

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*

刘亚攀¹, 冉雪琴¹, 陈璐莹¹, 张静¹, 阮佳¹, 李永新^{1,2}, 孙成均^{1,2△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041); 2. 四川省食品安全监测与风险评估重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 建立功能食品中赤藓糖醇、木糖醇、半乳糖醇、山梨醇、甘露醇、麦芽糖醇,以及葡萄糖和三氯蔗糖的柱前紫外衍生-高效液相色谱同时测定方法。**方法** 食品中的糖醇等经水提取后,与苯甲酰氯反应生成紫外衍生物,衍生物经 C₁₈ 柱分离,柱温为 30 ℃,甲醇-水梯度洗脱,流速 1.00 mL/min,检测波长为 232 nm。**结果** 所测 8 种物质的标准曲线线性良好($r>0.999$),检出限低于 2.2 μg/mL,加标回收率为 89.6%~117.0%,日内相对标准偏差小于 5%。**结论** 该方法衍生反应简便快速、所需试剂经济易得,本法不需特殊检测器,易于推广,适用于功能食品中多种糖醇的同时测定。

【关键词】 糖醇 苯甲酰氯 柱前紫外衍生 高效液相色谱法 功能食品

Simultaneous Determination of Sugar Alcohols and Sugars in Functional Foods by Precolumn Ultraviolet Derivatization-High Performance Liquid Chromatography LIU Ya-pan¹, RAN Xue-qin¹, CHEN Lu-ying¹, ZHANG Jing¹, RUAN Jia¹, LI Yong-xin^{1,2}, SUN Cheng-jun^{1,2△}. 1. Department of Sanitary Technology, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Risk Assessment of Sichuan, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: sunchj@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a method using precolumn ultraviolet derivatization coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous determination of erythritol, xylitol, galactitol, sorbitol, mannitol, maltitol, glucose and sucrose in functional foods. **Methods** Target sugar alcohols and sugars in food samples were extracted in water by ultrasonic method and then reacted with benzoyl chloride to form violet-absorbing products, which were separated on a C₁₈ column with gradient elution using methanol and water as mobile phase. The experiment was performed using a flow rate of 1.00 mL/min, column temperature at 30 ℃ and detected wavelength at 232 nm. **Results** The linear correlation coefficients of all the derivatives were more than 0.999. The detection limits of the method were as low as 2.2 μg/mL. The average recoveries were 89.6%-117.0%, with intraday relative standard derivations lower than 5%. **Conclusion** This method is simple, inexpensive and easy to operate and it is suitable for the determination of sugar alcohols and glucose and sucrose in functional foods.

【Key words】 Sugar alcohols Benzoyl chloride Precolumn ultraviolet derivatization High performance liquid chromatography Functional foods

糖醇是一类含两个以上羟基的多元醇,多用糖氢化还原制取,具有某些糖的属性,能提供一定热量,但不引发龋齿,不升高血糖,因此非常适宜作为糖尿病患者专用食品中糖的替代品^[1]。目前糖醇已在各种无糖、低糖功能食品中得到广泛应用。我国的无糖食品产业在近十年来发展迅猛,各种无糖、低糖功能食品层出不穷,但国家标准及标准检验方法严重滞后。因此,建立有效可靠的能同时测定功能

食品中多种糖醇的方法,对于我国相关标准的制定,控制无糖、低糖功能食品质量,具有重要意义。目前,食品中糖醇的分析方法有高效液相色谱-蒸发光散射检测法^[2]或示差折光检测法^[3],以及高效阴离子色谱-脉冲安培检测法^[4,5],但这些检测仪器在一般实验室较少配置。如果将糖醇进行紫外衍生化,便可以采用常规的高效液相色谱-紫外检测器进行检测分析。苯甲酰氯是一种酰化试剂,可用于羟基或氨基的紫外衍生,对于糖类物质而言,已有采用苯甲酰氯作为衍生剂测定血液等生物材料中少数几种糖或糖醇的报道^[6-8],但应用于功能食品中多种糖

* 科技部“十二·五”科技支撑项目(No. 2012BAD33B02)资助

△ 通讯作者, E-mail: sunchj@scu.edu.cn

醇的同时衍生分析,尚未见文献报道。本研究建立了可同时检测多种糖醇的紫外衍生-高效液相色谱(HPLC-UV)分析法,采用常规 C_{18} 柱分离、紫外检测器检测,无需特殊设备,提高了分析灵敏度,通过对实际样品检测,取得满意结果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HP 1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司,美国),配紫外-可见光检测器。

赤藓糖醇、半乳糖醇(含量>99%,成都艾科达化学试剂有限公司);木糖醇、山梨醇、甘露醇、麦芽糖醇、三氯蔗糖(含量>99%,成都格雷西亚化学技术有限公司);葡萄糖(含量>99%,天津市科密欧化学试剂有限公司);苯甲酰氯(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);氢氧化钠、磷酸、乙酸乙酯均为分析纯;甲醇为色谱纯。优普超纯水($18.25\text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$)。

1.2 HPLC-UV 分析条件

分离柱为 C_{18} 柱(Synergi 4u Fusion-RP 80 Å, $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$),检测波长为 232 nm ,柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相为甲醇-水,梯度洗脱程序为初始甲醇:水为 75:25;30 min,甲醇:水为 90:10,流速 1.00 mL/min 。

1.3 标准系列的制备

准确称取赤藓糖醇、木糖醇、半乳糖醇、山梨醇、甘露醇各 0.10 g (精确到 0.0001 g),以 10 mL 30%乙醇水溶解,配制成浓度均为 10 mg/mL 的标准贮备液;准确称取麦芽糖醇、葡萄糖及三氯蔗糖各 0.40 g (精确到 0.0001 g),以 10 mL 30%乙醇水溶解配制成浓度均为 40 mg/mL 的标准贮备液。取以上各标准储备液 1.00 mL 并用 30%乙醇水定容至 10 mL ,得到赤藓糖醇、木糖醇、半乳糖醇、山梨醇、甘露醇浓度均为 1.00 mg/mL ,葡萄糖、三氯蔗糖、麦芽糖醇浓度均为 4.00 mg/mL 的混合标准液。将混合标准液用 30%乙醇水稀释成赤藓糖醇、木糖醇、半乳糖醇、山梨醇、甘露醇浓度均为 2.0 、 5.0 、 10.0 、 50.0 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$,葡萄糖、三氯蔗糖、麦芽糖醇浓度均为 8.0 、 20.0 、 40.0 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的标准系列。

1.4 衍生处理

取标准系列各浓度溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 于 5 mL EP 管中,加 $20\text{ }\mu\text{L}$ 苯甲酰氯和 8 mol/L NaOH $100\text{ }\mu\text{L}$,旋涡混匀 1 min 后室温($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)静置,不时旋涡混匀, 10 min 后加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 6 mol/L 磷酸,混匀后加入

$200\text{ }\mu\text{L}$ 乙酸乙酯,充分旋涡混匀以萃取衍生产物, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,取上清 $10\text{ }\mu\text{L}$ 进样分析。以各物质衍生产物的峰面积对其浓度绘制标准曲线。混合标准液衍生产物色谱图见图 1。

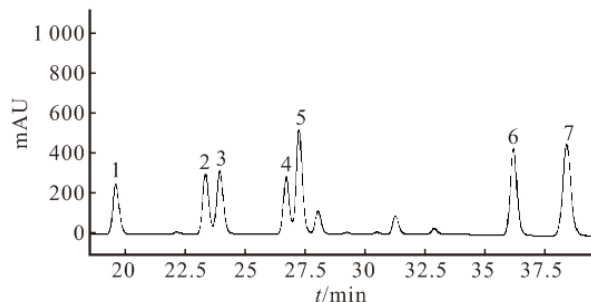


图 1 混合标准溶液衍生产物色谱图

Fig 1 Chromatogram of the mix standard solution

1: Erythritol (19.6 min); 2: Xylitol (23.4 min); 3: Glucose (24.0 min); 4: Galactitol (26.7 min); 5: Sorbitol + mannitol (27.3 min); 6: Sucrose (36.2 min); 7: Maltitol (38.4 min)

1.5 样品处理

准确称取 0.20 g 样品(精确到 0.001 g)于 5 mL EP 管中,加入纯水 2.00 mL ,超声提取 10 min 后, $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,取上清液经纯水稀释适当倍数后作为样液。吸取样液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 按照 1.4 所述衍生步骤衍生化,产物经 HPLC-UV 分析,保留时间定性,峰面积标准曲线定量。

口香糖用剪刀剪碎后称样,由于其属于胶体基质,将超声提取时间延长至 40 min ^[5],胶囊去壳取内容物称样,片剂粉碎后称样。由于蛋白质可能干扰衍生反应^[6],影响衍生产率,故富含蛋白质的样品提取液需预先用三氯乙酸进行蛋白质沉淀处理,上清液经碳酸钾中和后再作为样液进行衍生分析。

2 结果与讨论

2.1 衍生条件

2.1.1 衍生剂的选择 由于糖醇是糖分子上的醛基或酮基被还原成羟基而成的多元醇,其分子不再具有还原性基团,因此用于针对糖分子还原端的紫外衍生试剂(如 2-氨基吡啶和 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮等^[9,10])便无法应用于糖醇的衍生,故需选择针对糖醇分子中多羟基的衍生试剂。羟基易被酰化,常见的具有紫外吸收基团的酰化试剂有苯甲酰氯^[6-8]、对硝基苯甲酰氯(PNBC)^[11,12]、茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)^[13,14],预实验中我们比较了此 3 种衍生剂与糖醇的反应。发现苯甲酰氯作衍生剂在氢氧化钠的催化下与糖醇反应,室温下 10 min 便可完成,反应条件温和,操作简单。PNBC 作衍生剂反应

条件则相对苛刻,其遇水易分解,反应前须将试液吹干,操作繁琐,耗时,以吡啶为催化剂,70 ℃ 90 min 才能反应完全。FMOC-Cl 衍生剂需在 60 ℃ 水浴中 50 min 才反应完全,耗时也较长。从经济性方面考虑,苯甲酰氯价格也是最便宜的。所以,实验采用苯甲酰氯作为糖醇的紫外衍生剂。

2.1.2 苯甲酰氯的用量 实验考察了 50 μL 100 μg/mL 的糖醇混标与不同量的苯甲酰氯(5, 10, 20, 30 μL)在 100 μL NaOH 中反应的峰面积变化情况。结果表明,当苯甲酰氯用量增加,衍生物峰面积随之增加,但当其用量超过 20 μL 时,各物质峰面积达到最大值,且不再随苯甲酰氯的增加而增加,山梨糖醇、麦芽糖醇和三氯蔗糖衍生物峰面积还有下降趋势。故本法选择的苯甲酰氯用量为 20 μL。

2.1.3 氢氧化钠用量 由于糖醇分子中有多个羟基,各羟基被苯甲酰化的难易程度有差异,所以有些糖醇会出现多种副产物,虽然 Oehlke 等^[6]指出糖醇羟基的这种不完全反应由糖醇和苯甲酰氯分子的三维结构决定,改变苯甲酰化的条件并不能使反应产物单一化。实验证明,衍生反应体系中氢氧化钠浓度对衍生副产物的生成量影响很大。我们考察了 50 μL 100 μg/mL 混标与 20 μL 苯甲酰氯在 100 μL 浓度分别为 4.0、6.0、8.0、9.0 和 10 mol/L 的 NaOH 溶液中反应各衍生物峰面积的变化。结果表明,当反应体系中 NaOH 浓度小于 6.0 mol/L 时,副产物较多,且主产物产率较低;而当浓度为 9.0 mol/L 时,副产物已经基本消除,且主产物产率较高,但是反应体系在放置过程中凝结,不利于后续处理;故本法选择 8.0 mol/L NaOH 可满足各糖醇最适衍生条件,产率高且反应体系不出现凝结。NaOH 浓度对衍生物峰面积的影响见图 2。

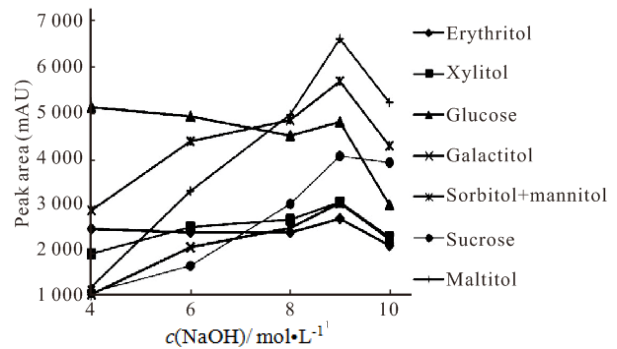


图 2 NaOH 浓度对衍生物峰面积的影响

Fig 2 The effect of NaOH concentration on peak area

2.1.4 反应温度 预实验中考察了温度(4 ℃, 25 ℃, 40 ℃, 60 ℃, 80 ℃)对衍生的影响,实验结果

表明,在室温(25 ℃)即可使衍生物峰面积达到较高水平,4 ℃低温抑制反应的发生,40 ℃衍生结果与室温(25 ℃)下无显著性差异,但温度再升高使部分衍生产物峰面积有所下降,可能是产物在高温下不稳定或副反应增加造成的影响。故本法选择衍生温度为室温(25 ℃)。

2.1.5 反应时间 预实验考查了反应时间分别为 5、8、10、12、15、20 min 时衍生产物峰面积情况,结果表明,随着反应时间的增加,产物峰面积增加,当反应时间为 10 min 时,各衍生物峰面积达最大值,再延长反应时间,反应体系出现凝结现象,不利于后续样品处理,故本法固定反应时间为 10 min。如需进一步提高方法的灵敏度,还可将衍生产物乙酸乙酯萃取液经氮气吹干后加入小体积的流动相溶解进样分析。稳定性实验表明,衍生产物经乙酸乙酯提取后在 4 ℃冰箱中密封保存至少可稳定 1 周。

2.2 色谱条件

2.2.1 色谱柱 预实验中比较了三款 C₁₈ 柱对衍生产物的分离效果。Synergi Fusion-RP C₁₈ 柱在梯度洗脱时能使赤藓糖醇、三氯蔗糖和麦芽糖醇衍生产物达到基线分离;木糖醇与葡萄糖,半乳糖醇与(山梨醇+甘露醇)这两对关键峰分离度能达到 1.2,分析时间在 40 min 以内,由于山梨醇和甘露醇互为差向异构体,推测其产物也互为差向异构体,在该条件下无法分离,故本实验测定二者的总量,但 Miyagi 等^[8]采用 Cadenza CD-C₁₈ 柱,77.5% 乙腈水等度洗脱能使山梨醇和甘露醇的苯甲酰氯衍生产物分离度达到 1.69,故有关这两种糖醇衍生产物是否互为差向异构体有待进一步考察。另外两款色谱柱, Synergi Hydro-RP C₁₈ 柱和 Luna C₁₈ 柱虽然能使木糖醇与葡萄糖产物峰达到基线分离,但半乳糖醇与(山梨醇+甘露醇)产物峰分离效果不及 Synergi Fusion-RP C₁₈ 柱,且最后出峰的麦芽糖醇衍生产物在 42 min 之后出峰,分析时间过长。综合考虑选择使用 Synergi Fusion-RP C₁₈ 柱。

2.2.2 洗脱条件 预实验比较了乙腈水和甲醇水分别作为流动相进行梯度洗脱,并未见乙腈水分离效果优于甲醇水,考虑成本效益,采用甲醇水作为流动相。80% 甲醇水等度洗脱可达到与梯度洗脱相当的分离效果,但分析时间超过 50 min。采用 75%~90% 甲醇水梯度洗脱可使分析时间缩短到 40 min 以内,且三氯蔗糖和麦芽糖醇衍生产物的峰型较等度洗脱有明显改善,故本法采用梯度洗脱。柱温对保留时间有较为明显的影响,柱温升高,各物质出峰

提前,分析时间缩短,但关键峰分离度减小,综合考虑分析时间和分离度,本法固定柱温为 30 ℃。

2.2.3 检测波长 本实验衍生产物经二极管阵列检测器(diode array detector,DAD)进行光谱扫描分析,确定各糖醇和糖的衍生产物最大吸收波长为 232 nm,故实验固定检测波长为 232 nm。

表 1 方法的回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Table 1 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges and detection limits of the method				
	Linear equation	Correlation coefficient (<i>r</i>)	Linear range (μg/mL)	Detection limit (μg/mL)
Erythritol	$Y=46.49x+26.0$	0.999 6	2-100	0.64
Xylitol	$Y=42.15x+33.3$	0.999 8	2-100	0.61
Glucose	$Y=22.75x+64.5$	0.999 2	8-400	1.29
Galactitol	$Y=35.00x+55.5$	0.999 4	2-100	0.63
Sorbitol+mannitol	$Y=49.64x+45.9$	0.999 8	4-200	0.65
Sucrose	$Y=14.55x+46.7$	0.999 5	8-400	2.20
Maltitol	$Y=22.38x+14.0$	0.999 7	8-200	1.30

系,相关系数(*r*)为 0.999 2~0.999 8,检出限为 0.64~2.20 μg/mL。

2.4 方法精密度

称取某功能食品 6 份按 1.5 方法超声提取,在超声前加入等量一定量混标溶液,在同一天内进行 6 次平行测定,以考察方法的日内精密度,各物质保留时间日内相对标准偏差(*RSD*)在 1.42%~2.68%之间,峰面积 *RSD* 在 1.04%~4.25%之间。

2.5 方法准确度

在样品中加入不同量的混标溶液(0.10,0.20,0.30 g/kg),按本法衍生后测定,并计算加标回收率,结果见表 2,可见各分析物的平均加标回收率为 89.6%~117.0%。

表 2 本法加标回收实验结果 (*n*=3)

Table 2 Recoveries of the method (<i>n</i> =3)					
	Background (g/kg)	Spiked (g/kg)	Found (g/kg)	Recovery (%)	Mean of recovery (%)
Erythritol	0.16	0.10	0.27	110.0	106.0
		0.20	0.37	105.0	
		0.30	0.47	103.0	
Xylitol	0.17	0.10	0.29	120.0	117.0
		0.20	0.40	115.0	
		0.30	0.52	117.0	
Glucose	0.87	0.40	1.21	85.0	94.3
		0.80	1.66	98.8	
		1.20	2.06	99.2	
Galactitol	0.20	0.10	0.30	100.0	101.0
		0.20	0.40	100.0	
		0.30	0.51	103.0	
Sorbitol+mannitol	0.29	0.20	0.48	95.0	89.6
		0.40	0.68	97.5	
		0.80	0.90	76.3	
Sucrose	0.58	0.40	0.93	87.5	94.4
		0.80	1.28	97.5	
		1.20	1.76	98.3	
Maltitol	0.60	0.40	0.97	92.5	91.0
		0.80	1.35	93.8	
		1.20	1.64	86.7	

2.3 标准曲线和线性范围

浓度为 2.0~100 μg/mL 的标准溶液经过衍生处理后 HPLC-UV 分离检测,以各物质的峰面积对其浓度绘制标准曲线,以 3 倍信噪比确定各物质的检出限,本法回归方程、相关系数、线性范围和检出限见表 1。在线性范围内,8 种物质有良好的线性关

2.6 样品检测

应用本法对数种功能食品和超市购买的无糖食品进行了分析测定,某样品测定结果见表 3,色谱图见图 3。所检测的 10 种食品中,有 7 种检出葡萄糖,含量为 0.27~21.70 g/kg;有 8 种检出山梨醇和甘露醇,含量为 0.68~175.00 g/kg;各有 2 种检出赤藓糖醇和木糖醇,含量分别为 2.91~28.80 g/kg 和 2.99~263.00 g/kg;有 3 种分别检出半乳糖醇、三氯蔗糖和麦芽糖醇。

综上所述,本文所报道的功能食品中多种糖醇和糖的柱前紫外衍生-高效液相色谱方法简便、快速、灵敏、准确,适用于功能食品中多种糖醇的快速检测。

表 3 功能食品中 8 种糖及糖醇测定结果(g/kg)
Table 3 Testing results of some food samples (g/kg)

Sample	Erythritol	Xylitol	Glucose	Galactitol	Sorbitol+mannitol	Sucrose	Maltitol
1	28.80	263.00	ND	ND	175.00	4.19	ND
2	ND	ND	3.21	ND	10.40	ND	ND
3	ND	2.99	21.70	ND	63.00	ND	ND
4	ND	ND	8.37	ND	3.78	ND	ND
5	ND	ND	4.01	ND	ND	ND	ND
6	2.91	ND	15.70	ND	2.93	ND	ND
7	ND	ND	0.27	0.05	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	107.00	ND	42.70
9	ND	ND	ND	ND	58.50	ND	ND
10	ND	ND	5.11	ND	0.68	ND	ND

ND: Not detected

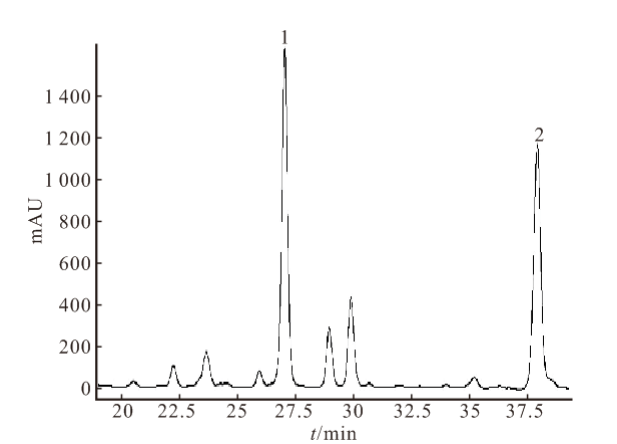


图 3 蛹虫草片样品色谱图

Fig 3 The chromatogram of a functional food sample

1: Sorbitol+manneritol; 2: Maltitol

参 考 文 献

1 尤 新. 食糖替代品——糖醇. 中国食物与营养, 2008; (6): 23-26.

2 史海良, 杨红梅, 王 浩等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定无糖食品中糖醇. 分析试验室, 2009; 28(S2): 294-296.

3 施燕支, 郭雪清, 余启荣等. HPLC 示差折光分析法测定口香糖中的木糖醇等多种糖醇的含量. 首都师范大学学报(自然科学版), 2005; 26(1): 62-67.

4 刘玉峰, 唐华澄, 李 东. 离子色谱法在糖和糖醇分析检测中的应用研究. 北京工商大学学报(自然科学版), 2010; 28(4): 61-64.

5 林 榕. 离子色谱法同时测定食品中糖醇和糖的方法学研究与应用. 天津: 天津大学化工学院, 2012.

6 Oehlke J, Brudel M, Blasig IE. Benzoylation of sugars, polyols

and amino acids in biological fluids for high-performance liquid chromatographic analysis. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994; 655(1): 105-111.

7 Kwang-Hyok S, Ui-Nam P, Sarkar C, *et al.* A sensitive assay of red blood cell sorbitol level by high performance liquid chromatography; potential for diagnostic evaluation of diabetes. Clin Chim Acta, 2005; 354(1-2): 41-47.

8 Miyagi M, Yokoyama H, Hibi T. Sugar microanalysis by HPLC with benzoylation; improvement via introduction of a C-8 cartridge and a high efficient ODS column. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007; 854(1-2): 286-290.

9 孙清华, 刘道杰. 用于测定糖的衍生试剂的研究进展. 化学试剂, 2005; 27(11): 653-656.

10 王仲孚, 贺建宇, 尉亚辉等. 用于寡糖链分析的 HPLC 柱前衍生化方法研究进展. 有机化学, 2006; 26(5): 592-598.

11 Nojiris S, Taguchi N, Oishi M, *et al.* Determination of sugar alcohols in confectioneries by high-performance liquid chromatography after nitrobenzoylation. J Chromatogr A, 2000; 893(1): 195-200.

12 毛丽莎, 孙成均, 李永新等. 柱前荧光衍生-高效液相色谱法测定尿和血清中的环境雌激素. 分析化学, 2005; 33(1): 33-36.

13 Sánchez-Hernández L, García-Ruiz C, Crego AL, *et al.* Sensitive determination of d-carnitine as enantiomeric impurity of levo-carnitine in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal, 2010; 53(5): 1217-1223.

14 Vogt C, Kiessig S. Separation of d/l-carnitine enantiomers by capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 1996; 745(1): 53-60.

(2014-01-20 收稿, 2014-04-25 修回)

编辑 汤 洁