

文章编号: 1673-1689(2011)04-0576-07

HPLC 示差折光法测定水产品中 还原糖、磷酸化单糖和蔗糖

张进杰, 顾伟钢, 闫永芳, 姚燕佳, 陈健初, 叶兴乾*
(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: 以市售淡水鱼为试材, 建立水产品中还原糖(葡萄糖、核糖)、磷酸化糖(磷酸化核糖和磷酸化葡萄糖)和蔗糖的定性、定量检测方法。对鱼肉中各糖进行检测, 建立鱼肉中糖的高效液相示差折光分析法检测法。将鱼肉分成背部肌肉和腹部肌肉两个部分, 用乙醇/水提取鱼肉中各糖物质, 经树脂吸附处理后, 对鱼肉中各糖物质进行分析。磷酸化糖检测, 首先用碱性磷酸酶脱磷酸化, 然后用同法进行检测。结果显示: 各糖物质分离效果较好, 方法学验证, 各物质线性关系良好, 回收率在 70.2%~98.5% 之间, 重复性 RSD 均小于 5%。

关键词: 水产品; 还原糖; 磷酸化糖; 碱性磷酸酶; HPLC-RI

中图分类号: TS 2

文献标识码: A

Determination of Reducing Sugars, Phosphorylated Sugars and Sucrose in Fish Products by HPLC-RI

ZHANG Jin-jie, GU Wei-gang, YAN Yong-fang, YAO Yan-jia,
CHEN Jian-chu, YE Xing-qian*

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The freshwater fish were selected as materials, and a HPLC-RI method for detecting reducing sugars, phosphorylated reducing sugars and sucrose from fish meat and other foods was established in this study. The chromatographic conditions of reducing sugars were investigated and optimized. A Hypersil NH2 (4.6 250 mm, 2.5 μ m) column was used, the mobile phases were 80% ethanol and 20% purified water at the flow rate of 0.6 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the differential refractive index detector temperature was 40 °C. Ethanol/water (80% v/v) was used to extract mono- and disaccharides from dorsal and belly of fish, and adding resin to remove the amino acids and salts from the extract. The sugars in fish dorsal and belly were determined by the established HPLC-RI method. Phosphorylated sugars were first dephosphorylated by alkaline phosphatase and then determined by the same method. The result showed that the method had a good resolution and good linearity, the recovery rate was between 70.2% and 98.5%, and the RSD of repeatability were all lower than 5%. The

收稿日期: 2010-10-09

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BAD9B05); 浙江省科技计划项目(2008C02015); 浙江省重大科技专项(2010C12012)。

* 通信作者: 叶兴乾(1962-), 男, 浙江宁波人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事农产品加工和食品快速分析研究。

Email: psu@zju.edu.cn

result of detection showed that there were differences in category and content of sugars between different parts of fish.

Key words: fish product, reducing sugars, phosphorylated sugars, sucrose, HPLC-RI

在高蛋白食品(水产品 and 肉制品等)中所含的碳水化合物(尤其是还原糖)能和氨基酸、肽、蛋白质等发生美拉德反应产生多种风味物质^[1]。新鲜猪肉中加入少许核糖,烹饪后猪肉特有的烤肉味明显加强^[2]。也有报道在肉制品制作过程中添加 5'-磷酸核糖, 6'-磷酸葡萄糖或葡萄糖能促进肉制品特有的风味^[3]。因此对高蛋白食品中糖的研究具有重大意义。在一些肉制品和植物发酵液中某些游离糖和二聚糖的含量已有报道^[4-6]。但对鱼制品中的还原糖,磷酸化糖和蔗糖含量的研究还少有详细报道。

用气相色谱法可以检测牛肉的水相提取物中游离糖(葡萄糖,果糖和核糖)和磷酸化糖(6'-磷酸葡萄糖,6'-磷酸果糖,1,6'-2 磷酸果糖)含量,但需通过复杂的衍生化前处理操作步骤^[5]。也有报道利用离子交换色谱柱,电流脉冲检测器,耐碱 HPLC 系统可同时检测还原糖及它们的磷酸化物质^[7],此法具有高效率和高灵敏度,但仪器成本太高,一般实验室不具备如此高端的条件。

作者以 HPLC 示差折光法同时测定淡水鱼肉中核糖、葡萄糖、果糖和蔗糖,检测磷酸化糖含量时采用碱性磷酸酶对磷酸化糖进行脱磷酸化处理后进行检测,然后采用差量法算得磷酸化糖含量。此法同样适用于其他食品,如腊鱼、鱼丸、土豆还有莲藕中糖物质含量的检测。

1 材料与方 法

1.1 材料

10 种淡水鱼(青鱼、草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳊鱼、团头鲂、鲶鱼、乌鳢)于 2010 年 3~5 月间分批购自杭州市农贸市场,选体态均一的成年活鱼。分别取鱼背部肌肉和腹部肌肉,去皮和可见脂肪和红肉后备用;腊鱼(LY1),腊鱼(LY2),鱼丸 1,鱼丸 2:购自杭州物美超市;添加蔗糖腌制腊鱼(LT)和未加糖腌制腊鱼(LN):作者所在实验室自制于 2010 年 2 月份,-80℃条件贮存。

主要试剂:氯仿:分析纯,上海生工产品;HPLC 级乙醇和乙腈:美国 Tedia 公司产品;纯水,HPLC 级:娃哈哈公司产品;所有还原糖和磷酸化糖(5'-磷酸 D 核糖二钠,6'-磷酸 D 葡萄糖二钠水

合物, α -D 乳糖 1 水化合物,D-核糖,D-果糖,D-葡萄糖,1,6'-2 磷酸 D 果糖钠盐,6'-磷酸 D 果糖二钠,蔗糖:均购自 Sigma 公司产品;碱性磷酸化酶(EC 3.1.3.1,取自小牛的肠粘膜):购自 Sigma 公司;树脂 Dowex 50WX4(强酸性阳离子交换树脂,20-400 目)和 Anino WGR-2(弱阴离子交换树脂,20-40 目);注射器滤膜(0504-017K,直径 13 mm,孔径 0.2 μ m):购自上海摩速科学器材有限公司。

1.2 鱼肉中糖的提取

鱼肉中提取糖的试验过程参考 Jones 和 Aliani^[8,9]的方法,稍加修改。取 100 g 左右鱼肉(背脊肌肉或腹部肌肉)用绞肉机搅碎。取碎鱼肉(3 g)置于 50 mL 离心管中。加入 0.5 mL 40 mmol/L 的 α -D 乳糖作为内标。添加 10 mL 无水乙醇均质 3 min。然后 800 g 离心 5 min。再用体积分数 80% 乙醇重复提取 3 次。约 40 mL 的上清液,再添加 150 mL 氯仿混匀脱脂,静置 40 min 后分液。取 1.5 mL 提取液进行酶解,用于分析磷酸化糖。

取 6 mL 提取液和 3 g 树脂混合物(Dowex 50WX4 和 Anion WGR-2 质量比 1:1)除去干扰物,比如盐和氨基酸。混合浊液在 800 g 离心 30 min 除去树脂,上清液用于 HPLC 分析(4℃条件下可储存 24 h)。

1.3 酶解处理

碱性磷酸酶(0.55 units mL⁻¹),在甘氨酸缓冲液(50 mmol/L,含 0.5 mmol/L 的 MgCl₂,用 0.1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 9.3)中配制。3.5 mL 酶液和 1.5 mL 鱼肉提取物混合,39℃水浴 90 min。自然冷却后,用 Acrodisc 13LC 滤膜过滤除酶,然后同上步还原糖提取处理加入 3 g 树脂混合物,进行还原糖提取。磷酸葡萄糖和磷酸核糖含量通过酶处理和非酶处理之差计算得。

1.4 色谱条件确立

1.4.1 色谱条件 HPLC 分离条件参考田燕铃^[10]的方法,Waters e2695 系列高效液相色谱仪,Empower 2 工作站,Waters 2414 示差折光监测器,Hypersil NH2 柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m);以乙腈和水的混合液为流动相,通过调节乙腈/水(V/V)的比例,柱温,检测池温度和流速来达到各峰分离的目的。

1.4.2 定性 将4种糖分别配成 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 80:20$ 溶液,并在已确定的色谱条件下测定,确定标准物质的保留时间,再将各糖分别混合,用保留时间结合峰增高法定性。

1.5 验证

1.5.1 线性关系的考察 称取1 mg 核糖、葡萄糖、果糖、蔗糖,定容于10 mL 容量瓶中。假定每个标样的质量浓度为100 mg/L,稀释成不同质量浓度梯度。在已确定的色谱条件下,进样10 μL ,进行HPLC分析。在测定过程中根据需要调整浓度。根据液相色谱中的峰面积与标准样品中标准物质的绝对进样量进行线性回归,确定回归方程、相关系数和线性范围。

1.5.2 回收率、重复性和最低检测限的考察 将一定量的各糖标准品加到3 g 碎肉样品中,按照1.2节方法进行前处理,在已确定的色谱条件下进行HPLC测定,同时检测未加糖标样的同种鱼肉样品。计算各组分的加标回收率。重复性为此回收率检测试验的6个平行处理。

加标回收率(%) = (实测质量(mg) - 样品中质量(mg)) / 添加质量(mg) \times 100%

取最低质量浓度的标准品混合液,用流动相进行倍比稀释(2、3、4、6、8、12、16和24倍)。取10 L

进样。以信噪比 $S/N = 3$ 为标准,测试该色谱条件下的最低检测量。

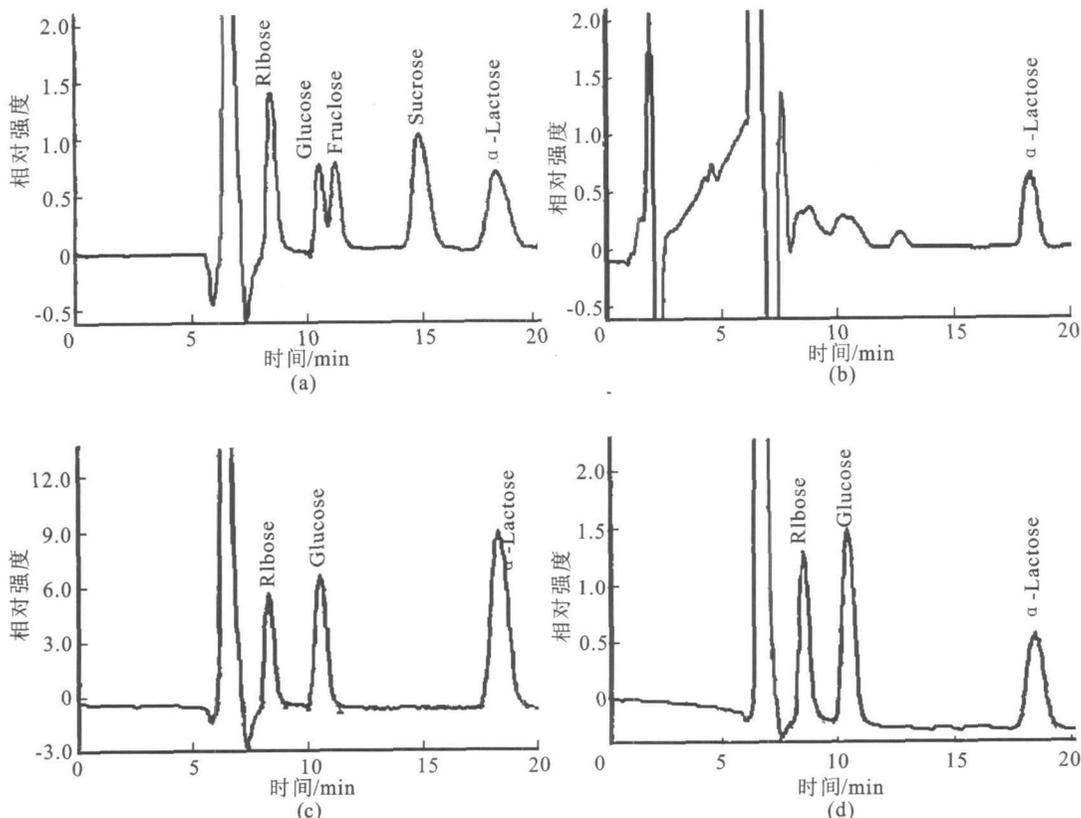
1.6 数据统计

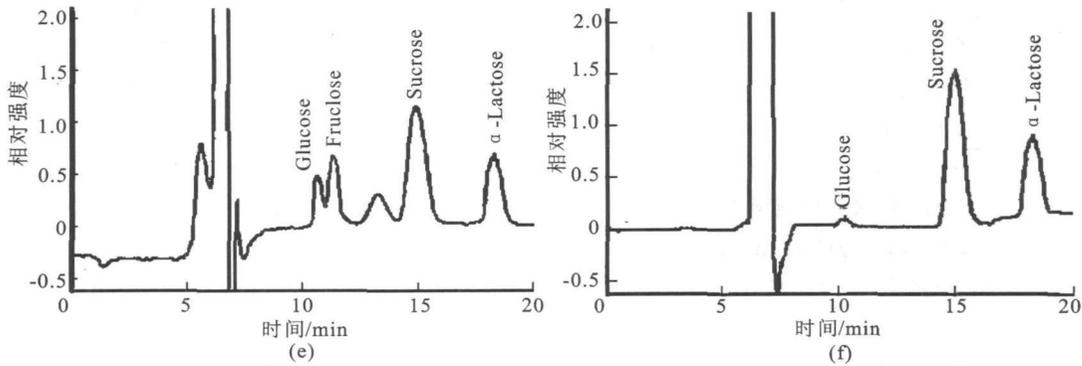
采用 Excel 2003 软件进行数据分析。各样品测定结果以均值 \pm 标准差(means \pm SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件

在前人研究^[9,10]的基础上采用氨基柱为固定相,选择乙腈与水的混合液作为流动相,通过优化分离条件,达到较优的 HPLC-RI 分离各糖的条件。作者曾考察不同乙腈-水体积比(75:25、78:22、80:20和82:18),不同流量(0.5、0.6、0.7和0.8 mL/min)不同柱温(20、25、30和35 $^{\circ}\text{C}$)和不同检测池温度(30、35、40和45 $^{\circ}\text{C}$ 等)对分离结果的影响。结果表明乙腈-水(两者体积比80:20),流量0.6 mL/min,柱温为25 $^{\circ}\text{C}$,检测池温度35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,核糖、蔗糖和 α -乳糖分离度好,峰形锐、出峰时间适宜;葡萄糖和果糖具有相似的分子结构,保留时间较接近,经实验验证不影响其定性和定量计算。5种单糖的色谱图见图1(a)。





(a) 核糖、葡萄糖、果糖、蔗糖和 α-乳糖标准品色谱图; (b) 未经树脂处理的鲫鱼背部肌肉色谱图; (c) 未经酶解鲫鱼腹部肌肉色谱图; (d) 经酶解后的鲫鱼背部肌肉色谱图; (e) 腌制腊鱼色谱图; (f) 莲藕。(e, f 未经酶解处理)

图 1 典型样品各糖含量色谱图

Fig. 1 Typical examples of HPLC chromatograms, obtained as described and plotted to different scales

2.2 定性分析

通过峰增高法并参照保留时间进行定性分析, 确定保留时间为 8.418、10.275、10.979、14.800、18.150 min 的物质分别为: 核糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、α-乳糖。

2.3 方法学验证结果

以峰面积为横坐标, 标准物质的绝对进样量为纵坐标进行回归, 计算得各单糖标准曲线、线性范围、相关系数(见表 1)。由表 1 的数据表明, 各物质峰面积与绝对进样量之间呈良好的线性关系。

表 1 标准曲线的回归方程、相关系数和线性范围

Tab. 1 Regression equations correlation coefficients and their linearity range

糖	回归方程	相关系数 (R ²)	质量浓度线性范围/(mg/L)
核糖	y = 39410x + 2310.7	0.9999	0.1 ~ 100
葡萄糖	y = 39566x - 2009.2	0.9832	0.1 ~ 100
果糖	y = 37629x + 8009.2	0.9873	0.1 ~ 100
蔗糖	y = 38114x - 14742	0.9998	0.1 ~ 100
α-乳糖	y = 26046x - 6014.1	0.9999	0.1 ~ 100

核糖, 葡萄糖, 蔗糖, 果糖, 磷酸化核糖和磷酸

表 2 鱼肉提取物中各种单糖的回收率和最低检测限

Tab. 2 Recovery from fish and detection limit in aqueous solution

糖	回收率/%						平均值	SD	检测限 ^b
	(1) ^a	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)			
核糖	95.7	96.5	96.2	96.7	96.5	95.5	96.2	0.48	85 ng
葡萄糖	97.2	97.7	97.5	94.6	98.5	97.6	97.2	1.34	125 ng
果糖	98.5	98.6	99.1	97.3	98.5	98.2	98.4	0.60	125 ng
蔗糖	99.4	98.8	98.5	99.1	96.5	98.4	98.5	1.03	150 ng
磷酸化核糖	92.3	90.6	89.3	95.6	91.2	90.1	91.5	2.25	
磷酸化葡萄糖	70.2	68.2	71.5	68.7	75.3	72.4	71.1	2.63	

a 单个样品的检测值。b 最低检测限, 以 10μL 进样量计。

化葡萄糖的平均回收率分别为 96.2、97.2、98.4、98.5、91.2 和 70.7%。表 2 为 6 个平行重复检测结果, 以标准偏差来衡量重复性。变异系数范围在 0.6%~3.8% 之间。均优于 Aliani 等^[9] 所得试验结果, 此差别可能是其采用柱后衍生和 UV 紫外检测器与本实验检测系统不同有关。Wight 和 van Niekerk^[11] 以蜂蜜为研究对象, 采用热水提取法提取蜂蜜中的单糖, 柱后衍生法检测果糖和葡萄糖, 得到的回收率分别为 99.1% 和 98.1%, 与作者实验结果接近。

在本 HPLC 方法中核糖、葡萄糖、果糖和蔗糖的最低检测限分别为 85、125、125 和 150 ng, 转化成浓度分别为 8.5 μg/mL、12.5 μg/mL 和 15 μg/mL, 比 Aliani 等^[9] 的报道, 核糖、葡萄糖和果糖的最低检测限 0.62、0.72 和 0.71 mg/mL 要低。却比 Wight 和 van Niekerk^[11] 报道的葡萄糖、果糖和乳糖的检测限 11、6、55 ng 要高出许多。这主要是本试验采用的是示差折光检测器。RID 相对于 UV、FD 和 ELSD 的灵敏度偏低。但此检测限足以满足本试验的需求, 而且本操作简便、效率高、检测系统价格适中。

2.4 提取方法优化

乙醇/水混合物作萃取剂能起到沉淀蛋白,同时使鱼肉组织中的酶钝化,所以通常用来提取单糖和二糖。通过预试验得出 $V(\text{乙醇}):V(\text{水})=80:20$ 是提取单糖的最佳比例。单糖也可以用水提^[11],但水提法会导致提取液中含有原料鱼肉中的酶类,导致后步碱性磷酸酶脱磷酸化反应受到干扰,故本试验采用 $V(\text{乙醇}):V(\text{水})=80:20$ 提取样品中的糖。

由图 1(b) 可知鱼肉的乙醇/水混合物提取液中的物质非常复杂。为避免氨基酸、核苷酸等物质干扰,在本实验中乙醇/水混合提取液用阳离子树脂和阴离子树脂进行吸附纯化,除去磷酸化糖、氨基酸和盐类等杂质,然后再进行糖含量检测。

在检测磷酸化糖含量时,首先对乙醇/水的提取液进行碱性磷酸酶酶解,再采用树脂进行除杂。

2.5 碱性磷酸酶水解反应

碱性磷酸酶对磷酸化糖的酶解没有特异性,能够水解磷酸化糖成其相应的前体还原糖。所以在鱼肉的糖提取液中添加碱性磷酸酶对磷酸化葡萄糖和磷酸化核糖进行脱磷酸化处理,生成相应的还原糖(葡萄糖和核糖),通过检测,计算出酶解前后相应还原糖含量之差,得出鱼肉中磷酸化葡萄糖和磷酸化核糖的含量。

在 pH 值分别为 8.3、9.3 和 10.3 的条件下检测碱性磷酸酶的活性,得出在 pH 值为 9.3 的条件下碱性磷酸酶水解 5'-磷酸核糖和 6'-磷酸葡萄糖的活性最强。在 5'-磷酸核糖和 6'-磷酸葡萄糖得混合溶液中将 1.3 mg/mL 的 5'-磷酸核糖完全水解的酶液最低浓度是 2.7 u/mL,将 1.2 mg/mL 的 6'-磷酸葡萄糖完全水解的最低酶液浓度为 9.6 u/mL。39 °C 条件下 5'-磷酸核糖完全转化的水浴加热时间为 60 min,而 6'-磷酸葡萄糖完全转化需要 90 min。在本实验过程中为确保 5'-磷酸核糖和 6'-磷酸葡萄糖能完全酶解,酶解条件确定为:碱性磷酸酶浓度选择 9.625 u/mL,39 °C 水浴加热 90 min。

还发现在磷酸化核糖与磷酸化葡萄糖糖标准品的混合液中,经酶解,5'-磷酸核糖可以 100% 的转化成核糖,6'-磷酸葡萄糖转化成葡萄糖的转化率在 80%~85% 之间。6'-磷酸葡萄糖的较低转化率,在某种程度上解释了表 2 中 6'-磷酸葡萄糖的低回收率。延长水浴时间和增加酶量不能提高 6'-磷酸葡萄糖转化为葡萄糖的转化率,也不能提高

6'-磷酸葡萄糖的回收率。有报道^[8],在水溶液的环境中碱性磷酸酶水解 6'-磷酸果糖的转化率为 97%,1,6'-2 磷酸果糖的转化率为 68%,当为这两种糖的混合溶液时,它们的总转化率只有 70%;证实碱性磷酸酶不仅能够将 6'-磷酸葡萄糖部分转化为葡萄糖,而且能将 6'-磷酸葡萄糖转化成果糖(5%左右的转化率)。在本实验条件下(pH 9.3, 39 °C),在葡萄糖溶液中添加碱性磷酸酶,经检测葡萄糖有 100% 的回收率,没有出现果糖杂峰,所以 6'-磷酸葡萄糖转化为果糖,可能是所用的磷酸化酶不纯的缘故造成。如图 1(c, d) 所示,本试验所用的磷酸化酶没有将磷酸化葡萄糖转化为果糖的现象发生。

选择了一种与被分析的还原糖无干扰且在鱼肉中不存在的还原糖作为内标。首先棉籽糖被选择内标,但是棉籽糖在碱性磷酸酶存在的条件下容易发生部分分解反应;鱼肉中不含 α -D-乳糖,且 α -D-乳糖不被碱性磷酸化酶分解,所以将 α -D-乳糖选作内标。

2.6 鲜鱼肉中还原糖和磷酸化糖含量的检测

糖溶液的典型色谱图如图 1(a) 所示。核糖、葡萄糖、果糖和蔗糖相对于乳糖保留时间短,先被检测到。图 1(b) 是鱼肉中糖提取液未经树脂吸附处理,直接检测的色谱图,由图得出,鱼肉的直接乙醇/水提取液中干扰物质非常多。图 1(c) 是鱼肉中糖未经磷酸化酶酶解的色谱图,图 1(d) 是相同鱼肉经酶解后的色谱图。图 1(c) 和图 1(d) 的色谱峰高度之间的差异是酶解处理的提取过程导致提取液浓度差异所致。

由图 1(c) 和图 1(d) 可以看出新鲜鱼肉中不含蔗糖。图 2 是 10 种市售新鲜鱼样的背部肌肉和腹部肌肉的还原糖(核糖和葡萄糖)和磷酸化糖(磷酸核糖和磷酸葡萄糖)的 6 次质量分数检测结果的平均值和标准偏差。由图可知不同鱼种间各糖质量分数均不相同,同种鱼部位不同各糖质量分数也均不相同。鲫鱼和鳊鱼腹部肌肉中糖总质量分数最高,分别为 260.2 mg/hg 和 262.1 mg/hg。鲢鱼和鳙鱼背部肌肉中总糖质量分数最低,分别为 48.7 mg/hg 和 49.1 mg/hg。青鱼、草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼、鳊鱼和团头鲂鱼背部肌肉糖含量均比腹肌肉低,而鲢鱼和乌鳢的背部肌肉糖含量却高于腹肌肉。鱼肉组织中各糖含量少有报道, Jones^[8] 用 HPLC 方法从鱼组织中分离出磷酸化核糖和磷酸化葡萄糖,但没有对核糖和葡萄糖进行分析,也未对磷酸化核糖和磷酸化葡萄糖含量作具体报道。

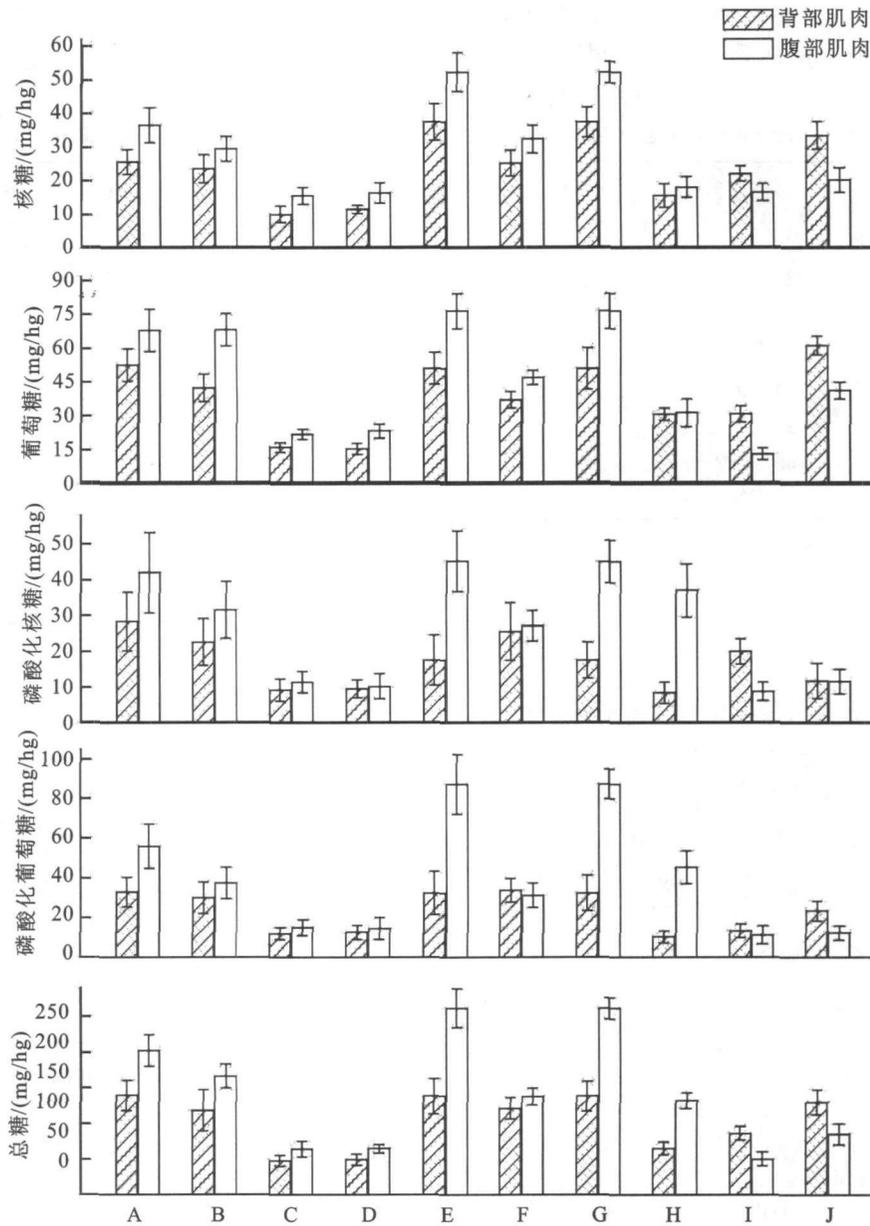


图2 10种淡水鱼(A:草鱼;B:青鱼;C:鲢鱼;D:鳊鱼;E:鲫鱼;F:鲤鱼;G:鳊鱼;H:团头鲂;I:鲶鱼;J:乌鳢)背部肌肉和腹部肌肉中还原糖和磷酸化糖的质量分数(均以100g样品湿基计算)($n=6$)

Fig.2 Concentrations (mg 100g⁻¹ wet weight) of reducing and phosphorylated sugars in dorsal and belly of 10 kinds of fish (A: *Ctenopharyngodon idellus*; B: *piceus*; C: *Hypophthalmichthys molitrix*; D: *Aristichthys mobilis*; E: *Carassius auratus*; F: *Cyprinus carpio*; G: Chinese perch; H: *Megalobrama amblycephala*; I: Oriental sheat-fish; J: *Ophicephalus argus*) ($n=6$)

2.7 其他食品中糖物质含量检测

用本方法检测腊鱼和鱼丸等鱼肉制品中糖含量。如图1(e)和表3所示。腌制腊鱼和市售鱼丸中均检测出核糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、磷酸化核糖和磷酸化葡萄糖6种糖。自制加糖(蔗糖)腌制的腊鱼中蔗糖质量分数为620.0 mg/hg,未添加蔗糖腌制的腊鱼中未检测出蔗糖,说明市售腊鱼在腌制过程中均添加了蔗糖。在不含蔗糖的腊鱼样品中未检测出核糖,而含蔗糖量高的自制加糖腊鱼(LT)

样品中核糖含量最高(65 mg/hg)。鲜鱼中未检测到果糖,被检测鱼丸中不含果糖或低含量果糖(2.5 mg/hg),而腌制腊鱼中含有果糖,且含量非常高(17.6507 mg/hg),这可能与腊鱼长期受微生物的作用和鱼肉中本身的内源酶类作用有关,具体原因还有待研究。

本方法同样应用于植物性食品中糖含量的检测,如图1(f),莲藕中含葡萄糖和蔗糖,其中蔗糖含量高达1353.7 mg/hg。如表3所示土豆中含葡萄糖

(920.2 mg/hg)、果糖(373.2 mg/hg)含量比 Aliani 含有蔗糖,但本实验检测到土豆中含蔗糖(27.2 g/hg)等^[9]报道的 0.5-1.5 g/hg 稍低,但是他未报道土豆中 hg),这可能和检测方法和土豆品种不同有关。

表3 食品中糖质量分数的检测结果

Tab.3 Concentrations (mg/100g wet weight) of sugars and phosphorylated sugars in some foods

材料	核糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	磷酸化核糖	磷酸化葡萄糖	总糖
LY1	1.8±0.02	29.2±0.23	36.5±0.62	182.8±3.7	16.3±0.22	32.3±0.42	297.1±4.1
LY2	2.5±0.03	22.3±0.12	17.6±0.02	317.2±8.2	21.2±0.28	47.1±0.52	428.6±6.8
LT	6.5±0.01	15.7±0.30	50.7±0.05	620.0±2.5	35.7±0.52	50.9±0.31	784.5±5.3
LN	ND	15.1±0.75	22.3±0.52	ND	19.6±0.12	31.4±0.26	89.6±0.91
鱼丸1	9.3±0.04	23.7±0.17	2.5±0.02	371.3±4.2	31.7±0.32	37.7±0.12	482.2±2.7
鱼丸2	16.7±0.12	28.2±0.32	ND	815.1±7.3	26.6±0.17	32.2±0.50	918.8±8.2
藕	ND	65.7±2.02	ND	1353.7±6.9	ND	ND	1419.4±9.7
土豆	ND	920.2±5.3	373.2±7.2	27.2±0.52	ND	ND	1293.4±8.5

注:ND:未检出,(n=6)

3 结 语

采用 HPLC-IR 技术建立核糖、葡萄糖、果糖、蔗糖的线性回归方程,相关系数均为 0.999,质量浓度线性范围 20~200 mg/L,核糖、葡萄糖、果糖、蔗糖的最低检测限分别为 85, 125, 125 和 150 ng。用氨基柱测定鱼肉中各糖含量的前提需用离子交换

树脂对其进行脱氨基酸和盐等纯化处理。磷酸化单糖检测,首先用碱性磷酸酶脱磷酸化,检测酶解前后样品中各还原糖含量之差得出各磷酸化单糖质量分数。用碱性磷酸化酶酶解鱼肉中的磷酸化单糖的最优条件是:碱性磷酸酶浓度选择 9.625 u/mL,39℃下水浴 90 min。此方法可应用于新鲜淡水鱼肉及鱼肉制品等食品中糖物质的定性、定量分析,样品无需衍生化,方法灵敏度高、重现性好。

参考文献(References):

- [1] Cerny C. The aroma side of the Maillard reaction[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1126: 66-71.
- [2] Meinert L, Schäfer A, Bjerregaard C, et al. Comparison of glucose, glucose 6-phosphate, ribose, and mannose as flavour precursors in pork; the effect of monosaccharide addition on flavour generation[J]. *Meat Science*, 2009, 81(3): 419-425.
- [3] Kayim M, Cimen M, Can E, et al. Biochemical taste parameters in meat and sea products[J]. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011, 6(3): 233-237.
- [4] 张梁,陈蕴,石贵阳,等. HPLC 法测定玉米浓醪发酵酒精液中的纤维二糖和蜜二糖[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(2): 89-92.
ZHANG Liang, CHEN Yun, SHI Guiyang, et al. Determination of cellobiose and melibiose in the distillate of high-gravity ethanol broth from corn by HPLC[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(2): 89-92. (in Chinese)
- [5] Jarboe J K, Mabrouk A F. Free amino acids, sugars, and organic acids in aqueous beef extract[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1974, 22(5): 787-791.
- [6] Madruga M S, Elmore J S, Oruna-Concha M J, et al. Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(2): 513-520.
- [7] Hu Q, Zhou T S, Hu G, et al. Determination of sugars in Chinese traditional drugs by CE with amperometric detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 30: 1047-1053.
- [8] Jones N R, Burt J R. The separation and determination of sugar phosphates, with particular reference to extracts of fish tissue[J]. *The Analyst*, 1960, 85: 810-814.
- [9] Aliani M, Farmer L J. Post column derivatization method for determination of reducing and phosphorylated sugars in chicken by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 2760-2766.
- [10] 田艳铃,王浩,刘艳琴,等. HPLC 示差折光分析法测定饮料中果糖、葡萄糖、蔗糖含量[J]. *中国食品添加剂*, 2006, 6: 187-189.
TIAN Yanling, WANG Hao, LIU Yanqin, et al. Determination of fructose, glucose, sucrose components in beverage by HPLC with refractive index detector[J]. *China Food Additive*, 2006, 6: 187-189. (in Chinese)
- [11] Wight A W, van Niekerk P J. A sensitive and selective method for the determination of reducing sugars and sucrose in food and plant material by high performance liquid chromatography[J]. *Food Chemistry*, 1983, 10(3): 211-224.