

高效液相色谱法测定维生素C咀嚼片和泡腾片中木糖醇、山梨醇和蔗糖的含量

刁飞燕, 刘春霖, 吴晓云, 李启艳*

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定维生素C泡腾片和咀嚼片中木糖醇、山梨醇和蔗糖的分析方法。

方法 采用CAPCELL PAK NH₂柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(70:30, V:V)为流动相, 流速为1 mL/min, 柱温为35 °C, 示差折光检测器进行检测。**结果** 木糖醇、山梨醇、蔗糖分别在10.50~104.94 μg ($r=0.9993$)、9.98~99.72 μg ($r=0.9999$)、9.72~97.24 μg ($r=0.9980$)范围内呈良好线性关系, 检出限均为2 μg; 平均回收率分别为95.1%、92.7%、92.6%, RSD分别为1.56%、2.22%、1.76%。**结论** 该方法简单、快速、准确, 分离度良好, 适用于维生素C咀嚼片和泡腾片中木糖醇、山梨醇和蔗糖的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 维生素C咀嚼片和泡腾片; 木糖醇; 山梨醇; 蔗糖

Determination of xylitol, sorbitol and sucrose in chewable and effervescent vitamin C by high performance liquid chromatography

DIAO Fei-Yan, LIU Chun-Lin, WU Xiao-Yun, LI Qi-Yan*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of xylitol, sorbitol and sucrose in chewable and effervescent vitamin C by high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were separated on a CAPCELL PAK NH₂ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of water and acetonitrile (30:70, V:V). The flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 35 °C, and samples were detected with refractive index detector. **Results** The standard curve of xylitol was linear over the range in 10.50~104.94 μg ($r=0.9993$). The standard curve of sorbitol was linear over the range in 9.98~99.72 μg ($r=0.9999$). The standard curve of sucrose was linear over the range in 9.72~97.24 μg ($r=0.9980$). The limit of detection was 2 μg. The recovery was 95.1%, 92.7% and 92.6% and the RSD was 1.56%, 2.22% and 1.76%, respectively. **Conclusion** Each substance can be separated with this method, which is simple, rapid and accurate. It can be used for the determination of xylitol, sorbitol and sucrose in chewable and effervescent vitamin C.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; chewable and effervescent vitamin C; xylitol; sorbitol; sucrose

*通讯作者: 李启艳, 副主任药师, 研究方向为保健食品质量控制。E-mail: 15253118118@163.com

*Corresponding author: LI Qi-Yan, Deputy Chief Pharmacist, Shandong Institute for Food and Drug Control, No. 2749, the New Lok Street, High-tech District, Jinan 250101, China. E-mail: 15253118118@163.com

1 引言

维生素C是基础的必需营养素之一,对人体生命活动的许多过程发挥重大作用,维生素C无法自身合成,必须从外部摄取,因此适量补充维生素C对人体健康有重要意义。维生素C泡腾片和咀嚼片因其口感好、服用方便,是目前补充维生素C类保健食品的主要剂型。为了改善口感,通常在产品中加入木糖醇、山梨醇和蔗糖作为甜味剂^[1],但过量食用可引起腹泻,同时对人体血糖含量^[2]有重要影响。因此建立分析方法测定其中的蔗糖、木糖醇和山梨醇含量具有重要意义。

目前测定糖的分析方法有化学法^[3]、酶比色法、酶电极法^[4]、毛细管电泳法^[5]、高效液相色谱法^[6-15]等。化学法准确性差,测定结果偏高,酶比色法和酶电极法测定组分单一,易受酶纯度及酶活性的影响。本研究采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)结合示差折光检测器同时测定木糖醇、山梨醇和蔗糖3种组分,可以克服上述方法缺点,结果准确可靠。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

维生素C咀嚼片(4批),维生素C泡腾片(9批)购于各药店及超市。

维生素EC泡腾片和韵生牌维生素EC泡腾片(山东希福生物科技有限公司,批号:2015060301、2015060302、2015060303、2015060401、2015060402、2015060403);力度伸维C加锌泡腾片(山东新华制药股份有限公司,批号:131144);维口佳®维生素C泡腾片(西安利君制药有限责任公司,批号:1505077-2);果维康®维生素C泡腾片(石药集团欧意药业有限公司,批号:375151407);纽士健牌维生素C咀嚼片(山东森健生物科技有限公司,批号:150701);维生素C咀嚼片(山东保和生物工程有限公司,批号:20150319、20150320、20150321)。

乙腈(色谱纯,德国Merker公司);超纯水(美国Millipore公司);木糖醇(>99.0%,Dr Ehrenstorfer GmbH,批号:80826);山梨醇(批号:101109-201402,中国食品药品检定研究院);蔗糖(>99.8%,批号:111507-201303,中国食品药品检定研究院)。

2.2 仪器与设备

Mettler Toledo MS 电子天平(美国梅特勒-托利多公司);Waters e2695 高效液相色谱仪(配Waters 2414 示差折光检测器,美国Waters公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TDZ5-WS 台式低速离心机(长沙湘仪有限公司);FW-100 高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂);BPZ-6063 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱:CAPCELL PAK NH₂ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温:35℃;流动相:乙腈:水(70:30, V:V);流速:1 mL/min;检测器:示差折光检测器(温度35℃)。进样量:20 μL。

2.3.2 溶液的配制

(1) 标准溶液的制备

精确称取木糖醇、山梨醇、蔗糖适量分别置于10 mL容量瓶中,用水配制成浓度为10 mg/mL的标准储备液。分别准确吸取不同体积木糖醇、山梨醇、蔗糖标准储备液,用水稀释成浓度分别为0.5、1、2、3、5 mg/mL的混合标准工作液。

(2) 样品溶液的制备

准确称取粉碎均匀的样品适量,于50 mL容量瓶中,加入40 mL水,超声提取20 min,静置,待冷却至室温时定容至刻度,3500 r/min离心5 min,取上清液过0.45 μm的滤膜,滤液供HPLC分析。

(3) 阴性样品溶液的制备

经测定,样品维口佳®维生素C泡腾片中木糖醇、山梨醇和蔗糖三种物质均未检出,按其处方量制成不含上述物质的阴性样品,同2.3.2(2)项下方法处理,即得。

3 结果与分析

3.1 检测器和色谱柱的选择

糖类物质的分析,应用较多的检测器为示差折光检测器和蒸发光散射检测器,本研究通过等度洗脱分析木糖醇、山梨醇和蔗糖3种物质,所测含量均为百分含量,示差检测器满足这一分析要求,色谱柱与检测器温度一致,避免因温度变化而引起的基线漂移。与Prevail Carbohydrate ES等专用糖柱相比,CAPCELL PAK NH₂柱造价较低,维护相对简单,满

足分析要求。

3.2 样品提取方法与试剂的选择

比较以下 3 种提取方法对所测物质含量的影响,第 1 种,先加入乙酸锌和亚铁氰化钾,后用水定容,搅拌,静置,过滤,取滤液,用乙腈稀释待测;第 2 种,用水超声提取 30 min 后,定容至刻度,混匀,离心,取上清液待测;第 3 种,用 70%乙腈超声提取 30 min 后,定容至刻度,混匀,离心,取上清液待测。经比较,3 种方法对同一样品所测物质含量差异无统计学意义,第 1 种方法中乙酸锌和亚铁氰化钾的作用为

蛋白质沉淀剂,所测样品中蛋白质含量极少,对所测物质无干扰,故无需添加;第 3 种方法成本相对较高,易对环境造成污染,与这两种方法相比,第 2 种方法简单易行,对环境污染少。

3.3 标准与样品图谱

分别精密吸取 2.3.2 项下的对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪中,记录色谱图,结果显示,供试品色谱图中,呈现与对照品保留时间相同的色谱峰,阴性对照未呈现相应的色谱峰,阴性对照无干扰,见图 1~图 4。

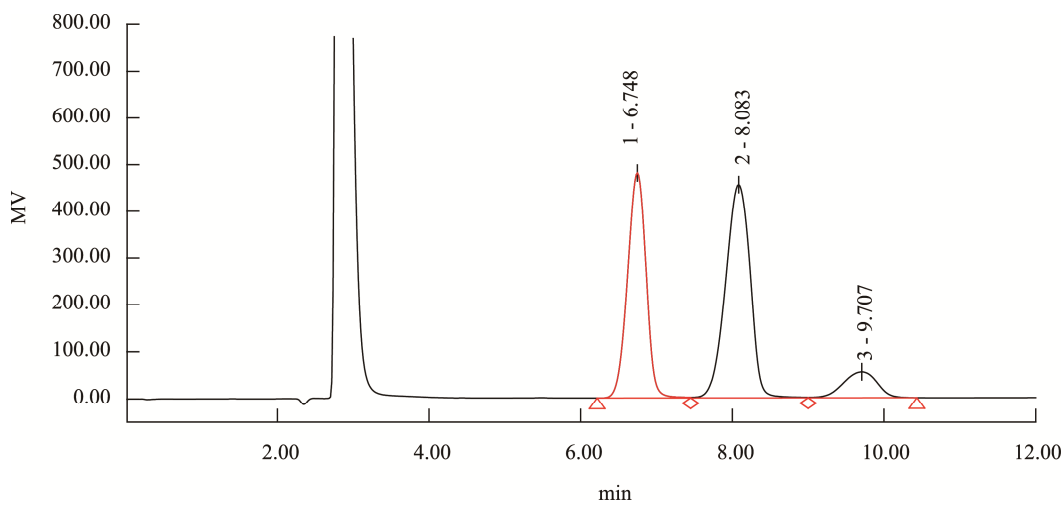


图 1 混合标准溶液(1-木糖醇; 2-山梨醇; 3-蔗糖)
Fig. 1 Chromatogram of standard sample (1-xylitol; 2-sorbitol; 3-sucrose)

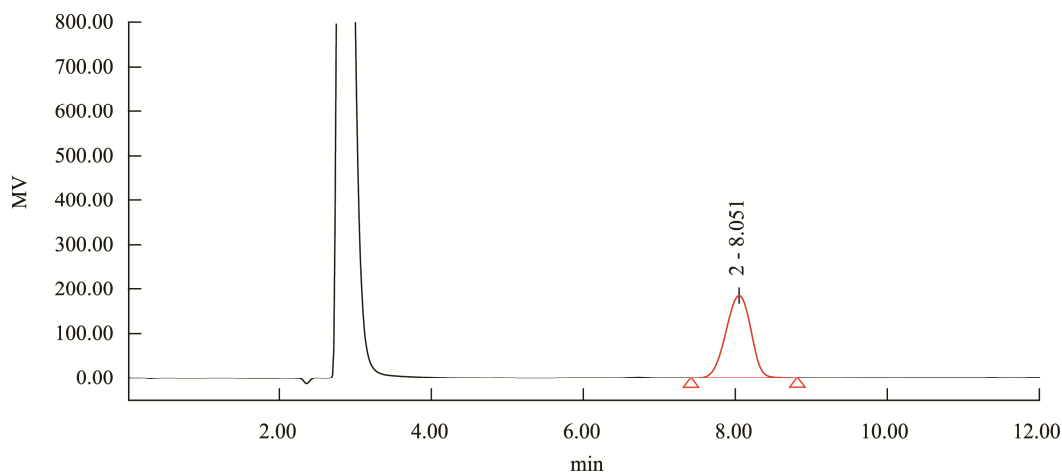


图 2 典型样品咀嚼片色谱图(2-山梨醇)
Fig. 2 Chromatogram of chewable tablets (2-sorbitol)

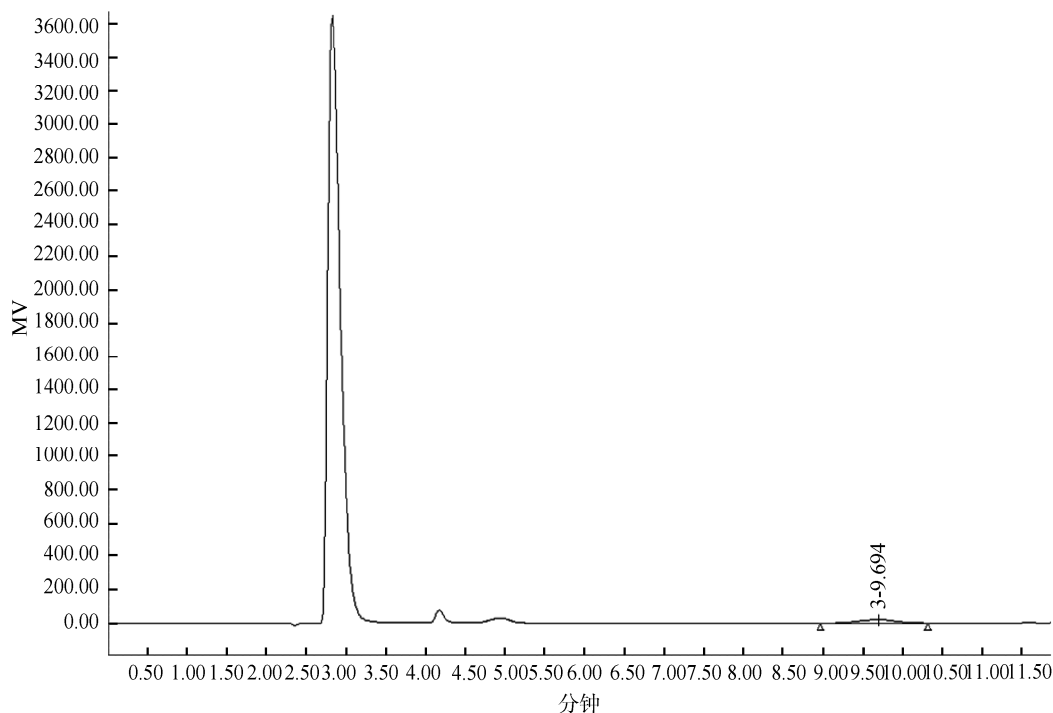


图3 典型样品泡腾片色谱图(3-蔗糖)

Fig.3 Chromatogram of effervescent tablets (3-sucrose)

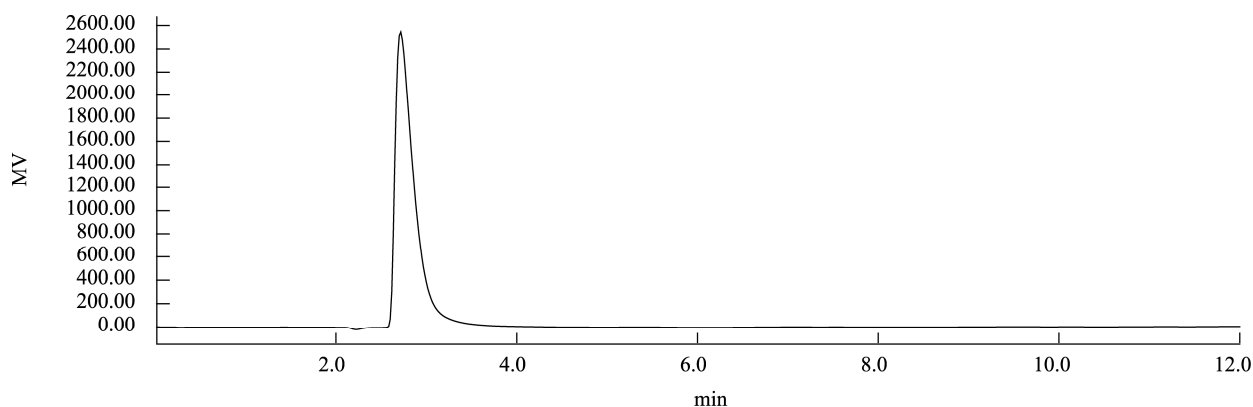


图4 阴性样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of blank samples

3.4 标准曲线与检出限

分别取上述标准溶液进样,按2.3.1项下的色谱条件进样测定,各组分以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程:木糖醇 $Y=6.28 \times 10^4 X - 4.91 \times 10^3$, $r=0.9993$,线性范围:10.50~104.94 μg ;山梨醇 $Y=5.81 \times 10^4 X - 3.15 \times 10^3$, $r=0.9999$,线性范围:9.98~99.72 μg ;蔗糖 $Y=5.70 \times 10^4 X - 2.35 \times 10^3$, $r=0.9980$,线性范围:9.72~97.24 μg 。以3倍信噪比确定最低检出限,各组分检出限均为2 μg 。

3.5 仪器精密度实验

取浓度为2 mg/mL的混合标准品溶液连续进样5次,山梨醇、木糖醇和蔗糖峰面积的RSD分别为1.56%、1.19%和1.98%,表明仪器精密度良好。

3.6 方法精密度和回收率实验

取2.3.2(3)项下制备的阴性样品5份,分别加入木糖醇、山梨醇和蔗糖各约50 mg,按2.3.2(2)项下方法同法提取测定,根据加标量和测定量计算回收率和精密度,结果见表1。

表 1 各检测物质回收率
Table 1 Recoveries and relative standard deviations

组分	本底值	加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD (%)
木糖醇	ND	52.47	49.32	94.00	95.05	1.56
	ND	50.48	49.15	97.37		
	ND	51.26	48.86	95.32		
	ND	50.09	46.85	93.53		
	ND	50.56	48.05	95.04		
	ND	49.66	45.18	90.97		
山梨醇	ND	50.12	47.09	93.95	92.73	2.22
	ND	50.66	46.40	91.60		
	ND	49.85	45.54	91.35		
	ND	51.02	48.86	95.77		
	ND	48.62	45.63	93.85		
	ND	49.12	44.32	90.23		
蔗糖	ND	50.22	46.86	93.31	92.59	1.76
	ND	51.45	47.12	91.58		
	ND	49.85	46.85	93.98		

注: ND 表示未检出; RSD: 相对标准偏差。

3.7 样品的测定

取 13 批样品(4 批咀嚼片, 9 批泡腾片), 按 2.3.2(2) 所述方法对样品进行提取测定, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果(n=3)
Table 2 Results in sample for all three substances (n=3)

样品序号	木糖醇(g/100 g)	山梨醇(g/100 g)	蔗糖(g/100 g)
样品 1	ND	6.11	2.20
样品 2	ND	5.83	2.10
样品 3	ND	5.75	2.09
样品 4	ND	6.27	2.26
样品 5	ND	6.35	2.42
样品 6	ND	6.15	2.13
样品 7	ND	ND	28.55
样品 8	ND	ND	ND
样品 9	ND	ND	4.23
样品 10	ND	ND	36.75
样品 11	ND	48.90	ND
样品 12	ND	46.74	ND
样品 13	ND	48.59	ND

注: ND 表示未检出, 样品 1-9 为泡腾片, 10-13 为咀嚼片。

由表 2 看出, 13 批样品中木糖醇均未检出, 1 批泡腾片样品木糖醇、山梨醇、蔗糖 3 种物质均未检出, 6 批泡腾片山梨醇和蔗糖均检出, 2 批泡腾片检出蔗糖, 3 批咀嚼片检出山梨醇, 1 批咀嚼片检出蔗糖, 检出样品中山梨醇的含量范围为 5.75~48.90 g/100 g, 蔗糖的含量范围为 2.09~36.75 g/100 g。

4 讨 论

本研究建立了高效液相色谱法测定维生素 C 咀嚼片、泡腾片中山梨醇、木糖醇和蔗糖的含量。在所测样品中, 木糖醇均未检出, 山梨醇的含量范围为 5.75~48.90 g/100 g, 蔗糖的含量范围为 2.09~36.75 g/100 g。与蔗糖相比, 木糖醇有热量低的特点, 可作为糖尿病人安全的甜味剂和营养补充剂, 山梨醇热值与蔗糖相近, 甜度为蔗糖一半, 具有吸湿、保水作用, 但木糖醇和山梨醇过量食用可引起肠道问题, 目前相关标准对维生素 C 咀嚼片、泡腾片中木糖醇、山梨醇、蔗糖的限值并未作明确规定, 需进一步加强研究。本研究为建立相关标准提供了依据。

参考文献

[1] U.S. Food and Drug Administration. A food labeling guide [S].

- [2] 丁健桦, 饶火瑜, 王兴祥. HPLC 法初步研究维生素 C 的稳定性[J]. 食品工业, 2004, 1: 44-45.
Ding JH, Rao HY, Wang XX. Study of the factors which affect the stability of vitamin C by HPLC [J]. Food Ind, 2004, 1: 44-45.
- [3] GB/T 5009.7-2008 食品中还原糖的测定[S].
GB/T 5009.7-2008 Reducing sugar determination in foods [S].
- [4] GB/T 16285-1996 食品中葡萄糖的测定[S].
GB/T 16285-1996 Glucose determination in foods [S].
- [5] 傅崇岗, 单瑞峰, 苏昌华. 毛细管电泳电化学检测法测定枣中糖类物质[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 91-94.
Fu CG, Shan RF, Su CH. Simultaneous determination on sucrose glucose and fructose in jujube by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Food Sci, 2003, 24(12): 91-94.
- [6] GB/T 5009.8-2008 食品中蔗糖的测定[S].
GB/T 5009.8-2008 Determination of saccharose in foods [S].
- [7] Li J, Chen ML, Zhu Y. Separation and determination of carbohydrates in drinks by ion chromatography with a self-regenerating suppressor and an evaporative light-scattering detector [J]. J Chromatogr A, 2007, 1155: 50-56.
- [8] 刁春霞, 张雪梅, 刘波. 干红葡萄酒中总糖测定方法的改进[J]. 中国酿造, 2009, (5): 165-166.
Diao CX, Zhang XM, Liu B. Improvement of determination method of the total sugar in dry red wine [J]. China Brew, 2009, (5): 165-166.
- [9] 林慧, 颜春荣, 徐春祥, 等. HPLC-ELSD 法同时测定食品中的 10 种糖和糖醇[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 286-290.
Lin H, Yang CR, Xu CX, *et al.* Simultaneous determination by HPLC-ELSD of 10 kinds of sugars and sugar alcohols in foods [J]. Food Sci, 2013, 34(12): 286-290.
- [10] 张洁, 翟志雷, 张伟, 等. HPLC 法同时测定维生素 C 咀嚼片中维生素 C 和糖的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10): 1534-1536.
Zhang J, Zhai ZL, Zhang W, *et al.* Simultaneous determination of vitamin C and sugar in chewable vitamin C by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(10): 1534-1536.
- [11] 刘亚攀, 冉雪琴, 陈璐莹, 等. 柱前紫外衍生-高效液相色谱法同时测定功能食品中八种糖醇和糖[J]. 四川大学学报, 2014, 45(5): 831-835.
Liu YL, Ran XQ, Chen LY, *et al.* Simultaneous determination of sugar alcohols and sugars in functional foods by precolumn ultraviolet derivatization-high performance liquid chromatography [J]. J Sichuan Univ, 2014, 45(5): 831-835.
- [12] 陈晓霞, 游景水, 杨祖伟. 高效液相色谱法测定保健食品中三氯蔗糖的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1883-1886.
Chen XX, You JS, Yang ZW. Determination of sucralose content in health food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(5): 1883-1886.
- [13] 黄蕊, 吴光斌, 陈发河. 高效液相色谱法测定水果中常见的 4 种糖和糖醇[J]. 集美大学学报, 2014, 19(3): 180-184.
Huang R, Wu GB, Chen FH. Measurement of 4 common sugars and sugar alcohol in fruits by high performance liquid chromatography [J]. J Jimei Univ, 2014, 19(3): 180-184.
- [14] 赵文惠, 曾诚, 丛媛媛. 高效液相-示差折光法比较新疆地产 8 种蜂蜜中 4 种糖的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 4194-4196.
Zhao WH, Zeng C, Cong YY. Determination of fructose, glucose, sucrose, and maltose in honey by high performance liquid chromatography with refractive index detector [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 4194-4196.
- [15] 许丽珠, 李秀英, 黄金凤, 等. 超滤离心净化-高效液相色谱法同时测定配方乳粉中的单糖、双糖和低聚果糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 634-637.
Xu LZ, Li XY, Huang JF, *et al.* Simultaneous determination of monosaccharides, disaccharides and fructo-oligosaccharides in milk powder by ultra-filtration clean up coupled with HPLC [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(2): 634-637.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刁飞燕, 主管药师, 主要研究方向为保健食品检测。
E-mail: 964024377@qq.com



李启艳, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品质量控制。
E-mail: 15253118118@163.com