

# 超声提取-离子色谱-脉冲积分安培检测法检测 黑果腺肋花楸果中的 8 种单糖和双糖

于 丽, 刘 瑜, 周健南, 裴程程\*

(沈阳海关, 沈阳 110016)

**摘要: 目的** 建立超声提取-离子色谱-脉冲积分安培检测法测定黑果腺肋花楸果中的 8 种单糖和双糖的方法。**方法** 采用水浸提超声提取及膜过滤法前处理黑果腺肋花楸果样品, 以 Dionex CarboPac PA10 Analytical Column(4 mm×250 mm)阴离子交换色谱柱为分析柱, 以 Dionex CarboPac PA10 Guard Column(4 mm×50 mm)为保护柱, 以 NaOH 与 CH<sub>3</sub>COONa 的组合溶液作为流动相, 采用梯度淋洗分离程序, 脉冲积分安培方法检测。**结果** 8 种单糖和双糖的检出限分别为 5、8、3、4、7、2、5、2 μg/L, 且均具有较宽的线性范围(0.05~20 mg/L)。黑果腺肋花楸果中单糖和双糖测定的相对标准偏差在 0.96%~6.12%之间, 8 种单糖和双糖的加标回收率达到 90.5%~102.1%。**结论** 本方法同时检测黑果腺肋花楸果中的单糖和双糖, 其方法简便快捷、分离效果好、基体干扰少、无需衍生、灵敏度高, 适用于黑果腺肋花楸果中的常见单糖和双糖组分的分析。

**关键词:** 离子色谱法; 黑果腺肋花楸果; 单糖; 双糖

## Determination of 8 kinds of monosaccharides and disaccharides in *Aornial mealnocarpa* fruit by ultrasonic extraction-ion chromatography-pulse integral ampere detection

YU Li, LIU Yu, ZHOU Jian-Nan, PEI Cheng-Cheng\*

(Shenyang Customs, Shenyang 110016, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of eight kinds of monosaccharides and disaccharides in *Aornial mealnocarpa* by ultrasonic extraction, ion chromatography-pulse-integral amperometric detection. **Methods** The samples of *Aornial mealnocarpa* fruit were pretreated by ultrasonic extraction with water extraction and membrane filtration. The analytical column was Dionex CarboPac PA10 Analytical Column (4 mm × 250 mm), the column Dionex CarboPac PA10 Guard Column(4 mm × 50 mm) was used as the protective column. The mobile phase was NaOH and CH<sub>3</sub>COONa, gradient elution procedure was used for separation and pulse integral amperometric for detection. **Results** The detection limits of 8 kinds of monosaccharides and disaccharides were 5, 8, 3, 4, 7, 2, 5, and 2 μg/L, respectively, and all of them had a wide linear range of 0.05-20 mg/L. The relative standard deviation of disaccharide determination was 0.96%-6.12%, and the recoveries of 8 kinds of monosaccharides and disaccharides were 90.5%-102.1%. **Conclusion** The method can be used to detect monosaccharide and

基金项目: 海关总署科研项目(2019HK105)

Fund: Supported by Research Project of General Administration of Customs (2019HK105)

\*通讯作者: 裴程程, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 749175404@qq.com

\*Corresponding author: PEI Cheng-Cheng, Senior Engineer, Shenyang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenyang 110016, China. E-mail: 749175404@qq.com

disaccharide in *Aornial mealnocarpa* fruit at same time. It is simple, rapid, effective, less matrix interference, derivative-free and highly sensitive, and is suitable for the analysis of common monosaccharides and disaccharides components in *Aornial mealnocarpa* fruit.

**KEY WORDS:** ion chromatography; *Aornial mealnocarpa* fruit; monosaccharides; disaccharides

## 1 引言

黑果腺肋花楸果在 2018 年 9 月顺利通过国家卫生健康委员会对新食品原料的安全评估审查, 被列为新型新食品原料。黑果腺肋花楸又名不老梅, 系蔷薇科腺肋花楸属的一个种, 落叶灌木, 原产于北美东北部, 波罗的海沿岸至太平洋沿岸均有分布, 我国自引种以来, 主要分布于辽宁、吉林等地。黑果腺肋花楸果实具有极高的营养价值: 富含花青素、多酚、类黄酮、花色苷、维生素和矿物元素等多种对人体有益的物质, 对抗衰老和预防心脑血管疾病有特效, 在医药领域和食用色素、饮料、果酒等食品领域用途广泛。单双糖分子中含多个羟基, 这些羟基能与酸作用生成酯。人体内的葡萄糖在酶作用下生成葡萄糖磷酸酯, 如 1-磷酸吡喃葡萄糖和 6-磷酸吡喃葡萄糖等。单双糖的磷酸酯在生命过程中具有重要意义, 它们是人体的许多代谢的中间产物。黑果腺肋花楸果中含有丰富的单双糖类成分, 测定糖类成分的含量常用的方法有分光光度法<sup>[1-5]</sup>、液相色谱法<sup>[6-8]</sup>、气相色谱法<sup>[9,10]</sup>、离子色谱法<sup>[11,12]</sup>。分光光度法检测的重现性与准确性较差; 液相色谱检测糖类物质灵敏度较低; 气相色谱测定糖需要衍生化, 回收率低, 操作繁琐; 离子色谱法可改善以上不足。目前针对黑果腺肋花楸果中糖类成分的研究很少。本实验采取超声提取-离子色谱-脉冲积分安培检测法建立黑果腺肋花楸果中单糖和双糖含量的测定方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料、仪器与试剂

黑果腺肋花楸果: 产自海城、丹东、鞍山、朝阳、铁岭、锦州、葫芦岛, 每个地区采集 10 批次, 均为当年新鲜果。

ICS-5000 型离子色谱仪(美国 Thermo 公司); Milli-Q 超纯水系统、Heraeus Multifuge X1R 型台式离心机(美国 Thermo 公司); KQ-600DV 型超声波清洗器(中国昆山公司); 醋酸钠、氢氧化钠(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 8 种糖(麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖、核糖)(国家标准物质中心); 所用水均为电阻率 $\geq 18.2$  MQ·cm 的超纯水。

### 2.2 阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖等 8 种糖标准溶液配制

分别精确称取麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘

糖、木糖、果糖和核糖标准品 50 mg(精确至 0.1 mg)于烧杯中, 用超纯水溶解, 然后转移至 50 mL 容量瓶中, 并用超纯水定容至刻度, 配制成 1000 mg/L 标准储备液。用移液枪分别移取 5.0 mL 8 种糖标准储备液于 50 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 充分混匀, 配制成 100 mg/L 标准混合储备液。用移液枪分别移取 0.025、0.10、0.25、0.50、2.50、5.00、10.00 mL 标准混合储备液于 50 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 充分混匀, 配制成 8 种糖质量浓度分别为 0.05、0.20、0.50、1.0、5.0、10.0、20.0 mg/L 的混合标准曲线稀释液。

### 2.3 样品前处理方法

称取均匀粉碎黑果腺肋花楸果试样 5.0 g(精确至 0.01g), 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 40 mL 左右超纯水, 振荡均匀, 置于超声波清洗器中, 超声提取 30 min, 每隔 5 min 振荡一次, 冷却后用超纯水稀释至刻度, 充分混匀。移取约 40 mL 溶液至离心管中, 置于台式离心机中, 以 10000 r/min 转速离心 5 min, 取离心后澄清液约 10 mL, 溶液经定量滤纸过滤, 再通过 0.22  $\mu$ m 水性滤膜和 H 型前处理柱<sup>[13]</sup>(预先使用 10 mL 超纯水活化), 弃去前面 3 mL, 收集后面洗脱液于离子色谱自动进样瓶中, 用于上机检测。

### 2.4 色谱条件

选择 DIONEX CarboPac PA10 Analytical Column(4 mm $\times$ 250 mm)阴离子交换色谱柱为分析柱; DIONEX CarboPac PA10 Guard Column(4 mm $\times$ 50 mm)为保护柱; ED5000 脉冲安培检测(PAD); 自动进样器 AS-DV; 工作站 Chromeleon 6.8, 梯度淋洗液分离程序(见表 1); 流速 0.8 mL/min, 糖检测波形选择标准四电位波形(见表 2); 安培检测器; 进样量: 25  $\mu$ L; 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 以峰面积外标法定量。

表 1 流动相条件  
Table 1 The condition of mobile phase

时间/min	流速/(mL/min)	OH <sup>-</sup> 浓度/(mmol/L)	醋酸钠浓度/(mol/L)	梯度曲线
0	0.8	20	0	线性
40	0.8	50	0.05	线性
45	0.8	100	0	线性
50	0.8	20	0	线性
55	0.8	20	0	线性

表 2 糖标准四电位波形

时间/s	电位/V	积分	时间/s	电位/V	积分
0.00	+0.10	—	0.42	-2.00	—
0.20	+0.10	开始	0.43	+0.60	—
0.40	+0.10	结束	0.44	-0.10	—
0.41	-2.00	—	0.50	-0.10	—

### 3 结果与分析

#### 3.1 色谱柱的选择

糖类化合物具有电化学活性,在强碱性溶液中以阴离子形态存在<sup>[14]</sup>,可以在阴离子交换色谱柱上被保留,不同的糖组分得到分离。在强碱性条件下,糖类化合物在一定的电位下可以在金电极表面被氧化从而改变电流大小,所以可通过电化学法-脉冲安培检测器进行检测。目前常用的用于分离单、双糖的阴离子交换分析柱有 3 种柱型: DIONEX CarboPac MA1、DIONEX CarboPac PA1 和 DIONEX CarboPac PA10。DIONEX CarboPac MA1 分析柱的柱容量大,保留性强,溶剂消耗大,适合于弱电离的糖醇类化合物的检测。DIONEX CarboPac PA1 分析柱比 DIONEX CarboPac MA1 分析柱的柱效高,适合单糖和双糖的检测,但是  $\text{OH}^{-1}$  在低浓度范围进行检测时,由于淋洗液中含有微量溶解氧的负峰干扰使得糖组分检测的灵敏度偏低。DIONEX CarboPac PA10 分析柱在不同浓度的  $\text{OH}^{-1}$  中具有较高的灵敏度,并且每种糖的分离度较好。因此,选择 DIONEX CarboPac PA10 分析柱进行单糖和双糖的检测。

#### 3.2 淋洗液及淋洗液浓度的选择

离子色谱-脉冲积分安培检测法分析单糖和双糖时最常用的淋洗液是 NaOH,淋洗液浓度的变化对各种糖组分之间的分离度及方法的灵敏度影响较大,改变淋洗液的浓度,可以改变待分离组分的出峰时间和分离度,因为蔗

糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖和核糖这 6 种糖的保留时间非常接近,本研究分别用 10、15、20、30、40 mmol/L 浓度的 NaOH 淋洗液来分析 NaOH 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,当淋洗液浓度大于 30 mmol/L 时,8 种单糖和双糖的色谱峰重叠严重,分离度较差;当淋洗液浓度低于 15 mmol/L 时,发现随着 NaOH 淋洗液浓度降低,各糖组分色谱峰的保留时间也相应延长,根据各个单糖和双糖组分之间分离度能够达到实验要求且高效的原则,最终选择了 20 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液。由于本研究选择低浓度的 NaOH 溶液作为淋洗液,而脉冲积分安培检测法是在碱性条件下的电化学响应下实现的,所以每次进下一个样品前使用高浓度 NaOH(100 mmol/L)淋洗液对色谱柱进行冲洗,持续冲洗 10 min,目的是对色谱柱进行再生处理,否则检测的重现性会变差,灵敏度会降低。

#### 3.3 色谱柱柱温和淋洗液流速的选择

20 mmol/L NaOH 溶液作为淋洗液,改变色谱柱柱温,观察待测糖组分色谱峰的变化发现:当色谱柱柱温大于 35 °C 时,色谱峰的分离度变差;当色谱柱柱温低于 25 °C 时,各色谱峰变宽。在 25~35 °C 之间调节柱温,实验表明色谱柱温在 30 °C 时各个色谱峰峰形较好,分离的效果也满足实验要求。所以选择色谱柱温度为 30 °C。调节淋洗液流速分别为 1.0、0.8、0.5 mL/min,流速越低保留时间越长,流速越高分离度越差,因此,淋洗液流速选择 0.8 mL/min 效果最佳。

#### 3.4 标准曲线与最低检出限

用优化后的方法分析了黑果腺肋花楸果中 8 种单、双糖,以峰面积为研究对象,麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖和核糖测量范围在 0.05~20 mg/L 内,峰面积(Y)与浓度(X)均呈现很好的线性关系。在信噪比为 3 时计算出麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖和核糖的检出限分别为 5、8、3、4、7、2、5、2  $\mu\text{g/L}$ ,线性回归方程、线性范围和检测限见表 3。

表 3 方法的线性范围、回归方程、相关系数、检出限、定量限

成分	线性范围/(mg/L)	回归方程	相关系数 $r$	检出限/ $(\mu\text{g/L})$	定量限/(mg/100 g)
阿拉伯糖	0.05~20	$Y=5.204X+0.908$	0.9998	3	0.10
葡萄糖	0.05~20	$Y=4.326X+1.143$	0.9991	4	0.12
甘糖	0.05~20	$Y=2.428X+0.462$	0.9984	7	0.20
木糖	0.05~20	$Y=6.752X+1.072$	0.9975	2	0.10
蔗糖	0.05~20	$Y=1.821X-0.374$	0.9959	8	0.20
果糖	0.05~20	$Y=3.595X+0.662$	0.9987	5	0.15
核糖	0.05~20	$Y=6.026X+0.072$	0.9992	2	0.10
麦芽糖	0.05~20	$Y=4.166X+0.251$	0.9969	5	0.15

### 3.5 重现性实验

取 10 mg/L 的麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖和核糖混合液适量, 分别连续进样 10 次, 得到这 8 种糖的峰面积测定值的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 3.25%、6.12%、2.14%、2.68%、5.67%、0.96%、3.54%、1.06%, 这 8 种糖保留时间的相对标准偏差(RSD)分别为 0.72%、0.47%、0.25%、0.31%、0.52%、0.18%、0.41%、0.61%, 证明方法的重现性很好。

### 3.6 加标回收率实验

以丹东产黑果腺肋花楸果为本底, 采用标准加入法进行麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖和核糖的回收实验: 样品前处理同 2.3, 样品测定的回收

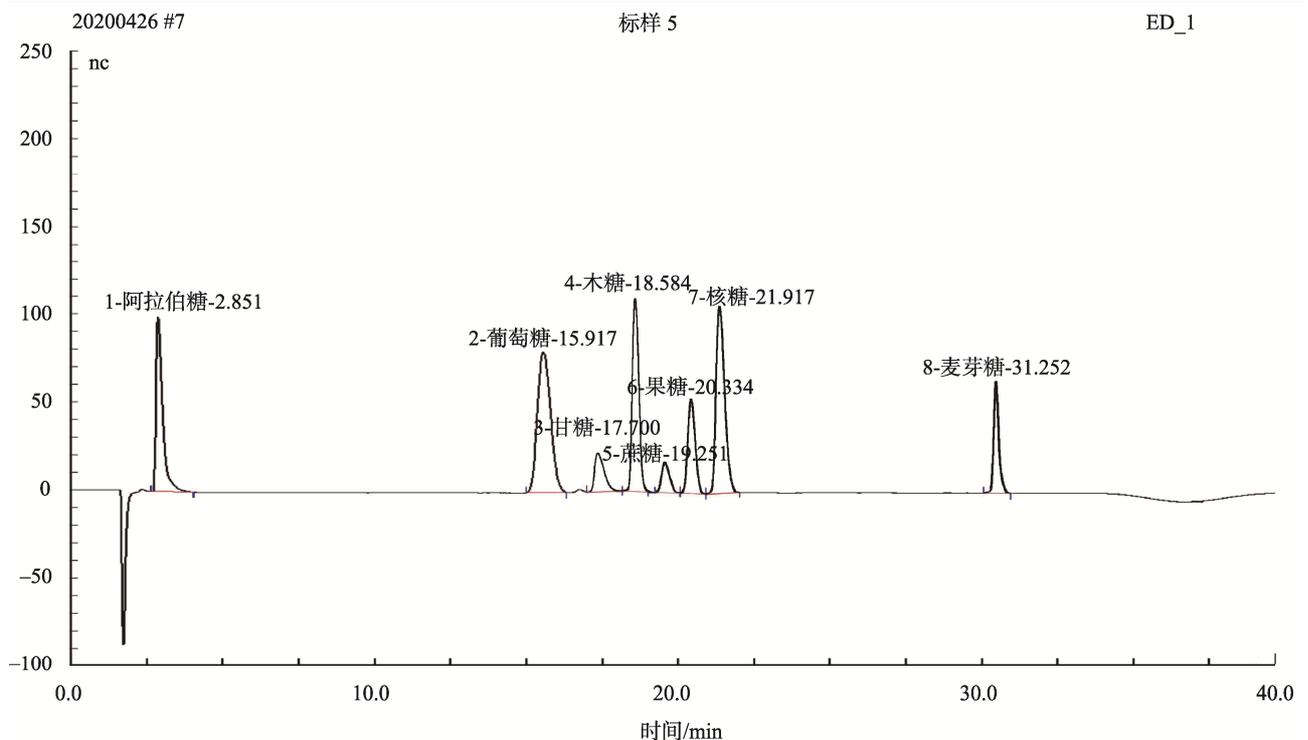
率范围在 90.5%~102.1%, 加标回收率较高, 符合国家标准 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》<sup>[15]</sup>中附录 F 中对测得的待测物添加水平在 0.1~10 mg/100 g 时回收率应在 90%~110%之间的要求。其结果见表 4。

### 3.7 样品色谱图与测定结果

辽宁海城、丹东、鞍山、朝阳、铁岭、锦州、葫芦岛出产的黑果腺肋花楸果, 每个地区分别采集 10 批次样品, 将以 2.3 方法前处理完成的黑果腺肋花楸果样品溶液按照 2.4 色谱条件进行色谱分析, 黑果腺肋花楸果中麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、果糖均有检出, 说明辽宁地区种植的黑果腺肋花楸果中含有多种单糖和双糖, 其中葡萄糖相对含量较高。色谱图见图 1, 测定结果为该地区 10 批次样品的平均值, 见表 5。

表 4 回收率实验结果( $n=3$ )  
Table 4 Results of recovery experiment( $n=3$ )

样品名称	糖类别	本底值/(mg/100 g)	加入值/(mg/100 g)	检测值/(mg/100 g)	回收率/%	RSD/%
黑果腺肋花楸果	阿拉伯糖	0.199	1.0	1.152	95.3	2.42
	葡萄糖	15.11	10.0	24.35	92.4	3.52
	甘糖	/	1.0	0.905	90.5	4.98
	木糖	1.62	1.0	2.527	90.7	1.51
	蔗糖	2.57	1.0	3.496	92.6	5.76
	果糖	0.196	1.0	1.109	91.3	4.06
	核糖	/	1.0	1.021	102.1	0.97
	麦芽糖	1.57	1.0	0.953	95.3	2.70



注: 1:阿拉伯糖; 2: 葡萄糖; 3: 甘糖; 4: 木糖; 5: 蔗糖; 6: 果糖; 7: 核糖; 8: 麦芽糖。

图 1 8 种单、双糖色谱图

Fig.1 Eight kinds of monosaccharides and disaccharides

表 5 黑果腺肋花楸果中 8 种单、双糖含量( $n=3$ )  
Table 5 8 kinds of monosaccharides and disaccharides in *Aornial mealnocarpa* fruit ( $n=3$ )

名称	阿拉伯糖/ (mg/100 g)	葡萄糖/ (mg/100 g)	甘糖/ (mg/100 g)	木糖/ (mg/100 g)	蔗糖/ (mg/100 g)	果糖/ (mg/100 g)	核糖/ (mg/100 g)	麦芽糖/ (mg/100 g)
海城	0.327	19.28	/	1.78	3.96	0.296	/	2.42
丹东	0.199	15.11	/	1.62	2.57	0.196	/	1.57
鞍山	0.158	16.73	/	1.43	4.38	0.174	/	1.38
朝阳	0.537	21.32	/	2.38	5.16	0.315	/	3.24
铁岭	0.219	12.48	/	0.625	2.44	0.168	/	1.82
锦州	0.165	13.89	/	1.39	3.20	0.149	/	2.05
葫芦岛	0.188	10.63	/	1.17	2.03	0.203	/	1.48

注:“/”表示低于检出限。

#### 4 结 论

本实验建立了超声提取-离子色谱-脉冲积分安培检测法同时检测黑果腺肋花楸果中的麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘糖、木糖、果糖和核糖的方法。实验表明,该方法操作简单、快速,分离效果好、灵敏度高、准确度高。该方法实用性强,具有一定的应用价值。通过对辽宁地区种植的黑果腺肋花楸果中单糖和双糖的普查分析,说明黑果腺肋花楸果中含有多种单糖和双糖,其中葡萄糖含量相对较高。

#### 参考文献

- [1] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. GB 2760-2014 Nation food safety standard-Standard for use of food additives [S].
- [2] 付晓伶, 周荣耀, 潘广文. 离子色谱法测定大肠癌患者尿液中的甘露醇和乳果糖[J]. 分析化学, 2012, 40(4): 608-611. Fu XL, Zhou RY, Pan GW. Determination of mannitol and lactulose in urine by ion chromatography [J]. Anal Chem, 2012, 40(4): 608-611.
- [3] 魏远安, 郑惠玲, 吴少辉, 等. 高效离子色谱法分离、检测低聚果糖[J]. 食品科学, 2018, 36(14): 151-155. Wei YA, Zheng HL, Wu SH, et al. Separation and determination of fructooligosaccharides by high performance ion chromatography [J]. Food Sci, 2018, 36(14): 151-155.
- [4] 耿丽娟, 黄峻榕, 冯峰, 等. 高效阴离子交换色谱脉冲安培检测法测定奶粉中的低聚果糖[J]. 色谱, 2014, 32(12): 1381-1384. Geng LJ, Huang JR, Feng F, et al. Determination of fructooligosaccharides in milk powder by high performance anion exchange chromatography with pulse amperometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(12): 1381-1384.
- [5] 熊建飞, 周光明, 许丽, 等. 离子色谱法测定奶粉中的葡萄糖、蔗糖和乳糖[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 176-179. Xiong JF, Zhou GM, Xu L, et al. Determination of glucose, sucrose and lactose in milk powder by ion chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(8): 176-179.
- [6] 熊建飞, 周光明, 何强. 离子色谱法测定玄参中的单糖和低聚寡糖田[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 340-343. Xiong JF, Zhou GM, He Q. Determination of monosaccharides and oligosaccharides in radix scrophulariae by ion chromatography [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(7): 340-343.
- [7] 赵丹霞, 王力清, 黄秋研. 离子色谱-脉冲安培法测定婴幼儿配方乳粉中葡萄糖等质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2014, (11): 44-46. Zhao DX, Wang LQ, Huang QY. Determination of glucose in infant formula milk powder by ion chromatography-pulsed amperometry [J]. China Dairy Ind, 2014, (11): 44-46.
- [8] Wei Y, Ding MY. Analysis of trehalose in transgenic tobacco extracts by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. Chin J Chromatogr, 2001, 19(3): 226-229.
- [9] 胡才龙, 李丹, 李晓磊. 高效阴离子交换色谱测定蜂蜜中葡萄糖和果糖的研究[J]. 长春大学学报, 2011, 21(10): 56-59. Hu CL, Li D, Li XL. Determination of glucose and fructose in honey by high performance anion exchange chromatography [J]. J Changchun Univ, 2011, 21(10): 56-59.
- [10] 张磊, 周光明, 熊建飞. 离子色谱法检测水果、饮品中的蔗糖、葡萄糖和果糖田[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.
- [11] 马甲民, 崔鹤. 离子色谱法-积分安培检测器测定葡萄酒中的天然糖[J]. 食品科学, 2015, 36(12): 139-142. Ma JM, Cui H. Ion chromatography-integral ampere detector for the determination of natural sugars in wine [J]. Food Sci, 2015, 36(12): 139-142.
- [12] 杨晓敏. 离子色谱脉冲安培法测定乳制品中 5 种单双糖[J]. 广州化工, 2015, (17): 12-15. Yang XM. Determination of 5 monosaccharides and disaccharides in dairy products by ion chromatography with pulsed amperometric detection [J].

Guangzhou Chem Ind, 2015, (17): 12-15.

(责任编辑: 王 欣)

- [13] 牟世芬, 于泓, 蔡亚岐. 糖的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测分析[J]. 色谱, 2009, 5: 667-974.

Mou SF, Yu H, Cai YQ. Determination of sugars by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 5: 667-974.

- [14] 赵丹霞, 王力清, 黄秋研. 离子色谱-脉冲安培法测定婴幼儿配方乳粉中葡萄糖等质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2014, (11): 44-46.

Zhao DX, Wang LQ, Huang QY. Determination of glucose in infant formula milk powder by ion chromatography-pulsed amperometry [J]. China Dairy Ind, 2014, (11): 44-46.

- [15] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].

GB/T 27404-2008 Standard for quality control of laboratories-Physical and chemical testing of food [S].

## 作者简介



于 丽, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: yl9862@sina.com

裴程程, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 749175404@qq.com