

# 高效液相色谱法测定莲子酶解液中果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖含量

张逸寒, 臧浩科\*, 王蕊, 阎瑾, 王晓如

河北中烟工业有限责任公司, 河北 石家庄

收稿日期: 2022年5月1日; 录用日期: 2022年5月15日; 发布日期: 2022年5月25日

## 摘要

目的: 建立高效液相色谱-示差折光检测器法测定莲子酶解液中葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖的分析方法。方法: 莲子粉末溶于水后, 经超声波提取, 加入 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、半纤维素酶发生酶解, 提取液经离心、过滤后, 进行上机测定。采用Prevail Carbohydrate ES色谱柱(5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm), 以乙腈-水(体积比为75:25)为流动相, 流速为1.0 mL/min, 柱温25 $^{\circ}$ C, 检测器池温度35 $^{\circ}$ C。结果: 本方法有较好的线性关系( $r = 0.999$ ), 精密度高(RSD < 4%), 准确度高(回收率97.3%~101.7%), 适用于莲子酶解液中葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖的定量分析。采用该方法确定了莲子酶解最优混合酶比例为 $\alpha$ -淀粉酶:糖化酶:纤维素酶:半纤维素酶 = 1.1%:1.4%:0.9%:0.9%, 在该条件下, 莲子酶解液中果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖含量分别为2.74 mg/mL, 21.58 mg/mL, 0.26 mg/mL, 3.62 mg/mL。该方法前处理简单, 分析时间短, 操作步骤简单, 重复性好, 定量准确, 可对莲子酶解液中的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖进行准确测定。

## 关键词

莲子, 酶解, 高效液相色谱, 示差检测器

# Determination of Fructose, Glucose, Sucrose and Maltose in Lotus-Seeds Enzymatic Hydrolysates by HPLC

Yihan Zhang, Haoke Zang\*, Rui Wang, Jin Yan, Xiaoru Wang

China Tobacco Hebei Industrial Company, Shijiazhuang Hebei

Received: May 1<sup>st</sup>, 2022; accepted: May 15<sup>th</sup>, 2022; published: May 25<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 张逸寒, 臧浩科, 王蕊, 阎瑾, 王晓如. 高效液相色谱法测定莲子酶解液中果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖含量[J]. 分析化学进展, 2022, 12(2): 141-148. DOI: 10.12677/aac.2022.122018

## Abstract

**Objective:** A method for the quantitative determination of glucose, fructose, sucrose and maltose in Lotus-Seeds enzymatic hydrolysates was established by high-performance liquid chromatography-refractive index detector (HPLC-RID). **Methods:** Lotus-Seeds powder was dissolved in pure water and extracted by ultrasonic wave. After adding  $\alpha$ -amylase-glucoamylase-cellulase-hemicellulase system, the enzymatic extraction was then centrifuged, filtered and determined by HPLC-RID using Prevail Carbohydrate ES column (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm). The mobile phase is 75% acetonitrile-25% water solution at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature and the detection pool temperature were controlled at 25°C and 35°C. **Results:** The calibration curves exhibited good linearity ( $r = 0.999$ ), precision (RSD < 4%) and accuracy (recoveries range from 97.3% to 101.7%). This method met the needs of quantification of glucose, fructose, sucrose and maltose in Lotus-Seeds enzymatic hydrolysates. The optimized enzyme system addition in lotus seeds was  $\alpha$ -amylase 1.1%, glucoamylase 1.4%, cellulose 0.9%, hemicellulose 0.9%. Under this experimental condition, the contents of fructose, glucose, sucrose and maltose in the lotus-seed hydrolysates were 2.74 mg/mL, 21.58 mg/mL, 0.26 mg/mL and 3.62 mg/mL, respectively. **Conclusion:** This method has simple pretreatment, short analysis time, simple operation steps, good repeatability and high accuracy. It can provide accurate quantitative results for the determination of fructose, glucose, sucrose and maltose in the lotus-seed enzymatic hydrolysates solution.

## Keywords

Lotus-Seeds, Enzymatic Hydrolysates, High-Performance Liquid Chromatography, Refractive Index Detector

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

莲子又名水芝丹, 属睡莲科莲属(*Nelumbo nucifera* Gaertn), 是我国水生蔬菜的重要经济作物, 是食药两用的珍贵食品。莲子具有很高的营养价值, 含有磷脂、生物碱、氨基酸、类黄酮、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、水溶性多糖等成分, 具有清除自由基、延缓器官衰老等功效[1] [2] [3] [4] [5]。淀粉是莲子的主要成分[6], 由于淀粉糊具有老化的物理性质, 低温静置会形成不溶性的硬性凝胶块, 影响莲子的开发利用。 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶是具有内切活性和外切活性的淀粉酶, 能水解  $\alpha$ -1,4-糖苷键, 生成葡萄糖。纤维素酶和半纤维素酶是不同种复合酶的总称, 可降解纤维素和半纤维素, 提高植物资源利用率, 最终水解为葡萄糖[7]。因此, 可采用酶解法处理莲子, 以提高莲子还原糖的得率, 进一步了解莲子多糖的组成及结构。

目前, 多糖的一级结构的分析方法主要有化学分析法、分光光度法、高效毛细管电泳法、气相色谱法、高效液相色谱法和酶学方法[8]-[13]等。与其他方法相比, HPLC 法具有简单、快速、精密度好、定量准确等优点, 适用于成批样品的检测, 有助于提高检测效率, 降低分析误差[14] [15]。与 HPLC 配合使用的检测器主要有示差折光检测器[16]、电喷雾检测器[17]、蒸发光散射检测器[18] [19]和质谱[20]等。与其它检测器相比, 示差折光检测器虽然灵敏度略低, 但其成本较低, 具有较好的线性和稳定性, 定量能力强。故本实验通过复合酶分解莲子, 采用高效液相色谱-示差检测法测定莲子酶解液中葡萄糖、果糖、

蔗糖、麦芽糖的含量,为莲子及相关产品的生产加工提供参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与试剂

葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖(标准品,国药集团化学试剂有限公司);柠檬酸、氢氧化钠(分析纯,阿拉丁试剂有限公司); $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、半纤维素酶(江苏锐阳生物科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);0.22  $\mu\text{m}$  有机系微孔滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司);莲子(神威大药房);Prevail Carbohydrate ES 色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm, 美国 Grace 公司)。

### 2.2. 仪器与设备

ME204E 电子分析天平(上海 METTLER-TOLEDO 仪器有限公司);KQ-250DE 型数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);TG20 高速离心机(长沙英泰仪器有限公司);MaxQ 8000 恒温摇床(美国 Thermo Fisher 科技公司);S40 型 pH 计(上海 METTLER -TOLEDO 仪器有限公司);1290 Infinity II 型高效液相色谱仪(配 1260 RID 示差折光检测器,德国 Agilent 公司)。

### 2.3. 实验方法

1) 标准储备液:准确称取果糖标准品 2.5000 g、葡萄糖标准品 2.0000 g,置于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 水溶解,用乙腈定容至刻度线,摇匀,制成果糖、葡萄糖浓度为 50.0 mg/mL 和 40mg/mL 的标准储备液 A,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;准确称取蔗糖、麦芽糖标准品各 1.000 g,置于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 水溶解,用乙腈定容至刻度线,摇匀,制成蔗糖、麦芽糖浓度为 20.0 mg/mL 的标准储备液 B,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

2) 标准工作溶液:分别准确移取 2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL、6.0 mL 标准储备液 A 和 0.250 mL、0.500 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL 标准储备液 B,用乙腈:水(60:40)定容至 10 mL,配制成不同浓度的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的标准工作溶液,用于绘制标准工作曲线。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 色谱柱的选择

常用于食品中糖类测定的色谱柱有 C18 柱[21] [22]、氨基柱[23] [24]和糖柱[14] [25] [26]等。C18 柱对单糖保留保留较弱,需要进行柱前衍生化方可分离[27]。本实验比较了氨基柱和糖柱,发现使用氨基柱时,麦芽糖的峰形较差。使用糖柱时,样品的峰形最好,四个样品能得到完全分离,且分析时间不超过 15 min。因此本实验选择 Prevail 糖柱进行 4 种糖的分析。

### 3.2. 流动相的选择

本实验比较了乙腈与水比例为 80:20 (v/v), 75:25 (v/v), 70:30 (v/v), 65:35 (v/v)的分离效果。结果表明,当水比例增大时,出峰时间提前,果糖与葡萄糖无法达到完全分离,峰宽过窄。当乙腈比例增大时,四种糖可以得到较好的分离,但易造成色谱峰展宽和拖尾,影响分析灵敏度和分离效果。当乙腈与水比例为 75:25 (v/v)分离效果和灵敏度最为理想,其液相色谱图见图 1。

### 3.3. 工作曲线、检出限和定量限

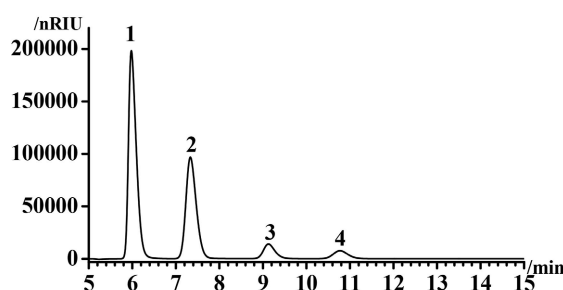
将不同等级的混合标准工作溶液,按质量浓度从低到高的顺序对混合标准工作溶液进行 HPLC-RID 分析,以四种糖的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标建立标准工作曲线。将最低质量浓度的标准溶液

重复进样 10 次, 计算其标准偏差, 以 3 倍标准偏差为检出限, 以 10 倍标准偏差为定量限。4 种糖类物质的检出限及线性范围见表 1。

**Table 1.** Retention time, linear range, standard curve, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of fructose, glucose, sucrose, maltose

**表 1.** 四种糖类物质的保留时间、线性范围、标准曲线、相关系数、检出限与定量限

化合物	保留时间 (min)	线性范围 (mg/mL)	标准曲线	R	检出限 (mg/mL)	定量限 (mg/mL)
果糖	5.97	10.00~30.01	$y = 123774.7x + 7782.1$	0.999	0.05	0.16
葡萄糖	7.33	8.01~24.03	$y = 99111.8x + 679.3$	0.999	0.07	0.24
蔗糖	9.11	0.50~6.00	$y = 132151.9x - 908.2$	0.999	0.02	0.06
麦芽糖	10.76	0.50~6.01	$y = 92970.9x - 633.2$	0.999	0.05	0.17



**Figure 1.** Chromatograph of fructose, glucose, sucrose, maltose

**图 1.** 四种糖标准物质色谱图

### 3.4. 溶液稳定性和方法精密度

取同一份中间浓度标准溶液, 分别在 0、2、4、6、10、24 h 进行测定, 通过计算峰面积的相对标准偏差(RSD), 从而判定溶液的稳定性。如表 2 所示, 四种糖类物质峰面积的 RSD 均小于 1%, 说明在 24 h 内该溶液的稳定性良好。

一日内每隔 2 h 配制低、中、高三个浓度的混合溶液作为供试品溶液, 共处理 5 组。对 15 份供试液进行测定, 计算峰面积的 RSD 作为日内精密度。如表 3 所示, 四种糖类峰面积的 RSD 均小于 4%, 说明该方法的精密度良好。

### 3.5. 加标回收率

取 9 份莲子酶解物样品, 分别添加三个浓度的 4 种混合糖标准溶液加入到 3 份平行样品中, 对每个样品用优化好的色谱条件进行测定, 计算其回收率及相对标准偏差, 结果见表 4。由表 4 可知, 4 种糖他的平均加标率为 97.3%~101.7%, RSD 均小于 5%, 均能满足实验要求, 说明该方法定量结果准确可靠。

### 3.6. 莲子酶解条件的优化

冷浸法和超声法可用来提取莲子中的水溶性糖[26]。为了提高莲子的得糖率, 采用酶解法提取莲子粉末中的糖类物质。本文将果糖、葡萄糖、麦芽糖和蔗糖的总和视为总糖含量。 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、纤维素酶和半纤维素酶的添加量对总糖得率的影响如图 2 所示。随着加酶量的提高, 总糖得率逐渐提高, 这是因为酶量的增加使得更多的淀粉、纤维素、半纤维素转化为糖类物质。而当加酶量达到一定程度时, 得糖率的增加趋势变缓, 结合实际应用成本, 确定  $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、纤维素酶和半纤维素酶的添加量

占莲子酶解液的质量百分比为 1.1%:1.4%:0.9%:0.9%。四种酶中,糖化酶对提升莲子酶解液的总糖得率贡献最高。

**Table 2.** Peak area of fructose, glucose, sucrose, maltose within 24 h and the relative standard deviation

**表 2.** 24 h 内果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的测定结果及其相对标准偏差

化合物名称	峰面积							RSD/%
	0 h	2 h	4 h	6 h	10 h	24 h	ave	
果糖	2,551,172	2,526,750	2,511,744	2,530,310	2,548,877	2,546,401	2,535,876	0.61
葡萄糖	1,623,497	1,607,155	1,611,246	1,621,157	1,626,113	1,606,290	1,615,910	0.54
蔗糖	267,807	265,149	266,039	266,039	268,682	267,360	266,846	0.50
麦芽糖	186,429	187,168	188,098	189,027	188,098	186,238	187,510	0.58

**Table 3.** Data of the intraday precision of fructose, glucose, sucrose, maltose

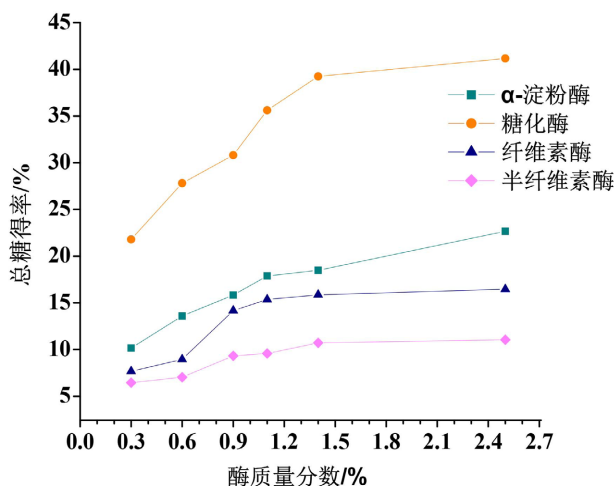
**表 3.** 四种糖类物质的日内精密度

化合物名称	浓度 (mg/mL)	峰面积						RSD/%
		1#	2#	3#	4#	5#	ave	
果糖	5.00	616,754	639,033	627,893	617,991	629,131	626,161	1.46
	15.00	1,880,493	1,829,746	1,886,682	1,835,934	1,832,221	1,853,015	1.52
	30.00	3,636,856	3,905,447	3,823,756	3,846,036	3,591,060	3,760,631	3.67
葡萄糖	5.00	487,318	510,114	503,176	498,221	492,274	498,221	1.80
	15.00	1,473,481	1,484,383	1,409,058	1,496,276	1,517,090	1,476,058	2.76
	30.00	2,990,882	3,134,594	3,109,816	2,853,117	2,926,460	3,002,974	3.98
蔗糖	0.50	65,168	66,489	65,168	63,846	66,489	65,432	1.69
	3.00	395,548	398,191	412,727	398,191	406,120	402,155	1.77
	6.00	792,003	811,826	778,788	782,753	814,469	795,968	2.06
麦芽糖	0.50	48,641	47,712	48,641	49,571	47,712	48,455	1.61
	3.00	278,280	295,014	284,787	289,436	288,506	287,205	2.15
	6.07	563,700	574,857	554,403	541,387	565,560	559,981	2.26

**Table 4.** Data of the recovery of fructose, glucose, sucrose, maltose

**表 4.** 四种糖的加标回收率

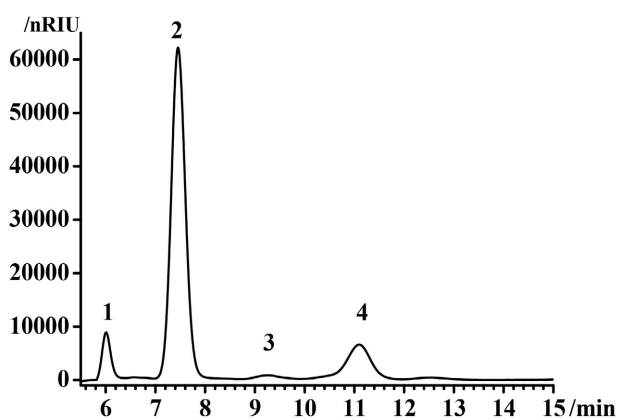
化合物名称	初始值 (mg/mL)	添加值 (mg/mL)	测量值(mg/mL)			平均值 (mg/mL)	RSD (%)	回收率 (%)
			1#	2#	3#			
果糖	2.74	2.00	4.65	4.54	4.98	4.72	4.80	99.1
		2.50	5.38	5.44	4.98	5.27	4.72	101.1
		3.00	5.79	5.58	5.61	5.66	2.02	97.3
葡萄糖	21.58	15.00	36.02	35.09	37.96	36.36	4.02	98.5
		20.00	41.59	39.65	43.02	41.42	4.08	99.2
		25.00	46.63	45.61	47.58	46.61	2.11	100.1
蔗糖	0.26	0.20	0.46	0.48	0.44	0.46	4.55	99.7
		0.25	0.51	0.53	0.50	0.51	3.34	100.8
		0.30	0.56	0.55	0.58	0.56	2.87	101.3



**Figure 2.** Effect of enzyme addition on yield of total sugar  
**图 2.** 酶添加量对总糖得率的影响

### 3.7. 莲子酶解液的测定

采用优化的混合酶比例处理莲子浸提液，得到莲子酶解液。对其 4 种糖的含量进行测定，其色谱结果如图 3 所示。采用本研究建立方法测定莲子酶解液中四种糖的浓度，结果如表 5 所示。莲子酶解液的主要成分为葡萄糖，占总糖含量的 76.5%，果糖、葡萄糖、麦芽糖三种还原糖的含量占总糖含量的 99.08%。该混合酶体系中将莲子大部分淀粉水解为还原糖。按照总糖得率 = 总糖浓度 × 料液体积/莲子粉质量计算，该条件下莲子酶解液的总糖得率为 56.4%。



注：1 为果糖；2 为葡萄糖；3 为蔗糖；4 为麦芽糖。

**Figure 3.** Chromatograph of glucose, fructose, sucrose and maltose in Lotus-Seeds enzymolysis Lotus-Seeds enzymatic solution

**图 3.** 莲子酶解液的色谱图

**Table 5.** Concentrations of four sugars in Lotus-Seed enzymolysis solution

**表 5.** 莲子酶解液中四种糖的浓度

化合物	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
浓度(mg/mL)	2.74	21.58	0.26	3.62

## 4. 结论

本文建立了一种高效液相色谱-示差折光检测器检测莲子酶解液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖四种糖的定性定量分析方法, 乙腈-水(75:25, V:V)为流动相, 以 Prevail Carbohydrate ES 色谱柱进行分离, 四种糖的分离效果良好, 分析时间不超过 15 min。该方法线性范围宽, 灵敏度高, 稳定性好, 准确性与精密度良好, 可用于检测莲子酶解液中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的含量。通过调整混合酶比例, 优化了莲子酶解条件。与化学滴定法、苯酚-硫酸法相和衍生化法相比, HPLC-RID 方法分析时间短, 操作步骤简单, 重复性好, 定量准确, 可获得更多的产物信息, 这对于进一步了解莲子的有效成分, 指导莲子类相关产品的生产开发具有现实意义。

## 基金项目

河北中烟工业有限责任公司科技计划项目(HBZY2022B007)。

## 参考文献

- [1] 方嘉沁, 韩舜羽, 王凤娇, 等. 莲子的营养成分及其在食品工业中的加工研究进展[J]. 农产品加工, 2019(6): 72-75.
- [2] 马忠杰, 王慧琴, 刘丽娟, 等. 莲子的抗衰老实验研究[J]. 中草药, 1995, 26(2): 81-82.
- [3] 许益民. 莲子中磷脂成分的研究[J]. 植物学通报, 1992(4): 46-47.
- [4] 郑宝东, 郑金贵, 曾绍校. 我国主要莲子品种营养成分的分析[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 153-156.
- [5] 郑宝东. 中国莲子(Nymphaeaceae Nelumbo Adans)种质资源主要品质的研究与应用[D]: [博士学位论文]. 福州: 福建农林大学, 2004.
- [6] Luo, H.L., Liu, X.X., Huang, X.Y., et al. (2016) Chemical Deterioration of Lotus Seeds during Storage. *Journal of Food Quality*, 39, 496-503. <https://doi.org/10.1111/jfq.12217>
- [7] 张晓勇, 高向阳, 陈秀霞, 等. 纤维素酶半纤维素酶的应用及分子相关性[J]. 纤维素科学与技术, 2006, 14(1): 47-51.
- [8] 邓义红. 雪莲水溶性多糖的研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中央民族大学, 2007.
- [9] 胡居吾, 吴静, 吴磊, 等. 蔓三七叶多糖的理化性质及免疫调节活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 74-80.
- [10] 陈蕾, 何新苗, 孟磊, 等. 洋甘菊多糖中单糖组分的高效液相色谱及高效毛细管电泳测定比较[J]. 食品与药品, 2019, 21(5): 347-351.
- [11] 芮光伟, 李维, 蒙英. 川芎多糖提取及 GC-MS 法测定其单糖含量及结构分析[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 150-152.
- [12] 韦秀莎, 黄金石, 吴娅妮, 等. 蛭螭多糖的鉴定及其含量测定[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(11): 2152-2157.
- [13] 邓云霞, 瞿伟菁, 曹群华, 等. 金耳胞外多糖的结构分析[J]. 中草药, 2005(4): 497-498.
- [14] 王栩璐, 林宏, 任仕云, 等. 高效液相色谱法测定蜂王浆中 6 种糖的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4474-4479.
- [15] 梁智安, 王成龙, 龙飞. 液相色谱示差折光法测定酒中的总糖和还原糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2188-2194.
- [16] 李瑞瑞, 马雪红, 刘红, 等. 大蒜中低聚糖的 TLC 鉴别和 HPLC-RID 含量测定[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(6): 686-691.
- [17] 冯鑫, 程睿, 王珮玥, 等. 电喷雾检测器、蒸发光散射检测器与示差折光检测器测定食品中 5 种糖成分的方法比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(4): 1513-1518.
- [18] 林慧, 颜春荣, 徐春祥, 等. HPLC-ELSD 法同时测定食品中的 10 种糖和糖醇[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 286-291.
- [19] 师源, 何强, 李莹, 等. 高效液相色谱法测定浓缩果汁中 5 种可溶性糖[J]. 化学分析计量, 2019, 28(1): 91-94.
- [20] 朱韬, 何颂华, 吕轶峰, 等. 柱前衍生化-HPLC-MS/MS 法测定启脾丸中掺假蜂蜜[J]. 食品工业, 2020, 41(11): 328-331.

- [21] 黄岛平, 陈秋虹, 陈建红, 等. 高效液相色谱法测定龙眼肉多糖的单糖组成[J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 234-236.
- [22] 付兴情, 黄绿, 吴增, 等. 柱前衍生化-高效液相色谱法分析缅甸刺梧桐胶多糖的单糖组成[J]. 分析科学学报, 2021, 37(1): 75-80.
- [23] 赵芳. HPLC-RID 法测定蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖及乳糖含量[J]. 食品安全导刊, 2021(33): 92-94.
- [24] 季佳佳, 张永昭, 汪洋, 等. 果糖、葡萄糖分析方法的研究[J]. 广州化工, 2021, 49(11): 76-78.
- [25] 李云康, 潘思轶. 高效液相色谱法测定柑橘汁糖的组成[J]. 食品科学, 2006(4): 190-192.
- [26] 汝新楠, 王红, 郭信芳, 等. 莲子中水溶性糖的提取及含量测定[J]. 时珍国药研究, 1997(4): 40-41.
- [27] 李怡欣, 张盟雨, 王颂, 等. 高效液相色谱法测定油茶饼粕多糖组成[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 126-131, 136.