

二醇基柱高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定饮料中的糖

魏 泱, 郭 亮, 丁明玉

(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 采用二醇基柱分离、蒸发光散射检测法测定了饮料中的糖。比较了乙腈-水、二氯甲烷-甲醇两种流动相分析糖的特点。采用二氯甲烷-甲醇为流动相, 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和棉子糖的峰面积与绝对进样量的标准曲线在绝对进样量为 1.6 μg ~40 μg 时均具有良好的线性关系。该方法对上述 5 种糖的检测限分别为 0.20 μg , 0.16 μg , 0.16 μg , 0.20 μg 和 0.20 μg 。

关键词 高效液相色谱法; 二醇基柱; 蒸发光散射检测; 糖; 饮料

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号: 1000-871X(2001)06-0520-03

1 前言

人们对糖进行分析大多采用高效液相色谱法(HPLC)。其中氨基柱^[1-3]对糖有较高的分离效率, 但由于氨基柱柱填料自身的水解以及固定相上的氨基与糖的羰基之间易形成希夫碱, 因而缩短了柱的使用寿命。我们在流动相里加入乙二胺, 得到了与化学键合氨基柱柱效相当的动态修饰柱^[4]。由于柱上吸附的有机胺不断得到更新, 分析柱可长时间保持稳定。但还原糖和修饰剂乙二胺之间仍然存在反应, 导致被分析的还原糖(如葡萄糖、麦芽糖、乳糖)的检测限高于非还原糖(如蔗糖、棉子糖)。二醇基柱分析糖的机理和氨基柱类似, 但柱填料稳定, 分析糖时柱填料不会和糖发生反应^[5]。

蒸发光散射检测器(ELSD)可以直接对糖进行检测, 且具有较高的灵敏度^[6]。本文利用二醇基柱和蒸发光散射检测器, 建立了一种可靠的直接测定饮料中糖的 HPLC-ELSD 法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HP 1100 高效液相色谱仪(美国 Hewlett Packard 公司)配有四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)和化学工作站。另配有 Alltech 500 ELSD(美国 Alltech 公司)。

果糖(北京市西中化工厂)、葡萄糖(北京瀛海精细化工厂)、蔗糖(北京化工厂)、麦芽糖(Fluka 公司)、乳糖(中国军事医学科学院药材供应站)均为分析纯试剂; 棉子糖(Fluka 公司)为生化试剂; 乙腈(Scharlau 公司)和甲醇(天津四友公司)为色谱纯试剂; 二氯甲烷(北京化工厂)为分析纯试剂; 水为去离

子水。流动相使用前用 0.45 μm 滤膜过滤。

配制质量浓度均为 10 g/L 的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和棉子糖等 6 种糖的储备水溶液, 使用前用甲醇将它们稀释成 40 mg/L~2 000 mg/L 的工作溶液。

苹果汁和橙汁(帕马拉特公司)、醒目苹果味汽水和芬达橙味汽水(可口可乐公司)、苹果、橙子均从市场上购买并由本实验室榨汁。所有样品均通过 0.45 μm 的滤膜过滤, 滤液用甲醇稀释 50 倍后直接进行 HPLC 分析, 进样量为 20 μL 。

2.2 色谱条件

分析柱为 Lichrospher 100 Diol(250 mm \times 4.0 mm i.d., 5 μm) 配有预柱 Zorbax Rx-SIL(12.5 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm), HP 公司产品。柱温为室温。

分别采用乙腈-水、二氯甲烷-甲醇两种流动相进行比较, 流速均为 1.0 mL/min。当流动相为前者时, ELSD 参数为: 漂移管温度 85 $^{\circ}\text{C}$, 氮气流速 2.05 L/min; 当流动相为后者时, ELSD 参数为: 漂移管温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 氮气流速 2.00 L/min。

3 结果与讨论

3.1 分离条件的选择

3.1.1 乙腈-水为流动相 寡糖是由单糖通过糖苷键连接起来的, 寡糖中单糖单元的数目被称为糖的聚合度。与动态修饰氨基柱相比较, 糖在二醇基柱上的保留比较弱。聚合度相同的糖, 如: 果糖与葡萄糖(聚合度为 1)、蔗糖、麦芽糖与乳糖(聚合度为 2)在醇基柱上的保留类似。在这种体系中, 麦芽糖和乳糖难以充分分离。乙腈比例较小时, 麦芽糖和乳糖保留时间很接近, 若增加乙腈的比例, 会由于糖在

乙腈中溶解性很差, 使得其色谱峰严重展宽, 同样不能得到有效分离。因此, 本文只采用了果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和棉子糖等 5 种糖作为研究对象。流动相中加入体积分数为 0.1% 的三乙胺作为 pH 调节剂, 可以防止糖的旋光异构体分离, 使每种糖只出一个单峰^[7]。

当乙腈-水的体积比为 86:14 时, 果糖与葡萄糖、蔗糖与麦芽糖之间可以得到较好的分离, 但棉子糖的保留时间过长, 在 61 min 时出一个扁峰。为

此 本文采用了线性梯度洗脱方式: 0~27 min, V(乙腈): V(水)=86:14; 27 min~32 min, V(乙腈): V(水)由 86:14 线性变化至 75:25; 32 min~40 min, V(乙腈): V(水)=75:25; 40 min~45 min, V(乙腈): V(水)由 75:25 线性变化至 86:14。由于系统存在平衡问题, 整个分析过程需要 50 min。在梯度洗脱条件下, 棉子糖在 39 min 时出一个尖锐的色谱峰。利用乙腈-水作为流动相分析糖的标准混合物的色谱图见图 1。

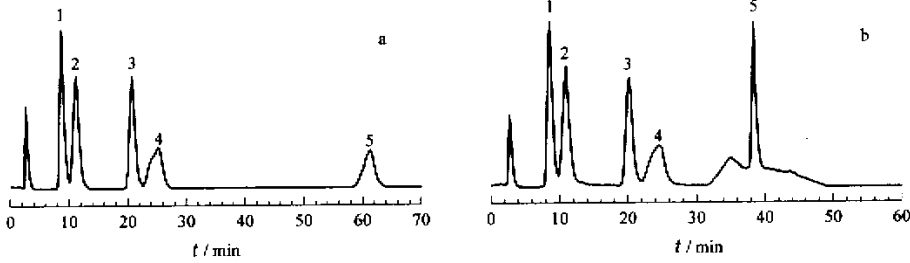


图 1 乙腈-水为流动相分析 5 种糖的标准混合物的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig.1 HPLC-ELSD chromatograms of a standard mixture of five carbohydrates with acetonitrile-water as mobile phase

a. isocratic elution(V(acetonitrile): V(water)= 86:14); b. gradient elution(volume fraction of acetonitrile in the mobile phase :0-27 min , 86% ;27 min-32 min 86%→75% ;32 min-40 min 75% ;40 min-45 min 75%→86%) .

1. fructose ; 2. glucose ; 3. sucrose ; 4. maltose ; 5. raffinose.

3.1.2 二氯甲烷-甲醇为流动相 以二氯甲烷-甲醇为流动相, 果糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和棉子糖在二醇基柱上的保留行为和以乙腈-水为流动相时基本一致。麦芽糖和乳糖仍得不到有效的分离。

当二氯甲烷与甲醇的体积比为 3.2:1 时, 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和棉子糖能够在适当的时间内得到有效分离。和乙腈-水为流动相相比, 采用二氯甲烷-甲醇作为流动相具有以下优点: 上述 5 种糖能

够在较短的时间内(23 min)得到较好的分离; 该体系下, 不会产生糖的旋光异构体分离, 每种糖都能够洗脱为尖锐的色谱峰; 由于流动相中不含水和胺, 柱填料水解的现象可以避免, 延长了柱的寿命。因此, 本文选用二氯甲烷-甲醇(体积比为 3.2:1)溶液作为流动相来分析样品中的糖。在此条件下得到的糖的标准混合物和饮料(自榨苹果汁)的色谱图见图 2, 其他样品的色谱图略。

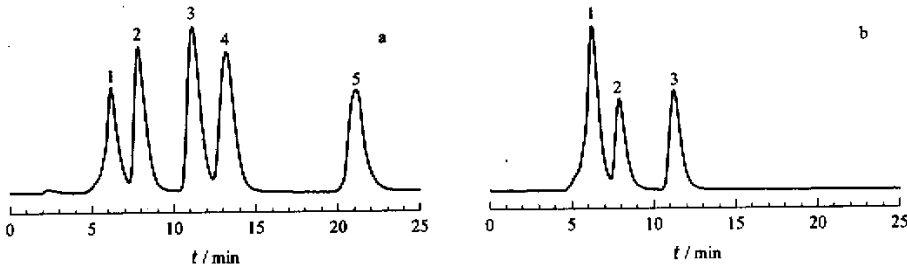


图 2 二氯甲烷-甲醇(体积比为 3.2:1)溶液为流动相分析糖的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig.2 HPLC-ELSD chromatograms of carbohydrates with dichloromethane-methanol (3.2:1 volume ratio) as mobile phase

a. standard mixture of five carbohydrates ; b. apple juice extracted by ourselves.

1. fructose ; 2. glucose ; 3. sucrose ; 4. maltose ; 5. raffinose.

3.2 线性范围和检出限

将 40 mg/L, 80 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 800 mg/L, 1 200 mg/L, 1 600 mg/L 和 2 000 mg/L 的系列工作溶液依次进样 20 μL, 对应的糖的绝对进样量为 0.8 μg, 1.6 μg, 4.0 μg, 8.0 μg, 16.0 μg,

24.0 μg, 32.0 μg 和 40.0 μg。根据 ELSD 测得的峰面积 A 对相应的糖的绝对进样量 C 进行线性回归, 再将最小质量浓度的标准溶液逐级稀释, 依次进样 20 μL, 计算当信噪比为 3 时所对应的标准溶液的质量浓度以确定检出限。结果见表 1。由表 1 可见, 所

测 5 种糖的峰面积与其绝对进样量之间呈良好的线性关系, 5 种糖的检测限相近。

表 1 5 种糖的定量分析参数

Table 1 Parameters of quantitative analysis for five carbohydrates

Carbohydrate	Linear range (μg)	Calibration equation ¹⁾	Calibration coefficient r	Detection limit (μg)
Fructose	1.6-40	$A = -11.65 \times 10^4 + 6.29 \times 10^4 C$	0.999	0.20
Glucose	1.6-40	$A = -2.05 \times 10^4 + 6.79 \times 10^4 C$	0.999	0.16
Sucrose	1.6-40	$A = -2.72 \times 10^4 + 8.20 \times 10^4 C$	0.997	0.16
Maltose	1.6-40	$A = -7.52 \times 10^4 + 8.86 \times 10^4 C$	0.997	0.20
Raffinose	1.6-40	$A = -6.38 \times 10^4 + 7.06 \times 10^4 C$	0.995	0.20

1) A: peak area; C: amount added (μg).

3.3 样品的分析

样品通过 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤后, 用甲醇稀释 50 倍, 进样 $20 \mu\text{L}$ 进行 HPLC 分析, 结果 6 种样品中均只含有果糖、葡萄糖、蔗糖 3 种糖。对同一份样品重复进样 5 次, 测定其峰面积, 再取 5 次测定的平均值计算样品中糖的质量浓度, 结果见表 2。

表 2 稀释 50 倍的样品中糖的测定结果 ($n=5$)

Table 2 Results of carbohydrates determined in 50-fold diluted drinks ($n=5$)

Sample	Fructose	Glucose	Sucrose
Apple juice extracted by ourselves	1.231 ± 11	511 ± 5	486 ± 4
Smart apple flavored carbonated drink	693 ± 7	719 ± 9	1.096 ± 8
Parmalat pure apple juice	802 ± 7	437 ± 6	1.090 ± 5
Orange juice extracted by ourselves	550 ± 12	312 ± 10	910 ± 15
Fanta orange flavored carbonated drink	801 ± 5	843 ± 1	831 ± 2
Parmalat pure orange juice	642 ± 1	446 ± 3	1.318 ± 15

在浓度已知的样品溶液中加入一定量的糖标准溶液, 重复进样 3 次, 测定果糖、葡萄糖和蔗糖的回收率, 结果 6 种样品中 3 种糖的回收率为 $96.6\% \sim$

103.0% 。

与用乙二胺动态修饰氨基柱分析糖的结果相比, 二醇基柱对糖的分离效率不如氨基柱。从本实验来看, 无论采用乙腈-水还是二氯甲烷-甲醇作为流动相, 乳糖和麦芽糖都不能在当前所使用的二醇基柱上得到完全分离。相对于乙二胺动态修饰氨基柱, 二醇基柱的优越性首先在于柱填料稳定, 而且在分析过程中柱填料不会和糖发生反应, 这样不仅保证了色谱柱的使用寿命及糖的定量分析的准确性, 而且提高了还原糖的检测灵敏度。其二, 采用二氯甲烷-甲醇作为流动相, 可以避免柱填料的水解, 糖在这种体系中, 不会产生旋光异构体分离, 流动相中无须加入碱性物质。

参考文献:

- [1] Macrae R, Dick J. J Chromatogr, 1981, 210: 138-145
- [2] Clement A, Yong D, Brechet C. J Liq Chromatogr, 1992, 15(5): 805-817
- [3] SHAN Lian-ju, WANG Cheng-hong, SHAN Ling-qing, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2000, 28: 524
单连菊, 王成红, 单凌青, 等. 分析化学, 2000, 28: 524
- [4] Wei Y, Ding M Y. J Chromatogr A, 2000, 904: 113-117
- [5] Berthod A, Chang S S C, Kullman J P S, et al. Talanta, 1998, 47: 1 001-1 012
- [6] WEI Yang, DING Ming-yu. Chinese Journal of Chromatography, 2000, 18(5): 398-401
魏 泱, 丁明玉. 色谱, 2000, 18(5): 398-401
- [7] Verzele M, Damme F V. J Chromatogr, 1986, 362: 23-31

Diol Column as Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Carbohydrates in Drinks with Evaporative Light Scattering Detection

WEI Yang, GUO Liang, DING Ming-yu

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method with a diol column and evaporative light scattering detector (ELSD) was established for the direct analysis of fructose, glucose, sucrose, maltose and raffinose in mixture. A separation column (Lichrospher 100 Diol, $250 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$, Hewlett-Packard, USA) and a guard column (Zorbax Rx-SIL, $12.5 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$) were used. The mobile phase was a mixture of dichloromethane-methanol (3.2:1, volume ratio). Regression equations revealed linear relationship (correlation coefficients: 0.995-0.999) between the mass of carbohydrates injected and the peak area of carbohydrates detected by ELSD. The detection limits of ELSD ($S/N=3$) were about $0.20 \mu\text{g}$ for all carbohydrates. This system could be used for the routine analysis of simple carbohydrates in some common drinks on market.

Key words: high performance liquid chromatography; diol column; evaporative light scattering detection; carbohydrate; drink