

# HPLC 法测定单糖酸水解体系中 5-HMF 的研究

刘淑兰<sup>1</sup>, 余筱洁<sup>1</sup>, 刘斌<sup>2</sup>, 赵静<sup>1</sup>, 叶晓非<sup>1</sup>, 马海乐<sup>1</sup>, 周存山<sup>1,\*</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013;

2. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083)

**摘要:**本研究建立了直接进样测定葡萄糖、果糖和柠檬酸、磷酸的糖酸高温体系中 5-HMF 含量的高效液相色谱法, 采用安捷伦 Lc1260 高效液相色谱仪, 紫外检测器, 检测波长 284 nm, 流动相为 5% (V/V) 甲醇水溶液。经过测定条件分析(检测波长、流动相比比例、流速和样品过滤方式)与方法评价(选择性、精密度、检出限、回收率和样品测定等)研究, 得到标准曲线方程为  $y = 0.006x - 0.137$ , 相关系数  $R^2$  为 0.999, 精密度高, 样品回收率在 98%~102% 之间。在测定样品中的 5-HMF 含量时, 样品溶液测定的目的峰附近基本无杂峰。

**关键词:** 5-HMF, 糖酸体系, 高效液相色谱法, 准确度, 精确度

## HPLC method for determination of 5-HMF in monosaccharide acid hydrolysis system

LIU Shu-lan<sup>1</sup>, YU Xiao-jie<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>, YE Xiao-fei<sup>1</sup>, MA Hai-le<sup>1</sup>, ZHOU Cun-shan<sup>1,\*</sup>

(1. Department of Food and Biological Engineering, Zhenjiang 212013, China;

2. Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In this study, 5-HMF determination was carried out by high performance liquid chromatography in monosaccharide-acid catalytic system with direct injection. The optimization of the determination was approached using Agilent Lc1260 HPLC and UV detector. The detection wavelength was 284 nm and the mobile phase was 5% (5/95, v/v) methanol deionized water solution. By the analysis of measurement conditions (detector wavelength, mobile phase ratio and velocity, filter ways) and evaluation (Selectivity, accuracy, detection limit, recovery rate, etc), the standard curve equation was  $y = 0.006x - 0.137$ , the correlation coefficient  $R^2$  was 0.999. The accuracy was high and the sample recovery rate was from 98% to 102%. The proposed methodology was applied to analysis of 5-HMF successfully in samples. The analytical performance of the method made it suitable for the routine determination of samples. The sample solution measured out pure peaks and there were no impure peaks.

**Key words:** 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde; Monosaccharide acid catalytic system; High performance liquid chromatography method; Accuracy; Precision

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0304-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.053

葡萄糖加热脱水可形成 5-羟甲基糠醛 (5-HMF), 5-HMF 分子结构中含有一个呋喃环, 一个醛基和一个羟甲基, 可通过紫外吸光度法进行检测<sup>[1]</sup>; 化学性质活泼, 可以制备多种衍生物<sup>[2]</sup>。5-HMF 对人体横纹肌及内脏有损害, 但近年来研究发现, 5-HMF 具有抗氧化等对人体有益的作用, 有可能作为新型活性物质被研究<sup>[3]</sup>。同时在食品加工

中如美拉德反应等过程中, 5-HMF 均有产生, 因此, 它成为非酶褐变的重要指示因子, 成为医药、食品行业的研究热点。

食品中的成分复杂, 碳水化合物作为主要成分之一, 在加热过程中, 会转化为 5-HMF。磷酸、柠檬酸等物质可催化此反应。而葡萄糖和果糖作为典型的同分异构六碳糖, 为碳水化合物转化为 5-HMF 的

收稿日期: 2014-10-11

作者简介: 刘淑兰 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 糖类资源化绿色利用, E-mail: 1056571774@qq.com。

\* 通讯作者: 周存山 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白功能化物理加工和糖类资源化绿色利用, E-mail: cunshanzhou@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170672); 国家博士后基金特别资助和面上资助 (2014T70489, 2013M541621); 江苏省博士后基金项目 (1302152C); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏大学高级人才启动项目 (12JDG074); 江苏大学青年学术带头人培育 (2012) 资助。

一般反应<sup>[4-6]</sup>。在研究两者催化转化为5-HMF反应动力学模型的过程中,找到一种正确、可靠、简便的测定方法,尤为重要<sup>[7-8]</sup>。

目前测定方法有:吸光度法、气相色谱法、液相色谱法、气质联用、液质联用等等<sup>[9-10]</sup>。吸光度法操作简便,设备造价相对低,检测结果快,但准确度相对低,任何在同一波长下有紫外吸收的物质都会影响测定结果,且测定检出限较高,灵敏度太低<sup>[11-12]</sup>;气相色谱法一次可同时测定多种物质,出峰快,测定效率高,但5-HMF稳定性不好,容易分解成乙酰丙酸和甲酸,或发生聚合反应,或发生聚合反应,且样品中不能含有水,操作相对不易,技术含量相对较高,此法比较适合定性分析,外标法不宜用于定量<sup>[13-14]</sup>;气质、液质联用法,设备昂贵,测定成本高,一般实验室无力配备,且由于将进入质谱仪,对样品前处理要求较高。

本文主要建立一种适于糖酸体系中5-HMF的反相高效液相色谱法测定方法,以便于可靠、准确、高效的测定葡萄糖、果糖在磷酸、柠檬酸催化作用下生成的5-HMF,建立其形成的动力学模型,为监控5-HMF在糖酸食品配料中5-HMF形成规律及食品安全监测等。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

5-HMF(CAS:67-47-0) 纯度>99%,购于美国Sigma公司;甲醇 色谱纯,美国MREDA技术有限公司;葡萄糖、果糖、磷酸和柠檬酸 均为分析纯级,国药集团化学试剂。

1260C 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;附属设备有VWD紫外检测器 G1314B;进样器 G1329B;二元泵 G1312C;紫外/可见分光光度计 UV-1801 北京瑞利分析仪器集团;0.22 μm和0.45 μm(水相、有机相)针孔过滤器 上海安谱科学仪器有限公司;多功能氮吹仪 HN200 济南海能仪器有限公司;坐式酒精喷 02075 洛阳金澜教学仪器设备有限公司;数显恒温油浴锅 HH-QS 江苏金坛市亿通电子有限公司。

### 1.2 分析条件

C<sub>18</sub> 色谱柱 4.6 × 100 mm, 3.5 μm, 检测波长 284 nm, 柱温 30 °C, 5% (v/v) 甲醇水溶液为流动相, 流速 0.5~1.5 mL/min, 以 0.45 μm 有机相、0.45 μm 水相, 0.22 μm 有机相、0.22 μm 水相针孔过滤器处理酸催化后的样品溶液。

### 1.3 标品和样品制备

1.3.1 标准溶液的配制 精确称取5-HMF标准品0.2010 g, 用去离子水溶解, 置于100 mL容量瓶中定容, 配成母液2.010 mg/mL的5-HMF溶液, 作为母液于4 °C条件下避光保存, 保质期为3个月。

吸取母液5 mL稀释至100 mL, 作为浓度为0.1005 mg/mL的次母液, 移取0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、8.00、32.00 mL定容至50 mL, 然后和母液、次母液同时测定。加上母液、次母液, 共配有九个待测标准溶液。按上述的色谱分析条件进行HPLC分析。

1.3.2 酸催化单糖反应制备样品溶液 吸取3 mL糖-酸水溶液, 其中酸浓度0.5%, 单糖浓度5 g/mL, 置于5 mL棕色安瓿瓶, 冲入氮气, 使用封口膜进行暂时封口, 防止氮气泄露, 氮气稳定, 加热时不易爆炸<sup>[15]</sup>。然后使用坐式酒精喷灯进行封口, 封口要严密。油浴锅升至120 °C后, 将安瓿瓶置于其中, 反应4 h, 稀释至一定倍数, 使其浓度处于线性范围内。最后使用针孔式滤头过滤, 置于高效液相色谱样品瓶中, 于4 °C保存, 待测。

### 1.4 方法评价

测定9个浓度的5-HMF标准样品的峰面积, 然后以峰面积为x, 5-HMF浓度为y, 作图, 制定标准曲线, 确定线性关系、测定范围, 并计算相关系数。以峰时间、峰面积、峰高、峰宽、对称因子的RSD为主要评价指标, 测定日间、日内误差加标回收率等, 计算此测定方法的精密度, 准确度<sup>[16-18]</sup>。

加标回收率的计算公式如下:

$$R(\%) = \frac{(M_2 - M_1)}{M_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中:R-加标回收率, M<sub>0</sub>-加标用标准样质量, 标样溶液中5-HMF质量, M<sub>0</sub> = C<sub>0</sub> × V<sub>0</sub>; M<sub>1</sub>-试样量, 即试样测定的5-HMF质量, M<sub>1</sub> = C<sub>1</sub> × V<sub>1</sub>; M<sub>2</sub>-加标试样中测得的5-HMF质量, M<sub>2</sub> = C<sub>2</sub> × V<sub>2</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定条件的确定

2.1.1 吸收波长的选定 取2.010 mg/L标准5-HMF溶液, 在224~320 nm波长下进行扫描(如图1所示), 由图可知, 目标物质5-HMF在284 nm处出现最大吸收峰, 故将检测波长定为284 nm。

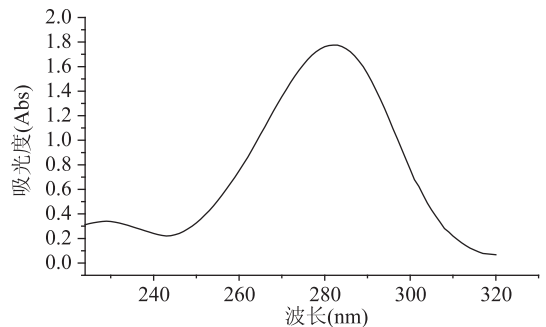


图1 5-HMF的紫外波长扫描

Fig.1 Spectra of UV wavelength scanning

2.1.2 流动相比比例 将标准品分别以甲醇: 5% (v/v) 甲醇水溶液比例(v/v)为0/100、5/95、10/90, 三者为流动相测定, 得到出峰时间为5.603、3.278、1.932 min, 观察三者叠加图谱, 对比峰形可以看出, 0/100时, 峰形最好, 对称因子最接近1; 甲醇比例越大, 出峰时间越短, 峰高变小, 峰形变宽, 峰形的对称因子偏离1, 对称性降低。故测定流动相定为5% (5/95, v/v) 甲醇水溶液, 三者图谱叠加对比如下图2。

2.1.3 针孔式过滤器 以0.45 μm有机系、0.45 μm水系, 0.22 μm有机系、0.22 μm水系针孔过滤器处理酸催化反应后的样品溶液, 将四种情况下的测定图

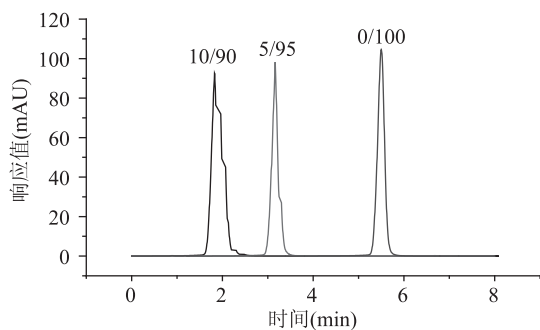


图2 流动相分析图谱对比

Fig.2 Spectra of comparison of mobile phase

谱叠加后,观察发现图谱无明显差别。四者的出峰时间、峰面积、峰高、峰宽、对称因子的 RSD 经计算,分别为 0.0031、0.00029、0.0035、0.0052、0.0040、0.0004,都小于 5%。

测定结果表明此四种过滤器在测定单糖酸水解体系中的差异性不大,溶液中的 5-HMF 含量不足以溶解水系过滤器的滤膜,从而引入杂质,影响测定结果。故今后的测定中,可采用 0.45  $\mu\text{m}$  水系针孔式过滤器。现将四种情况下测定的图谱叠加如图 3 所示。

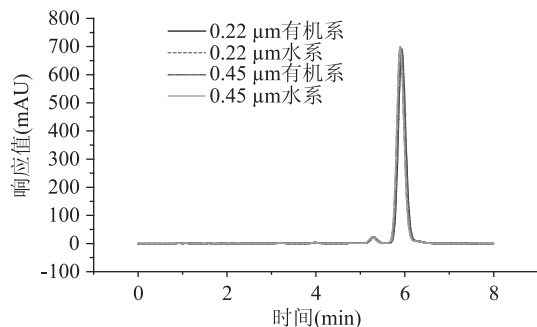


图3 四种针孔滤头图谱对比

Fig.3 Spectra of comparison four filters

2.1.4 流速的确定 以 0.5、1.0、1.5 mL/min 为流速,测定同一样品,测得出峰时间分别为 10.256、5.608、3.592 min,图谱如图 4 所示,当流速为 1 mL/min 时,出峰时间不会太迟,测定效率较快,且峰形对称因子最接近于 1,对称性好,峰高最大,峰形尖,峰宽窄,柱效最高。流速为 0.5、1.5 mL/min 时,峰形相对较差,有拖尾现象,峰高较低,故流速选为 1.0 mL/min。

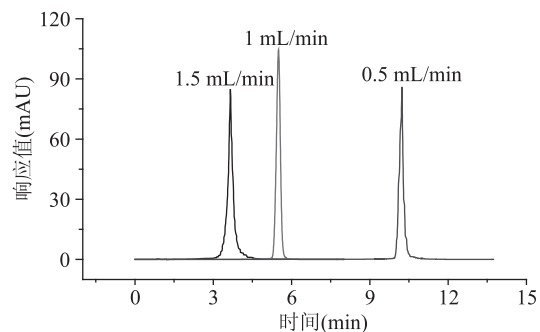


图4 流速效果的图谱

Fig.4 Spectra of comparison flow rate

## 2.2 方法评价

2.2.1 线性关系 利用此测定条件对 9 个浓度的标准样品进行分析,记录峰面积如表 1。观察图谱,发现在 201.0 mg/L 浓度处,峰形出现变形,对称因子降为 0.6,但不影响标准曲线的相关系数 ( $R^2$  为 0.999)。本次实验中,为避免稀释不够,确保浓度不超过 201.0 mg/L,最大测定浓度应为 100.5~201.0 mg/L 之间,设定为 150.0 mg/L。

对数据进行处理测得浓度(y)与峰面积(x)的方程关系为式(2),相关系数  $R^2$  为 0.999。

$$y = 0.006x - 0.137 \quad \text{式(2)}$$

表1 标准品的峰面积

Table 1 Peak area of standard samples

序号	浓度(mg/L)	峰面积(mAU·s)
1	0.1005	16.0
2	0.201	29.3
3	1.005	149.1
4	2.01	318.3
5	8.04	1210.8
6	16.08	2360.4
7	64.32	9506.0
8	100.5	14740.9
9	201.0	29401.5

2.2.2 选择性 将未反应的原料溶液与反应后的溶液,在同样的测定条件下进行分析,将结果叠加如图 5,可知,5-HMF 峰基本不受葡萄糖糖、果糖、磷酸、柠檬酸等物质的影响,原料液在 284 nm 下紫外吸收相对较弱,响应值很低,可以认为对目标物质 5-HMF 测定无影响。目的峰周围无干扰峰。

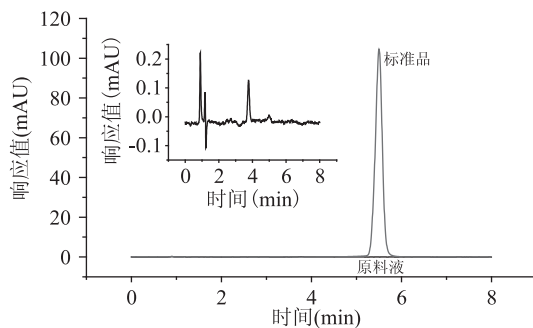


图5 原料溶液和标准溶液图谱对比

Fig.5 Spectra of comparison between raw material solution and standard solution

### 2.2.3 精确度

2.2.3.1 日内误差 将浓度为 6.958 mg/L 的标样,每隔 1 h 连续进样 7 次,叠加图谱为图 6,结果显示图谱无明显差别,结果如表 2,算得日内误差:出峰时间、峰面积、峰高、峰宽、对称因子、峰面积百分比如表 2 所示, RSD 分别为 0.0036、0.0013、0.0007、0.0107、0.0054、0.0001,都远远小于 0.05。

2.2.3.2 日间误差 将浓度为 6.958 mg/L 的标样,放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,分别放置 1、2、4、8 d,然后取出进行测定分析,叠加图谱如图 7,计算日内误差:出峰时间、峰面积、峰高、峰宽、对称因子、峰面积百分比如表 3 所示, RSD 分别为 0.0043、0.0003、0.0037、

表2 日内误差

Table 2 Intra-day precision

序号	时间(min)	峰面积(mAU·s)	峰高(mAU)	峰宽(min)	对称因子	峰面积(%)
1	5.577	1179.6	100.7	0.1848	0.862	99.91
2	5.596	1182.8	100.4	0.1840	0.868	99.90
3	5.595	1184.1	99.9	0.1863	0.869	99.89
4	5.625	1182.8	99.3	0.1884	0.860	99.90
5	5.623	1181.3	99.5	0.1866	0.865	99.89
6	5.630	1183.7	99.1	0.1888	0.870	99.90
7	5.623	1183.0	98.8	0.1891	0.858	99.91
平均	5.610	1182.5	99.67	0.1869	0.8645	99.90
标准偏差	0.0203	1.5424	0.6945	0.002	0.0047	0.0072
相对偏差	0.0036	0.0013	0.007	0.0107	0.0054	0.0001

表3 加标回收率

Table 3 Recovery rate after adding standard solution

序号	1		2		3	
	体积(mL)	5-HMF 浓度(mg/L)	体积(mL)	5-HMF 浓度(mg/L)	体积(mL)	5-HMF 浓度(mg/L)
标样	500	89.062	400	56.747	1000	171.548
试样	200	30.091	400	66.605	400	47.078
加标样	700	72.001	800	61.160	1400	138.445
回收率	99.67%		98.18%		102.01%	

0.0029、0.0126、0.0001,都远远小于0.05。

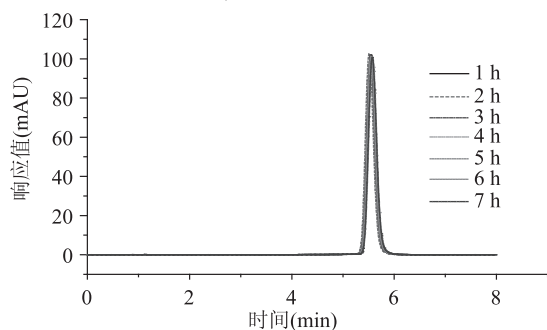


图6 日内误差

Fig.6 Intra-day precision

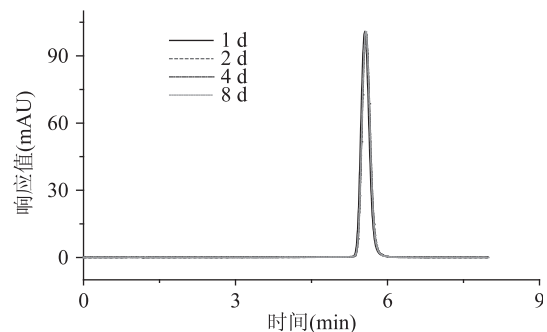


图7 日间误差

Fig.7 Inter-day precision

2.2.4 加标回收率 将标准液加入样品液中,涡旋1 min,混合均匀,进行分析测定,现将测定结果整理如表3,然后按照公式2,进行处理数据,计算加标回收率,分别为99.67%、98.19%、102.01%。

由表3可以看出,在大浓度标样加入小浓度试样、小浓度标样加入大浓度试样两种容易扩大误差

的情况下,此测定方法的加标回收率在98%~102.5%之间,接近于100%。因此可以得出结论,此方法可靠,测得数据真实有效。

2.2.5 检测限 调节标品浓度,降低浓度,使5-HMF峰面积减少,峰高降低至信噪比(S/N)的三倍为界限,仪器可检测到5-HMF最低含量为0.0101 mg/L;对于单糖酸解体系来说,由于各反应体系在各反应条件下的转化程度不同,故无法计算最低仪器能检测到的样品浓度限。若葡萄糖转化率为50%,则葡萄糖的浓度至少为0.0288 mg/L,才可以有效的检测得到。若果糖经过催化反应后转化率为90%,则果糖浓度至少为0.0160 mg/L,才可有效的检测得到。

## 2.3 样品测定

将葡萄糖(G)磷酸(P)体系、葡萄糖(G)柠檬酸(L)体系、果糖(F)磷酸(P)体系、果糖(F)柠檬酸(L)体系混合液,用于120℃催化反应4 h后,稀释至标准曲线范围内,测定得到图谱,叠加后如图8。

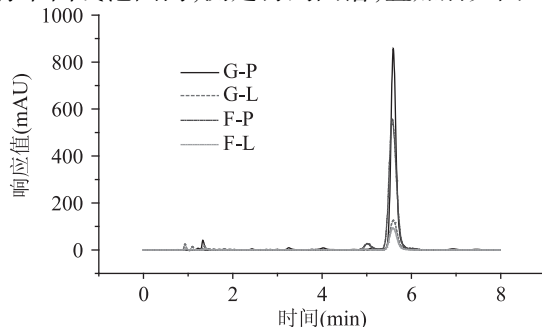


图8 四种反应体系

Fig.8 Four kinds of reaction system

计算得到5-HMF的含量分别为42.47、39.33、(下转第384页)

donating antioxidant activity [J]. Food Chem, 2007, 105: 414-420.

[23] 成坚, 曾庆孝, 马佩玲. 水煮鹅肉汤挥发性风味成分的 GC/MS 分析[J]. 中国调味品, 2003(9): 15-17.

[24] Wei C, Xi W, Nie X, et al. Comparison of Volatile Compounds of Flaxseeds Oils Isolated by three Technologies using SPME-GC/MS combined with Electronic Nose [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2015, 117(3).

[25] Jiménez A, Aguilera M P, Beltrán G, et al. Application of

(上接第 307 页)

9.01、6.49 mg/L, 经计算四者出峰时间 RSD 为 0.0344, 观察峰形, 目的峰周围基本无干扰峰, 对称因子接近于 1。此测定方法在今后的研究过程中可以使用。

### 3 结论

在葡萄糖磷酸体系、葡萄糖柠檬酸体系、果糖磷酸体系、果糖柠檬酸体系中, 单糖经过高温催化反应, 转化为 5-HMF, 可以采用本次高效液相测定条件进行检测。检测条件为 5% 甲醇水溶液, 检测波长为 284 nm, 整个运行时间为 8.0 min, 出峰时间大约是 5.6 min。得到的标准曲线中, 5-HMF 的浓度线性范围为 0.1005~201.0 mg/L, 线性相关系数  $R^2$  为 0.999。仪器可检测到 5-HMF 最低含量为 0.0101 mg/L, 小于 0.1005 mg/L, 故本测定方法测定浓度范围为 0.1005~150.0 mg/L。

在此测定条件下, 进样重复性好, 日内误差和日间误差比较小, 都小于 0.05, 加标回收率高, 在 95%~105% 之间, 精密度高。实验证明, 此检测方法可以用于单糖酸水解中 5-HMF 的测定, 为今后测定糖酸食品中 5-HMF 的含量提供依据。

### 参考文献

- [1] 王军, 张春鹏, 欧阳平凯. 5-羟甲基糠醛制备及应用的研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27(5): 702-707.
- [2] Kui Zhong, Fang Chen, Zhengfu Wang, et al. Inactivation and kinetic model for the *Escherichia coli* treated by a co-axial pulsed electric field[J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(6): 752-758.
- [3] 董喜恩, 蒋峰, 罗根祥. 糖类脱水生成 5-羟甲基糠醛的研究进展[J]. 化工中间体, 2010, 02: 17-22.
- [4] Zhou Cunshan, Yu Xiao, Ma Haile, et al. Properties and catalytic activity of magnetic and acidic ionic liquids: Experimental and molecular simulation [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105: 300-307.
- [5] 董坤, 张泽会. 离子液体中木质素磺酸催化果糖制备 5-羟甲基糠醛[J]. 有色金属科学与工程, 2011, 2(2): 38-42.
- [6] Zhou Cunshan, Yu Xiaojie, Yang Huqing, et al. The Preparation of Levulinic Acid by Acid-catalyzed Hydrolysis of Bamboo Shoot Shell in the Presence of Acidic Ionic Liquid Using the Box-Behnken Design [J]. Energy Sources, Part A-recovery

solid-phase microextraction to virgin olive oil quality-control [J]. J.Chromatogr, 2006, 1121: 140-144.

[26] 陈超, 黄克霞, 李梦, 等. 新疆胡麻油香气萃取条件研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 242-245.

[27] Lee J, Kim D, Chang P, et al. Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) analysis of oxidized volatiles from free fatty acids (FFA) and application for measuring hydrogen donating antioxidant activity [J]. Food Chem, 2007, 105: 414-420.

utilization and environmental effects, 2013, 35(19): 1852-1862.

[7] Zhou Cunshan, Yu Xiaojie, Ma Haile, et al. Examining of athermal effects in microwave-induced glucose/glycine reaction and degradation of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97: 38-44.

[8] Yu Su, Heather M. Brown, Huang Xiwen, et al. Single-step conversion of cellulose to 5-hydroxymethylfurfural (HMF), a versatile platform chemical [J]. Applied Catalysis A-general, 2009, 361(1): 117-122.

[9] 杨凤丽, 刘启顺, 白雪芳, 等. 由生物质制备 5-羟甲基糠醛的研究进展[J]. 现代化工, 2009, 29(5): 18-22.

[10] 郭天鑫. 5-羟甲基糠醛的检测方法及其在食品中产生研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.

[11] 冯红伟, 扶雄. 紫外分光光度法测定糖蜜中 5-羟甲基糠醛含量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 365-367.

[12] 代学民. 离子液体中金属氯化物催化糖脱水制备 5-羟甲基糠醛[D]. 天津: 天津大学, 2008.

[13] Khaled W Omari, Jessica E Besaw, Francesca M Kerton. Hydrolysis of chitosan to yield levulinic acid and 5-hydroxymethylfurfural in water under microwave irradiation [J]. Green Chemistry, 2012, 14: 1480-1487.

[14] 钱文, 黄朝瑜, 张伟娜. GC 法对含葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的测定 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1601-1603.

[15] Feridoun Salak Asghari, Hiroyuki Yoshida. Acid-Catalyzed Production of 5-Hydroxymethyl Furfural from D-Fructose in Subcritical Water [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006, 45(7): 2163-2173.

[16] Nadia Spano, Marco Ciulu, Ignazio Floris, et al. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey [J]. Talanta, 2009, 78(1): 310-314.

[17] Amr E Edris, Michael Murkovic, Barbara Siegmund. Application of headspace-solid-phase microextraction and HPLC for the analysis of the aroma volatile components of treacle and determination of its content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) [J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1310-1314.

[18] Viviane Maria Rizelio, Luciano Valdemiro Gonzaga, Graciele da Silva Campelo Borges, et al. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples [J]. Food Chemistry, 2012, 133: 1640-1645.