



# Определение углеводного состава меда методом ВЭЖХ

©А.В.Романов, О.Г.Ларионов

Институт физической химии и электрохимии им А.Н.Фрумкина РАН

119991, Москва, Ленинский пр.31, стр.4

Е.Ю. Балашова, П.Б. Коржов

ООО «Аналитический центр Апис», 140150, Московская область, Раменский район, пос. Быково, ул. Верхняя д. 18 А

---

Разработана методика определения фруктозы, глюкозы, сахарозы и мальтозы в меде. Диапазон измерений для каждого сахара составляет 1,0 – 500,0 мг на 1 г меда. Методика может применяться для анализа различных типов меда-сырца и на всех стадиях производственного процесса переработки меда.

---

Разработана методика определения фруктозы, глюкозы, сахарозы и мальтозы в меде. Диапазон измерений составляет 1,0 – 500,0 мг на 1 г меда. Методика может применяться для анализа различных типов меда-сырца и на всех стадиях производственного процесса переработки меда.

## ВВЕДЕНИЕ

Углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза и др.) составляют основную часть пчелиного меда. Их общее содержание достигает 80%. Глюкоза и фруктоза составляют 80-90% от суммы всех сахаридов в созревшем меде, сахароза – до 5% [1, 2]. Оставшиеся 20% общего содержания меда приходятся на долю воды. В меде также обнаружены микроэлементы, витамины, ферменты, флавоноиды и другие биологически активные компоненты [1]. Мед имеет, как правило, кислую среду, т.к. содержит органические (около 0,3%) и неорганические (0,03%) кислоты [1]. Кислоты находятся в меде в свободном и связанном состоянии и попадают в него из нектара, пади, пыльцы, а также образуются в процессе ферментативных процессов и окисления углеводов.

Моносахариды (фруктоза и глюкоза) образуются из сахарозы под действием ферментов, содержащихся в пчелиной слюне [3].

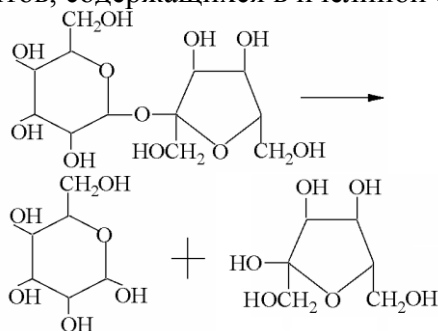


Рис 1. Образование фруктозы и глюкозы из сахарозы под действием ферментов.

Цель данного исследования – разработка и валидация методики определения углеводного состава меда с помощью ВЭЖХ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты и оборудование:

- Жидкостный хроматограф Agilent 1100, укомплектованный дегазатором Degasser G1379A, насосом QuatPump G1311A, автосемплером ALS G1313A, термостатом колонок Colcom G1316A, рефрактометрическим детектором RID G1362A и системой обработки данных Agilent ChemStation Rev. B.01.03.
- Колонка Supelcosil LC-NH2 5micron 4.6x250 mm, "Supelco", USA.
- Микропипетки объемом 100 и 1000 мкл, "VWR", Poland .
- Пипетка объемом 5 мл, "Biohit", Finland.
- Весы аналитические AnD GR-202 (точность 0,00001 г), "AnD", Japan.
- Деионизатор воды Millipore Simplicity, "Millipore", France.
- Ультразвуковая баня S 30 H Elmasonic, "Elma", Germany.
- Фильтр Nylon 0.45 micron 13 mm.
- Фруктоза стандартная, имп.
- Глюкоза стандартная, имп.
- Сахароза стандартная, имп.
- Мальтозы моногидрат стандартный, имп.
- Ацетонитрил УФ – 200 нм для ВЭЖХ "Lecbiopharm", Россия.

### Методика эксперимента.

При разработке методики стандартный раствор готовили по точной навеске. Для обеспечения длительного хранения стандартный раствор смешивали с ацетонитрилом в соотношении 1/1. Рабочие растворы стандартов готовили разбавлением стандартного раствора смесью вода-ацетонитрил 1/1.

При анализе образцов меда растворы готовили следующим образом: 1г исследуемого меда (точная навеска) растворяли в 50 мл деионизованной воды. Раствор перемешивали до полного растворения меда в УЗ – ванне при комнатной температуре в режиме «перемешивание». Затем раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 микрон. Фильтрат смешивали с ацетонитрилом в соотношении 1/1 и анализировали методом ВЭЖХ.

В процессе отработки методики были определены условия анализа:

- режим элюирования изократический, состав подвижной фазы ацетонитрил/вода в объемном соотношении 82/18 без смешения из двух отдельных емкостей. Состав подвижной фазы может варьироваться для достижения полного разделения пиков глюкозы и фруктозы.

Объемная скорость элюирования 1,0 мл/мин.; объем инъекции 10 мкл; температура термостата колонки 35°C; времена удерживания стандартов: - фруктоза –  $6,7 \pm 0,2$  мин, глюкоза –  $7,6 \pm 0,2$  мин, сахароза –  $11,1 \pm 0,2$  мин, мальтоза –  $12,8 \pm 0,2$  мин

Калибровочная зависимость сигнала детектора от содержания каждого углевода была определена в диапазоне концентраций 0,1 – 10,0 мг/мл (соответствует 10 – 1000 г/кг меда) по 6 точкам, для каждой точки было выполнено по 3 измерения. Для примера в Таблице 1 и на рис.1 представлены в результаты калибровки для фруктозы. В указанном диапазоне зависимость линейная с коэффициентом корреляции 0,99995.

Таблица 1.  
 Линейность для концентраций 10-1000 г/кг

Образец	Концентрация пробы (мг/г)	Площадь пика (mRIU*s)
1.1	10,0	7620.5
1.2	10,0	7707.1
2.1	100,0	80775.2
2.2	100,0	86497.3
3.1	300,0	236832.0
3.2	300,0	234736.0
4.1	500,0	424053.0
4.2	500,0	436511.0
5.1	700,0	616744.0
5.2	700,0	622402.0
6.1	1000	857912.0
6.2	1000	857677.0

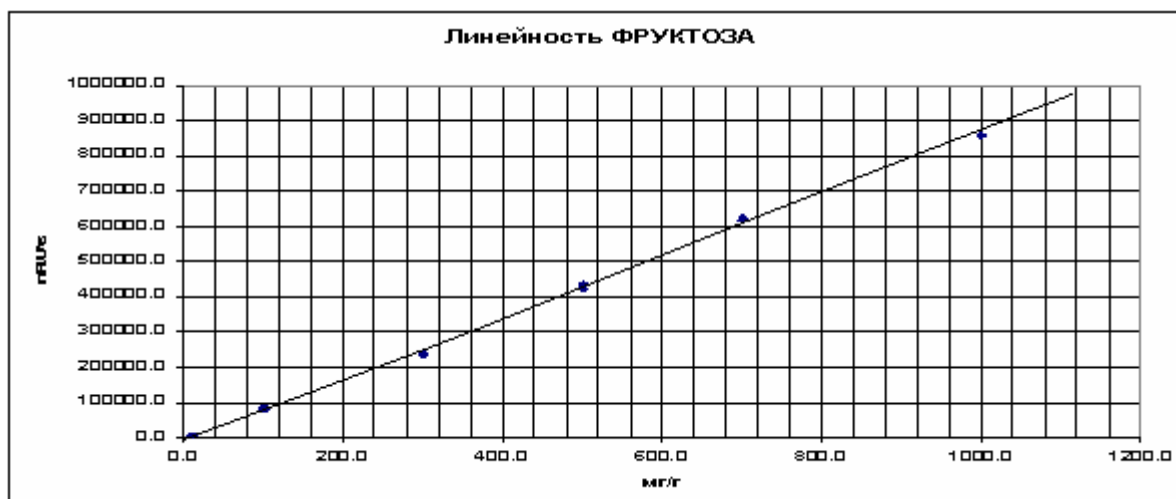


Рис 1. Фруктоза. Линейность для концентраций 10-1000 г/кг.  
 Коэффициент корреляции 0,99995.

Для оценки воспроизводимости результатов для каждого углевода были приготовлены и проанализированы по 5 растворов стандартов с концентрацией 5,0 мг/мл. Каждый раствор хроматографировался 1 раз. Результаты представлены в таблице 2. Относительное стандартное отклонение площадей пиков 5-ти инъекций из разных виал составило 1,8, 1,2, 1,2 и 1,1 % для фруктозы, глюкозы, сахарозы и мальтозы соответственно.

Воспроизводимость результатов для растворов стандартов

Образец	Концентрация пробы (мг/мл)	Площадь пика (nRIU*s) Фруктоза	RetTime (min)	Площадь пика (nRIU*s) Глюкоза	RetTime (min)	Площадь пика (nRIU*s) Сахароза	RetTime (min)	Площадь пика (nRIU*s) Мальтоза	RetTime (min)
1	5.0	424053.0	6.790	411679.0	7.710	431882.0	11.100	391171.0	12.800
2	5.0	436511.0	6.790	418701.0	7.710	439821.0	11.100	395004.0	12.800
3	5.0	432375.0	6.780	411113.0	7.710	444979.0	11.080	392546.0	12.800
4	5.0	420239.0	6.790	413120.0	7.720	433188.0	11.100	399844.0	12.820
5	5.0	419924.0	6.790	422106.0	7.710	438338.0	11.100	388272.0	12.810
Среднее		426620.4	6.8	415343.8	7.7	437641.6	11.1	393367.4	12.8
S(x) Среднеквадратичное отклонение		7468.2	0.0	4828.9	0.0	5293.4	0.0	4361.4	0.0
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение		1.8	0.1	1.2	0.1	1.2	0.1	1.1	0.1
$\Delta x$		19193.2	0.0	12410.3	0.0	13604.0	0.0	11208.8	0.0
$\Delta x_{ср}$		7835.6	0.0	5066.5	0.0	5553.8	0.0	4576.0	0.0

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Описанной выше методикой были проведены анализы четырех видов меда: подсолнечникового, липового, гречишного и цветочного. Типичная хроматограмма подсолнечникового меда представлена на рисунке 2.

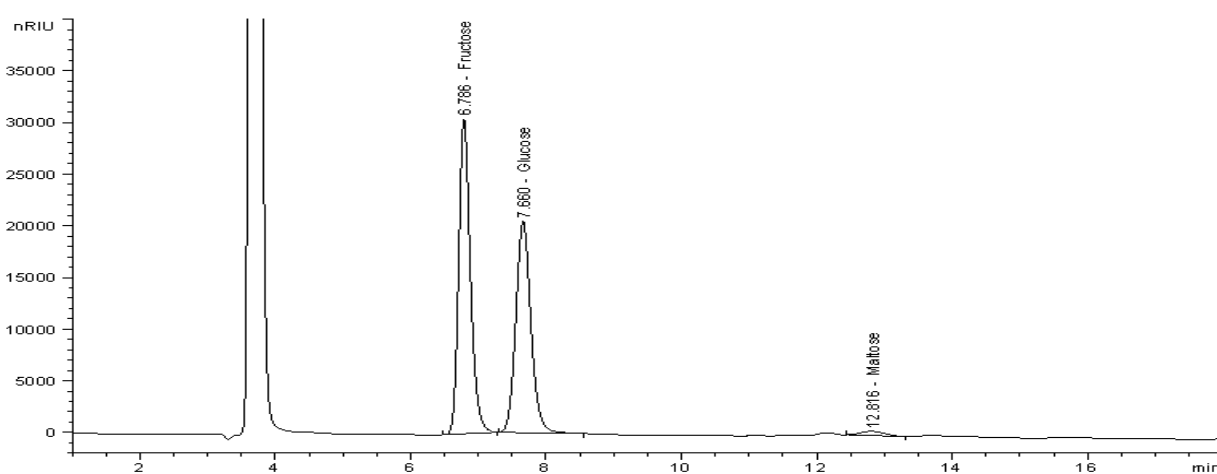


Рис 2. Хроматограмма подсолнечникового меда

Для оценки воспроизводимости результатов были проведены 5 параллельных опытов с растворами одного и того же меда. Результаты представлены в таблице 3. Относительное стандартное отклонение площадей пиков 5 инъекций из разных виал составило 0,268, 0,50 и 2,266% для фруктозы, глюкозы и мальтозы соответственно. Сахароза в представленном образце отсутствовала.

Таблица 3.

## Воспроизводимость результатов

Образец	Мед подсолнечниковый	Площадь пика (nRIU*s) Фруктоза	RetTime (min)	Площадь пика (nRIU*s) Глюкоза	RetTime (min)	Площадь пика (nRIU*s) Мальтоза	RetTime (min)
1		366130.0	6.790	318164.0	7.710	11445.0	12.820
2		365411.0	6.790	320025.0	7.710	10821.0	12.820
3		366028.0	6.780	319115.0	7.710	11214.0	12.800
4		363825.0	6.790	318208.0	7.720	11181.0	12.820
5		366100.0	6.790	322015.0	7.710	10905.0	12.810
Среднее		365498.8	6.8	319505.4	7.7	11113.2	12.8
S(x) Среднеквадратичное отклонение		981.0	0.0	1597.1	0.0	251.8	0.0
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение		0.268	0.066	0.500	0.058	2.266	0.070
$\Delta x$		2521.1	0.0	4104.6	0.0	647.1	0.0
$\Delta x_{ср}$		1029.2	0.0	1675.7	0.0	264.2	0.0

Для оценки извлекаемости углеводов из меда были проведены опыты с добавками по методу «введено/найдено»: к образцам различных медов с известным содержанием углеводов (определено по калибровочному графику) добавили по 0,02, 0,04 и 0,06 г (точная навеска) фруктозы и глюкозы на грамм анализируемого меда. Для каждой добавки готовили по 3 навески исследуемого меда. В качестве примера в таблице 4 и на рисунке 3 представлены данные для подсолнечникового меда. Для других образцов меда получены аналогичные данные.

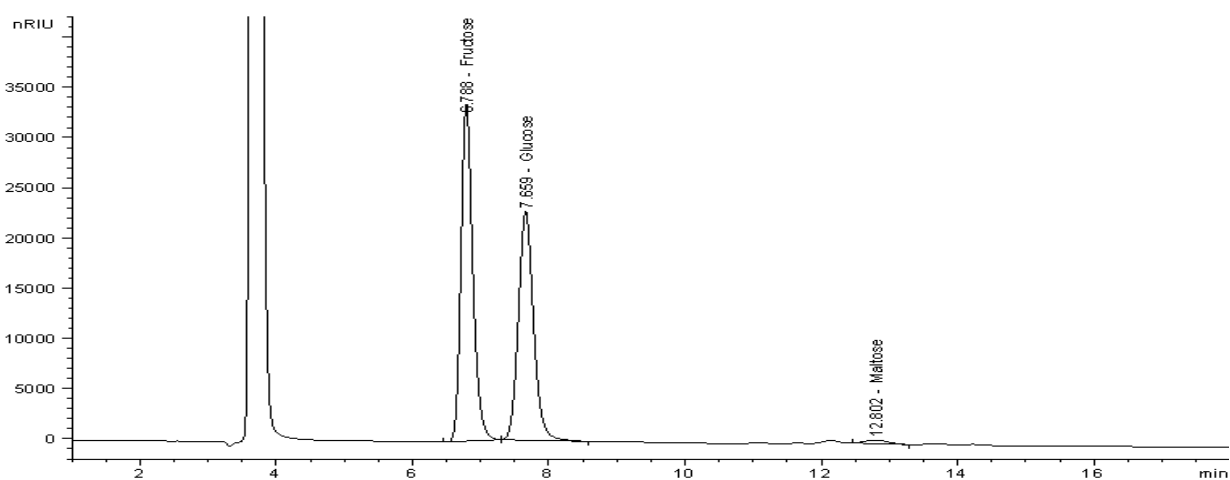


Рис 5. Хроматограмма меда (подсолнечник) с добавкой 0,04 г фруктозы и 0,04 г глюкозы.

Таблица 4.

Результаты анализа извлекаемости углеводов из растворов подсолнечникового меда.

Образец	Подсолнечниковый мед	Площадь пика (nRIU*s) Fructose	Найдено mg/ml	Ret Time (min)	Выход %	Площадь пика (nRIU*s) Glucose	Найдено mg/ml	Ret Time (min)	Выход %
1.1	Исходное содержание мг/мл Фруктоза 4,056 Глюкоза 3,720	378191.0	4.191	6.780	98.473	328039.0	3.838	7.660	97.908
1.2		380648.0	4.217	6.780	99.084	331589.0	3.880	7.660	98.980
1.3		381127.0	4.223	6.780	99.225	330896.0	3.871	7.660	98.750
1.4		381724.0	4.229	6.780	99.366	331463.0	3.877	7.660	98.903
1.5		381505.0	4.227	6.780	99.319	330617.0	3.867	7.660	98.648
Среднее		380639.0	4.217	6.78	99.093	330520.8	3.867	7.66	98.638
S(x) Среднеквадратичное отклонение		1428.1	0.015	0.00		1443.8	0.017	0.00	
Sr(x) Относительное среднеквадр. отклонение		0.4	0.366	0.00		0.4	0.434	0.00	
Δx		3670.3	0.040	0.00		3710.5	0.043	0.00	
Δхср		1498.4	0.016	0.00		1514.8	0.018	0.00	
2.1	Исходное содержание мг/мл Фруктоза 4,056 Глюкоза 3,720	404029.0	4.474	6.780	100.404	353610.0	4.130	7.660	100.243
2.2		403932.0	4.473	6.780	100.382	353064.0	4.130	7.660	100.243
2.3		404139.0	4.476	6.780	100.449	353326.0	4.130	7.660	100.243
2.4		404254.0	4.477	6.780	100.471	353708.0	4.130	7.660	100.243
2.5		404863.0	4.475	6.780	100.426	353006.0	4.130	7.660	100.243
Среднее		404243.4	4.475	6.78	100.426	353342.8	4.130	7.66	100.243
S(x) Среднеквадратичное отклонение		366.7	0.002	0.00		314.7	0.000	0.00	
Sr(x) Относительное среднеквадр. отклонение		0.1	0.035	0.00		0.1	0.000	0.00	
Δx		942.4	0.004	0.00		808.8	0.000	0.00	
Δхср		384.7	0.002	0.00		330.2	0.000	0.00	
3.1	Исходное содержание мг/мл Фруктоза 4,056 Глюкоза 3,720	414599.0	4.591	6.790	98.604	361600.0	4.225	7.660	97.801
3.2		414651.0	4.591	6.790	98.604	360659.0	4.214	7.660	97.546
3.3		414644.0	4.591	6.790	98.604	363594.0	4.248	7.660	98.333
3.4		415309.0	4.598	6.790	98.754	365158.0	4.266	7.660	98.750
3.5		414722.0	4.591	6.790	98.604	361260.0	4.221	7.660	97.708
Среднее		414785.0	4.592	6.79	98.634	362454.2	4.235	7.66	98.028
S(x) Среднеквадратичное отклонение		296.2	0.003	0.00		1870.0	0.022	0.00	
Sr(x) Относительное среднеквадр. отклонение		0.1	0.068	0.00		0.5	0.510	0.00	
Δx		761.3	0.008	0.00		4806.0	0.056	0.00	
Δхср		310.8	0.003	0.00		1962.0	0.023	0.00	

Для остальных анализированных медов получены аналогичные результаты.

Как видно из результатов, приведенных в таблице 4 метод ВЭЖХ показывает хорошее соответствие между введенным и найденным количеством фруктозы и глюкозы.

### Основные характеристики метода

Предел обнаружения метода, мг/г	0,5
Диапазон определяемых концентраций мг/кгг	1,0-500,0
Среднее значение открываемости углеводов %	97-102
Максимально допустимое расхождение между результатами двух параллельных внутрилабораторных определений (сходимость), при $p=0,95$ , %	7

## ВЫВОДЫ

Разработана методика определения углеводного состава меда. Она пригодна во всем необходимом диапазоне концентраций и предназначена для анализа меда-сырца и контроля качества меда на всех стадиях промышленной переработки.

## Список литературы

1. Crane, E.// A book of honey. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, Melbourne 1975
2. ГОСТ 19792-2001 Мед натуральный. Технические условия
4. Bogdanov, S., Lullmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Persano Oddo, L., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Moriot, M., Lhereiter, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., D'Arcy, B., Mossel, B. and Vit, P.//Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 108-125. 1999
5. EU Council// Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities L10, 47-52 (2002)