

离子色谱法测定海带中甘露醇的含量

陈伟珠^{1,2,3}, 晋文慧^{1,2,3}, 张怡评^{1,2,3}, 陈晖^{1,2,3}, 洪专^{1,2,3*}

(1. 自然资源部第三海洋研究所, 厦门 361005; 2. 自然资源部海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 厦门 361005;
3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 厦门 361005)

摘要: 目的 建立测定海带中甘露醇含量的离子色谱法。**方法** 通过对色谱柱、流动相等色谱条件优化, 考察对海带中甘露醇及其他组分的分离效果。**结果** 采用 DIONEX CarboPac PA10(4 mm×250 mm)色谱柱, 以 H₂O:NaOH 溶液($c=250 \text{ mmol/L}$) (90:10, V:V)为流动相, 流速为 0.80 mL/min, 用脉冲安培检测器检测。在该条件下, 甘露醇在 1.01~80.83 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数为 0.9926, 最低检出限为 0.03 μg/mL, 最低定量限为 0.10 μg/mL, 平均回收率为 101.61%。**结论** 该方法简单、灵敏, 测定结果准确, 是测定海带中甘露醇含量的有效方法。

关键词: 海带; 甘露醇; 离子色谱法; 脉冲安培检测器

Determination of mannitol in *Laminaria japonica* by ion chromatography

CHEN Wei-Zhu^{1,2,3}, JIN Wen-Hui^{1,2,3}, ZHANG Yi-Ping^{1,2,3}, CHEN Hui^{1,2,3}, HONG Zhuan^{1,2,3*}

(1. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China; 2. Technical Innovation Center for Utilization of Marine Biological, Xiamen 361005, China; 3. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of mannitol in *Laminaria japonica* by ion chromatographic. **Methods** The separation effect of mannitol and other components in *Laminaria japonica* were investigated by optimizing the chromatographic conditions of column and flow equivalence. **Results** DIONEX CarboPac PA10 (4 mm×250 mm) column was used. H₂O:NaOH solution ($c=250 \text{ mmol/L}$) (90:10, V:V) was used as the mobile phase, and the flow rate was 0.80 mL/min. Under these conditions, mannitol showed a good linear relationship in the range of 1.01–80.83 g/mL. The correlation coefficient was 0.9926, the minimum limit of detection was 0.03 g/mL, the minimum limit of quantification was 0.10 g/mL, and the average recovery was 101.61%. **Conclusion** The method is a simple, sensitive, accurate and effective method for detection of mannitol in *Laminaria japonica*.

KEY WORDS: *Laminaria japonica*; mannitol; ion chromatographic method; pulse ampere detector

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFF0201104)、厦门海洋研究开发院共建项目 (K200101)、“十三五”北海市海洋经济创新发展示范项目(Bhsfs009)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFF0201104), Xiamen Ocean Research and Development Institute Co-construction Project (K200101), and the Marine Economy Innovation Development Area Demonstration Project of Beihai (Bhsfs009)

*通信作者: 洪专, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为海洋天然产物。E-mail: hzh@tio.org.cn

Corresponding author: HONG Zhuan, Professor, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China.
E-mail: hzh@tio.org.cn

0 引言

海带(*Laminaria japonica*)是一种营养丰富的食用褐藻, 含有多种功能性活性成分, 如海带多糖、甘露醇、碘等, 能补血润脾、预防或医治甲状腺肿大、降低血液中的胆固醇, 并有化痰、利水泄热的功效^[1-3]。甘露醇又称D-甘露糖醇, 为六元醇, 是白色或无色、不吸湿的结晶性粉末, 无臭, 具有清凉甜味, 微涩, 甜度约为蔗糖的70%, 是自然界中发现最早的一种糖醇。药理及临床研究表明: 甘露醇具有利尿、脱水、镇咳、平喘、清除人体内强毒性的羟自由基等作用, 用作注射剂或是其他药物的增补成分, 可治疗颅脑疾患、眼科病、老年嗜睡症、重度肺心病、右心衰竭等疾病, 也是治疗糖尿病的代用糖^[4-12]。甘露醇在食品、医药、化工等行业中, 都具有广阔的应用前景。甘露醇可采用葡萄糖或蔗糖溶液电解还原或催化还原的方法获得, 也可以从海带、海藻中提取。

目前甘露醇的测定方法有氧化还原滴定法^[1,13]、薄层扫描法^[14]、分光光度法^[15]、气相色谱法^[16-17]、高效液相色谱法^[2,18-23]和质谱法^[24], 但在实际应用中多采用2005年版中国药典规定的氧化还原滴定法、高效液相色谱法。氧化还原滴定法容易受到多种还原物质的干扰, 一般适用于较高纯度样品的甘露醇含量测定。高效液相色谱法是较好的方法, 由于甘露醇没有紫外吸收, 检测器一般选用示差折光检测器或蒸发光散射检测器, 其方法的灵敏度较低。脉冲安培离子色谱法是近年发展起来的仪器分析方法, 使用该方法, 样品不需要衍生便可以直接分离测定糖醇, 且具有极高的灵敏度^[25]。本研究采用离子色谱法测定海带中甘露醇的含量, 以期为海带中甘露醇的含量测定提供准确可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ICS-4000离子色谱仪(脉冲安培检测器, AgCl参比电极及Chromelon数据处理系统, 美国DIONEX公司)。

甘露醇(对照品, 纯度≥99%, 上海源叶生物科技有限公司); NaOH溶液(50%, 美国Fisher Scientific公司); 实验用水均为蒸馏水; 干海带条(福建远扬药业有限公司提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

精密称取甘露醇25.26 mg, 加水溶解稀释至50 mL, 配制成505.2 μg/mL甘露醇溶液母液, 再精密移取一定量的甘露醇母液加水稀释配制成不同浓度的系列标准溶液, 浓度分别为1.01、5.05、10.10、20.21、40.42、80.83 μg/mL的甘露醇对照品溶液。

1.0%盐酸溶液: 取浓盐酸3 mL, 加入水108 mL混匀。

1.2.2 样品前处理

称取1.00 g的干海带条, 剪碎后, 加入1.0%盐酸溶液30 mL, 在100 °C的水浴体条件, 搅拌4 min, 取上清液稀释10倍作为供试品溶液待测。

1.2.3 离子色谱条件

保护柱: CarboPac PA10 (4 mm×50 mm); 分析柱: CarboPac PA10 (4 mm×250 mm); 流动相: H₂O:NaOH溶液($c=250 \text{ mmol/L}$)(90:10, V:V); 流速: 0.80 mL/min; 柱温30 °C; 进样10 μL。

2 结果与分析

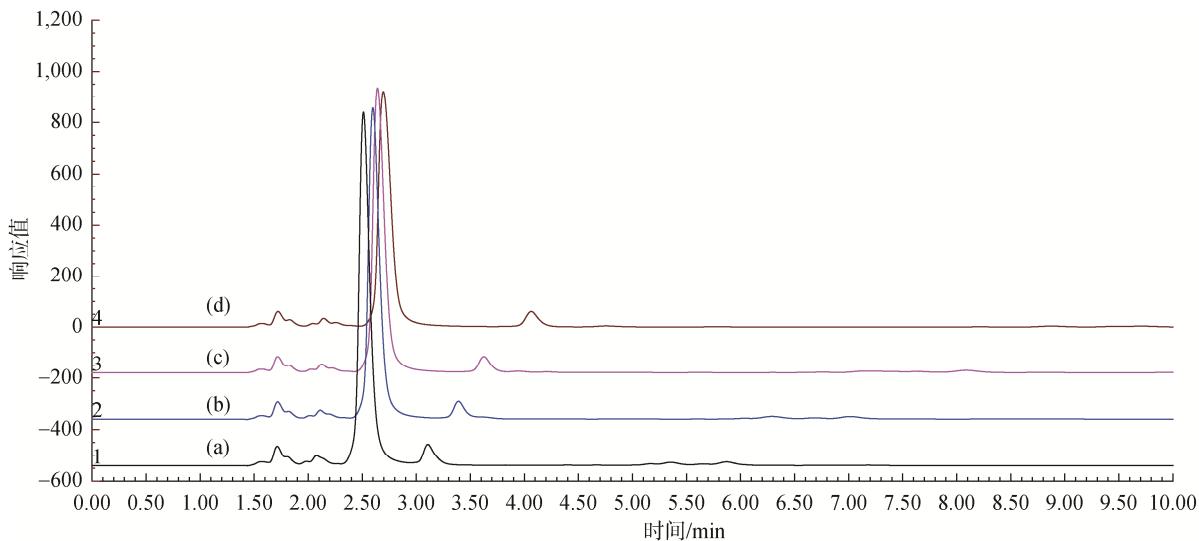
2.1 海带中甘露醇的提取

本文采用酸提取法提取海带中甘露醇^[1,4]。采用酸提取法提取海带中甘露醇的影响因素主要为提取液酸度、提取温度、固液比、提取时间。本文参考林国荣等^[4]研究的提取条件, 确定最终提取条件为: 称取1.00 g的干海带条, 剪碎后, 加入1.0%盐酸溶液30 mL, 在100 °C的水浴体条件, 搅拌4 min, 上清液稀释10倍后待测。

2.2 色谱条件的优化

采用离子色谱法检测醇类化合物常用糖柱。本研究选择CarboPac PA10(250 mm×4.0 mm)和CarboPac MA1(250 mm×4.0 mm)进行比较。经过色谱条件的摸索, 采用CarboPac MA1(250 mm×4.0 mm)色谱柱, 在流速0.80 mL/min和柱温30 °C, 流动相中H₂O:NaOH($c=250 \text{ mmol/L}$)的比例是50:50(V:V)条件下, 样品主峰跟其他峰能有效分离, 甘露醇主峰保留时间为15 min, 样品运行时间较长; 采用CarboPac PA10(250 mm×4.0 mm)色谱柱, 在流速0.80 mL/min和柱温30 °C, 流动相H₂O:NaOH($c=250 \text{ mmol/L}$)为75:25~90:10(V:V)条件下, 甘露醇主峰跟其他峰能有效分离, 且样品运行时间短, 甘露醇主峰保留时间均在3.0 min之内。虽然随着淋洗液中NaOH溶液比例增加, 样品保留时间稍微提前, 但样品主峰与其他杂质峰的分离度基本不变。因此选择色谱柱CarboPac PA10(250 mm×4.0 mm)、流动相H₂O:NaOH($c=250 \text{ mmol/L}$)为90:10(V:V)作为下一步考察的条件。

以H₂O:NaOH($c=250 \text{ mmol/L}$)为90:10(V:V)作为流动相和流速0.80 mL/min的条件下, 进一步考察柱温(30、35、40 °C)对样品分离效果的影响。实验结果表明柱温对样品的分离度和保留时间基本无影响(图1), 因此考虑到柱子使用寿命, 选择柱温为30 °C。在此条件下, 进一步考察流速(0.40、0.60、0.80 mL/min)对样品分离效果的影响。随着流速的提高, 保留时间缩短, 但样品峰之间的分离效果差别不显著。因此, 综合分离效果、分析时间等情况, 流速选择0.80 mL/min。海带中甘露醇的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析谱图分别如图2。



注: (a) $\text{H}_2\text{O}:\text{NaOH}(90:10, \text{V}: \text{V})$; (b) $\text{H}_2\text{O}:\text{NaOH}(86:14, \text{V}: \text{V})$; (c) $\text{H}_2\text{O}:\text{NaOH}(80:20, \text{V}: \text{V})$; (d) $\text{H}_2\text{O}:\text{NaOH}(75:25, \text{V}: \text{V})$ 。

图 1 PA10 柱的甘露醇离子色谱图
Fig.1 Ion chromatogram of the mannitol on the PA10

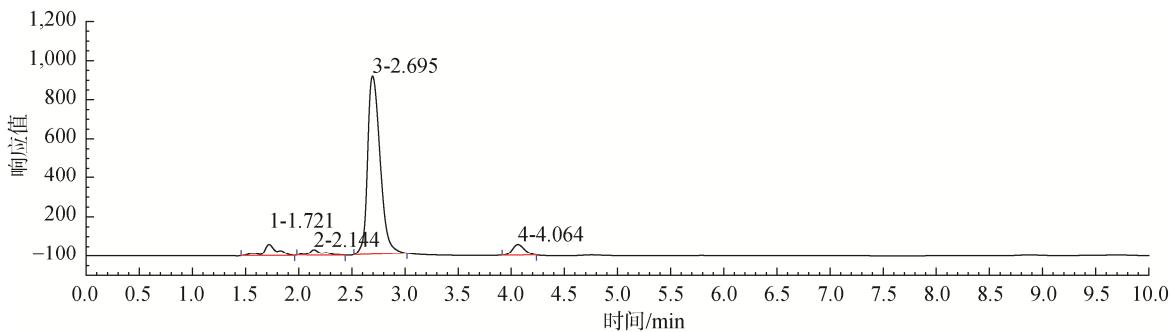


图 2 海带中甘露醇的离子色谱图
Fig.2 Ion chromatogram of the mannitol in *Laminaria japonica*

2.3 方法的线性范围及检出限

将 1.2.1 配制好的标准溶液, 按照 1.2.3 的色谱条件测定, 甘露醇的浓度与峰面积见表 1。以对照品的进样浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 色谱峰面积值为纵坐标作图, 并计算标准曲线的回归方程。标准曲线的回归方程为: $Y=0.237X+0.6119$, $r^2=0.9926$, 表明甘露醇在 1.01~80.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系良好。将对照品溶液逐级稀释后, 以信噪比 $S/N=3$ 时的质量浓度为检出限, $S/N=10$ 时的质量浓度为定量下限。计算得出检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量限为 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 甘露醇的浓度与峰面积

Table 1 Concentration and area of mannitol

浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.01	5.05	10.10	20.21	40.42	80.83
峰面积	0.2492	1.5023	3.0322	5.9334	11.1088	19.1966

2.4 回收率与精密度实验

取剪碎后的海带条, 精密称取 1.000 g, 共 6 份, 分别

加入精密称取的甘露醇 6.000 mg, 按照 2.2.2 项进行处理, 制备样品溶液, 按照 1.2.3 项的色谱条件进行样品测定, 计算加标回收率。结果平均回收率为 101.61%, RSD 为 3.15% (表 2), 实验结果表明该方法的回收率良好。

表 2 加标回收试验结果

Table 2 Recoveries of spiking experiments

样品中甘露醇含量/mg	对照品添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	回收率平均值/%	RSD/%
17.09	6.01	5.91	98.36	101.61	3.15
17.09	6.06	6.28	103.56		
17.10	6.08	6.28	103.24		
17.09	6.08	6.45	106.07		
17.10	6.04	6.07	100.45		
17.09	6.07	5.95	98.00		

2.5 实际样品测定

称取 3 份海带条, 按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液 3

份, 按照 1.2.3 项色谱条件进行测定, 计算得到 3 份海带条的含量分别为 17.44 mg/g、17.46 mg/g 和 17.55 mg/g。

3 结 论

本研究建立了海带中甘露醇含量测定的离子色谱法, 甘露醇在 1.01~80.83 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数为 0.9926, 检出限为 0.03 μg/mL, 定量限为 0.10 μg/mL, 平均回收率为 101.61%。该方法运行时间短、灵敏度高, 不受其他杂质干扰, 是测定海带中甘露醇含量的有效方法, 为海带中甘露醇的定量检测提供了准确可靠的技术手段。

参考文献

- [1] 刘振融, 郝林. 响应面优化果胶酶浸提海带甘露醇条件的研究[J]. 食品工业, 2018, 39(2): 177~181.
- LIU ZR, HAO L. Optimization of pectinase enzymolysis mannitol extraction from *Laminaria japonica* areseh by response surface methodology [J]. Food Ind, 2018, 39(2): 177~181.
- [2] 姚骏, 张弘, 郭森, 等. 海带的生物活性及系列产品开发研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(8): 198~202.
- YAO J, ZHANG H, GUO S, et al. The Research status of *Laminaria japonica* areseh biological activity and the development of series product [J]. Food Res Dev, 2018, 39(8): 198~202.
- [3] 宋武林. 海带的主要功能及加工利用研究现状[J]. 渔业研究, 2016, 38(1): 81~86.
- SONG WL. Research on the primary functions and utilization of *Laminaria japonica* [J]. J Fish Res, 2016, 38(1): 81~86.
- [4] 林国荣, 姚剑瑞, 杨杰坤. 海带多糖和甘露醇的提取工艺研究[J]. 福建水产, 2014, 36(3): 206~210.
- LIN GR, YAO JR, YANG JK. Research on extraction technology of polysaccharides and mannitol from *Laminaria japonica* [J]. J Fujian Fish, 2014, 36(3): 206~210.
- [5] 刘艳芳, 薛俊杰, 张劲松, 等. 蜈蚣草子实体中甘露醇含量的测定[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 57~60.
- LIU YF, XUE JJ, ZHANG JS, et al. Determination of mannitol in *Cordyceps militaris* fruiting body [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24: 57~60.
- [6] NURMI HM, LÄTTI AM, BRANNAN JD, et al. Comparison of mannitol and citric acid cough provocation tests [J]. Res Med, 2019, 158: 14~20.
- [7] PATIL H, GUPTA R. A comparative study of bolus dose of hypertonic saline, mannitol, and mannitol plus glycerol combination in patients with severe traumatic brain injury [J]. World Neurosurg, 2019, 125: e221~e228.
- [8] SUN SW, LI YP, ZHANG HZ, et al. The effect of mannitol in the early stage of supratentorial hypertensive intracerebral hemorrhage: A systematic review and meta-analysis [J]. World Neurosurg, 2019, 124: 386~396.
- [9] WASKOWSKI J, PFORTMUELLER CA, ERDOES G, et al. Mannitol for the prevention of peri-operative acute kidney injury: A systematic review [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2019, 58(1): 130~140.
- [10] KULLKARNI SS, SURYANAN R, RINELLA JV, et al. Mechanisms by which crystalline mannitol improves the reconstitution time of high concentration lyophilized protein formulations [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2018, 131: 70~81.
- [11] CHUKWUMA CI, MATSABISA MG, ERUKAINURE OL, et al. Shahidul Islam D-mannitol modulates glucose uptake ex vivo; suppresses intestinal glucose absorption in normal and type 2 diabetic rats [J]. Food Biosci, 2019, 29: 30~36.
- [12] MONTES-CORTÉS DH, NOVELO-DEL VALLE JL, OLIVARES-CORICH IM, et al. Impact of intestinal mannitol on hyperammonemia, oxidative stress and severity of hepatic encephalopathy in the ED [J]. Am J Emerg Med, 2018, 36(9): 1570~1576.
- [13] 李颜, 史薇娜, 唐庆九, 等. 比色法测定冬虫夏草和蛹虫草中多糖和甘露醇的含量[J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 53~57.
- LI Y, SHI WN, TANG QJ, et al. Determination of polysaccharides and mannitol in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* using colorimetric methods [J]. Acta Fudulis Fungi, 2007, 14(3): 53~57.
- [14] 宝琪, 庞志功. 西藏冬虫夏草中 D-甘露醇的薄层扫描分析[J]. 中草药, 1995, 26(4): 189.
- WANG BQ, PANG ZG. TLC determination of D-mannitol in Xizang *Cordyceps sinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1995, 26(4): 189.
- [15] 李雪, 包天桐, 王雁. 比色法测定冬虫夏草中甘露醇的含量[J]. 中草药, 1999, 24(1): 19~21.
- LI X, BAO TT, WANG YAN. Determination of mannitol in *Cordyceps sinensis* by colorimetric method [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1999, 24(1): 19~21.
- [16] 王波, 徐哲, 金顺姬, 等. 色谱法测定蛹虫草中 D-甘露醇的含量[J]. 长春中医药学报, 2005, 21(2): 37~44.
- WANG B, XU Z, JIN SJ, et al. GC determination of mannitol in *Cordyceps militaris* [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med, 2005, 21(2): 37~44.
- [17] 许丽卫, 陈闻, 耿梅梅, 等. 气相色谱-质谱联用法测定山羊血浆中甘露醇和乳果糖含量[J]. 动物营养学报, 2020, 32(6): 1~7.
- XU LW, CHEN W, GONG MM, et al. Determination of mannitol and lactulose contents in goats' plasma by gas chromatography-mass spectrometry method [J]. Chin J Anim Nutr, 2020, 32(6): 1~7.
- [18] 石子仪, 吴云, 朱月美, 等. HPLC-ELSD 测定肉苁蓉中甜菜碱、甘露醇、果糖、葡萄糖和蔗糖的含量[J]. 中国现代中药, 2019, 21(12): 1644~1646.
- SHI ZY, WU Y, ZHU YM, et al. Quantitative determination of betaine, mannitol, fructose, glucose and sucrose in cistanche herba by HPLC-ELSD [J]. Mod Chin Med, 2019, 21(12): 1644~1646.
- [19] 谷华, 丁孝良, 孙宝军. HPLC 法测定玉屏风颗粒中黄芪甲苷及甘露醇的含量[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 839~843.
- GU H, DING XL, SUN BJ. Determination of contents of astragaloside and mannitol in Yupingfeng granules by HPLC [J]. World Chin Med, 2019, 14(4): 839~843.
- [20] 倪金鹏. 檀香叶中甘露醇的含量测定方法研究[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(5): 1015~1017.
- NI JP. Study on Determination method of mannitol in sandalwood leaves [J]. Heilongjiang Med J, 2015, 28(5): 1015~1017.
- [21] 朱方剑, 陈建, 林丽萍, 等. HPLC-ELSD 法测定乌灵菌粉中甘露醇的含量[J]. 中国药事, 2013, 27(5): 534~536.

- ZHU FJ, CHEN J, LIN LP, et al. Content determinint of mannitol in wuling powder by HPLC-ELSD [J]. Chin Pharm Aff, 2013, 27(5): 534-536.
- [22] 杨学军, 傅黎春, 李金兰, 等. HPLC-ELSD 法测定注射用灯盏花素中甘露醇的含量[J]. 北方药学, 2012, 9(8): 16-17.
- YANG XJ, FU LC, LI JL, et al. Determination of mannitol in Breviscapine Injection by HPLC-ELSD [J]. J North Pharm, 2012, 9(8): 16-17.
- [23] 吴敬梅, 李燕平, 瞿亮, 等. 冬虫夏草甘露醇含量的高效液相色谱法测定[J]. 食药用菌, 2016, 24(6): 388-392.
- WU JM, LI YP, QU L, et al. Determination of mannitol content in *Cordyceps militaris* by high performance liquid chromatography [J]. Edible Med Mushrooms, 2016, 24(6): 388-392.
- [24] 张铭雅, 朱志铭, 姚迪, 等. HILIC-MS/MS 技术同时检测蛹虫草中虫草素、虫草酸、腺苷和肌苷含量的方法学[J]. 生物加工过程, 2019, 17(4): 106-112.
- ZHANG MY, ZHU ZM, YAO D, et al. Simultaneous detection of cordycepin, D-mannitol, adenosine and inosine in *Cordyceps militaris* by HILIC-MS/MS [J]. Chin J Bioprocess Eng, 2019, 17(4): 106-112.
- [25] 张水锋, 盛华栋, 姜侃, 等. 梯度洗脱优化-离子色谱-脉冲安培法分析婴幼儿配方乳粉中的糖和糖醇[J]. 色谱, 2016, 34(10): 946-950.
- ZHANG SF, SHENG HD, JIANG K, et al. Simultaneous determination of 9 sugars and sugar alcohols in foods by ion chromatography with pulsed amperometric detection [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(10): 946-950.
- (责任编辑: 王欣)

作者简介



陈伟珠, 副研究员, 主要研究方向为海洋天然产物。

E-mail: wzchen@tio.org.cn

洪专, 教授, 主要研究方向为海洋天然产物。

E-mail: hzh@tio.org.cn

“饮料品质控制及检测分析”专题征稿函

饮料工业是我国食品工业的重要组成部分, 与人民物质生活息息相关。近年来, 随着人们物质生活水平的不断提高, 对饮料的品质要求也在不断提升, 好喝与安全已经成为一种潮流与时尚。

近年来的塑化剂风波、勾兑门、农残门、致癌门等诸多事件或多或少地困扰着饮料行业发展, 饮料品质安全问题越来越得到社会和广大消费者的关注。

鉴于此, 本刊特别策划“饮料品质控制及检测分析”专题, 主要围绕饮料产业发展现状、饮料加工过程中质量控制与品质安全管理、饮料质量检测标准、饮料中有毒有害物质的检测方法、饮料包装材料等或您认为本领域有意义问题展开讨论, 计划在**2021年3/4月**出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心 吴永宁 研究员和专题主编北京市营养源研究所 许洪高 研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力, 综述及研究论文均可。请在**2021年2月28日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题饮料品质控制及检测分析):

网站:www.chinafoodj.com(备注:投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2021专题:饮料品质控制及检测分析”)

邮箱投稿:E-mail:jfoods@126.com(备注:饮料品质控制及检测分析专题投稿)