

文章编号:1673-1689(2009)04-0513-04

## 高效液相色谱法测定龙眼果中水溶性单糖和寡糖

林婧烨, 柯李晶, 鲁伟, 周建武\*, 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:** 用高效液相色谱-蒸发光散射测定龙眼果中水溶性单糖和寡糖组分的种类和含量, 考察这些糖组分在龙眼晒干前后的变化。采用 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱为固定相, V(乙腈): V(水)=80:20 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 蒸发光散射法检测。绘制 7 种标准糖的线性回归方程并计算其检测限, 进而分别分离测定新鲜龙眼果和龙眼干中水溶性糖的种类和含量。研究发现: 龙眼鲜果和干果中的单糖和寡糖主要为果糖、葡萄糖、蔗糖。3 种糖在 25~1 000 μg/mL 范围内与其色谱峰面积之间有良好的线性关系, 标准品回收率在 97%~106% 之间, 相对标准偏差(RSD) 小于 0.40%。3 种糖中以蔗糖的质量分数为最高, 达 517.28 mg/g。3 种糖的总质量分数在鲜果中为 830.36 mg/g, 而在干果中下降了 14.8%, 其中又以蔗糖的下降最为显著, 达 20.6%, 质量分数降低的原因可能是晒干过程发生了美拉德反应和寡糖的水解。

**关键词:** 高效液相色谱; 蒸发光散射; 龙眼; 糖; 美拉德反应

中图分类号: O 657.72

文献标识码: A

### Determination of Monosaccharides and Oligosaccharides in Dimocarpus Longan Lour by HPLC-ELSD

LIN Jing-ye, KE Li-jing, LU Wei, ZHOU Jian-wu\*, RAO Ping-fan

(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fujian 350002, China)

**Abstract:** The object of this manuscript was to develop a easy and efficient detect method for the monosaccharides and oligosaccharides composition in Dimocarpus longan lour by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with Evaporative Light Scattering Detector (ELSD). The HPLC column is Hypersil NH<sub>2</sub>, the mobile phase is acetonitrile:water = 80:20 at a flow rate of 1.0 mL/min. Regression equation, correlation coefficient and detection limits of saccharides were measured and calculated, before the category and content of saccharides in longan were determined. It was found that fructose, gulcose, sucrose were the major saccharides of longan. The recovery rates were 97% to 106% and the relative standard deviations were less than 0.40%. Sucrose contributed the highest sugar content, which was 517.28 mg/g. The total content of these 3 kinds of saccharides was 830.36 mg/g, which was dropped by 14.8% in sun-dried pulps of longan. The content of sucrose decreased most significantly, by 20.6%. Maillard reaction is assumed to be responsible for these decreases.

**Key words:** HPLC, evaporative light scattering, dimocarpus longan lour, saccharides, Maillard reaction CLC

收稿日期: 2008-12-05

基金项目: 福建省科技厅基金项目(2008Y0088, 2008Y0053); 福州大学科研基金项目(2008-XQ-26)。

\* 通讯作者: 周建武(1977-), 男, 福建福州人, 理学博士, 副研究员, 主要从事蛋白质化学研究。

Email: jianwuzhou@gmail.com

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour) 俗名桂圆, 是无患子科龙眼属植物。龙眼是国家卫生部公布的药用和食用两用的植物, 是我国南方重要的经济作物之一, 也是历史悠久的滋补佳品<sup>[1]</sup>。龙眼中含有丰富的糖类, 它们是龙眼中的主要化合物之一。龙眼中的水溶性糖, 特别是还原糖参与着龙眼干制过程中褐变反应及美拉德产物的生成, 使桂圆肉具有一些新鲜龙眼不具有的药用功能。建立龙眼果中水溶性糖的分离和测定方法对研究龙眼加工过程中发生的美拉德反应具有重要意义。高效液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 是一种高效、快速的糖分析方法, ELSD 具有稳定性好, 灵敏度高等优点<sup>[2-3]</sup>。采用 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱、乙腈-水作流动相、蒸发光散射检测器, 能够有效的分离检测 7 种糖标准样品的混合物, 分离并检测出龙眼中多种水溶性单糖和二糖, 方法准确、简便、快速, 具有较强的实用性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

DGU-20A5 高效液相色谱仪: 日本 SHIMADZU 公司产品; SEDEX 75 蒸发光散射检测器: 法国 SEDERE 公司产品; J-25 I 型 高速离心机: 美国 Beckman 公司产品; Alpha-4LSC 冻干机: 德国 CHRIST 公司产品; 电子天平; 磁力搅拌器。

配制质量浓度分别为 1 g/L 的鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖 (分析纯) 的储备液, 使用前用流动相将它们稀释成 25~1 000 mg/L 的溶液, 乙腈为色谱纯 (MERCK 公司产品), 水为 MilliQ 50 处理器 (Millipore 公司产品) 制备的超纯水。

### 1.2 色谱条件

分析柱为大连依利特 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 V(乙腈):

V(水)=80:20, 流量为 1.0 mL/min, 柱温为室温, 进样量 20 μL; ELSD 的漂移管温度 70 °C, 氮气作载气, 体积流量 2.00 L/min。

### 1.3 样品处理

称取新鲜龙眼果 (大小均一) 及自制带壳龙眼干各 10 颗, 加 200 mL 水 4 °C 提取过夜, 离心、滤液冻干成粉末。精确称取新鲜及干龙眼肉的冻干粉各 20 mg 完全溶解于 10 mL 体积分数为 80% 的乙醇溶液, 4 °C 抽提 6 h 后静置, 离心, 除醇后稀释定容至 10 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

常用的糖分析柱主要是依据空间排阻、离子交换、配位交换、分配吸附等不同的模式组合有效的进行糖类分析。文献报道的分析方法大多使用碳水化合物专用分析柱和氨基分析柱<sup>[4-5]</sup>。作者选择 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱作固定相 (柱温为室温), 以乙腈/水为流动相对龙眼果中的多种糖进行分离。虽然提高流动相中水的比例可以加快分离过程, 但不利于流动相在漂移管内的汽化, 使基线噪声增大, 从而导致分析灵敏度的降低。在兼顾分离速度和分离效果的基础上, 确定了乙腈和水的体积比例为 80:20, 流量为 1 mL/min。采用 ELSD 对被分离成分进行检测, 设定漂移管温度为 70 °C, 氮气流量为 2 mL/min。图 1 为此条件下 7 种标样的 HPLC 色谱图, 图 2、3 为龙眼干和新鲜龙眼样品的 HPLC 色谱图。图 1~3 中 1 为鼠李糖; 2 为木糖; 3 为阿拉伯糖; 4 为果糖; 5 为葡萄糖; 6 为蔗糖; 7 为麦芽糖。

### 2.2 样品提取剂的选择

水和乙醇均是良好的糖类物质提取剂, 曾满枝等曾对乙醇浸泡提取方法进行改进<sup>[6-7]</sup>, 作者采用体积分数为 80% 乙醇作提取剂, 能使样品得到很好

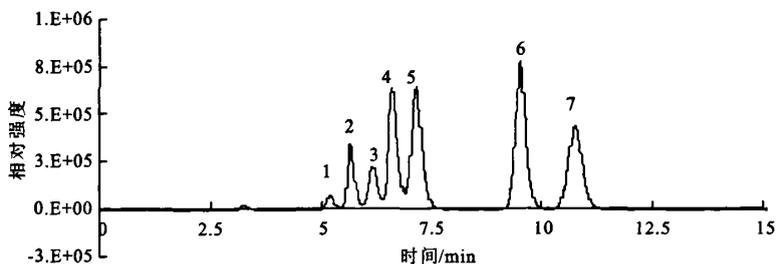


图 1 标样 HPLC 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standards

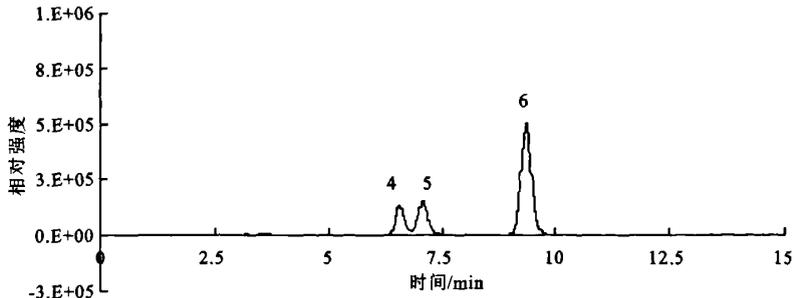


图 2 龙眼干样品 HPLC 色谱图

Fig. 2 Chromatograms of dried longan extraction samples

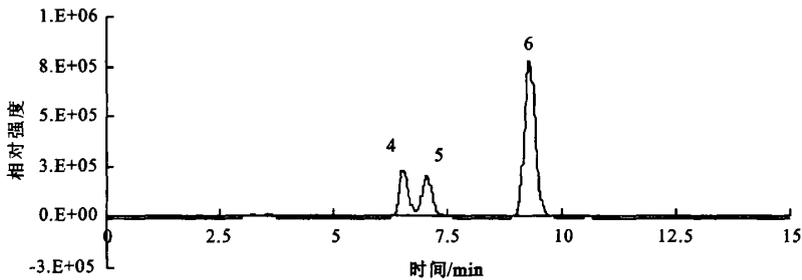


图 3 龙眼新鲜样品 HPLC 色谱图

Fig. 3 Chromatograms of fresh longan extraction samples

的溶解并且有效的沉淀龙眼中少量的蛋白质。如果乙醇体积分数过高,龙眼冻干粉容易结块,不利于提取,而乙醇体积分数过低,会把龙眼中的多糖提取出来且不利于蛋白质的沉淀,因此作者用体积分数为 80% 的乙醇提取龙眼及圆肉冻干粉。

2.3 线性回归方程及检测限

将质量浓度为 25、50、100、200、500、1 000 mg/L 的标准糖溶液,按 1.2 的测定条件下进样 20  $\mu$ L,对应糖的绝对量为 0.5、1、2、4、10、20  $\mu$ g。根据 ELSD 测得的峰面积 A,对应糖的绝对进样量 y 进行线性回归,绘制曲线方程。将最低质量浓度的标样稀释,根据信噪比 S/N=3,测得每个组分最低检测质量浓度<sup>[8]</sup>,结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 1.3 项下得到的样品溶液进样 20  $\mu$ L 进行 HPLC 分析,以色谱保留时间确定糖的种类,并按以上曲线方程(见表 1)计算每种糖的质量分数,结果见表 2。龙眼鲜果和干果中的单糖和寡糖主要为 3 种,分别是果糖、葡萄糖、蔗糖。3 种糖的含量以蔗糖为最高,在鲜果中可达 517.28 mg/g。3 种糖的总量在鲜果中为 830.36 mg/g,而在干果中为 707.16 mg/g,下降了 14.8%,其中又以蔗糖的下降

最为显著,达 20.6%。果糖和葡萄糖的含量变化相对有限,分别为 4.4% 和 6.1%。龙眼晒干过程中氨基酸含量有明显下降,其中以游离氨基酸更为显著(数据另文发表),而且龙眼果的褐变明显,由此可见晒干过程中还原糖和氨基酸发生了美拉德反应,即非酶促褐变反应。果糖和葡萄糖都能发生美拉德反应,但蔗糖不能。但龙眼干中的蔗糖含量下降却比葡萄糖和果糖,分析其原因,可能是蔗糖在晒干过程中发生了酶促或非酶促的大量水解,生成了葡萄糖和果糖,补充了这两种糖因发生美拉德反应造成的损失,从而在维持葡萄糖和果糖较高含量的同时保证了美拉德反应的需求。

表 1 龙眼中单糖和寡糖的标准曲线方程及检出限

Tab. 1 Regression equation, correlation coefficient and detection limits of sugars in longan

糖	线性方程	相关系数 r	线性范围/ $\mu$ g	检测限/ $\mu$ g
果糖	$M=9E-07A+0.370$	0.998 1	0.5~20	0.16
葡萄糖	$M=7E-07A+0.477$	0.996 1	0.5~20	0.20
蔗糖	$M=8E-07A+0.432$	0.998 2	0.5~20	0.16
麦芽糖	$M=1E-06A+0.269$	0.998 6	0.5~20	0.30

表2 龙眼鲜果及干果中水溶性糖的分析结果( $n=5$ )

Tab.2 Analytical results of longan samples (mg/g,  $n=5$ ) (mg/g)

样品名称	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	总糖
鲜果	133.41	179.67	517.28	—	830.36
干果	127.54	168.75	410.87	—	707.16

表3 回收率实验( $n=5$ )Tab.3 Recoveries and repeatability ( $n=5$ )

糖	加入质量/mg	测得质量/mg	回收率/%	RSD/%
果糖	0.10	0.097	97.00	0.25
葡萄糖	0.11	0.115	105.00	0.30
蔗糖	0.20	0.2115	106.00	0.36
麦芽糖	0.05	0.0491	98.20	0.11

## 2.5 回收率与精密度

将定量标准糖加入 1.3 项下得到的鲜果冻干粉样品中,在选定的色谱条件下平行测定 5 次,计算出回收率和精密度(RSD),结果见表 3。其中,果糖、葡萄糖、蔗糖的回收率分别为 97.0%、105.0% 和 106.0%,精密度分别为 0.25、0.30、0.36。说明龙眼果中测得的 3 种糖的质量分数准确可靠。

## 3 结语

初步建立了高效液相色谱-蒸发光散色法分析龙眼果中可溶性糖的方法,各个糖组份间分离效果良好,相对偏差均小于 0.4%。如前所述,新鲜龙眼经过加热焙制后,3 种糖均有不同程度的减少,结合总氨基酸和游离氨基酸含量均明显降低,推测这种含量的降低可能是由于糖与氨基酸类物质发生了非酶促的褐变反应,即美拉德反应,以及寡糖的水解所造成。

## 参考文献(References):

- [1] 黄建蓉,李琳,李冰. 龙眼肉生理功效和活性成分的研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 221-224.  
HUANG Jian-rong, LI Lin, LI Bin. Research progress in bioactivities of *Arillus Longan* and its bioactive ingredients[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(3): 221-224. (in Chinese)
- [2] 王明娟,胡昌勤,金少鸿. 蒸发光散射检测器在药物分析及其它方面的应用[J]. 中国药事, 2002, 16(7): 431-434.  
WANG Min-juan, HU Chang-qin, JIN Shao-hong. Review on the application of evaporative light-scattering detector in pharmaceutical analysis[J]. *Chin Pharm Aff*, 2002, 16(7): 431-434. (in Chinese)
- [3] 马艳蓉,柴国林,张莅峡. HPLC-ELSD 在中药分析中的应用[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(4): 368-370.  
MA Yan-rong, CAI Guo-lin, ZHANG Li-xia. HPLC-ELSDs application in traditional Chinese medicine analysis[J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2004, 11(4): 368-370. (in Chinese)
- [4] 谭和平,叶善蓉,陈丽,等. 茶叶中糖类物质分析方法综述[J]. 中国测试技术, 2007, 33(5): 1-4.  
TAN He-pin, YE Shan-rong, CHEN Li, et al. Review of carbohydrates determination for tea [J]. *China Measurement & Testing Technology*, 2007, 33(5): 1-4. (in Chinese)
- [5] 张梁,陈蕴,石贵阳,等. HPLC 法测定玉米浓醪发酵酒精醪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 Gui-yang, 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)
- [6] 赵仁邦,刘孟军,刘卫华,等. 高效液相色谱法测定枣中的糖类物质[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 138-141.  
ZHAO Ren-bang, LIU Meng-jun, LIU Wei-hua, et al. Determination of carbohydrates in Chinese jujube by using HPLC [J]. *Food Science*, 2004, 25(8): 138-141. (in Chinese)
- [7] 李雪华,龙盛京,谢云峰,等. 龙眼多糖、荔枝多糖的分离提取及其抗氧化作用的探讨[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(3): 342-344.  
Li Xue-hua, Long Sheng-king, Xie Yun-feng, et al. The extraction of euphoria *Longan steud* and *Litchi chinensis* sonn polysaccharides and its effect of cleaning oxygen radical [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2004, 21(3): 342-344. (in Chinese)
- [8] Yang W, Ming Y. D. Analysis of carbohydrates in drinks by high performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 904: 113-117.

(责任编辑:朱明)