

高效液相色谱-蒸发光散射法测定苹果中可溶性糖的含量*

王艳颖¹, 胡文忠¹, 庞 坤², 马 堃¹

1(大连民族学院生命科学学院, 辽宁 大连, 116600) 2(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连, 116023)

摘 要 为了快速定量检测苹果中可溶性糖的含量, 建立了应用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)测定糖的方法, 确定了高效液相色谱分离条件。色谱条件为: 色谱柱(APS-2HYPERASIL, 4.6 mmID×250 mm, 5 μ m); 流动相为 V(乙腈): V(水)=80:20; 柱温为室温; 流速 0.8 mL/min; 进样量 5 μ L; ELSD 的漂移管温度 40℃, 氮气流速 1.5 mL/min。结果表明, 在此条件下, 果糖、葡萄糖、蔗糖的浓度分别与峰面积成很好的线性关系 ($r>0.999$), 检测限分别为 80、90、80 ng; 加标回收率在 96.75%~103.65%, 相对标准偏差在 1.41%~1.89%。研究证明, 该方法具有快速、简便、准确的特点, 是测定果蔬中可溶性糖含量较为理想的分析方法。

关键词 高效液相色谱, 蒸发光散射检测, 苹果, 可溶性糖

苹果是人们喜爱的水果之一, 具有色泽鲜艳、爽脆可口、汁多味甜、香气浓郁等优点而深受广大消费者欢迎, 可溶性糖(包括果糖、葡萄糖和蔗糖等单糖和双糖)是苹果中重要的风味成分和营养成分, 准确测定苹果中可溶性糖的含量对于研究苹果的品质和贮藏加工特性具有重要的意义。通常糖的测定方法有容量法、比重法、比色法、气相色谱法、高效液相色谱法等^[1~3], 一般的化学方法只能测定糖的总量, 不能测定糖的组成。气相色谱法虽可测定糖的组成, 但必须对糖进行衍生化才可检测, 从而使检测步骤繁琐, 且不可避免地引入误差。而使用高效液相色谱法测糖是由于糖本身在紫外区无吸收, 通常使用示差折光检测器(RID)进行检测, 但 RID 检测灵敏度较低, 而且受外界因素影响较大。蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种新型的通用型质量检测器, 基于不挥发样品颗粒对光的散射程度与其质量成正比而进行的检测, 对没有紫外吸收、荧光或电化学活性的物质以及产生末端紫外吸收的物质均能产生响应, ELSD 稳定性好, 灵敏度高, 无溶剂峰干扰, 弥补了 HPLC 传统检测器的不足^[4,5]。本研究采用高效液相色谱与低温型蒸发光散射检测器联用(HPLC-ELSD)测定苹果中可溶性糖的含量, 旨在研究和建立一种快速、准确、直接同时测定多种糖分的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

第一作者: 在读硕士, 工程师(胡文忠教授为通讯作者, Email: huz@dlnu.edu.cn)。

* 国家自然科学基金项目(30671458)、(30771508), 辽宁省教育厅高等学校科研基金(2005L057)资助项目。

收稿日期: 2007-12-26, 改回日期: 2008-05-06

高效液相色谱仪(LC-20AD 型, 日本岛津公司); Shimadzu LCMS Solution 色谱工作站(日本岛津公司); SEDEX 75 低温型蒸发光散射检测器(美国迪马公司); BR4i 型高速冷冻离心机(法国 Jouan); T-25 型匀浆机(德国 IKA); DK-S26 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); AL204 型电子分析天平(Mettler-Toledo instr. Ltd)。

D-果糖, D-葡萄糖, 蔗糖(美国 Amresco 公司), 各种糖标样的纯度均大于 99%。乙腈为色谱纯试剂(德国 Merck 公司)。实验用水为二次蒸馏水。

苹果: 购于大连开发区红梅市场。

1.2 标准溶液的配制

精确称取果糖、葡萄糖、蔗糖各 25.0 mg 置于 25 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释、定容, 配制成 5 mg/mL 混合糖标准液。使用前用蒸馏水稀释成所需浓度的标准工作溶液。

1.3 样品处理

准确称取 10 g 果肉, 研磨后加入 50 mL 蒸馏水, 于 80℃ 恒温水浴中保温 20 min, 不时搅拌, 使可溶性糖充分浸出, 然后离心和过滤, 将滤液全部收集在 100 mL 的容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度。待测液用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 滤液供 HPLC 分析。

1.4 色谱条件

色谱柱: APS-2HYPERASIL (4.6 mmID×250 mm, 5 μ m); 柱温为室温; 流动相为 V(乙腈): V(水)=80:20; 流速 0.8 mL/min; 进样量 5 μ L。

蒸发光散射检测器(ELSD)的漂移管温度 40℃, 氮气作载气, 流速 1.5 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

根据糖分子都含有极性基团的特点,选用极性较大的溶剂乙腈作流动相,因为糖在乙腈中的溶解度较小,所以,采用乙腈和水的混合溶剂作流动相^[3]。实验发现,乙腈在流动相中的比例增大,可有效改善色谱峰形,有利于各组分的基线分离,但乙腈比例增大不利于糖的溶解,分析时间也显著延长,且峰信号较弱。当增加流动相中水的比例时,分析时间变短,峰信号增强,但水的比例过大,果糖和葡萄糖组分峰相互靠近,不易实现基线分离;同时,不利于流动相在漂移管内的汽化,使基线噪声增大,降低分析的灵敏度。综合考虑分离效果、峰信号的强弱、分析时间等因素,

选择流动相中乙腈与水体积比例为 80 : 20 时,分离效果最佳。

2.2 ELSD 参数的选择

漂移管温度和载气流速是 ELSD 检测器的两个重要参数^[4]。漂移管温度影响检测器的响应,温度升高,流动相蒸发趋于完全,信噪比上升,但温度过高,可能导致分析物部分汽化,信号响应值变小,雾化载气流速影响雾化器中液滴的形成,从而影响检测器的响应,信噪比随流速的增加而升高。由于本实验使用的是低温型 ELSD,所以漂移管温度设为 40℃ 即可使流动相完全蒸发,达到理想的分离效果。使用氮气作载气,流速为 1.5 mL/min 时,可达到最小的噪声信号,色谱图基线平稳。糖的标准品与苹果样品的色谱图见图 1。

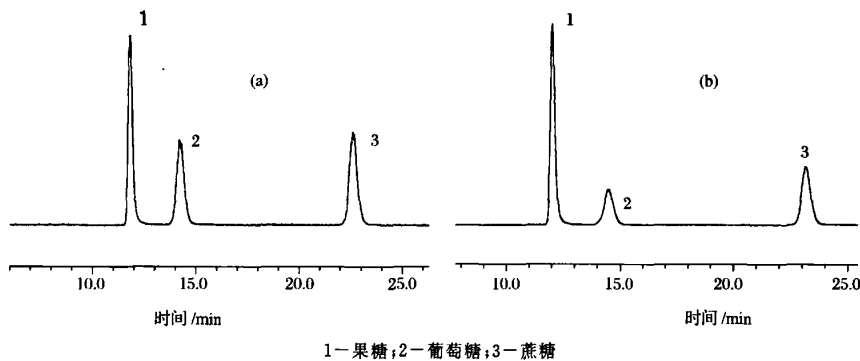


图 1 糖标样(a)和苹果样品(b)的色谱图

2.3 线性范围与检测限

将配好的混合糖标准贮备液依次稀释为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 mg/mL 的不同浓度混合糖标准溶液,在测定条件下进样 5 μ L,根据测

得的峰面积与相应糖的浓度进行线性回归,得到曲线方程。再将最小浓度的标准溶液逐级稀释,依次进样 5 μ L,计算当信噪比 S/N=5 时所对应的糖标准溶液的质量浓度以确定检测限,结果见表 1。

表 1 各种糖的标准回归方程、相关系数、线性范围和检测限

组 分	回归方程	相关系数(r)	线性范围/ μ g	检测限/ng
果 糖	$A=3.486 \times 10^6 m - 8.528 \times 10^5$	0.999 4	1.25~25	80
葡萄糖	$A=2.394 \times 10^6 m - 3.977 \times 10^5$	0.999 5	1.00~25	90
蔗 糖	$A=2.939 \times 10^6 m - 6.713 \times 10^5$	0.9995	1.25~25	80

2.4 回收率与精密度

在已知糖含量的苹果样品中,分别加入 4.0 mg 的糖标准溶液,在测定条件下连续进样 6 针,计算其回收率(回收率为:加标样品测量值减去样品测量值再除以标准加入量)和相对标准偏差(RSD),实验结果见表 2。

2.5 样品分析结果

用该方法测定了 5 种苹果样品中的糖含量,结果见表 3。

表 2 方法回收率和精密度(n=6)

组 分	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
果 糖	11.198	4.000	15.068	96.75	1.89
葡萄糖	3.626	4.000	7.712	102.15	1.41
蔗 糖	5.674	4.000	9.820	103.65	1.64

表 3 苹果样品中糖含量的分析结果 mg/g

组 分	富士	国光	黄金	红玉	乔纳金
果 糖	43.1	33.4	42.3	39.6	37.2
葡萄糖	27.3	29.6	31.5	35.4	25.8
蔗 糖	48.6	49.8	47.7	42.3	36.7

3 结 论

参 考 文 献

由于糖类化合物在正常紫外区和可见区范围内没有吸收,采用蒸发光散射检测器对糖类化合物进行高效液相色谱测定。由分析结果可知,本实验采用80%乙腈作流动相,在进样量仅为5 μ L的情况下,方法的标准回收率为96.75%~103.65%,相对标准偏差为1.41%~1.89%,而且在25 min内即能完成对各种糖的良好分离。说明此方法简便快速,结果准确可靠,分离效果良好,且具有较高的灵敏度,是检测果蔬中可溶性糖含量的理想方法。

Determination of the Soluble Sugars in Apple by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector(HPLC-ELSD)

Wang Yanying¹, Hu Wenzhong¹, Pang Kun², Ma Kun¹

1(College of Life Science,Dalian Nationalities University,Dalian 116600,China)

2(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China)

ABSTRACT A HPLC-ELSD method for quantification analysis of the soluble sugar in apple was developed under the chromatographic condition by using column (APS-2HYPERASIL, 4.6 mmID \times 250 mm, 5 μ m) and a mobile phase was V (acetonitrile): V (water) = 80:20, column temperature - room temperature, flow rate - 0.8 mL/min, sample volume - 5 μ L. The temperature of drift tube was 40 $^{\circ}$ C, flow rate of N₂ - 1.5 mL/min. The results showed that the concentrations of fructose, glucose and sucrose revealed a strongly positive correlations with the peak area respectively and the detection limit ranged from 80 ng to 90 ng, The average recoveries were 96.75%~103.65% and the relative standard deviations were 1.41%~1.89%. The experimental results indicated that this method was rapid, simple, accurate and an ideal way to determine soluble sugar content in fruits and vegetables.

Key words high performance liquid chromatography(HPLC), evaporative light-scattering detector(ELSD), apple, soluble sugar

政策
法规
标准

我国首次发布微生物类真菌农药基础性国家标准

我国首次制订的微生物类真菌农药5个基础性国家标准近期已发布,并将于2008年8月1日实施。这5个标准是:真菌农药母药产品标准编写规范 GB/T 21459.1—2008、真菌农药粉剂产品标准编写规范 GB/T 21459.2—2008、真菌农药可湿性粉剂产品标准编写规范 GB/T 21459.3—2008、真菌农药油悬浮剂产品标准编写规范 GB/T 21459.4—2008和真菌农药饵剂产品标准编写规范 GB/T 21459.5—2008。

此系列标准是针对我国现有真菌农药产品标准要求不统一,剂型混乱,质量差异显著,管理相对薄弱等突出问题,在国内外尚无类似标准文本的条件下,根据真菌农药产品的特点和实际生产情况,创造性制订了真菌农药产品的5种剂型的标准编写规范。

标准中规定了真菌类农药术语,制订了产品标准的鉴定技术和检测方法的规范性编写要求。其内容简洁明了,文字精练,实用性和操作性强,适合我国国情,是一个比较完整、严谨、科学的系列基础标准。同时也填补了我国和国际农药标准规范文本中微生物类真菌农药部分的空白,使我国真菌农药标准走进世界先进水平的行列。

标准的实施将统一和规范真菌农药产品质量管理,有助推动我国真菌农药的产业化,促进我国真菌农药的生产、经营、使用、管理和科研的发展,有助于我国真菌农药行业与国际接轨,促进对外交流和国际贸易,有助于促进我国真菌农药走进国际市场的大舞台。

此系列标准是真菌类农药的首个标准,具有一定探索性和规范性。它将对微生物农药领域的各种产品质量起到积极的推动作用,势必促进微生物农药的发展,为保护环境、保障人类身体健康做出应有的贡献。