

紫外分光光度法和高效液相色谱法测定和田红枣中总糖含量的比较研究

刘明川, 杨进平, 洪 达, 刘 敏, 翁玲玲, 杨胜杰, 王昭日*

杏辉医药集团 杏辉天力(杭州)药业有限公司研究所, 杭州 311100

摘要: 比较紫外分光光度法和高效液相色谱法测定和田红枣中总糖含量的差异, 探讨和田红枣中总糖含量测定方法的可靠性。采用苯酚-硫酸显色-紫外分光光度法在 489 nm 波长处测定和田红枣中总糖的含量。高效液相色谱法是测定和田红枣中三种糖(果糖、葡萄糖和蔗糖)的含量, 其之和即为总糖的含量。苯酚-硫酸显色-紫外分光光度法测得的和田红枣中总糖的含量为 603.30 mg/g。高效液相色谱法测得的和田红枣中总糖的含量为 598.01 mg/g。紫外分光光度法和高效液相色谱法测定的和田红枣中总糖的含量差异小, 高效液相色谱法可以代替紫外分光光度法对和田红枣中总糖的测定。

关键词: 和田红枣; 总糖; 高效液相色谱法; 紫外分光光度法

中图分类号: R917; Q946.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.019

Comparison of UV Spectrophotometry and HPLC on Quantitative Determination of Total Sugar Contents in Hetian Jujube

LIU Ming-chuan, YANG Jin-ping, HONG Da, LIU Min, WENG Ling-ling, YANG Sheng-jie, WANG Chao-jih*

Institute of Sinphar Tianli Pharmaceutical Co., Ltd. (Hangzhou), Sinphar Group, Hangzhou 311100, China

Abstract: To investigate the quantification method of total sugar in Hetian jujube using UV spectrophotometry and HPLC, total sugar content in Hetian jujube was determined by using phenol-sulfuric acid method and UV spectrophotometry at 489 nm. Total sugar in Hetian jujube consist three main types, including fructose, glucose, and sucrose, and their contents could be determined by HPLC, respectively. The content of total sugar in Hetian jujube was 603.30 mg/g by UV spectrophotometry, and it was 598.01 mg/g by HPLC analysis. The contents of total sugar in Hetian jujube determined by UV spectrophotometry and HPLC had small difference, which suggests that both methods are suitable to determine the total sugar in Hetian jujube. However, the HPLC method has advantages of simplicity of operation, system accuracy, high precision and reproducibility, and it is more suitable to be used for the quality control of Hetian jujube.

Key words: Hetian jujube; total sugar; HPLC; UV spectrophotometry

红枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)为鼠李科枣属植物成熟的果实,原产于中国,是我国的主要栽培种,现亚洲、欧洲、非洲、美洲和大洋洲的亚热带、温带地区的很多国家已有引种,但尚少较大规模的经济栽培^[1-4]。红枣全身都是宝,其果实、种仁、根皮都有药用功效,在《名医别录》、《神农本草》、《本草纲目》、《中医大辞典》等医学名著中均有医疗价值的记载,认为红枣有健脾养胃、益血壮神之功效^[5,6]。现代医学研究表明,红枣具有促进免疫、抗氧化、降脂、抗肿瘤等多种药理活性^[7-10]。据文献报道,红枣中不仅含有糖、蛋白质、氨基酸、膳食纤维、矿物质等常见的营

养物质,还含有三萜酸、黄酮、皂苷、腺苷、脂肪油、多种维生素等生理活性物质,其中糖类成分含量最为丰富,约占干物质的60%~80%^[11-14]。新疆和田枣与其它红枣相比,和田枣果形大、颗粒饱满、果肉厚实、皮薄核小、营养丰富,口味更甜醇,每一颗“和田枣”都是自然精华的结晶。

目前,对于和田红枣中总糖含量的测定多采用苯酚-硫酸显色-紫外分光光度法,但是此方法专属性不好,准确性不高,易受辅料的影响^[15]。因此寻找一种不易受辅料影响的具有较好专属性和准确性的红枣总糖含量的测定方法已经成为近年来的研究热点之一。本文首次建立了高效液相色谱法测定和田红枣总糖含量的测定方法,并比较与紫外分光光

度法的差异,为和田红枣及其产品的质量控制和开发利用奠定了理论基础。

1 仪器与材料

1.1 材料与试剂

和田红枣购自和田天力沙生药物开发有限责任公司,经台湾国防医学院林汉钦教授鉴定为鼠李科植物枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)的干燥成熟果实,样品(编号:20161206)储存于杏辉医药集团杏辉天力(杭州)药业有限公司研究所;葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究员,批号 100231-201606,含量 99.5%);果糖(中国食品药品检定研究员,批号 110833-201506,含量 99.7%);蔗糖(中国食品药品检定研究员,批号 111507-201303,含量 99.8%);苯酚(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);硫酸(优级纯,永华化学科技(江苏)有限公司),乙腈(色谱级,德国默克公司)。

1.2 仪器与设备

Waters 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,包括二元泵、蒸发光散射检测器自动进样器、柱温箱、在线脱气机、Empower 色谱工作站);Lambda 35 型紫外可见分光光度计(美国 PerkinElmer 仪器有限公司);Millipore 纯水机(美国 Millipore 公司);F-105 型低温冷却循环泵(瑞士步琪公司);R-210 型旋转蒸发仪(瑞士步琪公司);V-700 型真空隔膜泵(瑞士步琪公司);XS-205 型十万分之一分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);Freezone 型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司)。

2 方法与结果

2.1 苯酚-硫酸显色-紫外分光光度法测定总糖

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取无水葡萄糖对照品 0.500 8 g,加水溶解,并定容至 50 mL,混匀。精密移取 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,混匀,得 99.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.2 供试品溶液的制备

将和田红枣切成细末,精确称取 1.00 g,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,水浴回流 1 h,冷却,过滤。准确移取滤液 1 mL 至 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 测定波长的选择

精密移取 1 mL 供试品溶液于 25 mL 比色管中,

依次 1 mL 蒸馏水,1 mL 的 5% 苯酚溶液,摇匀,缓慢加入 5 mL 浓硫酸,摇匀,于沸水浴反应 2 min,取出放置 10 min,用紫外可见分光光度计在以相应试剂为空白,使用紫外分光光度计在 400 ~ 700 nm 波长处以相应试剂为空白参比,1 cm 玻璃比色皿测定吸光度值。根据扫描的光吸收曲线显示其最大吸收波长为 489 nm,与文献^[16]结果一致。

2.1.4 线性范围考察

精密吸取葡萄糖标准使用液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 分别置于 25 mL 比色管中,准确补蒸馏水至 2 mL,加入 50 g/L 苯酚溶液 1 mL,混匀后,小心加入硫酸 5 mL,混匀后,煮沸 2 min,10 min 后用分光光度计在 489 nm 波长处,以试剂空白为参比,1 cm 比色皿测定吸光度值。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.0667X - 0.0097$ ($R^2 = 0.9996$),线性范围 1.246 ~ 14.949 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.5 精密度

取 0.6 mL 葡萄糖标准使用液,按 2.1.3 项下方法显色,重复测定 6 次,记录吸光度值,RSD 为 0.11%,显示仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性考察

取样品液,按 2.1.3 项下方法显色,分别在 0、15、30、45、60 min 测定紫外吸收,记录吸光度,RSD 为 0.74%。显示样品在显色后 1 h 内进行测定结果稳定。

2.1.7 重复性考察

称取 6 份和田红枣样品按 2.1.2 项下方法制备,按 2.1.3 项下方法显色,测定吸光度,RSD 为 1.67%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收考察

取 5 mL 供试品溶液(已知浓度为 60.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)于 10 mL 量瓶中,再精密移取 3 mL 99.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液,加水至刻度,混匀。按 2.1.3 项下方法显色,测定吸光度,RSD 为 1.52%,可见此方法准确度良好,结果见表 1。

2.1.9 样品测定

精密移取 2.1.2 项下供试品溶液 1.0 mL 于 25 mL 比色管中,依次 1 mL 蒸馏水,1 mL 的 5% 苯酚溶液,摇匀,缓慢加入 5 mL 浓硫酸,摇匀,于沸水浴反应 2 min,取出放置 10 min,用紫外可见分光光度计在吸收波长为 489 nm 测定吸光度值,代入回归方程,计算供试品溶液的糖含量为 603.30 mg/g。

表1 葡萄糖的加样回收率试验结果

Table 1 Recovery test of glucose

供试品中量 Content (μg)	加入量 Added amount (μg)	实测值 Measured value (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average recovery (%)	RSD (%)
301.5	298.98	612.11	101.94	100.27	1.52
		611.93	101.91		
		601.56	100.18		
		588.84	98.06		
		595.33	99.14		
		602.71	100.37		

2.2 高效液相色谱法测定总糖

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Prevail Carbohydrate ES 碳水化合物色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈:水(80:20);柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;体积流量为 1 mL/min;发光散射检测器设定参数为:漂移管温度为 80 $^{\circ}\text{C}$, 气体压力为 40 Psi;进样量为 20 μL 。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取果糖 19.73 mg、葡萄糖 19.92 mg、蔗糖 19.91 mg 对照品置于 10 mL 量瓶中,加水溶解至刻度,此对照品溶液三种糖的浓度分别为 1967.081、1982.040、1987.018 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备

将和田红枣切成细末,精确称取 1.00 g,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,水浴回流 1 h,冷却,过滤。准确移取滤液 1 mL 至 5 mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 线性范围考察

精密移取混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mL 置于 2 mL 量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,得系列质量浓度的对照品溶液。精密吸取各对照品溶液 20 μL ,按 2.2.1 项下条件测定,以三种糖的质量浓度的对数值为横坐标,该成分峰面积的对数值为纵坐标,回归方程为如表 2 所示。

表2 三种糖组分的线性方程

Table 2 Linear equations of three kinds of standard substances

组分 Compound	标准曲线 Regression equation	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 R^2 Correlation coefficient
果糖	$Y = 1.6513 X + 1.2696$	98.354 ~ 1967.081	0.9996
葡萄糖	$Y = 1.6958 X + 0.2604$	99.102 ~ 1982.040	0.9999
蔗糖	$Y = 1.6922 X + 0.9644$	99.351 ~ 1987.018	0.9999

2.2.5 精密度

取浓度约为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 果糖、葡萄、蔗糖对照品溶液,记录峰面积,RSD 分别为 1.60%、1.70%、0.69%,显示仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察

取和田红枣供试品溶液,分别 0、2、4、6、8、10、12 h 测定,记录果糖、葡萄、蔗糖色谱峰的峰面积,RSD 分别为 0.18%、0.47%、0.19%,可知在 12 h 内测定,检测结果稳定。

2.2.7 重复性考察

称取 6 份和田红枣样品按 2.2.3 项下的方法制备,按 2.2.1 项下色谱条件测定,记录果糖、葡萄、蔗

糖色谱峰的峰面积,RSD 分别为 1.12%、1.86%、1.91%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察

精密移取 6 份已知三种糖含量的样品液 1.0 mL 分别置于 2 mL 量瓶中,分别精密移入对照品溶液,加水至刻度,微孔滤膜过滤,进样量为 20 μL ,记录峰面积,计算得:三种糖的回收率均在 95.0% ~ 105.0% 之间,RSD 均小于 3%,表明本方法准确可靠,结果见表 3。

2.2.9 样品测定

移取 2.2.3 项下供试品溶液适量,微孔滤膜过滤,按 2.2.1 项下条件测定,记录峰面积,经 2.2.4

表3 三种糖的加样回收率试验结果

Table 3 Recovery test of three kinds of standard substances

组分 Compound	原液中的量 Content (μg)	加入量 Added amount (μg)	实测值 Measured value (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均值 Average recovery (%)	RSD (%)
果糖	304.500	295.062	600.115	100.19	99.78	1.94
			598.216	99.54		
			588.441	96.23		
			590.111	96.79		
			595.785	98.72		
			603.023	101.17		
葡萄糖	195.488	198.204	389.110	97.69	95.11	2.68
			381.443	93.82		
			379.251	92.71		
			380.292	93.24		
			391.477	98.88		
			382.371	94.29		
蔗糖	699.003	695.456	1395.043	100.08	98.98	1.00
			1386.284	98.82		
			1379.022	97.78		
			1385.915	98.77		
			1396.162	100.24		
			1381.979	98.20		

项下所得的标准曲线计算所得果糖、葡萄糖和蔗糖的含量为 151.87、97.51、348.63 mg/g, 总糖即为三种糖含量之和, 经计算和田红枣总糖含量为 598.01 mg/g。

3 讨论

红枣是我国的著名的药食两用品种, 具有多种药理活性和保健功能。随着科技的发展和生活水平的提高, 和田红枣以其独具的特点, 也越来越受欢迎。目前, 市场上以和田红枣为原料制成的保健品也越来越多。总糖为和田红枣中的主要成分, 寻找一种能准确检测其成分的分析方法对于和田红枣及其产品的质量控制至关重要。在探究红枣总糖的测定方法时, 经过查阅大量的文献和书籍得知, 测定红枣总糖的分析方法多采用紫外分光光度法, 如苯酚硫酸法、蒽酮硫酸法等, 此方法是使用硫酸将聚糖水解为单糖, 显色剂再与单糖显色后, 使用紫外分光光度计测定其含量^[16,17]。紫外分光光度法操作简便, 对仪器要求不高, 但受人为影响较大, 专属性不强。当红枣产品原料中有 β -环糊精、麦芽糖糊精、淀粉

等辅料时, 使用此方法测定时硫酸也会将辅料水解为单糖, 不能准确测定。

本文在建立高效液相色谱法测定和田红枣总糖的含量时, 经过大量摸索发现: (1) 红枣口感较甜, 推测可能主要糖类物质为单糖; (2) 糖类物质在紫外下不显色, 很难使用 UV 作为检测器, 经查阅文献可用蒸发光散射检测器用来测定糖类成分; (3) 据文献报道目前使用高效液相色谱法测定单糖的主要是使用 Prevail Carbohydrate ES 碳水化合物色谱柱。基于此, 经大量实验以及与紫外分光光度法测定结果的反复对比, 发现和和田红枣总糖中的主要糖成分为果糖、葡萄糖和蔗糖, 此三种糖成分的含量之和即为和田红枣的总糖含量, 从而确定了此方法的可行性。紫外分光光度法测得的和田红枣总糖的含量为 603.30 mg/g。高效液相色谱法测得的和田红枣总糖含量为 598.01 mg/g。紫外分光光度法略高于高效液相色谱法, 分析原因可能是总糖中的其它微量的单糖、聚糖、多糖等带来的测定差异, 但两种方法检测结果相差很小均能较客观的反映总糖的含量。与紫外分光光度法相比, 高效液相色谱法具有以下

优点:(1)当红枣产品原料中有 β -环糊精、麦芽糖糊精、淀粉等辅料时,仍可准确测定;(2)受人为影响较小,专属性强,重复性好。可见高效液相色谱法可以代替紫外分光光度法对总糖的测定,为和田红枣及其产品的质量控制和开发利用提供技术支持。

参考文献

- Zhi JH(支金虎), Zheng QQ(郑强卿), Chen QL(陈奇凌), *et al.* Effect of plant growth regulators on photosynthetic characters of jujube around Tarim basin[J]. *Southwest China J Agr Sci*(西南农业学报), 2015, 28:2490-2495.
- Zhao T(赵堂), Hao FX(郝凤霞), Yang ML(杨敏丽). Analysis of the content of bioactive compound of cAMP from several types of jujubes[J]. *Hubei Agr Sci*(湖北农业科学), 2011, 50:4955-4957.
- Zhang Q(张琼), Wang ZT(王中堂), Shan GH(单公华), *et al.* Research progress in chemical constituents of *Zizyphus jujube*[J]. *Acta Agr Jiangxi*(江西农业学报), 2013, 25:25-29.
- Liang Q(梁芊), Sun HY(孙慧英), Li YL(李一路), *et al.* Present situation and suggestion of jujube cultivation in China[J]. *J Shanxi Agr Sci*(山西农业科学), 2017, 45:636-638.
- Yun P(云鹏), Liu YP(刘印平), Yang LX(杨立新), *et al.* The application of freezing-drying method for determination of 7 kinds of pyrethroid pesticides residues in dried jujube by gas chromatography[J]. *J Food Saf Qual*(食品安全质量检测学报), 2015, 6:3855-3862.
- Gao XM(高学敏), Xu ZM(徐占民), Li ZW(李钟文). Chinese materia medica(中药学)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000:1660-1665.
- Guo S(郭盛), Tang YP(唐于平), Duan JA(段金殿). Progress in pharmacological effects of compositions of jujube [C]. 8th Natl Symp Nat Med Resour P Abstr(全国第8届天然药物资源学术研讨会论文集), 2008:553-560.
- Zhang C(张采), Li J(李佳), Zhang YQ(张永清). Advances in studies on chemical constituents of jujube[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2011, 3:49-51.
- Guo S(郭盛). Study on the chemistry of *Fructus jujubae* resources[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine(南京中医药大学), 2009.
- Wang HY(王海元). The effect of jujube polysaccharide on exercise ability of mice and the study of its mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang normal university(浙江师范大学), 2009.
- Zhang YH(张艳红). Determination of nutrients in jujube and its quality evaluation[D]. Urumqi: Xinjiang University(新疆大学), 2007.
- Peng YF(彭艳芳). Analysis of bioactivity components and extraction of wax in Chinese jujube[D]. Baoding: Hebei Agricultural University(河北农业大学), 2008.
- Wang XH(王向红), Ji SS(吉爽爽), Sheng QH(生庆海), *et al.* Determination of monosaccharide components of eight varieties jujube water soluble polysaccharide by pre-column derivatization HPLC method[J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*(中国食品学报), 2014, 14:257-262.
- Yang PY(杨鹏元), Hong GF(洪广峰), Zhang QD(张启东), *et al.* Determination of roasted sweet aroma component in red jujube extract and optimization of its extraction technology[J]. *Acta Tabacaria Sin*(中国烟草学报), 2016, 22:41-50.
- Ge L(葛亮), Jiang Y(江钰), Hou XJ(侯旭杰), *et al.* Determination of total sugar in jujuba by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Chin J Spectrosc Lab*(光谱实验室), 2009, 26:893-895.
- Liu XF(刘晓芳), Liu YQ(刘养清), Han X(韩雪), *et al.* Determination of polysaccharide in *Zizyphus jujube* Mill. from different places[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2011, 13:28-30.
- Wei J(位杰), Wu CY(吴翠云), Jiang Y(蒋媛), *et al.* Sample preparation optimization for determination of soluble sugar in red jujube fruits by anthrone method[J]. *Food Sci*(食品科学), 2014, 35:136-140.