

蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖 NMR 定量分析研究

阎政礼¹, 杨明生^{2,*}, 李添宝², 冯志明²

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410006; 2. 湖南师范大学化学化工学院, 湖南 长沙 410081)

摘 要: 采用核磁共振波谱分析技术, 确定了蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖在重水中的各种构型, 归属了蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖的质子核磁共振谱的主要特征峰, 以邻苯二甲酸氢钾作内标, 同时对蜂蜜中上述三种主要糖进行了定量分析。葡萄糖、果糖和蔗糖测定结果的相对标准偏差分别为 0.33%、0.17%、1.34%, 回收率分别为 96.68%、98.03%、95.56%。该法取样量少, 直接定量, 所得结果重现性好、准确度高, 为蜂蜜的质量标准研究提供一种简单可行的方法。

关键词: 核磁共振; 蜂蜜; 葡萄糖; 果糖; 蔗糖; 测定

Quantitative Analysis of Glucose, Fructose and Sucrose in Honey by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

YAN Zheng-li¹, YANG Ming-sheng^{2,*}, LI Tian-bao², FENG Zhi-ming²

(1. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410006, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Various configurations of glucose, fructose and sucrose in honey were determined by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy when dissolved in heavy water, their main characteristic peaks in the ¹H-NMR spectrum were attributed, and their contents was measured with potassium biphthalate as an internal standard. The RSDs of determination of glucose, fructose and sucrose were 0.33%, 0.17% and 1.34%, respectively, and mean recoveries for them in spiked honey were 96.68%, 98.03% and 95.56%, respectively. This method can be applied to direct determination of small-amount samples with stable and repeatable results and high precision for study of quality standards of honey.

Key words: nuclear magnetic resonance (NMR); honey; glucose; fructose; sucrose; determination

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0253-03

糖类是蜂蜜的最主要组成部分, 蜂蜜中糖分以单糖为主, 双糖次之, 还含有少量三糖及低聚糖。蜂蜜中糖分含量约为 69%~86%, 其中果糖含量约为 32%~46%、葡萄糖含量约为 25%~37%、蔗糖含量约为 0~5%。测定蜂蜜中糖的传统方法有多种, 如: 测总含糖量的方法有硫酸-酚法^[1]、蒽酮比色法^[2]等, 测还原糖含量方法有铁氰化钾法^[3]、3,5-二硝基水杨酸法^[4]等。硫酸-酚法和蒽酮比色法都须加酸、加热处理糖, 使之脱水产生糠醛或羟甲基糠醛, 而与酚类化合物或蒽酮反应生成有色物质, 在生成物产生过程中, 温度、酸度等都会影响糠醛或羟甲基糠醛的转化率, 糖类不同, 转化率也不一样, 误差较大。铁氰化钾法滴定必须在沸腾条件下进行, 反应液碱度、热源强度、煮沸时间、滴定速度和终点误差等操作因素对测定结果影响很大,

甚至相同的人操作, 两次滴定结果都相差较远。3,5-二硝基水杨酸法测糖须在碱性条件下加热, 还原糖才能将 3,5-二硝基水杨酸还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸, 碱度和温度影响实验结果, 产生较大误差。应用铁氰化钾法和 3,5-二硝基水杨酸法测总糖时, 还须用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖降解成有还原性的单糖, 然后进行测定, 这个过程同样涉及到温度、酸碱度等影响因素, 且操作繁琐。若选用传统方法来检测蜂蜜, 不但步骤多、操作复杂, 且偏差较大, 给蜂蜜标准制定带来很多不便。

本实验通过多种核磁共振技术, 确认了蜂蜜在用重水作溶剂时葡萄糖和果糖的主要构型^[5]。根据蜂蜜、葡萄糖、果糖、蔗糖的 ¹H-NMR 谱、H-H COSY 谱、¹³C-NMR 谱、DEPT 谱、HSQC 谱、HMBC 谱, 归属了

收稿日期: 2008-09-23

作者简介: 阎政礼(1966—), 男, 实验师, 硕士, 主要从事食品卫生研究。E-mail: yanzhengli168@sina.com

* 通讯作者: 杨明生(1956—), 男, 副教授, 学士, 主要从事有机波谱研究。E-mail: ymshal@126.com

蜂蜜中三种主要糖及其差向异构体用于定量分析的相关质子特征峰。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

市购保质期内正品蜂蜜两种。

葡萄糖、果糖、蔗糖、邻苯二甲酸氢钾均为分析纯；重水(氘代度：99.8%) 中科院武汉分院；4,4-二甲基硅代戊磺酸钠(DSS)。

AVANCE 500MHZ超导傅立叶变换核磁共振仪 瑞士 Bruker 公司；Sartorius 电子天平；5mm 核磁共振样品管。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

称取约 80mg 蜂蜜至 5mm 的核磁共振样品管中，用于作蜂蜜的谱图。

准确称取约 20mg 邻苯二甲酸氢钾及约 80mg 蜜样 2，测试后加约 30mg 葡萄糖，用于测试葡萄糖的回收率。

准确称取约 20mg 邻苯二甲酸氢钾及约 80mg 蜜样 2，测试后加约 30mg 果糖，用于测试果糖的回收率。

准确称取约 10mg 邻苯二甲酸氢钾及约 80mg 蜜样 2，测试后加约 4mg 蔗糖，用于测试蔗糖的回收率。

准确称取约 20mg 邻苯二甲酸氢钾及约 80mg 蜜样 1，用于样品测试。

准确称取约 20mg 邻苯二甲酸氢钾及约 80mg 蜜样 2，用于样品测试及精密度实验。

以上准确称取的样品都精确到 0.1mg，样品管中均加 0.5ml 重水溶解，制作谱图时样品加约 1mg DSS 作为确定化学位移零点的内标物。

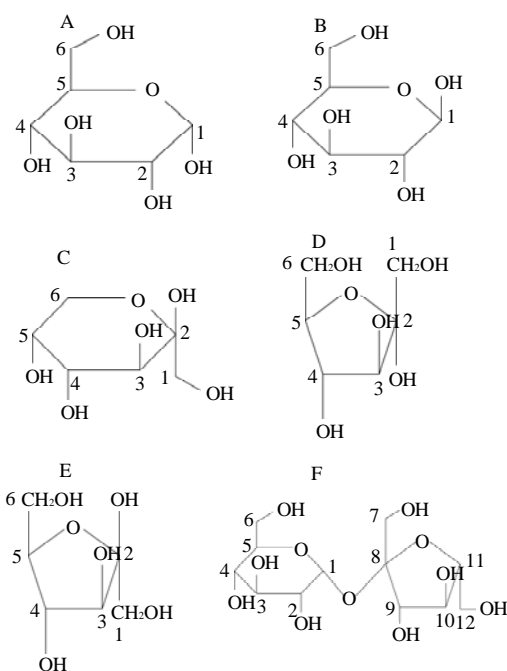
1.2.2 蜂蜜 ^1H -NMR 测定条件

将制好的样充分振摇，待样品及标准完全溶解，放置 10min，待溶液形成稳定构型后进行测定。每次测定都进行调谐、匀场，测定条件控制在：温度：300K，500MHZ 核磁共振仪频率：500.13MHz；氢谱谱宽：5376.344Hz；扫描次数：64；空扫次数：2；每个核磁样品管测量 6 次。谱图处理时以 DSS 确定化学位移零点。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖、果糖和蔗糖在重水中构型的确认

首先测定蜂蜜、葡萄糖标样、果糖标样和蔗糖标样的 ^1H -NMR 谱、H-H COSY 谱、 ^{13}C -NMR 谱、DEPT 谱、HSQC 谱、HMBC 谱，证实蜂蜜中存在 α -D-吡喃葡萄糖和 β -D-吡喃葡萄糖两种葡萄糖构型，与资料对照一致。天然的葡萄糖，无论是游离的或是结合的，均属 D 型，在水溶液中主要以吡喃式构型含氧环存在，为 α 和 β 两种构型的衡态混和物，链式含量极少，通过链式达到互变平衡。



A. α -D-吡喃葡萄糖；B. β -D-吡喃葡萄糖；C. β -D-吡喃果糖；D. α -D-呋喃果糖；E. β -D-呋喃果糖；F. 蔗糖。

图1 葡萄糖、果糖和蔗糖在重水中构型

Fig.1 Configurations of glucose, fructose and sucrose in D_2O

同样，通过以上谱可以归属出果糖构型，首先可以归属出果糖构型中高含量的一种，证明它为 β -D-吡喃果糖，这与资料[5]所讲蜂蜜中果糖主要是 β -D-吡喃果糖一致。再通过以上谱可以归属出 α -D-呋喃果糖和 β -D-呋喃果糖两种构型。次低含量为 β -D-呋喃果糖，最低含量为 α -D-呋喃果糖，这一点从蜂蜜和果糖标样的碳、氢谱可以得到证实。果糖在水溶液中同样存在环式和链式互变平衡体系，平衡混合物中除有两种吡喃型果糖外，还有两种呋喃型果糖。蜂蜜中果糖主要以 β -D-吡喃果糖、 α -D-呋喃果糖和 β -D-呋喃果糖三种构型存在，与文献报道的构型及相对含量相符。

通过蔗糖标样的 ^1H -NMR 谱、H-H COSY 谱、 ^{13}C -NMR 谱、DEPT 谱、HSQC 谱、HMBC 谱，可以对蔗糖进行归属， α -D-吡喃葡萄糖环上 1-C 与 β -D-呋喃果糖 8-C 通过氧原子连接起来，在重水只有一种构型。

2.2 葡萄糖、果糖和蔗糖 ^1H -NMR 谱特征峰的确认

蜂蜜的 ^1H -NMR 谱中，从低场到高场，如图 2， δ 5.389 归属为蔗糖 1-H，受蔗糖 2-H 的耦合而裂分为双峰，耦合常数 $^3J_{\text{H-H}}=4.1\text{Hz}$ 。 δ 5.217 归属为 α -D-吡喃葡萄糖的 1-H(端基质子)，受 2-H 的耦合而裂分为双峰，耦合常数 $^3J_{\text{H-H}}=3.8\text{Hz}$ 。 δ 4.628 归属为 β -D-吡喃葡萄糖的 1-H(端基质子)，受 2-H 的耦合而裂分为双峰，耦合常数 $^3J_{\text{H-H}}=8.0\text{Hz}$ 。 δ 4.1 两重峰归属为 α -D-呋喃果糖 3-H 和 β -D-呋喃果糖 3-H、4-H。 δ 4.018 单峰归属为 β -D-吡喃果糖 6-H 上一个质子两重峰中一个峰。 δ 3.993 归属为 β -D-吡喃果糖 6-H 的一个质子两重峰中另一个峰与 α -D-呋喃果

糖 4-H 两个峰中一个峰。 δ 3.976 单峰归属为 β -D-吡喃果糖 5-H 与 α -D-呋喃果糖 4-H 两个峰中另一个峰。

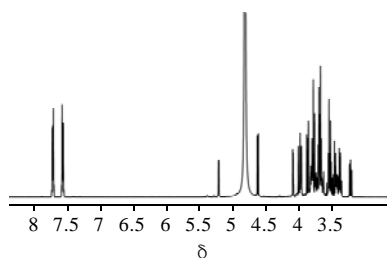


图2 蜂蜜加内标的¹H-NMR谱

Fig.2 ¹H-NMR spectrum of honey spiked with internal standard

2.3 定量内标物的选择

由于邻苯二甲酸氢钾容易获得很高的纯度且易溶于水,在化学分析中常用于酸碱滴定的标准物。在重水中,邻苯二甲酸氢钾的氢谱在 δ 7.5~7.8的低场范围内有两组多重峰不与其他峰相重叠,任选一组峰进行积分都为两个质子。

2.4 葡萄糖、果糖、蔗糖含量的计算公式

利用吸收峰面积与氢质子数成正比,通过加入标准物作内标,可以准确求出蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖含量(mg)。葡萄糖的积分值为 α -D-吡喃葡萄糖及 β -D-吡喃葡萄糖的端基质子积分值之和,若要计算葡萄糖两种构型比值,可计算两种构型积分比。果糖积分值为 β -D-吡喃果糖、 α -D-呋喃果糖和 β -D-呋喃果糖三种构型积分值之和,果糖四个峰正好包含了果糖三种构型,每种构型两个质子,因此,计算果糖含量时应除以2。蔗糖的积分值即为 α -D-吡喃葡萄糖环上1-H的积分值。

$$W_s = \frac{A_s/n_s}{A_R/n_R} \times \frac{M_s}{M_R} \times W_R$$

式中: W_s 为样品质量; A_s 为样品质子吸收峰面积; n_s 为样品吸收峰所包含质子数; W_R 为标准质量; A_R 为标准质子吸收峰面积; n_R 为标准吸收峰所包含质子数; M_s 为样品摩尔质量; M_R 为标准摩尔质量;其中S为葡萄糖、果糖和蔗糖; R 为邻苯二甲酸氢钾。

$M_{\text{葡萄糖}} = 180$; $M_{\text{果糖}} = 180.13$; $M_{\text{蔗糖}} = 342.3$;
 $M_{\text{邻苯二甲酸氢钾}} = 204.23$ 。

2.5 精密度实验

表1 精密度计算结果

Table 1 Precision of the determination of glucose, fructose and sucrose by this method

项目	测定结果(%, n=6)						平均值 (%)	标准偏 差(%)	相对标准 偏差(%)
葡萄糖	32.93	32.62	32.68	32.71	32.7	32.67	32.72	0.1083	0.33
果糖	40.39	40.46	40.44	40.30	40.5	40.39	40.41	0.06976	0.17
蔗糖	1.91	1.93	1.91	1.86	1.93	1.91	1.91	0.02563	1.34

测试时,将样品进行6次平行测定,按照公式计算蜂蜜中葡萄糖、果糖、蔗糖的百分含量,取6次平

均值,计算平均值、标准偏差和相对标准偏差,结果如表1所示。

从表1可以看出:葡萄糖、果糖和蔗糖测定结果的相对标准偏差分别为0.33%、0.17%、1.34%,多次测定结果接近,相对标准偏差亦在允许范围内,说明定量的精密度较满意。

2.6 加标回收率实验

测试时,每个样品添加标准品前测试6次,添加标准品后测试6次,取葡萄糖、果糖和蔗糖添加前后的量的均值,计算三种主要糖的回收率,其结果见表2。

表2 加标回收率实验结果

Table 2 Recoveries for glucose, fructose and sucrose in spiked honey

项目	加标6次测定结果(mg)						添加前量(mg)	添加量(mg)	回收率(%)
葡萄糖	60.77	60.80	60.86	60.80	60.75	60.84	30.93	30.9	96.68
果糖	58.83	58.86	58.90	58.93	58.77	58.95	29.66	29.8	98.03
蔗糖	6.34	6.32	6.42	6.38	6.35	6.29	2.05	4.5	95.56

由表2可以看出:葡萄糖回收率为96.68%,果糖回收率为98.03%,蔗糖为95.56%。实验达到了回收的目的,这说明核磁共振法测定蜂蜜准确度高,分析测定结果可靠性强。

2.7 蜂蜜中三种糖测试结果

每种蜂蜜取样2次,即 A_1 、 A_2 、 B_1 、 B_2 ,测试时,每个样测六次,取其均值,结果如表3。从表3可看出:两种蜂蜜测定结果接近葡萄糖、果糖和蔗糖的实际含量,该法被成功运用于检测蜂蜜。

表3 蜂蜜中三种糖测试结果

Table 3 Contents of glucose, fructose and sucrose of sugar in honey determined by this method

样品	平行样	葡萄糖(%)	果糖(%)	蔗糖(%)
1	A_1	32.72	40.41	1.91
	A_2	32.60	40.19	1.97
2	B_1	36.65	38.01	2.05
	B_2	36.83	38.2	2.10

3 结 论

采用核磁共振波谱分析技术可以同时检测蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖的含量。葡萄糖、果糖和蔗糖测定结果的相对标准偏差分别为0.33%、0.17%、1.34%,回收率分别为96.68%、98.03%、95.56%。该法具有操作简便、快速,重现性好、准确度高等优点。

参考文献:

- [1] 杨若明,钱文涛,刘春兰,等.藏药延根中粗多糖提取和含量分析[J].延边大学学报,2006,32(1): 36-38.
- [2] 魏晓明,符红,万幼平.流酸乙酰比色法测定鹿龟酒中多糖的含量[J].中成药,2000,22(5): 380-382.
- [3] 李凤玉.用铁氯化钾法测定王浆中总糖含量[J].养蜂科技,2005(3): 5-6.
- [4] 陈齐英,孙雪其,徐晓霞.3,5-二硝基水杨酸比色法测定壳菌口服液中多糖的含量[J].华西药杂志,2000,15(3): 193-194.
- [5] PRETSCH E, BUHLMANN P, AFFOLTER C.波谱数据表:有机化合物的结构解析[M].荣国斌,译.上海:华东理工大学出版社,2002: 152-237.