

离子色谱法测定糕点中的单、双糖的研究

侯玉柱,元晓梅,蒋明蔚,李晓斌,贾楠,宋全厚

(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

摘要 用高效阴离子交换色谱-脉冲积分安培检测法(HPAEC-PAD)测定了糕点中的水溶性的半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖。研究采用水浸提、脱脂、去蛋白及膜过滤法处理糕点样品,以 DIONEX CarboPac PA10(4 mm×250 mm)阴离子交换柱为色谱柱,以 NaOH 溶液作为流动相,采用梯度淋洗程序分离,脉冲积分安培检测。实验结果表明,本方法所测的 7 种糖的检出限为 0.005~0.02 mg/L(25.0 μ L 进样,S/N=3),样品加标回收率为 96.0%~102.5%。该方法具有灵敏度高、分离效果好、重现性好和样品不需要衍生处理的优点。

关键词 高效阴离子交换色谱,脉冲安培检测,糕点,单糖,双糖

国家预包装特殊膳食用食品标签通则^[1]中规定,固体和液体食品中的糖(指所有的单糖和双糖)的含量低于 0.5g/100g(100mL)才能标注为无糖。糕点中的单、双糖是指在糕点食品中游离存在和可能存在的如半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖等糖类化合物,由于缺乏 1 种快速准确的测定方法,不少糕点生产企业借助无糖和低糖造势促销,导致无糖和低糖市场混乱并且容易误导消费者,因此糕点中单、双糖的测定也就显得越来越重要。

通常食品中糖分的分析方法有化学法^[1]、毛细管电泳法(CE)^[3,4]、高效液相色谱法^[5~7]等。国家标准^[2]中规定测定食品中蔗糖是先将蔗糖用盐酸水解为葡萄糖和果糖等还原糖,再通过测定还原糖的总量间接换算得到蔗糖的含量,由于这种方法在水解过程中还可将部分糊精、麦芽糖等组分水解成葡萄糖,故使最后测定结果偏高。毛细管电泳法(CE)是利用带电粒子在高压电场中迁移速率不同而进行分离的一种新技术,其检测方式有紫外可见检测、激光诱导荧光检测、电化学检测等,但糖类物质既不带电,也无紫外吸收基团和荧光基团,所以不能直接利用毛细管电泳对其进行分离分析,需要先使糖带电或对糖进行衍生化,使其具有紫外吸收基团或荧光基团,然后才能进行分离测定。高效液相色谱法应用较多,它不需衍生化,虽然待测物在紫外光区无吸收,但由于在样品中的含量较高,可选用示差折光检测器进行检测,但是液相色谱法的灵敏度相对离子色谱法较低。

鉴于糖类化合物分子具有电化学活性及在强

碱溶液中呈离子化状态,对在恒电位下工作的安培检测器产生响应值,因此可以采用高效阴离子交换色谱-脉冲积分安培检测法(HPAEC-PAD)对糖类进行分析^[8~10]。

1 仪器与试剂

1.1 实验仪器

ICS-3000 型离子色谱仪(Dionex 公司,美国),主要配置:含在线脱气装置的四元梯度泵、安培检测器(Au 为工作电极,Ag/AgCl 为参比电极)、糖分离柱(CarboPac PA10,4 mm×250 mm)、糖保护柱(CarboPac PA10,2 mm×50 mm)、自动进样器 AS40、工作站 Chromeleon 6.8。

1.2 试剂与药品

250 mmol/L NaOH 溶液(Baker 公司质量分数 50%NaOH 溶液稀释而成),单、双糖标准物质(半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖,德国 Ehrenstorfer 公司),1 mol/L 醋酸钠(Fluka 公司醋酸钠配制),乙酸锌溶液(称取 21.9 g 乙酸锌,加 3 mL 冰乙酸,加水溶解并稀释至 100 mL),亚铁氰化钾溶液(称取 10.6 g 亚铁氰化钾,加水溶解并稀释至 100 mL)。SPE-H 型前处理柱。

实验中用水为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

2 实验方法

2.1 单糖标准曲线的绘制

分别准确称取 0.1g(精确至 0.000 1 g)半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖,加水溶解并

第一作者:硕士研究生(宋全厚教授级高工为通讯作者)。

收稿日期:2008-11-12,改回日期:2008-12-16

移入 100 mL 容量瓶中,定容至 100 mL,再分别稀释成质量浓度分别为 0.1、1.0、5.0、10.0、20.0 mg/L 的标准溶液。

2.2 试样制备

根据样品含糖量的不同准确称取糕点样品 1~5 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,加 30 mL 石油醚,加盖,振摇 2 min 后 2 000 r/min 下离心 10 min,倾去石油醚,反复操作,至脂肪完全除去后将剩余样品全部转移至 100 mL 具塞试管中,加水约 50 mL,置于 85~90℃ 水浴浸提 25 min,冷却至室温后,缓慢加入 5 mL 乙酸锌溶液及 5 mL 亚铁氰化钾溶液,加水定容至刻度,混匀,静置 30 min,用干燥滤纸过滤,弃去初滤液数毫升,将滤液稀释 100 倍体积后过 SPE-H 柱,再过 0.22μm 滤膜后上机测定。

2.3 色谱条件

色谱柱:CarboPac PA10, 4 mm×250 mm 型分离柱(带 CarboPac PA10, 4 mm×50 mm 型保护柱);流动相:NaOH 梯度淋洗液(程序见表 1);流速:0.8 mL/min;安培检测器;进样量:25 μL;柱温:30℃;以外标(峰面积)法定量。

表 1 淋洗液梯度程序表

时间	NaOH 浓度/mmol · L ⁻¹	NaAc 浓度/mol · L ⁻¹
0	25	0
15	25	0
35	50	0.05
40	100	0
45	25	0
60	25	0

3 结果与讨论

3.1 样品前处理

3.1.1 样品的脱脂

样品中含有较高的脂肪时不利于单双糖的提取,同时试样中较高的脂肪也会对色谱分析柱产生损伤,所以样品测定前必须先脱脂。本方法采用加入石油醚低速离心提取脂肪的方法除去样品中的脂肪。

3.1.2 样品中蛋白质的去除

本研究中对乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀法和三氯乙酸沉淀法做了对比实验,结果显示,三氯乙酸沉淀法中蔗糖的回收率较低,葡萄糖和果糖的回收率较高,证明确实存在双糖的转化,结果分析显示主要是蔗糖的水解,而乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀法可以达到满意的沉淀效果且各组分回收率较高,所以最终确定

采用加入乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀法除去样品中的蛋白质。

3.2 色谱柱及检测器的选择

本研究选择 CarboPac PA10 型色谱柱,是因为该色谱柱擅长分析单糖和双糖,并且在不同浓度的氢氧根中都具有很好的灵敏度。选择脉冲安培检测器(PAD)的主要优势体现在它的检测条件与淋洗液分离条件相一致,无需衍生,基体干扰少,可以获得较好的重现性和较高的准确度。

3.3 淋洗液浓度的选择

淋洗液浓度的变化对方法的灵敏度及各组分之间的分离度影响较大,强碱性溶液中单糖化合物在阴离子交换色谱柱上的保留行为主要与其 pKa 有关。常见单、双糖化合物的 pKa 值见表 2。

表 2 部分糖类化合物的 pKa 值

组分	pKa	组分	pKa	组分	pKa
半乳糖	12.35	葡萄糖	12.35	木糖	12.29
果糖	12.03	蔗糖	12.51	乳糖	11.98
麦芽糖	11.94				

由表 2 中数据可以看出,单糖化合物的 pKa 值非常接近,因此半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖和蔗糖这 5 种糖的保留时间非常接近,本研究首先选择了 20、25、30、40 mmol/L NaOH 4 个不同淋洗液浓度来分析流动相浓度的不同对各组分的分离带来的影响。综合不同浓度下各组分的分离情况,淋洗液浓度为 25mmol/L 时各峰之间分离度都在 1.5 以上,能够达到准确定量要求。

3.4 柱温的选择

离子色谱分析中温度对保留时间的影响较高效液相色谱中明显,因温度对电解质的影响大于对非电解质的影响。随着柱温的增加某些离子的保留时间可能增加,而另一些离子的保留时间可能减少。本研究选择 25、30、和 35℃ 3 个温度来分析分离柱温度的不同对分离效果的影响。结论证明在 30℃ 柱温下,既能保证各组分分离度都大于 1.5,又能够相对缩短各组分的保留时间,所以选择柱温为 30℃。

3.5 淋洗液流速的选择

与 HPLC 相似,离子交换色谱也可以通过改变流动相的流速来改变组分的保留时间而并不明显的降低分离效率,但是一方面流速的增加受分离柱最大操作压力的限制,另一方面,淋洗液的 pH 值、离子强度等不受流速改变的影响,故待测离子的洗脱顺序也

不受流速的影响,因此改变流速来改善分离度仅在有限范围内是可能的。本研究选择 0.6、0.8、1.0 mL/min 3 个流速来分析流速的变化对分离度的影响。结论证明流速 0.8 ml/min 时可达到最佳分离效果。

3.6 有机改进剂的选择

由于在同时进样中各组分保留强弱不同,若只采用等浓度淋洗则会出现多组分共淋洗或强保留组分无法洗脱现象。故梯度程序开始阶段采用较低浓度的淋洗液增加弱保留组分的分离,然后增加淋洗液浓度以缩短强保留组分的保留时间。对固定相亲和力强的糖类化合物的淋洗,如乳糖和麦芽糖,应在淋洗液中加入对固定相的亲和力大于 OH⁻ 的 Ac⁻,这样可有效减少强保留组分的保留时间和改进分离的选择性,本研究选择醋酸钠溶液作为改进剂,考察了 0.02、0.05、0.07、0.1 mol/L 4 个浓度下的分离情况,结果证明加入 0.02 mol/L 醋酸钠溶液时麦芽糖的保留时间没有明显的缩短,加入超过 0.07 mol/L 醋酸钠溶液时,麦芽糖的出峰受醋酸钠溶液系统峰干扰严重,加入 0.05 mol/L 醋酸钠溶液,可以有效缩短麦芽糖的保留时间,又可避开醋酸钠溶液系统峰的干扰,所以选择加入 0.05 mol/L 醋酸钠溶液为有机改

进剂。

本研究选择的最佳梯度淋洗程序列于表 1。在该淋洗条件下,7 种单、双糖以混标的形式同时进样均可达到很好的分离效果。图 1 为 7 种单、双糖混合标准溶液的色谱图。

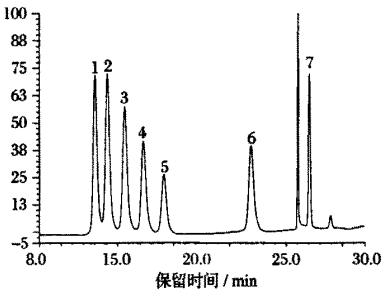


图 1 t 种单、双糖混合标准溶液色谱图

1.半乳糖;2.葡萄糖;3.木糖;4.果糖;5.蔗糖;6.乳糖;7.麦芽糖;

3.7 t 种糖的检出限、标准曲线和重现性

用优化后的方法分析了糕点中的 7 种单、双糖,其检出限、标准曲线和线性范围见表 3。以 5 mg/L 的混和标准溶液连续 7 次进样,各种单双糖的保留时间 RSD 为 0.1%~0.2%,峰面积 RSD 为 0.5%~0.7%,证明方法的重现性很好。

表 3 7 种单、双糖检出限及线性数据

分析物	检出限/mg·L ⁻¹ (S/N = 3)	线性方程	相关系数(r)	线性范围/mg·L ⁻¹
半乳糖	0.005	y=0.1646x-3E-05	0.999 4	0.1~10
葡萄糖	0.005	y=0.1478x+3E-05	0.999 9	0.1~10
木糖	0.005	y=0.166 7x-3E-05	0.999 7	0.1~25
果糖	0.01	y=0.21 21x-9E-06	0.999 8	0.1~25
蔗糖	0.02	y=0.597 9x+0.000 1	0.999 5	0.5~50
乳糖	0.01	y=0.244 3x-5E-06	0.999 7	0.1~25
麦芽糖	0.005	y=0.393 4x+3E-05	0.999 0	0.1~10

3.8 方法的回收率及精密度实验

为考察本方法的可靠性,本方法选择了一款含单、双糖种类较多的糕点样品进行了精密度实验,并采用标准加入法进行了回收率实验。结合糕点生产实际情况,鉴于糕点中单、双糖组成主要为葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖,故本研究选择对此 5 种糖做回收率实验。其结果见表 4。精密度实验结果见表 5。

表 4 回收率实验结果(n=3)

被测组分	样品含量 /mg	加标量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
葡萄糖(glucose)	1.54	2.00	3.50	98.0
果糖(fructose)	1.66	2.00	3.71	102.5
蔗糖(sucrose)	187	150	335	98.7
乳糖(lactose)	1.30	1.50	2.74	96.0
麦芽糖(maltose)	3.30	4.00	7.28	99.5

表 5 精密度实验结果(n=6) g/100g

组分	葡萄糖	果糖	蔗糖	乳糖	麦芽糖
1	3.003	1.953	36.454	0.142	0.817
2	3.048	1.987	36.582	0.124	0.820
3	2.973	1.903	36.105	0.126	0.808
4	3.035	1.884	36.722	0.136	0.842
5	2.975	1.903	36.086	0.123	0.810
6	3.136	2.022	37.624	0.125	0.759
平均值	3.028	1.942	36.595	0.129	0.809
标准偏差	0.056	0.050	0.515	0.007	0.025
RSD/%	1.837	2.564	1.408	5.608	3.082

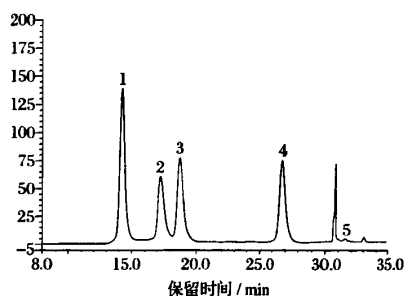
3.9 实际样品分析

将所建立的分析方法用于糕点食品中单、双糖的分析,表 6 为市场采集实际样品的测定数据。图 2 为某糕点样品(稀释 10000 倍)的离子色谱图。

表6 实际样品测定数据 g/100g

糕点名称	葡萄糖	果糖	蔗糖	乳糖	麦芽糖
蛋酥沙琪玛	2.322	0.334	11.303	0.492	7.590
牛奶薏米饼干	0.323	0.303	21.013	0.355	3.002
蛋糕	2.652	0.345	23.958	0.125	3.743
蝴蝶酥	1.374	0.778	26.507	ND	2.033
黄花糕	0.037	ND*	17.214	ND	ND
全麦消化饼	0.101	0.196	18.711	ND	0.192
无糖沙琪玛	0.101	0.046	0.312	ND	0.204
无糖纯咸茶点	0.016	0.042	0.345	ND	0.515
无糖蛋糕	0.023	0.034	0.254	ND	0.112
咸奶油面包	0.042	0.061	ND	ND	4.990
燕麦切片面包	0.055	0.060	0.136	ND	4.950
无糖消化饼干	0.032	0.052	1.232	0.112	0.242
鲜葱苏达饼干	0.034	0.055	1.051	0.102	0.204

注:ND,未检出



1. 葡萄糖; 2. 果糖; 3. 蔗糖; 4. 乳糖; 5. 麦芽糖

图2 某糕点样品的离子色谱图

4 结论

本研究采用离子色谱法测定食品中的游离单、双糖,通过对离子色谱法分离柱、检测器的选择和对色谱条件的摸索,优化出一套离子色谱程序,可于1次进样同时分离和测定了7种单、双糖,并成功应用于糕点实际样品的测定,各种单、双糖的回收率达为96.0%~102.5%,结果令人满意。

Determination of Monosaccharides and Disaccharide in Pastry by Ion Chromatography-integrated Pulsed Amperometric Detection

Hou Yuzhu, Yuan Xiaomei, Jiang Mingwei, Li Xiaobin, Jia Nan, Song Quanhui

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industry, National Food Quality Supervision and Testing center, Beijing 100027, China)

ABSTRACT The quantitative determination of water-soluble sugars such as Galactose, Glucose, Xylose, Fructose, Sucrose, Lactose and Maltose in pastry by ion chromatography-integrated pulsed amperometric detection method was studied. The method was used to determine pastry samples after pretreatment by water-leaching and membrane filtration. The separation was performed with Multi-step gradient program on a Dionex CarboPac PA10 anion exchange column with NaOH solution as the eluent. The results showed the LOD of seven kinds of monosaccharide and disaccharide ($S/N=3$) ranged from 5 $\mu\text{g/L}$ to 20 $\mu\text{g/L}$ and recoveries ranged from 96.0% to 102.5%. The developed method is sensitive and reliable.

Key words high performance anion exchange chromatography (HPAEC), pulsed amperometric detection (PAD), pastry, monosaccharide, disaccharide

离子色谱本身具有快速、灵敏、选择性好和同时测定多组分的优点,将离子色谱法应用于糖的检测无需衍生,无有毒试剂,简化了操作,减少了污染,提高了灵敏度,离子色谱法测糖在食品工业领域将会有更广泛的应用。

参考文献

- 1 2003 食品中还原糖的测定[S]. GB/T5009.7
- 2 食品中蔗糖的测定[S]. GB/T5009.8 2003
- 3 陈义. 毛细管电泳技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2006
- 4 傅崇岗, 单瑞峰, 苏昌华. 毛细管电泳电化学检测方法测定枣中糖类物质[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 91~94
- 5 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(03): 293
- 6 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]. 分析化学研究简报, 2005, 11(33): 1596~1598
- 7 Official Method Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Presweetened Cereals. AOAC, 2002, 14: 982
- 8 Cai Yaqi, Liu Jingshen, Shi Yali, Liang Lina, Mou Shifen. Determination of several sugars in serum by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1085: 98~103
- 9 Kuntian Tang, Lina Liang, Yaqi Cai, Shifen Mou. Determination of sugars and alditols in tobacco with high performance anion-exchange chromatography[J]. J Sep Sci, 2007, 30: 2160~2166
- 10 Valoran PH, Jeffrey SR. Determination of carbohydrates, sugar alcohols, and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 283: 192-199
- 11 预包装特殊膳食用食品标签通则[S]. GB 13432-2004