

离子色谱法同时测定蛋白胨中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖含量

朱叶青^{1*}, 吕娟¹, 王婷婷², 杜艳¹, 范鑫², 张彦斌²

(1. 呼和浩特市食品检验所, 呼和浩特 010090; 2. 内蒙古自治区食品检验检测中心, 呼和浩特 010090)

摘 要: **目的** 建立离子色谱法同时检测蛋白胨中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的分析方法。**方法** 样品用水作为提取剂, 用 OnGuard II RP 柱和 OnGuard II H 柱净化, 50 mmol/L NaOH 溶液作为流动相, 用 Carbowax PA20 柱进行离子色谱分析。**结果** 在该条件下 5 种糖都能得到较好分离, 线性良好, 葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的检出限为 0.002、0.004、0.011、0.007、0.018 mg/L, 平均回收率为 90.59%~97.68%(n=9)。**结论** 该方法操作简便、灵敏度高, 可用于作为蛋白胨中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的检测。**关键词:** 蛋白胨; 葡萄糖; 果糖; 蔗糖; 乳糖; 麦芽糖; 离子色谱

Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose, maltose and lactose in peptone by ion chromatography

ZHU Ye-Qing^{*}, LV Juan¹, WANG Ting-Ting², DU Yan¹, FAN Xin², ZHANG Yan-Bin²

(1. Hohhot Food Inspection Institute, Hohhot 010090, China;

2. Inner Mongolia Autonomous Region Food Inspection and Testing Center, Hohhot 010090, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simultaneous method for determination of glucose, fructose, sucrose, maltose and lactose in peptone by ion chromatography. **Methods** The sample was extracted with water, and purified by OnGuard II RP column and OnGuard II H column, with the mobile phase of 50 mmol/L NaOH solution. Carbowax PA20 column was used for ion chromatography analysis. **Results** Under these conditions, all five saccharides could be separated with good linearity. The limits of detection of glucose, fructose, sucrose, lactose and maltose were 0.002, 0.004, 0.011, 0.007, and 0.018 g/mL, respectively. The average recoveries were 90.59%~97.68% (n=9). **Conclusion** This method is simple and sensitive, which can be used for the determination of glucose, fructose, sucrose, maltose and lactose in peptone.

KEY WORDS: peptone; glucose, fructose, sucrose, lactose, maltose; ion chromatography

1 引 言

微生物培养基是在实验室中用来培养微生物的营养物质, 用于保证微生物繁殖、鉴定或保持活力。我国目前培养

基高端市场的份额占有比例方面, BD、Thermo Oxoid、Merck Millipore 等国际知名培养基品牌份额超过了 70%, 国产品牌所占份额较低, 为破解国外技术壁垒、解决我国培养基评价体系不规范问题, 切实提升国产培养基相关产品的质量和竞争力,

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2017YFC1601400)

Fund: Supported by Key Project of Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (2017YFC1601400)

*通讯作者: 朱叶青, 主任药师, 主要研究方向为食品、药品检验检测。E-mail: hhhtzyq@sina.com

*Corresponding author: ZHU Ye-Qing, Chief Pharmacist, Hohhot Food Inspection Institute, No.69, Horqin South Road, Hohhot International Student Pioneer Park, Hohhot 010090, China. E-mail: hhhtzyq@sina.com

本研究拟对各种天然培养基的组成进行分析, 蛋白胨作为培养基的重要原材料, 对其中所含各组分进行研究尤为必要。

蛋白胨是将肉、酪素或明胶用酸或蛋白酶水解后干燥而成的外观呈淡黄色的粉剂, 它可以作为微生物培养基的主要原料, 在食品的发酵工业及微生物检验等领域中的用量均很大, 其质量的优劣对食品安全检验检测工作及食品生产将产生直接的影响。糖类作为蛋白胨中提供微生物生长碳源的重要成分, 在其生长中起着重要作用。本研究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的原理^[1], 采用高效的阴离子交换柱^[2,3]进行分离, 用安培检测器进行检测^[4-6], 建立了蛋白胨中葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖的离子色谱测定方法, 对市售蛋白胨中五种糖类的含量进行测定, 为提升我国培养基企业的质控技术水平提供基础数据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ICS 5000⁺离子色谱仪(配脉冲安培检测器, 金电极, 美国 Thermo Fisher 公司); ME 204E 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); MS 3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); Carbpac PA20 色谱柱(美国 Thermo Fisher 公司)。

标准品: 果糖(99.6%)、蔗糖(99.5%)、乳糖(99.0%, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); D-无水葡萄糖(99.9%)、麦芽糖(94.4%, 中国食品药品检定研究院);

甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 高纯氮气($\geq 99.995\%$, 北京氮谱北分气体工业有限公司); 氢氧化钠溶液(50%, 美国 Sigma-Alorich 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

标准储备液: 分别精密称取果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖各 0.1 g、乳糖 0.2 g, 分别置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 置于 4 °C 冰箱中密封可贮藏一个月。

糖标准混合液: 移取储备液葡萄糖、乳糖各称取均质后的样品 0.06 g(0.0001 g), 置 20 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 室温静置 10 min 后, 取 1 mL 上清液至 10 mL

容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。将该稀释液 10 mL 分别用 OnGuard II RP 柱(用 5 mL 甲醇和 10 mL 水活化)和 OnGuard II H 柱(用 10 mL) 6 mL 微孔滤膜过滤后, 待测。

2.2.2 色谱条件

色谱柱: Carbpac PA20 Guard 柱(3 mm×30 mm, 6.5 μ m) 和 Carbpac PA20 Analytical 柱(3 mm×150 mm, 6.5 μ m)。

流动相: 5 mmol/L NaOH 溶液; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μ L。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

采用 NaOH 溶液作为淋洗液^[7-9], 麦芽糖出峰较晚, 为了提高分析速度, 尝试用梯度淋洗^[10,11], 麦芽糖虽然出峰提前, 但是由于梯度洗脱导致基线不稳, 且分析采集后需重新过渡到初始浓度, 对分析效率的提高无实际作用, 故采用等度淋洗进行分析。

用不同浓度的 NaOH 溶液进行淋洗, 随着 NaOH 浓度的降低, 各组分保留时间延长; 当 NaOH 浓度越低, 葡萄糖与果糖的分离度变小; 当 NaOH 浓度升高, 果糖与蔗糖的分离度变小, 最后综合考虑分析效率且分离度能达到实验要求的原则, 选择 50 mmol/L 的 NaOH 作为淋洗液。

淋洗液流速高于 0.5 mL/min, 葡萄糖、果糖分离度不好; 流速过低时, 各分析组分出峰太晚; 最终实验选择流速 0.4 mL/min, 各目标组分可达有效分离(见图 1)。

3.2 样品前处理条件优化

对于蛋白胨样品, 含有丰富的蛋白质、色素、脂类等物质, 这些物质如果引入色谱分离体系中, 不仅易造成色谱柱污染、柱效下降, 还会干扰对目标组分的分析。因此在提取糖的同时, 应该选择有效的方法将这些杂质分离。

分别使用乙醇、乙腈、碘基水杨酸、丙酮对样品进行净化^[12], 均不能有效去除基质干扰, (见图 2)。本实验最终采用 OnGuard II H 柱去除样品中的碱土金属离子、过渡金属离子和碳酸根离子, 用 OnGuard II RP 柱去除样品中芳香族化合物、脂类及有机羧酸等分析干扰物^[13,14], 葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖能与各杂峰得到有效分离(见图 3)。

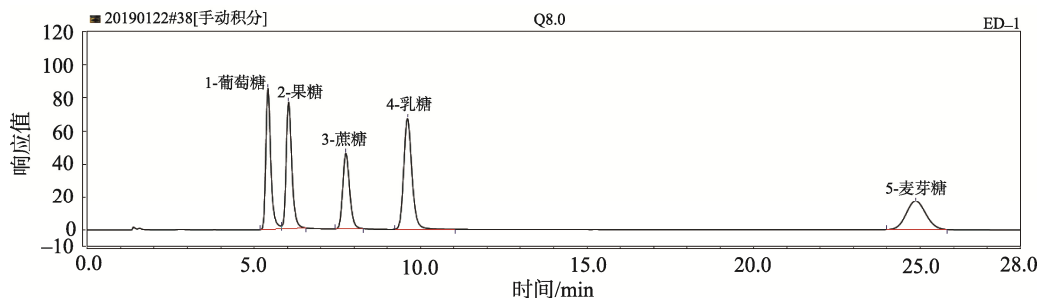


图 1 葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖标准品的离子色谱图

Fig.1 Ion chromatogram of glucose, fructose, sucrose, lactose and maltose

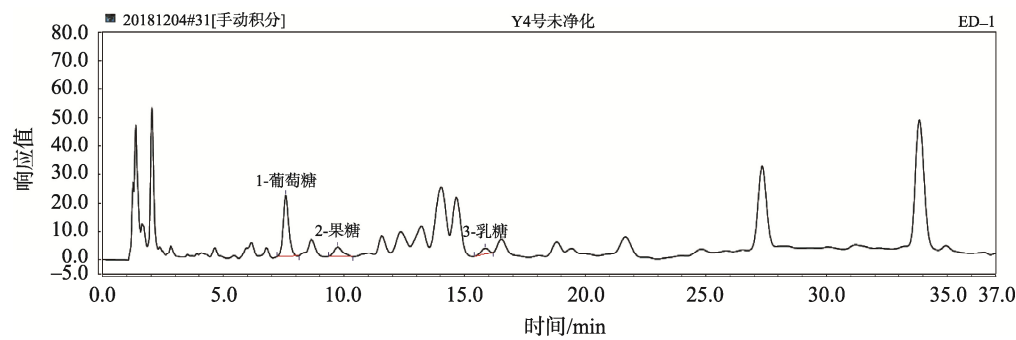


图 2 未净化样品离子色谱图
Fig.2 Ion chromatogram of the unpurified sample

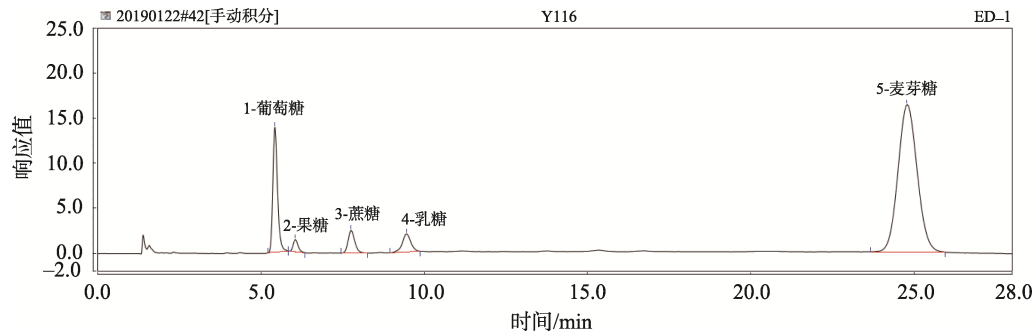


图 3 样品离子色谱图
Fig.3 Ion chromatogram of samples

3.3 方法验证

3.3.1 标准曲线、线性范围和检出限、定量限

在 2.4 项下的色谱条件下,将配制好的系列标准工作液,分别进样 5 μL 测定,以目标物峰面积为纵坐标(Y),相应质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标(X),绘制标准曲线,结果见表 1。

将果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖色谱信号峰与基线信号进行比较,以信噪比约为 3:1 时注入仪器的量确定为检出限,以信噪比约为 10:1 时注入仪器的量确定为定量限。葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖的检出限及定量限分别见表 1。

表 1 线性范围、回归方程、相关系数和检测限、定量限
Table 1 Linear range, regression equation, correlation coefficient, limit of detection and limit of quantitation

化合物	线性范围 /($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	r^2	LOD /(mg/L)	LOQ /(mg/L)
葡萄糖	0.02~4.80	$Y=3.5025X$	1.0000	0.002	0.006
果糖	0.05~4.00	$Y=1.6867X$	0.9994	0.004	0.012
蔗糖	0.05~10.00	$Y=1.3269X$	0.9966	0.011	0.033
乳糖	0.05~9.60	$Y=2.4278X$	1.0000	0.007	0.028
麦芽糖	0.05~10.40	$Y=1.4797X$	0.9999	0.018	0.054

3.3.2 准确度与精密度实验

精确称取某已测含量的蛋白胨样品,进行加标回收实验。分别的上述样品进行 3 个水平的加标回收率进行测定,每个水平进行 3 次平行实验,平均回收率为 90.59%~97.68%,RSD 为 0.20%~6.42%,见表 2。

表 2 5 种糖类的添加回收实验($n=9$)
Table 2 Addition and recovery of 5 kinds of saccharides ($n=9$)

待测组分	样品含量 /($\mu\text{g/mL}$)	加入量 /($\mu\text{g/mL}$)	测得量 /($\mu\text{g/mL}$)	加标回收率 /%	平均加标回收率/%	RSD /%
葡萄糖	0.5045	0.4880	0.9996	101.45	94.23	6.42
	0.5015	0.4880	0.9957	101.27		
	0.4908	0.4880	0.9840	101.07		
	0.5122	0.6832	1.0980	85.75		
	0.4938	0.6832	1.1010	88.87		
	0.5214	0.6832	1.1160	87.04		
	0.4969	0.8784	1.2872	89.97		
	0.5015	0.8784	1.3563	97.32		
	0.5045	0.8784	1.3419	95.33		

续表 2

待测组分	样品含量 /(μg/mL)	加入量 /(μg/mL)	测得量 /(μg/mL)	加标 回收率 /%	平均加标 回收率/%	RSD /%
果糖	0.6248	0.5035	1.1006	94.51	95.09	4.59
	0.6210	0.5035	1.0918	93.51		
	0.6077	0.5035	1.1021	98.19		
	0.6342	0.7049	1.2510	87.50		
	0.6115	0.7049	1.2750	94.13		
	0.6456	0.7049	1.2800	90.00		
	0.6153	1.0070	1.5796	95.76		
	0.6210	1.0070	1.6295	100.15		
	0.6248	1.0070	1.6527	102.08		
蔗糖	16.4147	11.0550	26.3860	90.20	90.59	5.54
	16.3152	11.0550	26.4670	91.83		
	15.9670	11.0550	26.4380	94.72		
	16.6634	16.0800	31.8378	94.37		
	16.0665	16.0800	31.9421	98.73		
	16.9618	16.0800	31.8996	92.90		
	16.1660	21.1050	33.8960	84.01		
	16.3152	21.1050	34.1530	84.52		
	16.4147	21.1050	34.1610	84.09		
乳糖	0.0000	10.0250	9.6300	96.06	94.87	0.92
	0.0000	10.0250	9.6510	96.27		
	0.0000	10.0250	9.6120	95.88		
	0.0000	14.0350	13.2350	94.30		
	0.0000	14.0350	13.2160	94.16		
	0.0000	14.0350	13.1650	93.80		
	0.0000	20.0500	18.9300	94.41		
	0.0000	20.0500	18.9250	94.39		
	0.0000	20.0500	18.9510	94.52		
麦芽糖	0.2673	10.9200	10.9320	97.66	97.68	0.20
	0.2657	10.9200	10.9420	97.77		
	0.2600	10.9200	10.9670	98.05		
	0.2714	15.2880	15.2040	97.68		
	0.2617	15.2880	15.1360	97.29		
	0.2762	15.2880	15.2260	97.79		
	0.2633	19.6560	19.4240	97.48		
	0.2657	19.6560	19.4660	97.68		
	0.2673	19.6560	19.4760	97.72		

4 结 论

本研究采用离子色谱法、脉冲安培检测,同时对蛋白胨中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖进行测定,该方法稳定、准确、分离度好、灵敏度高,且操作简单、快速,适合蛋白胨中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的检测及含量测定,与现行标准^[15]比较,用 GB 5009.8 高效液相色谱法-蒸发光检测器对 5 种糖进行检测,检出限分别为 70、90、80、120、140 mg/L,本法灵敏度远高于国标法,在检测蛋白胨等含糖较低的样品时具有较高的使用价值。

参考文献

[1] 于丽, 王婷, 周健南, 等. 超声提取-离子色谱法检测市售常见 15 种蔬菜中 7 种单糖和双糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 372-377.
Yu L, Wang T, Zhou JN, *et al.* Ultrasonic extraction-ion chromatography detection of 7 kinds of monosaccharides and disaccharides in 15 kinds of common vegetables [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(1): 372-377.

[2] 陶正毅, 武书彬, 晏群山, 等. 离子色谱法测定木薯渣中单糖组分及含量[J]. 造纸科学与技术, 2012, 31(3): 25-28.
Tao ZY, Wu SB, Yan QS, *et al.* Determination of monosaccharide in cassava dregs by ion chromatography [J] Paper Sci Technol, 2012, 31(3): 25-28.

[3] 朱松, 戴军, 陈尚卫, 等. 高效阴离子交换色谱法检测酱油中的单糖及双糖[J]. 分析测试学报, 2012, 33(11): 1411-1415.
Zhu S, Dai J, Chen SW, *et al.* Detection of monosaccharide and disaccharide in soy sauce by high performance anion exchange chromatography [J]. J Instrum Anal, 2012, 33(11): 1411-1415.

[4] NY/T 3163-2017 稻米中可溶性葡萄糖、果糖、蔗糖、棉籽糖和麦芽糖的测定 离子色谱法[S].
NY/T 3163-2017 Determination of soluble glucose, fructose, sucrose, cottonseed sugar and maltose in rice by ion chromatography [S].

[5] 邹学权, 傅飞霞, 陈孜. 离子色谱-脉冲安培法同时测定婴幼儿配方食品中的蔗糖与乳糖[J]. 浙江化工, 2018, 49(3): 48-51.
Zou XQ, Fu FX, Chen Z. Simultaneous determination of sucrose and lactose in infant formula food by ion chromatography-pulse amperometry [J]. Zhejiang Chem Ind, 2018, 49(3): 48-51.

[6] 潘丙珍, 奚星林, 陈秀明, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定烘焙咖啡豆及其掺假物中的糖类标记物[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(20): 5346-5352.
Pan BZ, Xi XL, Chen XM, *et al.* Determination of carbohydrate markers in roasted coffee beans and adulterated products by high performance anion exchange chromatography-pulse amperometric detection [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(20): 5346-5352.

[7] 莫润宏, 王富民, 倪张林, 等. 离子排斥色谱-双检测器法同时测定果蔬中的糖、有机酸和维生素 C[J]. 现代食品科技, 2016, 32(4): 277-283.
Mo RH, Wang FM, Ni ZL, *et al.* Simultaneous determination of sugar, organic acids and vitamin C in fruits and vegetables by agricultural products by ion-exclusion chromatography with refractive index and diode array detectors [J]. Mod Food Sci Technol, 2016, 32(4): 277-283.

[8] 张磊, 周光明, 熊建飞. 离子色谱法检测水果、饮品中的蔗糖、葡萄糖和果糖[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 159-162.
Zhang L, Zhou GM, Xiong JF. Determination of sucrose, glucose and

- fructose in fruits and beverages by ion chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(8): 159–162.
- [9] 曹丽. 单糖的离子色谱法分离及检测[J]. 中国医药导刊, 2012, 14(10): 1838–1840.
- Cao L. Separation and detection of monosaccharides by ion chromatography [J]. Chin J Pharm Sci, 2012, 14(10): 1838–1840.
- [10] 陈熠熠, 赵瑜, 庾苏行, 等. 离子色谱法同时测定蜂蜜中的多种糖类物质[J]. 广东化工, 2015, 42(8): 193–195.
- Chen YY, Zhao Y, Tuo SX, *et al.* Simultaneous determination of multiple sugars in honey by ion chromatography [J]. Guangdong Chem Ind, 2015, 42(8): 193–195.
- [11] 彭云云, 武书彬, 程江娜, 等. 离子色谱法测定蔗渣半纤维素中单糖及糖醛酸含量[J]. 造纸科学与技术, 2009, 8(5): 10–12.
- Peng YY, Wu SB, Cheng JN, *et al.* Determination of monosaccharide and uronic acid content in bagasse hemicellulose by ion chromatography [J]. Paper Sci Technol, 2009, 8(5): 10–12.
- [12] 刘玉峰, 李东, 唐华澄, 等. 高效离子色谱法测定乳及乳制品中低聚果糖含量[J]. 分析检测, 2012, 35(1): 40–44.
- Liu YF, Li D, Tang HC, *et al.* Determination of oligofructose content in milk and dairy products by high performance ion chromatography [J]. J Dairy Sci Technol, 2012, 35(1): 40–44.
- [13] 薛晓锋, 赵静, 吴黎明, 等. 离子色谱法测定蜂花粉与蜂王浆中的葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(11): 162–165.
- Xue XF, Zhao J, Wu LM, *et al.* Determination of glucose, fructose, sucrose and maltose in bee pollen and royal jelly by ion chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2012, 38(11): 162–165.
- [14] 于丽, 王婷, 周健南, 等. 超声提取-离子色谱法检测市售常见 15 中蔬菜中 7 种单糖和双糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 372–377.
- Yu L, Wang T, Zhou JN, *et al.* Determination of 7 monosaccharides and disaccharides in 15 common vegetables by ultrasonic extraction and ion chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(1): 372–377.
- [15] GB 5009.8-2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S].
- GB 5009.8-2016 National food safety standard-Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose in food [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介

朱叶青, 主任药师, 主要研究方向为食品、药品检验检测。
E-mail: hhhtzyq@sina.com