

高效液相色谱法测定食品中的单糖、双糖

刘玉峰¹, 李黎¹, 李东¹, 王晶², 方向², 吴方迪²

(1. 北京市营养源研究所分析室, 北京 100069 2. 国家标准物质研究中心, 北京 100013)

摘要: 本文建立了高效液相色谱法定量测定食品中的单糖、双糖, 确定的色谱条件如下: Waters NH₂ 氨基色谱柱(250mm × 4.6mm), 乙腈:水 85:15(V/V)为流动相, 流速 1.0ml/min, 示差折光检测器, 40℃柱温, 进样量 10μl, 外标法定量。该方法的精密度 RSD < 5%, 回收率大于 97%。在此色谱条件下 20min 内完成了单糖、双糖的分离, 结果比较理想。研究表明此新建方法准确而快速, 并能适用于多数食品中单糖、双糖的测定。

关键词: 高效液相色谱; 单糖、双糖; 食品

Determination of Monosaccharide and Disaccharide in Foods by HPLC Method

LIU Yu-feng¹, LI Li¹, LI Dong¹, WANG Jing², FANG Xiang², WU Fang-di²

(1. Laboratory Department, Beijing Research Institute for Nutritional Resources, Beijing 100069, China

2. National Research Center for Standard Substances, Beijing 100013, China)

Abstract: HPLC method was established to determine the monosaccharide and disaccharide in foods. The chromatographic conditions are as follows: Waters amino chromatographic column with refractive index detector, elution influent methanol:water (V/V) 85:15, flowrate 1.0ml/min and injection volume 10μl. The repeatability relative standard deviation of this method is below 5% and the recovery is over 97%. A satisfactory result is obtained under these optimum conditions, and the whole separation can be finished with in 20min. The results showed that this new HPLC analysis method is both correct and fast enough to be used in most kinds of foods contained monosaccharide and disaccharide.

Key words: HPLC; monosaccharide and disaccharide; foods

中图分类号: 0652.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0293-04

随着人们健康意识的日益增强, 过多地摄入蔗糖有可能会引起肥胖、龋齿、糖尿病等疾病的发生已成共识, 许多发达国家与发展中国家在他们的“国民健康指南”中, 无一例外地都劝告国民限制对蔗糖的摄入, 因此对于糖的准确定量也极为迫切。本文建立的高效液相色谱法正是克服了还原糖法专一性差的缺点, 采用外标法定量, 实现了对样品中 6 种单、双糖的准确定量。其中单糖包括葡萄糖、果糖、木糖; 双糖包括蔗糖、麦芽糖、乳糖。基于美国 FDA 将营养标签^[10]中的糖(sugars)定义为所有游离单糖、双糖(如葡萄糖、果糖、乳糖和蔗糖)的总和, 因此该方法也适用于营养标签中糖的含量测定。

1 材料与方法

1.1 样品

糕点类 5 种, 谷物类 9 种, 饮料类 2 种, 水果 1 种, 乳制品 2 种, 豆制品类 1 种, 糖浆类 2 种, 其它 2 种。

1.2 试剂

乙腈(色谱级)、水(去离子水)、石油醚(分析醇)、三氯乙酸(分析纯)。

1.3 标准品

D-木糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-蔗糖、D-麦芽糖和 α-D-乳糖 ACROS ORGANICS 公司。

1.4 仪器与设备

Shimadzu LC-10Avp 型高压液相色谱仪、示差折光检测器、超声波振荡器、离心机、烘箱、微孔过滤器、0.45 μm 微孔滤膜。

1.5 方法

1.5.1 色谱条件

色谱柱: Water NH₂ 氨基色谱柱(4.6 × 250mm); 流动相: 乙腈:水 85:15(V/V); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 40℃; 进样量: 10 μl。

1.5.2 标准溶液配制

1.5.2.1 标准储备液(浓度约为 40mg/ml)

收稿日期: 2005-12-16

作者简介: 刘玉峰(1972-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事食品营养成分分析检测的研究。

准确称取 2g (精确至 0.0001g) 经过干燥至恒重的木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖, 分别用纯净水定容于 50ml 容量瓶中。

1.5.2.2 标准使用液

用移液管各分别准确吸取 1、2、3、5ml 上述标准储备液 (约 40mg/ml 木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖), 用重蒸水定容于 10ml 容量瓶中 (浓度分别约为 4、8、12、20mg/ml)。

1.5.3 样品前处理

1.5.3.1 脂肪的提取

样品中脂肪含量过高会影响糖的提取, 可以按以下步骤进行脱脂。将样品置于 50ml 离心管中, 加入 50ml 石油醚, 1800r/min 离心 15min, 抽吸并弃去石油醚, 但不要虹吸出固体物料, 重复提取至脂肪完全除去。用氮气蒸发残留的石油醚, 将样品转移至 100ml 容量瓶, 用蒸馏水冲洗离心管, 洗液并入容量瓶。

1.5.3.2 一般食品

准确称取粉碎均匀的样品 5~10g (精确至 0.0001g), 置于 100ml 容量瓶中, 加水约 50ml, 超声提取 20min, 慢慢加入 50% 三氯乙酸溶液 5ml, 用蒸馏水定容至刻度, 混匀, 静置 30min, 用干燥滤纸过滤, 弃去初滤液数毫升, 滤液用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 待上机。

1.5.3.3 糖浆、蜂蜜类样品

准确称取 1~2g 样品 (精确至 0.0001g) 于 50ml 容量瓶, 用蒸馏水溶解并定容至刻度, 充分摇匀。

1.5.3.4 乳制品

含糖量 10% 以下乳制品 (如牛奶、乳饮料、酸奶等) 的称样量为 5g (精确至 0.0001g); 含糖量 10%~40% 乳制品 (如糖淡奶、淡炼乳、冰淇淋等) 的称样量为 2g (精确至 0.0001g); 含糖量 40% 以上乳制品 (奶粉、甜炼奶等) 的称样量为 1g (精确至 0.0001g)。

1.5.3.5 汽水等含有二氧化碳的饮料

吸取 50ml 样品置于蒸发皿中, 在水浴上除去二氧化碳后, 移入 100ml 容量瓶中, 并用水洗涤蒸发皿, 洗液并入容量瓶中, 再加水至刻度, 混匀后, 滤液用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 待上机。

1.5.4 定量方法

外标法。标准曲线制作: 分别取上述标准工作液, 上机。以峰面积为横坐标 x, 单、双糖浓度为纵坐标 y, 绘制标准曲线。

1.5.5 结果计算

$$X = \frac{c_0 \times A \times V}{A_0 \times m \times 1000} \times 100\%$$

式中, X 为样品中单糖或双糖含量(%); c_0 为标准溶液的浓度 (mg/ml); A_0 为标准溶液的峰面积相应值; A 为样品溶液的峰面积相应值; m 为样品质量 (g); V 为定容体积 (ml)。

2 结果与分析

2.1 沉淀剂对色谱分离测定的影响

对于蛋白质含量较高的样品, 需要去除蛋白。使用亚铁氰化钾和乙酸锌虽然可沉淀蛋白质, 但是在色谱图中会出现相应沉淀剂所产生的色谱峰, 这样对单糖、双糖的分离及整个色谱系统都会产生不良影响, 改用三氯乙酸作为沉淀剂后, 同样达到了沉淀蛋白质的目的, 而且谱图也不会受到影响。因此, 最终采用三氯乙酸作为蛋白沉淀剂。

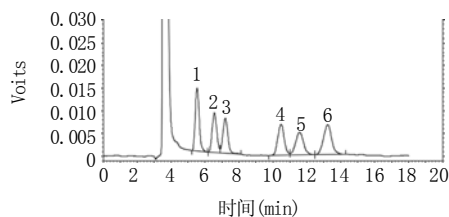
2.2 分析柱的选择

糖的 HPLC 测定法主要有两类。一类采用阳离子交换柱或者凝胶柱^[2-7], 以水、醋酸钙溶液或稀酸等作为流动相。也有人将 HPX-65A 与 HPX-87H 柱串联, 或者将 HPX-65A 的 Ag^+ 型和 Pb^{2+} 型混合使用, 加 Pb^{2+} 是为了减少糖在加温过程中的水解作用。第二类是使用化学键合固定相, 即氨基色谱柱, 流动相为乙腈-水。

我们在 Waters NH₂ 氨基色谱柱 (4.6 × 250mm) 和 Waters Sugar PAK I 阳离子交换树脂色谱柱之间进行了选择。与 Waters Sugar PAK I 糖柱相比, Water NH₂ 氨基色谱柱有以下优越性: (1) 对柱温要求不高, 大多数实验室的柱温箱都能达到所要求的温度; (2) 色谱柱的价格仅为 Waters Sugar PAK I 氨基色谱柱的 1/4; (3) 氨基色谱柱使用了乙腈-水做流动相, 可通过调节有机相与无机相的比例来实现对样品中 6 种单糖、双糖的同时分离。而 Waters Sugar PAK I 采用的是水作流动相, 不能同时分离这 6 种单糖、双糖。最终采用了 Waters NH₂ 氨基色谱柱。

2.3 流动相的选择

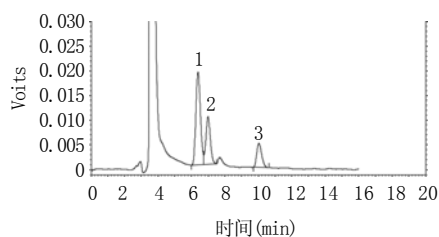
流动相中乙腈含量的多少直接影响分离效果。适当增加乙腈的含量会有利于 6 种糖的分离, 经多次实验, 最终确定流动相乙腈/水为 85:15。图 1、2 分别为 6 种



1. 木糖; 2. 果糖; 3. 葡萄糖; 4. 蔗糖; 5. 麦芽糖; 6. 乳糖。

图 1 单糖、双糖标准色谱图

Fig.1 Chromatogram of standards of monosaccharide and disaccharide



1. 果糖; 2. 葡萄糖; 3. 蔗糖。

图2 样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of sample

糖标准色谱图和样品色谱图。

2.4 温度与流速的选择

温度较低时,各糖的保留时间长,反之,则保留时间短。最终设定了检测温度为40℃。流速与保留时间有着直接的关系,随着流动相流速的增加保留时间减小,但流速过高会影响分离效果,而且会使色谱柱压力偏高,有损色谱柱的使用寿命,故本文采用流速1.0ml/min。

2.5 检测器的选择

示差折光检测器(RID)对压力、温度及流速的变化很敏感,对于糖类样品进样量在40~4000μg的范围内,进样量与峰面积的响应呈线性关系,但与峰高的响应则不呈这种关系。RID属中等灵敏度,其线性关系的最低敏感量为20μg,因此在使用RID检测器时应掌握好样品的称样量,在测定时尽量控制温度变化在1℃以内。并使其流动相充分进入参比池,减少测定误差。

2.6 标准回归方程

分别取各单糖、双糖的标准工作液,以峰面积为横坐标x,单糖、双糖浓度为纵坐标y,进行回归计算得标准曲线回归方程。结果见表1。

表1 单糖、双糖标准曲线回归方程
Table 1 Equations of curve of standard monosaccharide and disaccharide

单双糖	线性回归方程	相关系数R ²
木糖	$y = 0.00001472x + 0.60070711$	0.9992
果糖	$y = 0.00001852x - 0.18114634$	0.9999
葡萄糖	$y = 0.00001401x - 0.46971198$	0.9995
蔗糖	$y = 0.00001237x - 0.10987176$	0.9999
麦芽糖	$y = 0.00001474x + 1.45073153$	0.9896
乳糖	$y = 0.00001513x + 0.31721733$	0.9998

2.7 精密度实验

抽取2种样品,各称取6份,按本方法进行测定,每份重复测定3次,结果见表2和3。

实验结果表明RSD < 5%,说明方法有较高的精密度。

2.8 准确度实验

以蔗糖为例,对同一样品进行加标回收实验,结果见表4,从表中得知,回收率在97.73%~99.22%之

表2 山楂精密度实验结果
Table 2 Results of precision of whitethorn

n	山楂			
	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
1	7.32	17.73	9.0	25.73
2	7.30	16.56	9.19	24.28
3	7.62	16.54	9.20	24.44
4	7.34	16.98	8.76	24.62
5	7.32	16.56	9.02	25.69
6	7.71	16.22	9.60	24.26
X	7.44	16.76	9.14	24.84
S	0.18	0.53	0.27	0.69
RSD (%)	2.42	3.16	3.01	2.78

表3 奶粉精密度实验结果
Table 3 Results of Precision of milk powder

n	奶粉
	乳糖
1	20.53
2	20.49
3	20.86
4	21.01
5	20.99
6	21.05
X	20.82
S	0.25
RSD (%)	1.20

表4 样品加标回收率实验结果
Table 4 Results of recovery of sample

称样量(g)	原含量(g)	标准加入量(g)	加标测定值(g)	回收率(%)
10.8233	0.6178	0.8046	1.4026	98.61
7.3687	0.4185	0.4023	0.8144	99.22
5.4150	0.3102	0.2012	0.4998	97.73

间,有较高的准确度。

3 结论

通过对大量样品进行检测,并对检测方法、实验条件及结果的精密度、准确度进行讨论。最终确定了适用于食品中单、双糖含量测定的方法,即使用Waters NH₂ 氨基色谱柱,柱温40℃,示差折光检测器,乙腈/水(85:15)作为流动相,1.0ml/min流速,在20min内完成了食品中单、双糖的测定,效果比较理想。

参考文献:

- [1] JEON I J, IKINS W G. Analyzing food for nutrition labeling and hazardous contaminants[M]. Taylor and Francis, CRC Press Inc, 1994.
- [2] 美国AOAC 982.14(修订) 预加谷物中的葡萄糖,果糖,蔗糖和麦芽糖[S].
- [3] 甘宾宾. 高效液相色谱法测定食品中含糖量[J]. 食品与发酵工业, 2000, 23(2): 55.
- [4] 高娃,张欣,孔祥辉. 高压液相色谱法分析常见单糖、双糖[J]. 生物技术, 2000, 8(2): 44-46.

离子排斥色谱法测定桑椹原汁有机酸的研究

陈智毅, 陈卫东, 徐玉娟, 吴继军, 李升锋, 刘学铭

(广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共实验室, 广东 广州

510610)

摘 要: 用离子排斥色谱法, Ion Pac AS11 阴离子交换柱, 三种流动相系统 (2mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、24mmol/L NaOH、18mmol/L NaOH) 测定了桑椹原汁中的有机酸种类和相对含量, 从桑椹原汁中检出的主要的有机酸有苹果酸、酒石酸、草酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、甲酸等七种以及两种无机酸根 Cl^- 、 SO_4^{2-} 。

关键词: 桑椹; 有机酸; 离子排斥色谱; 果汁

Determination of Organic Acids in Mulberry Raw Juice by Ion Exclusion Chromatography

CHEN Zhi-yi, CHEN Wei-dong, XU Yu-juan, WU Ji-jun, LI Sheng-feng, LIU Xiu-min

(Sericulture and Farm Produce Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Mulberry raw juice organic acids were detected by ion exclusion chromatography, with anion exchange column (Ion Pac AS11) and three kinds of mobile phase (18mmol/L NaOH, 24mmol/L NaOH, 2mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) respectively. The main organic acids in the mulberry raw juice included malic acid, tartaric acid, oxalic acid, succinic acid, citric acid, acetic acid and formic acid, while two kinds of inorganic radicals (Cl^- , SO_4^{2-}) are identified.

Key words mulberry; organic acids; ion exclusion chromatography; juice

中图分类号: 0652.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0296-03

桑椹为桑科植物桑的成熟果穗, 含有丰富的糖类、有机酸、脂类、维生素、鞣质、矢车菊素、矿物质等成分, 具有调节免疫、促进造血细胞生长、抗诱变、降血糖、降血脂、护肝等药理作用, 在医药和食品工业中有广泛的应用^[1], 已经开发出桑果汁^[2]、桑椹酒^[3-4]、桑椹果茶^[5]、桑果酱^[6]等食品, 还从中提取天然食用红色素作为食品添加剂^[7-8]等。

有机酸是一类含有羧基的化学物质, 具有抑菌、抗病毒、增加冠脉流量、抑制脑组织脂质过氧化物生成、消炎、抗突变和抗癌等作用。有机酸广泛存在于不同种类的食物及其制品中, 是果汁中主要的风味营养物质, 它的含量高低与果汁制品的品质和药用价值有着极其密切的关系, 而且某些有机酸的含量是重要的质量

指标。但迄今未见桑椹有机酸的研究报道, 因此对桑椹有机酸的分析研究, 对进一步开发和利用桑椹这一天然资源具有重要的意义。有机酸的测定以前有用滴定法、荧光法、分光光度法、气相色谱法、薄层色谱法、酶法等, 但对有机酸的分析有一定的限制。目前, 离子排斥色谱法分析有机酸趋于成熟。本文报道以离子色谱仪, 阴离子排斥色谱柱的方法对桑椹原汁有机酸的研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

DX-600型离子色谱仪 美国Dionex公司(包括四元梯度泵、25 μL 定量进样环、CD25 电化学检测器和微膜

收稿日期: 2006-03-28

作者简介: 陈智毅(1963-), 男, 副研究员, 主要从事农产品加工、果蔬深加工。

⑤ 甘宾宾, 蒋世琼. 食品中糖类的高效液相色谱法测定[J]. 分析仪器, 2000(3): 38.

⑥ 吴莉, 周红. 应用氨基柱测定奶粉中的糖份[J]. 武汉化工学院学报, 2002, 24(2): 4-5, 8.

⑦ 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(6): 1-3.

⑧ 汤丽芬, 吴珏珩, 陈红英, 等. 高效液相色谱法测定食品中五种糖的含量[J]. 华南预防医学, 2002, 28(3): 40-41.