

高效液相色谱—蒸发光散射检测法 测定果汁中单糖的含量

刘倩¹, 康如龙¹, 苏小建²

(1. 广西师范大学 化学化工学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西师范大学 环境与资源学院, 广西 桂林 541004)

摘要:采用高效液相色谱(HPLC)对西瓜果汁中游离糖进行测定。结果表明:测定糖的最佳条件是色谱柱 CLC-NH₂(M), 流速 1.0 mL/min, 柱温为室温, 流动相为乙腈-超纯水(80:20); 该方法的回收率在 97.88%~99.35%, RSD 为 0.79%~3.62%。该方法简单、快速, 适用于检测果汁中游离糖的含量。

关键词:西瓜; 游离糖; 高效液相色谱

中图分类号:TS 255.44 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)21-0036-03

西瓜属葫芦科 1a 生蔓生草本。不仅生津止渴、营养丰富, 而且有很高的药用价值。西瓜是解暑的良药, 夏天常食能预防中暑, 对其它温热病也有辅助治疗作用^[1]。西瓜含糖量高, 糖是功能食品的辅料, 常应用到各类食品工业中。其中较为常用的有果糖、葡萄糖、蔗糖等。目前食品中涉及糖的项目, 多以还原糖或总糖来表示。因此, 建立一个快速、简便、准确的方法测定食品中各种糖分的含量, 对于评价食品的质量具有非常重要的意义^[2]。

目前, 关于游离糖的检测方法有化学法^[3]、酶电极法^[4]、气相色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6-7]、高效液相色谱法^[8-13]等。对于糖类物质的定量检测, 近年来常用气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)分析^[14-17], 由于糖类物质不含生色基团, 常规的 HPLC 检测方法对其进行直接检测比较困难^[18]。蒸发光散射检测器(ELSD)是一种质量型通用性检测器, 它消除了常见于传统 HPLC 检测方法中的难点, 不同于紫外和荧光检测器, ELSD 的响应不依赖于样品的光学特性, 任何挥发性低于流动相的样品均能被检测, 不受其官能团的影响。因此对无紫外吸收或紫外末端吸收的大分子化合物检测具有极大的优势^[19]。该研究试图建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)快速测定西瓜中的游离糖的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为市售西瓜。LC-10A 型高效液相色谱仪(配有 LC-10ATVP 型输液泵及 SIL-10ADVP 型自动进样器, 日本岛津公司); CLASS-VP 色谱工作站(日本岛津公司); SEDEX75 蒸发光散射检测器(配有卤素光源和光电倍增管, 上海智岩科学仪器有限公司); SB4200DT 型超声波清洗仪(武汉世纪超杰实验仪器有限公司)。乙腈(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 高纯水, 自制; 果糖、葡萄糖、蔗糖(纯度均≥99.0%)由日本进口生化试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 西瓜汁样品溶液的制备 西瓜, 成熟度均匀。去皮, 去籽, 切成小块, 台秤称得 50.00 g, 榨汁后转移至 1 000 mL 容量瓶中, 用高纯水定容, 超声震荡 15 min(功率比:99%; 温度:50℃), 然后用无菌瓶分装, 4℃保存备用。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: SHIM-PACKCLC-NH₂(M); 流动相: A 泵乙腈, B 泵高纯水(比例为 80:20); 流速 1.0 mL/min; 柱压力 5.5 MPa; 柱温: 室温; 进样量 10 μL; 分析时间 20 min; ELSD 雾化室温度为 40℃, 漂移管温度为 70℃, 氮气压力为 5.5 MPa。

1.2.3 标准溶液的配制与检测 分别称取果糖 0.3007 g、葡萄糖 0.5127 g、蔗糖 0.4031 g, 用高纯水充分溶解, 定容至 100 mL, 用高效液相色谱仪检测, 谱图如图 1 所示。

2 结果与分析

2.1 定性分析

在相同色谱条件下, 将样品色谱图与标准糖溶液的色谱图对比, 根据保留时间确定样品中的游离糖种类, 根据峰面积确定其浓度。由图 2 可知, 通过与标准样品

第一作者简介:刘倩(1988-), 女, 在读硕士, 研究方向为天然产物研究与开发。E-mail: liuqian1118@126.com.

责任作者:苏小建(1957-), 男, 本科, 教授, 硕士生导师, 研究方向为天然产物研究与开发。E-mail: xiaojiangsu@163.com.

基金项目:广西专项科研基金资助项目。

收稿日期:2012-06-27

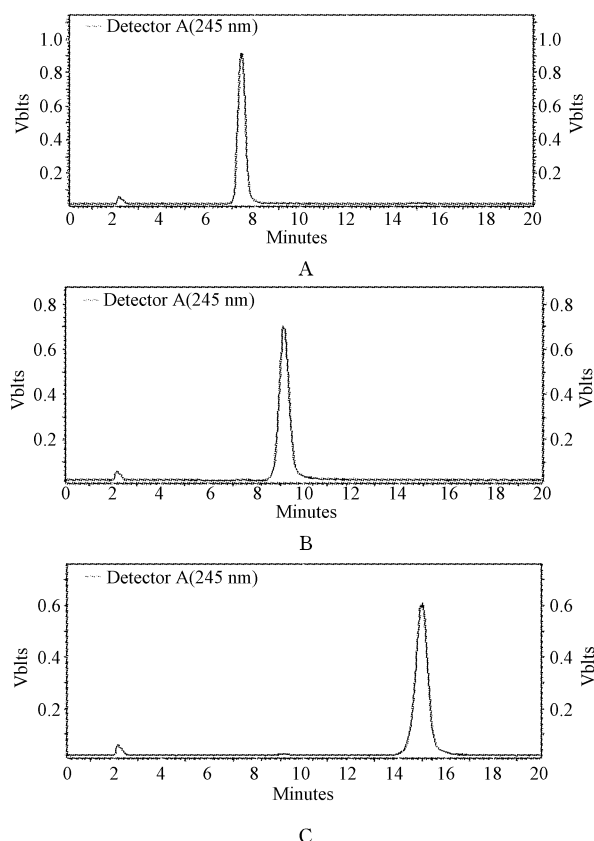


图1 标准溶液谱图

注:A:果糖;B:葡萄糖;C:蔗糖。

保留时间对比可确定西瓜溶液中的游离糖成分:保留时间在 7.325 min 处为果糖, 8.883 min 为葡萄糖, 14.576 min 处为蔗糖。

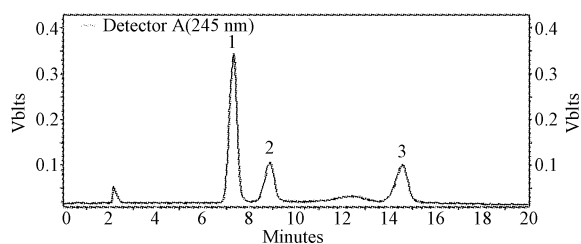


图2 西瓜果汁样品溶液谱图

注:1:果糖;2:葡萄糖;3:蔗糖。

2.2 标准曲线的绘制

分别准确移取不同浓度的标准溶液,进样 10 μL ,测定各标准品的峰面积,以 3 倍信噪比(S/N)计算检出限。各标准品的回归方程、线性相关系数和检出限结果见表 1。由表 1 可知,3 种游离糖的线性相关系数表以溶液浓度与峰面积呈现良好的线性关系;3 种糖的检出限均比较低,说明此方法用于果糖、葡萄糖、蔗糖的检测灵敏度较高。

表1 线性回归方程和检出限

标准品	回归方程	相关系数	检出限/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
果糖	$A=1.02084E-7C+0.09552$	0.9973	0.062
葡萄糖	$A=1.32552E-7C+0.17167$	0.9970	0.039
蔗糖	$A=1.04620E-7C+0.13886$	0.99967	0.068

2.3 加标回收率和精密度试验

取相同的 2 份西瓜汁样品溶液,1 份作本底,另 1 份分别添加一定量的 3 种糖的标准品溶液后测定成分含量。每份样品平行测定 5 次,考察测定方法的平均回收率和精密度,结果见表 2。由表 2 可知,该方法的回收率在 97.88%~99.35%;RSD 为 0.79%~3.62%,表明该分析方法准确、精密度高,重现性良好。

表2 回收率及精密度试验

样品成分	样液中的含量 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	加标量 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	加标实测量 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 $/\%$	相对标准偏差 RSD/ $\%$
果糖	4.3761	3.34	7.5540	97.88	0.0079
葡萄糖	2.6666	1.67	4.2659	98.22	0.0272
蔗糖	2.3847	0.55	2.4268	99.35	0.0362

3 结论与讨论

该研究确定了测定西瓜汁中游离糖的色谱条件:色谱柱:SHIM-PACK CLC-NH₂(M);流动相:乙腈-超纯水(80:20);检测器:蒸发光散射检测器(雾化室温度为 40℃,漂移管温度为 70℃,氮气压力为 5.5 MPa);流速:1.0 mL/min;柱温:室温。在该条件下,可以较好地定性定量分析西瓜汁的游离糖成分。

该方法具有灵敏度高、检测组分多、检测速度快等优点,且线性范围良好、重现性好、回收率高,分析结果可靠,可广泛应用于果汁饮料的质量控制。该研究测定出西瓜汁中含有可溶性糖主要有果糖、葡萄糖和蔗糖,其含量及比值是否可以作为评价西瓜汁中主要营养成分和风味的重要指标有待进一步研究。

参考文献

- [1] 华景清,蔡健.西瓜的营养与药用价值[J].食品与药品,2005,7(6A):67-68.
- [2] 朱群英,江勇,甘钰. HPLC-ELSD 法同时测定食品中 5 种糖[J].食品科学,2008,29(12):503-506.
- [3] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.8-1985 食品中蔗糖和还原糖的测定[S].北京:中国标准出版社,1985.
- [5] 李汉平.毛细管柱气相色谱法分析测定玉米皮渣的糖分组成[J].色谱,1988,6(4):255.
- [6] 傅崇岗,单瑞峰,苏昌华.毛细管电泳电化学检测法测定枣中糖类物质[J].食品科学,2003,24(12):91-94.
- [7] 叶建农,金薇,曹志广,等.毛细管电泳法测定市售饮料中糖类物质的研究[J].分析试验室,1999,18(3):23-26.
- [8] 黄红霞.应用高效液相色谱快速测定奶粉中的乳糖、蔗糖、葡萄糖[J].福建轻纺,1999,28(6):1-3.
- [9] 吴黎明,薛晓峰,周晓,等.蜂花粉中糖的高效液相色谱分析[J].食品科学,2008(6):335-338.
- [10] 张秀梅,杜丽清,谢江辉,等.高效液相色谱法测定菠萝果实中的糖分[J].食品科学,2007(11):450-452.
- [11] 莫海涛,李永库,潘发用,等.高效液相色谱-激光蒸发光散射检测法测定低蔗糖食品中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖含量[J].食品工业科技,2006(3):186-187.
- [12] 王艳颖,胡文忠,庞坤,等.高效液相色谱-蒸发光散射法测定苹果

中可溶性糖的含量[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(6): 129-131.

[13] 杨俊, 刘江生, 蔡继宝, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟草中的水溶性糖[J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1596-1698.

[14] Wim J B W, John H M H, Chyis D, et al. HPLC detection of soluble carbohydrates involved in mannitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(2): 287-291.

[15] Giuseppe Z, Lorenza C, Vincenzo G. Determination of organic acids, sugars, diacetyl and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatogra-

phy[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 2722-2726.

[16] 江和源, 陈小强, 寇小红, 等. 茶多糖的分级纯化及组分分析[J]. 茶叶科学, 2007, 27(3): 248-252.

[17] 陈智毅, 廖森泰, 刘学铭, 等. 白金针菇子实体的单、双糖组成及其含量分析[J]. 食用菌学报, 2008, 15(2): 57-60.

[18] 徐瑾, 张庆合, 张维冰, 等. 液相色谱荧光衍生法在糖类物质分析中的应用[J]. 色谱, 2003, 21(2): 115-120.

[19] 魏洪, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术[J]. 色谱, 2000, 18(5): 398-401.

Research on Free Sugars of Juice By HPLC-ELSD

LIU Qian¹, KANG Ru-long¹, SU Xiao-jian²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 2. College of Environment and Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: Using HPLC method to determine the free sugars in watermelon juice. The optimum condition was as follows: Chromatographic column CLC-NH₂(M), flow rate 1.0 mL/min, column under the condition of room temperature and the mobile phase consisted of an aqueous solution of acetonitrile-ultra pure water (80 : 20). The results showed that this method expressing high average recoveries ranged from 97.88% to 99.35% and good precision ranged from 0.79% to 3.62%. Free sugars in juice can be determined rapidly and effectively in this way.

Key words: watermelon; free sugars; HPLC

知识窗

高效液相色谱法

高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)又称“高压液相色谱”、“高速液相色谱”、“高分离度液相色谱”、“近代柱色谱”等。高效液相色谱是色谱法的一个重要分支,以液体为流动相,采用高压输液系统,将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,在柱内各成分被分离后,进入检测器进行检测,从而实现了对试样的分析。该方法已成为化学、医学、工业、农学、商检和法检等学科领域中重要的分离分析技术。

1906年俄国植物化学家茨维特首次提出“色谱法”和“色谱图”的概念。他在论文中写到:“一种植物色素的石油醚溶液从一根主要装有碳酸钙吸附剂的玻璃管上端加入,沿管滤下,后用纯石油醚淋洗,结果按照不同色素的吸附顺序在管内观察到它们相应的色带,就象光谱一样,称之为色谱图”。1930年以后,相继出现了纸色谱、离子交换色谱和薄层色谱等液相色谱技术。1952年,英国学者 Martin 和 Synge 基于他们在分配色谱方面的研究工作,提出了关于气-液分配色谱的比较完整的理论和方法,把色谱技术向前推进了一大步,这是气相色谱在此后的 10 多年间发展十分迅速的原因。1958年,基于 Moore 和 Stein 的工作,离子交换色谱的仪器化导致了氨基酸分析仪的出现,这是近代液相色谱的一个重要尝试,但分离效率尚不理想。1960年中后期,气相色谱理论和实践的发展,以及机械、光学、电子等技术上的进步,液相色谱又开始活跃。到 20 世纪 60 年代末期把高压泵和化学键合固定相用于液相色谱就出现了 HPLC。20 世纪 70 年代中期以后,微处理机技术用于液相色谱,进一步提高了仪器的自动化水平和分析精度。1990 年以后,生物工程和生命科学在国际和国内的迅速发展,为高效液相色谱技术提出了更多、更新的分离、纯化、制备的课题,如人类基因组计划,蛋白质组学有 HPLC 作预分离等。

高效液相色谱法的特点:一是高压。流动相为液体,流经色谱柱时,受到的阻力较大,为了能迅速通过色谱柱,必须对载液加高压;二是高效。分离效能高。可选择固定相和流动相以达到最佳分离效果,比工业精馏塔和气相色谱的分离效能高出许多倍;三是高灵敏度。紫外检测器可达 0.01 ng,进样量在 μL 数量级;四是应用范围广。70%以上的有机化合物可用高效液相色谱分析,特别是高沸点、大分子、强极性、热稳定性差化合物的分离分析,显示出优势;五是分析速度快、载液流速快。较经典液体色谱法速度快得多,通常分析 1 个样品在 15~30 min,有些样品甚至在 5 min 内即可完成,一般少于 1 h。

此外高效液相色谱还有色谱柱可反复使用、样品不被破坏、易回收等优点,但也有缺点,与气相色谱相比各有所长,相互补充。高效液相色谱的缺点是有“柱外效应”。在从进样到检测器之间,除了柱子以外的任何死空间(进样器、柱接头、连接管和检测池等)中,如果流动相的流型有变化,被分离物质的任何扩散和滞留都会显著地导致色谱峰的加宽,柱效率降低。高效液相色谱检测器的灵敏度不及气相色谱。