蜂蜜中寡糖的鉴定 Welchrom® HON 蜂蜜专用柱 (2020 版中国药典一部)

1、适用范围

适用于《2020 版中国药典一部》中蜂蜜中寡糖的鉴定。

2、测试原理

试样中的高分子糖，经活性炭-硅藻土柱的富集、浓缩，再用薄层色谱法分离、检测。经过与掺有一定含量的麦芽五糖的纯蜂蜜比较，来判定蜂蜜中寡糖的存在。

3、所需耗材和试剂

标准品： 纯蜂蜜、麦芽五糖

样品：掺假蜂蜜

试剂： 乙醇(分析纯)、正丁醇(分析纯)、乙酸(分析纯)、二苯胺(CAS: 537-67-7)、丙酮(分析纯)、苯胺、磷酸(优级纯)、超纯水。

薄层板：硅胶 G 板 200 mm×200 mm，膜厚 0.25 mm。使用前应画板，画板方法为下端留 2 cm，薄层板的宽度为 2.5 cm，从下端处向上量 3.5 cm 位置画线，此线为 Rf 值，从下端 2 cm 处向上量 10 cm 位置画线，此为爬板终点线，爬过此线视为爬板过程结束。画好板后需要在 110 ºC 恒温干燥箱中活化 1 h 后，

置于干燥器中放冷至室温，备用。

固相萃取柱：月旭 Welchrom® HON 蜂蜜专用柱，规格： 500 mg/12 mL

4、实验步骤

4.1 SPE 前处理步骤

活化：25 mL 水，过柱流速 1 滴/秒；

上样：在 50 mL 烧杯中称取 2 g 试样，精确到 1 mg，溶于 10 mL 水后，缓慢加到月旭 Welchrom® HON 蜂蜜专用柱上；

淋洗：25 mL 7%乙醇水；

洗脱：10 mL 50%乙醇水，收集洗脱液；

浓缩及复溶：收集的洗脱液置于 65 ºC 水浴中减压浓缩至干，残渣加入 30%乙醇 1mL 使之溶

解，作为供试品溶液。(溶解时候要注意确保残渣完全复溶)

麦芽五糖标准溶液的配置：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。

注：1) 整个 SPE 过小柱的前处理过程都需要用固相萃取真空装置，抽取一定的真空度以确保液体能够滴出小柱；

2) 旋蒸浓缩的时候应使用尽可能小体积的茄形瓶，推荐用 25mL 规格，以防止复溶的时候因接触面积过大而损失样品；可以少量多次地添加溶剂进行复溶；

3) 用超纯水活化小柱时，注意在液面下降至

小柱填料上端时，即可添加样品溶液上样，切记活化过程中不能将液面抽干，否则会影响小柱对寡糖的保留效果。

4.2 点板条件：

TLC 板：薄层色谱用硅胶板(涂层厚度 0.2-0.25 mm)

展开剂：正丙醇：水：三乙胺=60 :30 :0.7

显色剂：称取 1.0 g 二苯胺盐酸盐置于盛有 50.0 mL 丙酮的烧杯中，再加入 1 mL 苯胺，混合搅拌，同时加入 5 mL 85%的磷酸，此时会有白色絮状物出现，完全溶解后可以使用，此显色剂要现用现配，各种试剂要按照以上顺序添加。

注：1）显色剂的添加顺序一定要按照顺序添加，不可颠倒。

4.3 具体点板过程

用 10 μL 微量注射器在距离薄层板下端 2 cm 的位置，点上 3.0 μL 的样液，同时另取一块薄层板，点上同样量经过同样处理的纯蜂蜜和麦芽五糖标准溶液作为对照。点样时点越小、越集中爬板效果就越好。然后将其放置在展开槽中(在展开剂中进行展开，使用 250 mL 的广口瓶作为展开缸，加入 10 mL 展开剂即可)，待爬板结束后(一次跑板的时间大约需用时 2.5 h)，用吹风机将薄层板吹干后，均匀喷涂显色剂，再次吹干后，放置到 110 °C 的烘箱中烘烤 20-30 min（烘烤至显色），观察显色后的 TLC 板的效果。

5、实验结果与判断标准

从恒温干燥箱中取出薄层板，观察 TLC 板的显色情况，纯蜂蜜只在 Rf 值 0.35 以上的区域有

2~3 个蓝色中带灰色或咖啡色的斑点，相比较麦芽五糖或混有麦芽五糖的蜂蜜却是从原点开始呈现蓝色带状样的斑点群。

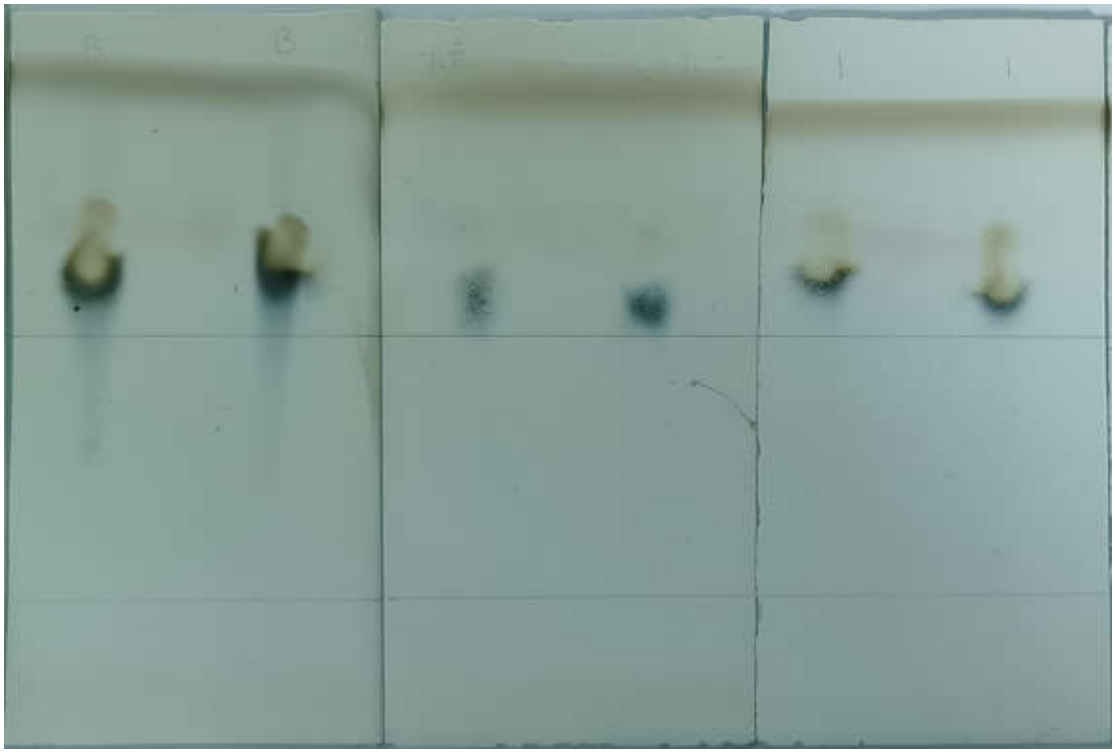

图 1 阳性蜂蜜样品　　图 2 为麦芽五糖标准品　　图 3 为阴性蜂蜜样品