

高效液相色谱法测定甘蔗节间果糖、葡萄糖和蔗糖的含量

逯平杰¹, 代容春¹, 叶冰莹^{1,2}, 林荣华^{1,2}, 何文锦^{1,2}, 陈由强^{1,2,3,*}, 陈如凯³

(1.福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108; 2.发育与神经生物学福建省高等学校重点实验室, 福建 福州 350108; 3.农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 研究高效液相色谱(HPLC)示差折光检测法测定甘蔗节间糖含量, 建立一种简便、快速和准确可靠的, 能同时测定果糖、葡萄糖、蔗糖含量的高效液相色谱法。HPLC 方法采用 Agilent Zorbax carbohydrate 柱(4.6mm × 250mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(75:25, V/V), 流速 1.0mL/min, 柱温 30℃, 检测器温度 35℃。该法相对标准偏差(RSD)为 0.82%~0.87%(n=5), 加标回收率为 97.84%~99.12%, 糖类质量浓度在 0.625~20mg/mL 内呈现良好的线性关系, 相关系数在 0.9982(n=6)以上。采用本法测定两种甘蔗品种不同时期、不同节间糖含量, 均获得满意结果。

关键词: 高效液相色谱法; 甘蔗节间; 果糖; 葡萄糖; 蔗糖

HPLC Determination of Fructose, Glucose and Sucrose in Sugarcane Internode

LU Ping-jie¹, DAI Rong-chun¹, YE Bing-ying^{1,2}, LIN Rong-hua^{1,2},
HE Wen-jin^{1,2}, CHEN You-qiang^{1,2,3,*}, CHEN Ru-kai³

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 2. State Key Laboratory of Developmental Biology and Neurobiology, Institution for Higher Learning in Fujian, Fuzhou 350108, China; 3. Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China)

Abstracts: Fructose, glucose and sucrose contents in sugarcane internodes were determined using high performance liquid chromatography with refractive index detector (RID). The chromatographic separation was achieved on an Agilent Zorbax carbohydrate column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), which was held at a constant temperature of 30 °C, using a mobile phase composed of acetonitrile and water (75:25, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min. RID temperature was set as 35 °C. Average spike recoveries for 5 replicate determinations of three saccharides were found in a range of 97.84% to 99.12%, with a relative standard deviation (RSD) between 0.82% and 0.87%. The developed calibration curves displayed good linearity over a concentration range of 0.625 to 20 mg/mL, with a correlation coefficient exceeding 0.9982 (n = 6). This method has been applied to determine two different varieties sugarcane internodes with satisfying results.

Key words: HPLC; sugarcane internode; fructose; glucose; sucrose

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0198-03

甘蔗是我国最重要的糖料作物, 它不仅是食糖业的重要原料, 而且是能源、化工、酿酒和饲料的原料^[1]。甘蔗节间含有较高的糖分, 主要是葡萄糖、果糖和蔗糖, 且不同生长时期、不同节间甘蔗糖分含量存在较大差异^[2]。测定甘蔗不同时期、不同节间糖含量, 分

析糖分积累的规律, 进而运用统计分析的方法了解蔗糖分积累与糖代谢相关酶活性变化之间的关系, 从生理生化方面探讨甘蔗生长和糖分积累的规律, 并为甘蔗高产高糖栽培及遗传改良等提供理论依据。

糖含量的测定方法有比色法^[3-5]、旋光法^[6]、气相色谱

收稿日期: 2010-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871575); 国家“863”计划项目(2007AA100701);

国家现代农业技术体系建设专项(nycytx-024-01-20)

作者简介: 逯平杰(1984—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: lpj124@163.com

* 通信作者: 陈由强(1956—), 男, 教授, 博士, 主要从事植物生理生化和分子生物学研究。E-mail: yqchen@fjnu.edu.cn

谱法等^[7-8]、液相色谱法^[9-11]。一般化学法只能测定各种糖的总量而不能分别测定各种糖的含量^[12],并且,有研究表明,测得的葡萄糖、果糖值比实际值略高^[13],极有可能影响甘蔗品质的判断。气相色谱法虽可分别测定不同糖的含量,灵敏度高,但由于糖类化合物沸点高,难以汽化,必须进行衍生化反应才可检测^[14-15],这使检测步骤繁琐,误差较大。目前,采用高效液相色谱法分析检测不同糖含量在蜂蜜、菠萝、马铃薯等中已有不少报道^[16-18],甘蔗节间糖含量测定目前报道主要采用一般的化学方法,本实验采用碳水化合物分析专用柱对甘蔗节间糖分进行分离分析,建立一种简便、快速和准确可靠的,能同时测定果糖、葡萄糖、蔗糖含量的高效液相色谱法。

1 材料与方法

1.1 材料

样品均采自福建农林大学农业部甘蔗所甘蔗种植园区。

1.2 试剂与仪器

葡萄糖、果糖、蔗糖标样为国产色谱纯(纯度均不低于99.5%),乙腈为色谱纯,实验用水为超纯水。

1100型高效液相色谱仪(具有示差折光检测器和针孔进样器) 美国安捷伦公司。

1.3 色谱分析条件

Agilent Zorbax carbohydrate 柱(4.6mm × 250mm, 5.0 μm); 流动相为乙腈-水(75:25, V/V); 柱温 30℃; 检测池温度 35℃; 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。

1.4 糖标准溶液的配制

准确称取果糖、葡萄糖、蔗糖各 2.0 g(精确到 0.0001g),转移至 100mL 容量瓶中,用高纯水定容至刻度,得到各自质量浓度均为 20mg/mL 的混标溶液。逐级稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625mg/mL。上机进样分析前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。每个样品重复 3 次。

1.5 样品处理

将冷冻的节间样品去皮,切碎,在液氮中磨成粉末状,精确称取样品粉末 1.00g(精确到 0.0001g),加入 80% 的乙醇 5mL, 80℃ 恒温水浴 30min 后, 12000r/min 离心 20min, 取上清液,残渣加入 5mL 80% 的乙醇溶液重复提取 1 次,合并提取上清液, 90℃ 水浴中蒸干乙醇,加入高纯水定容至 5mL,混匀后用一次性注射器抽取提取样液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后以备上机进样分析。每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 样品前处理

水和乙醇均是良好的糖类物质提取剂,比较常用的超声波水提方法、乙醇恒温水提方法的提取效果。结果表明:用乙醇作为样品提取溶剂时,分离效果、分离速度、准确度、回收率上优于用水作为样品提取溶剂。提取后的甘蔗样品在 12000r/min 转速以上可以沉淀悬浮物。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 流动相的选择

本实验采用 Agilent Zorbax carbohydrate 柱以乙腈-水比例为 85:15、80:20、75:25、70:30(V/V)不同比例的流动相测定糖混合标准品和甘蔗提取液中各种糖成分的含量和分离情况。实验证明提高流动相中水的比例可以加快分离过程,但也会造成其中果糖和葡萄糖色谱峰的重叠,随着乙腈体积分数的增加,甘蔗提取液中糖分离程度提高,当流动相中乙腈和水的体积比为 85:15 时分离效果最佳,但是保留时间较长。当流动相中乙腈和水的体积比为 75:25 时分离效果也很好,相邻峰的分离度较好,且保留时间较短,12min 就可以分析一个样品,在兼顾分离速度和分离效果的基础上,本实验采用流动相为乙腈和水的比例为 75:25。

2.2.2 色谱柱柱温的选择

比较色谱柱温度在 25、28、30、35℃ 条件下糖混合标准品和甘蔗提取液中各种糖成分的含量和分离情况。结果发现随着温度的降低,甘蔗提取液中糖分离程度提高,但是保留时间较长,35℃ 时,分离速度最快,但分离程度降低,并且柱温高会减少色谱柱的寿命,考虑到以上因素,本实验采用色谱柱柱温为 30℃。

2.2.3 流动相流速的选择

在 0.8~1.2mL/min 范围内改变流动相流速,发现在流速为 1.0mL/min 时,3 种糖出峰时间合适,峰形较好。

2.3 标准曲线的制作

取果糖、葡萄糖、蔗糖各级标准溶液(20、10、5、2.5、1.25、0.625mg/mL),进样 20 μL,以标样峰面积 y 为纵坐标、标样质量浓度 x 为横坐标,绘制标准溶液曲线,得线性回归方程,结果见表 1,图 1 为某级标样色谱图。

表 1 标准曲线的回归方程、相关系数和线性范围
Table 1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges for sucrose, glucose and fructose

组分	线性回归方程	相关系数	线性范围/(mg/mL)
果糖	$y=209595.08468x+48069.2657$	0.99952	0.625~20
葡萄糖	$y=174657.92718x-3352.31852$	0.99972	0.625~20
蔗糖	$y=209990.14148x+96915.1032$	0.99827	0.625~20

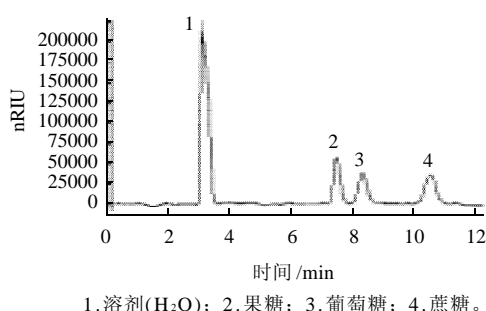
1. 溶剂(H₂O); 2. 果糖; 3. 葡萄糖; 4. 蔗糖。

图1 标样色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed sucrose, glucose and fructose standards

2.4 精密度与回收实验

对待测的提取液同一样品重复进样5次,测定峰面积,并通过计算相对标准偏差(RSD)考察其测定的精密度,得出3种糖的RSD依次为果糖0.82%、葡萄糖0.83%、蔗糖0.87%,说明精密度良好(表2)。

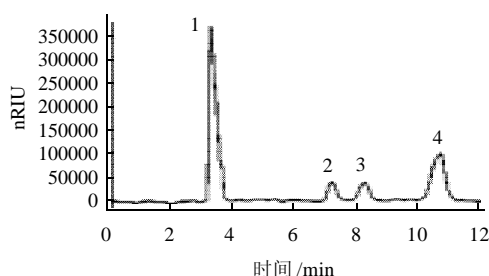
表2 方法的精密度和回收率(n=5)

Table 2 Spike recoveries and relative standard deviations for sucrose, glucose and fructose in a real sample (n = 5)

组分	样品含量/mg	加标量/mg	测得量/mg	RSD/%	回收率/%
果糖	13.71748	5.0	18.60948	0.82	97.84
葡萄糖	15.30875	5.0	20.26475	0.83	99.12
蔗糖	51.17643	5.0	56.11993	0.87	98.87

采用加标样回收法,把样品提取液等分为两份,一份精确加入果糖、葡萄糖、蔗糖的标样各100mg,一份不加,同时定容至10mL。经0.45 μm微孔滤膜过滤后,按照1.3节色谱分析条件平行测定5次,计算回收率。实验表明,3种糖的平均回收率分别为97.84%、99.12%、98.87%,说明该方法具有较高的准确度(表2)。

2.5 甘蔗节间样品分析



1. 溶剂; 2. 果糖; 3. 葡萄糖; 4. 蔗糖。

图2 甘蔗节间样品色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of a real sample

按照1.3节色谱分析条件对样品进行液相色谱分析,测定两个不同甘蔗品种(福农28和ROC-5)偶数节间果糖、葡萄糖、蔗糖的色谱峰峰面积,代入工作曲线分别计算其含量。图2为福农28第6节间样品色谱图。

3 结 论

实验结果表明,采用高效液相色谱法分析甘蔗节间果糖、葡萄糖、蔗糖,保留时间重现性好,三者的含量和峰面积比值之间呈良好的线性关系,相对标准偏差较好,加标回收率准确度较高,是一种检测分析甘蔗节间糖分组成和含量的简便、快速、准确的方法。

参考文献:

- [1] 陈如凯,林彦铨,张跃彬.甘蔗技术100问[M].北京:中国农业出版社,2009.
- [2] BRUMBLEY S M, SNYMAN S J, GNANASAMBANDAM A, et al. A compendium of transgenic crop plants: sugar, tuber and fiber crops[M]. Oxford, U K: Wiley-Blackwell Publishing, 2008.
- [3] 文赤夫,董爱文,李国章,等.蒽酮比色法测定紫花地丁中总糖及还原糖含量[J].现代食品科技,2005,21(3): 122-130.
- [4] 王俊刚,张树珍,杨本鹏,等.3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J].甘蔗糖业,2008(5): 45-49.
- [5] 李利军,孔红星,张家仁,等.间苯二酚与蔗糖反应的动力学研究[J].甘蔗糖业,2004(1): 16; 27-31.
- [6] 顾大明,鲍治宇,冯立彬.用旋光法测定蜂蜜主要成分含量的研究[J].哈尔滨建筑大学学报,2000,33(4): 124-126.
- [7] 何照范,张迪清.保健食品化学及其检测技术[M].北京:中国轻工业出版社,1998: 161-169.
- [8] 沈小婉,李明元,叶世柏,等.色谱法在食品分析中的应用[M].北京:北京大学出版社,1992.
- [9] BERNARDEZ M M, MIGUELEZ J D, QUEIJEIROB J G. HPLC determination of sugars in varieties of chestnut fruits from galicia[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17(1): 63-67.
- [10] 胡长平.液相色谱法对糖类的测定[J].安徽化工,2005,31(2): 57-58.
- [11] 刘玉峰,李黎,李东,等.高效液相色谱法测定食品中的单糖、双糖[J].食品科学,2007,28(3): 293-296.
- [12] 薛应龙.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1985.
- [13] 孙兰,黎淑端,聂木海,等.一起食品中还原糖测定结果异常的原因分析[J].中国卫生检验杂志,2005,15(9): 1137.
- [14] 贺永惠,王清华,刘长忠,等.乙酸酐衍生化气相色谱法测定小麦非淀粉多糖的单糖组成[J].光谱实验室,2009,26(4): 1039-1042.
- [15] 姜晓满,田卫,张海霞,等.糖类物质的色谱分析[J].药物分析杂志,2006,26(8): 1181-1186.
- [16] 张书芬,史萍萍,王全林,等.液相色谱示差折光法测定蜂蜜中的果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖[J].食品科学,2008,29(6): 280-283.
- [17] 刘胜辉,魏长宾,孙光明,等.高效液相色谱法测定台农6号菠萝果实中的糖分[J].食品科学,2009,30(12): 162-164.
- [18] WILSON A M, WORK T M, BUSHWAY A A, et al. HPLC determination of fructose, glucose, and sucrose in potatoes[J]. Journal of Food Science, 2006, 46(1): 300-301.