿贝折光仪测定水分含量时可直接读出,结果用 g/100 g 表示。

(3) 酸度:按 SN/T 0852—2000 中 3.5 规定的方法,采

用氢氧化钠标准溶液进行滴定,试验结果以(1 mol/L 氢氧化钠)mL/100 g 表示。

(4) pH 值的测定:参考文献[16],在 10 g 蜂蜜中加入 75 mL 超纯水,搅拌均匀后用 pH 计测定。

(5) 电导率:按 GB/T 18932.15—2003 的方法,称取相当于 20 g 无水蜂蜜,定容至 100 mL,在 20 ℃下进行测定,结果用 μ S/cm 表示。

1.3.3 糖组分定量分析

(1) 样品处理:准确称取 5 g 蜂蜜样品,用超纯水溶解后定容到 100 mL 容量瓶中。HPLC 分析前过 0.45 μ m 滤膜。

(2) 标准溶液的配制:将果糖配制成浓度梯度为 10,15, 20,25,30 mg/mL 的标准工作液。将葡萄糖配制成浓度梯度为 8,12,16,20,24 mg/mL 的标准工作液。将蔗糖和麦芽糖分别配制成浓度梯度为 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0 mg/mL 的标准工作液。将异麦芽糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖、松二糖、蜜二糖、海藻糖、黑曲霉糖、曲二糖、槐糖、 α 、 β -海藻糖、松三糖、棉籽糖、吡喃葡萄糖基蔗糖直接配制成 2 mg/mL 的标准工作液。

(3) HPLC—ELSD 色谱分析条件:流动相:乙腈/水(80/20);流速:1.0 mL/min;柱温:(25 $\pm$ 5) ℃;进样量:10 μ L。蒸发光散射检测器 ELSD;漂移管温度:70 ℃;雾化器:冷却;气体压力:1.38 $\times$ 10⁵ Pa。Waters Carbohydrate Analysis 色谱柱:3.9 mm $\times$ 300 mm,10 μ m。

1.4 数据分析

采用 Origin 8.0 进行单因素方差分析(ANOVA)分析和图表的绘制;采用 MATLAB(Version 7.11.0.584)进行主成分分析(PCA)。

2 结果和讨论

2.1 理化分析

每个蜂蜜样品的理化指标平行测定 3 次,结果用平均值 $\pm$ 标准偏差表示,见表 2。其中,1 号蜂蜜样品的水分含量超过 GH/T 18796—2012 标准规定的二级品的要求 24 g/100 g,为不合格蜜;8 号蜂蜜样品符合一级品的要求 20 g/100 g;而其它 6 种蜂蜜样品均为二级品。这是由于蜂蜜在刚采集时没有经过充分酿造,所以水分含量过高。所有蜂蜜样品的锤度符合 GH/T 18796—2012 标准规定的要求,都超过 60 g/100 g。所有蜂蜜样品的酸度低于 GH/T 18796—2012 标准规定的 4 mL/100 g。所有蜂蜜样品的电导率都符合 CAC2001 的要求,即小于 800 μ S/cm。

为研究不同酿造程度蜂蜜各理化指标的显著性差异,本试验对水分、锤度、酸度、pH、电导率这 5 个指标分别进行了单因素方差分析。设显著性水平为 0.05,则 P<0.05 时表示存在显著性差异;而 P<0.001 时表示差异非常显著。由分析结果可知,P_{pH}为 0.006 8,而其它指标的 P 值均<0.001,说明各指标不同酿造程度蜂蜜的差异都非常显著。通过 F 检验可知,电导率、水分含量、锤度这 3 个指标可能对区分不同酿造程度的蜂蜜占主导作用。而电导率与蜂蜜中的矿物质、有机酸、蛋白质等有关。水分和糖组分则是蜂蜜在酿造过程中发生变化的主要因素。

表 2 不同酿造程度蜂蜜的理化指标
Table 2 Physicochemical parameters of different honey samples

样品	水分/ (10 ⁻² g · g ⁻¹)	锤度/ (10 ⁻² g · g ⁻¹)	酸度/ (10 ⁻² mL · g ⁻¹)	pH	电导率/ (μS · cm ⁻¹)
1	24.60±0.02	73.77±0.06	1.65±0.06	4.20±0.04	148.15±1.48
2	21.20±0.17	77.10±0.17	1.44±0.10	4.33±0.23	241.18±5.32
3	21.00±0.10	77.30±0.10	1.77±0.09	4.21±0.23	177.80±1.25
4	21.60±0.10	76.77±0.06	1.85±0.10	4.81±0.06	161.10±0.64
5	21.27±0.25	77.03±0.25	1.97±0.05	3.92±0.35	162.00±0.64
6	20.73±0.06	77.53±0.06	1.95±0.05	4.52±0.18	161.80±0.62
7	21.90±0.26	76.40±0.26	1.96±0.05	4.55±0.22	161.95±0.45
8	19.53±0.12	78.70±0.17	2.06±0.12	4.29±0.38	157.30±1.24
F	250.74	223.38	18.24	4.39	323.57
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.006 8	<0.001

2.2 糖组分分析

为进一步研究蜂蜜在酿造过程中化学成分的变化,对 1 号、2 号、4 号、6 号和 8 号蜂蜜样品的各种单糖和寡糖进行

色谱定量分析,见图 1。同时在相同色谱条件下,对各糖标准品进行分析,得到不同的响应信号。表 3 为不同糖标准品在浓度为 2 mg/mL 时的保留时间和色谱积分面积。

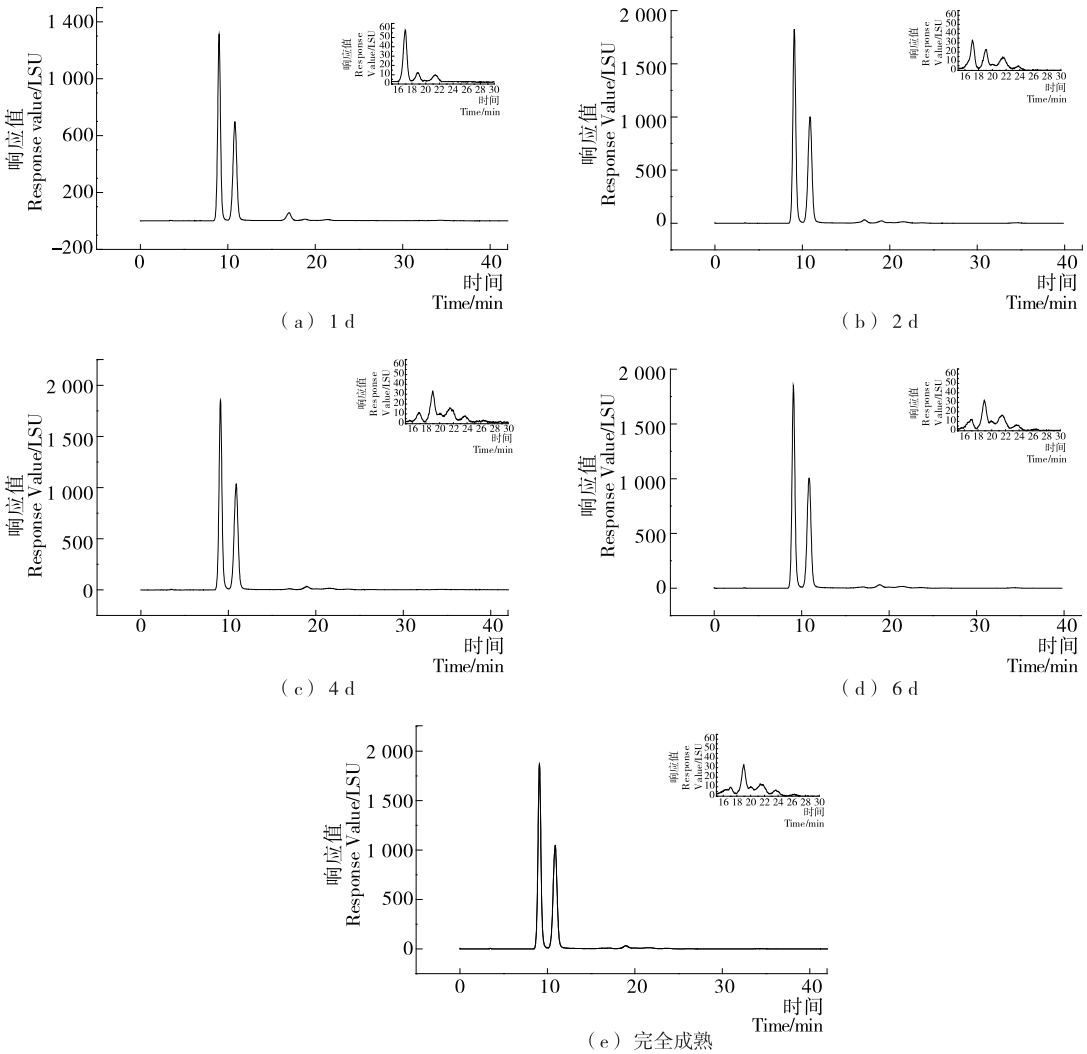


图 1 不同酿造程度蜂蜜的液相色谱图

Figure 1 Chromatograms from honey samples of different storage time in-hive

本试验共分离到 9 种糖,其中单糖有果糖和葡萄糖,二糖有蔗糖、麦芽糖、麦芽酮糖、黑曲霉糖、海藻糖、异麦芽糖,三糖只有吡喃葡萄糖基蔗糖。本试验所采用的 5 种蜂蜜样品未检测到曲二糖、槐糖、蜜二糖、松二糖、异麦芽酮糖、 α 、 β -海藻糖、松三糖及棉籽糖。在分离到的各种糖中,果糖的含量最高(248.72~397.73 g/kg),葡萄糖次之(187.64~267.87 g/kg),其它二糖和三糖的含量都不高。其中,1 号样品中没有检测到海藻糖,异麦芽糖也只在 6 号和 8 号样品中被定量分析到。随着蜂蜜在蜂巢中酿造时间的增加,果糖、葡萄糖、麦芽酮糖、黑曲霉糖、异麦芽糖的含量一直呈增加趋势,蔗糖则一直呈下降趋势,麦芽糖、海藻糖、吡喃葡萄糖基蔗糖先增加后逐渐平稳,见图 2。说明在蜂蜜的成熟过程中,除了水分含量发生降低外,蜂蜜由于自身酶和酸的作用还发生了生物化学反应,即各种糖在不断地分解、合成、转化。

果糖/葡萄糖(F/G)常用来评价蜂蜜的结晶性,果糖含量较高的蜂蜜不容易结晶,葡萄糖含量高的蜂蜜容易结晶,

表 3 糖标品的保留时间

Table 3 Retention times of carbohydrates

糖标准对照品	保留时间/min	积分面积
果糖	9.1	3 896 355
葡萄糖	10.9	1 614 869
蔗糖	17.1	3 961 612
松二糖	18.3	5 051 310
异麦芽酮糖	18.5	4 273 734
麦芽酮糖	19.4	5 029 851
黑曲霉糖	20.3	4 453 629
曲二糖	—	—
α 、 β -海藻糖	20.9	5 105 341
麦芽糖	21.5	2 408 433
槐糖	22.1	3 474 546
海藻糖	22.3	5 099 663
异麦芽糖	25.6	1 621 388
蜜二糖	28.1	1 860 475
吡喃葡萄糖基蔗糖	32.7	4 129 180
松三糖	33.2	3 807 329
棉籽糖	41.6	3 129 687

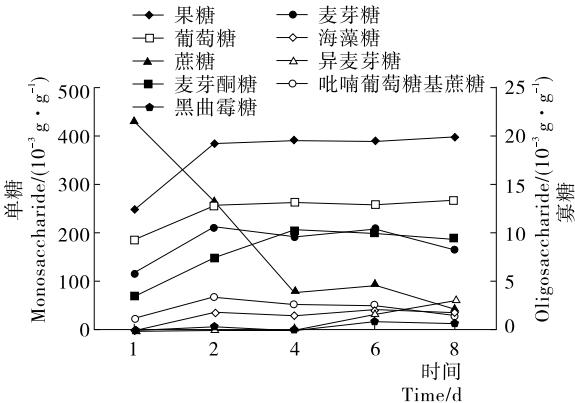


图 2 不同酿造程度蜂蜜样品的糖组分

Figure 2 Sugar composition of honey samples with different storage time in-hive

这是因为果糖的吸湿性和粘滞性比葡萄糖大。而有些研究^[17]则用葡萄糖/水(G/M)来表示蜂蜜的结晶性。本试验研究的蜂蜜样品 F/G 在 1.33~1.50;G/M 在 0.76~1.37,表示所有蜂蜜样品都不易结晶。

2.3 多元统计分析

为研究不同酿造程度蜂蜜差异性的影响因素,本试验对各样品测定的理化指标和糖组分进行了主成分分析(PCA)。由主成分分析可得,第一主成分的权重占总变量的 61.79%,第二主成分的权重占总变量的 23.90%,说明这 2 个主成分可以用来区分不同酿造程度的蜂蜜。由图 3(a)可知,不同酿造程度的蜂蜜分布在主成分分析得分图上的不同区域,说明理化指标和糖组分可以用来区分不同酿造程度的蜂蜜。由图 3(b)可知,果糖、海藻糖、葡萄糖、麦芽酮糖在 PC1 对区分不同酿造程度的蜂蜜有较大的贡献率,且呈正相关;水分含量、蔗糖在 PC1 上对区分不同酿造程度的蜂蜜有较大的贡献率,且呈负相关。吡喃葡萄糖基蔗糖、电导率在 PC2 上有较大的贡献率,且呈正相关;酸度、异麦芽糖在 PC2 上有较大的贡献率,且呈负相关。

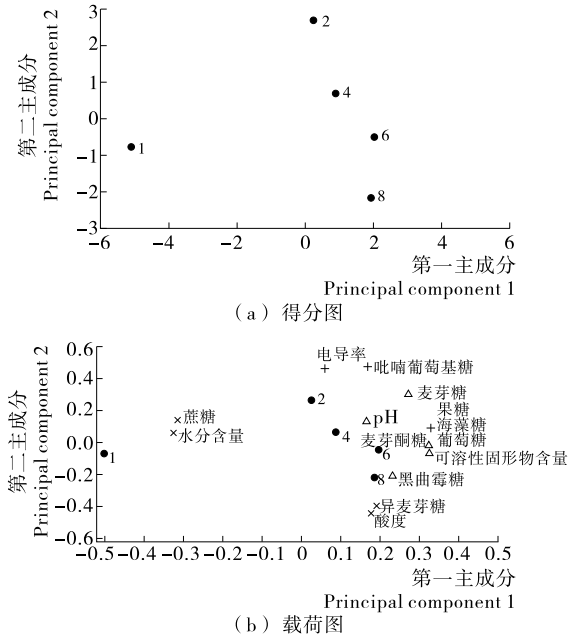


图 3 不同酿造程度蜂蜜的主成分分析

Figure 3 Representation of physicochemical parameters and carbohydrates of honey samples on the first two principal components

3 结论

本试验采用高效液相色谱法(HPLC—ELSD)在不同酿造程度的蜂蜜中共分离到 9 种糖分,而且这些糖组分的含量各不相同,说明蜂蜜在酿造过程中发生的生化反应主要是各种糖组分的转化和合成。通过主成分分析(PCA)可得,海藻糖、麦芽酮糖、吡喃葡萄糖基蔗糖可以作为鉴别不同酿造程度蜂蜜的特征性指标,这为评价蜂蜜品质以及蜂蜜真伪鉴别提供了化学成分上的依据,比常规理化指标更可靠、深入;也

(下转第 104 页)

横坐标,峰面积为纵坐标,得曲线方程为 $y=14\ 027x(r=0.999\ 87)$,因此氯化琥珀胆碱在 0.5~250.0 ng/mL 浓度范围内,线性关系良好,可用外标法定量。GB/T 5009.1—2013《食品卫生检验方法 理化部分 总则》和 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》附录 F.4 对检出限的定义为 $S/N=3$ 时对应样品中目标物的含量,因此,本方法的检出限为 4 μg/kg。

2.7 回收率和精密度

分别称取空白样品 0.5 g,添加 3 种不同浓度的氯化琥珀胆碱,按照 1.2.3 进行样品前处理并上机分析,每个浓度平行测定 6 次,计算回收率和精密度,见表 2。结果表明,本方法回收率高,重现性好。

表 2 阴性样品加标的回收率和精密度

Table 2 Recoveries and precisions of adding target in negative sample ($n=6$)

添加量/(μg · kg ⁻¹)	平均回收率/%	精密度(RSD)/%
5	103	12.1
15	96	8.7
50	98	6.3

2.8 样品检测情况

利用该方法检测了送检的 44 个狗肉样品,其中,4 个样品未检出,其余样品的检出量为 0.004~40.000 mg/kg。另外,研究还检测了 4 个送检的飞镖,检出量为 31~68 mg/个。因此,本方法可以用于检测畜肉和飞镖中的氯化琥珀胆碱。

(上接第 91 页)

可以为遏制蜂蜜市场以次充好、以假乱真、掺假造假等混乱现象的出现提供一定的参考和指导。在今后的研究中,可以更深入地探索蜂蜜从蜜源花期开始到结束全过程的糖组分变化规律。

参考文献

1 中华全国供销合作总社蜜蜂产品标准化技术委员会秘书处,中国蜂产品协会蜂蜜专业委员会,北京百花蜂业科技发展股份公司. GH/T 18796—2012 蜂蜜[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

2 龚绍安. 生产成熟蜜效益可观[J]. 蜜蜂杂志,2012,32(6):34.

3 陈渊. 生产成熟蜜是“得”还是“失”[J]. 蜜蜂杂志,2011,31(5):44~45.

4 许政,邱泽群,胡军军. 天然成熟蜂蜜及巢蜜[J]. 中国蜂业,2012(4):18~19.

5 鲍敬恒. “追花夺蜜”有感[J]. 蜜蜂杂志,2011,31(1):30.

6 王德安. 天然成熟蜂蜜的困境[J]. 中国蜂业,2009(3):39.

7 Fuente E de la, Ruiz-Matute A I, Valencia-Barrera R M. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1 483~1 489.

8 Brokl, Michal, Soria, et al. Separation of disaccharides by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. Application to honey analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(22): 11 561~11 567.

9 Viviane Maria Rizelio, Laura Tenfen, Roberta da Silveira, et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for deter-

3 结论

本试验通过仪器条件的建立、样品前处理的考察以及实际样品的检测,建立了狗肉中氯化琥珀胆碱的液相色谱串联质谱法。该方法选择性好,回收率高,测定过程简便快速,适用于狗肉中氯化琥珀胆碱的快速检测。但本试验存在较强的基质抑制作用,一定程度上影响了本方法的灵敏度,可以考虑通过改善固相萃取方式或改善色谱条件,从而降低基质抑制作用,进一步提高本方法的检测灵敏度。

参考文献

1 鞠文博,耿业业,高颂,等. 氯化琥珀胆碱对小白鼠及水貂口服毒理学实验[J]. 黑龙江畜牧兽医科技版,2013(3):112~113.

2 畅守鹏,张宏,董晓丽. 氯化琥珀胆碱急性中毒死亡 1 例[J]. 中国法医学杂志,2012,27(3):247

3 蒋明哲,程向炜,褚建新. 氯化琥珀胆碱分析测定的研究进展[J]. 法医学杂志,2013,29(6):451~453.

4 陈祥国,王淑真,吕纪忠,等. 离子色谱法分析生物检材中的氯化琥珀胆碱[J]. 刑事技术,2010(6):17~18.

5 颜鸿飞,欧阳振中,蔡婧怡,等. 肉类食品中乙氧喹啉残留的液相色谱检测及质谱确证[J]. 食品与机械,2012,28(5):83~86.

6 宣宇,孙楠,傅得锋,等. 液相色谱质谱联用检测血液和尿液中的琥珀胆碱及对标样的稳定性评价[J]. 分析实验室,2011,30(8):112~114.

7 张云峰,赵森,王炯. 超高效液相色谱—质谱法分析人全血中的氯化琥珀胆碱[J]. 中国法医学杂志,2013,28(6):475~477.

mination of carbohydrates in honey samples[J]. Talanta, 2012, 93(2): 62~66.

10 Roberto Consonni, Laura Ruth Cagliani, Clelia Cogliati, et al. NMR characterization of saccharides in Italian honeys of different floral sources[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4 526~4 534.

11 Morales V, Corzo N, Sanz M L, et al. HPAEC—PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 922~928.

12 张欣,单杨,李水芳. 基于多元散射校正和偏最小二乘(MSC/PLS)的傅里叶变换近红外光谱检测蜂蜜中还原糖[J]. 食品与机械,2009,25(6):109~112.

13 Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bey MB, et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 561~568.

14 Bentabol Manzanares A, García ZH, Galdón BR, et al. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition[J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 664~672.

15 张志国,王硕,生庆海. HPLC—ELSD 法检测液态奶中的低聚半乳糖[J]. 食品与机械,2011,27(3):68~70.

16 张英,石雪萍,张卫明. HPLC—ELSD 法与 HPLC—RID 法检测蜂蜜中糖分的比较[J]. 中国野生植物资源,2009,28(1):43~47.

17 Elena Venir, Massimiliano Spaziani, Enrico Maltini. Crystallization in “Tarassaco” Italian honey studied by DSC[J]. Food Chemistry, 2010, 122(2): 410~415.