

# 利用 NMR 技术同时测定几种果汁中的葡萄糖、果糖和蔗糖

张宏利<sup>1</sup>, 简利茹<sup>1</sup>, 高保卫<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨陵 712100;

2. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**采用核磁共振波谱分析技术,以邻苯二甲酸氢钾作内标,测定了几种果汁中葡萄糖、蔗糖和果糖的含量,与高效液相色谱法测定的其中3种果汁中葡萄糖、蔗糖和果糖的含量进行比较,结果表明,二者的测定结果无明显差异,核磁共振波谱法测定的葡萄糖、蔗糖和果糖的回收率达到了98.00%、97.31%和98.75%,标准偏差0.174、0.134和0.783,可以达到定量分析的要求。该法取样量少,样品不必进行任何处理,直接定性和定量测定,所得结果重现性好、准确度高,为葡萄糖、蔗糖和果糖的同时定量测定提供了一种简单可行的方法。

**关键词:**核磁共振;果汁;定量测定;高效液相色谱

中图分类号:S713

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2014)06-0217-04

## Simultaneous Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Several Kinds of Fruit Juice by Using NMR Technology

ZHANG Hong-li<sup>1</sup>, JIAN Li-ru<sup>1</sup>, GAO Bao-wei<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas; Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Biorational Pesticide Research and Development Center, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Potassium biphthalate was adopted as an internal standard, the contents of glucose, sucrose and fructose in several fruit juices were determined simultaneously by NMR technology. The results were compared with those obtained from HPLC method. No significant differences were observed between the two methods. With NMR method, the recovery rate of glucose, sucrose and fructose reached 98%, 97.31% and 98.75%, respectively with the standard deviations of 0.174%, 0.134% and 0.783%, respectively, which could meet the requirement of quantitative analysis. Only small amounts of the sample were needed, in which no pre-treatments were required. The method exhibited good reproducibility and high accuracy, which provides a simple and feasible method for simultaneous determination of glucose, sucrose and fructose.

**Key words:** NMR; fruit juice; quantitative determination; HPLC

糖是人体所必需的一种营养物质<sup>[1]</sup>,瓜果中的糖主要包括果糖、葡萄糖和蔗糖。由于各种糖的生理功能各异,果糖的升糖指数低,葡萄糖、蔗糖的升糖指数却很高,蔗糖易引起龋齿,而果糖却不会;适量食用蔗糖有助于提高机体对钙的吸收;但过量反而会妨碍钙的吸收<sup>[2-5]</sup>。目前食品中糖类的国标分析

方法有滴定法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱示差折光法<sup>[7]</sup>、高效液相色谱-蒸发光散射法<sup>[8]</sup>等。滴定法测定的是总糖;高效液相色谱示差折光法对温度很敏感,灵敏度比较低;高效液相色谱-蒸发光散射法测定过程复杂、费时。

核磁共振(Nuclear magnetic resonance, NMR)

收稿日期:2013-09-06 修回日期:2014-03-01

基金项目:西北农林科技大学大型仪器设备新功能开发项目(dysb110101)。

作者简介:张宏利,男,高级实验师,研究方向:化学与仪器分析。E-mail: honglizhang@126.com

\* 通信作者:高保卫,男,实验师,研究方向:仪器分析。E-mail: gaobaowei72@163.com

波谱分析技术主要用于化合物的结构测定<sup>[9-11]</sup>,在有机化学、生物化学及化学生物学等领域得到广泛应用,近年来,核磁共振波谱分析技术在定量测定方面有一定的应用。阎政礼<sup>[12-13]</sup>等采用核磁共振技术测定了苹果原汁及蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖的含量;于小波<sup>[14]</sup>等利用核磁共振法测定了硫酸依替米星的含量;朱咏梅<sup>[15]</sup>等利用核磁共振法测定了盐酸大观霉素的含量;张烨<sup>[16]</sup>等利用核磁共振法成功的测定了水溶性维生素的含量;沙沂<sup>[17]</sup>等对药物胶囊中克拉霉素含量进行了核磁共振方法的研究;高令杰<sup>[18]</sup>等也利用<sup>13</sup>C NMR 技术进行了低分子量聚酯定量分析的研究。在前人研究的基础上,采用去水峰技术,以排除水对葡萄糖和蔗糖中定量测定用的特征峰的干扰,并将测定结果与高效液相色谱的测定结果进行了比较,以期建立果汁中葡萄糖、果糖和蔗糖的同时定量测定新方法。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

所用水果除石榴购自临潼外,其他均购自本地超市。

核磁共振波谱仪: Bruker Avance III 型 400 MHz, 500 MHz 核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; BBO 探头: 5 mm; 核磁管: 内径 5 mm; Waters 600 高效液相色谱仪, 美国沃特斯公司; 电子天平: AUV 220 型, 日本岛津公司; 溶剂: D<sub>2</sub>O, 氘代度 99.8%, 美国 CIL 公司; 定量内标: 邻苯二甲酸氢钾 (Potassium biphthalate, PT), 含量 (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>) ≥ 99.8%, 上海紫一试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 取以上材料的可食部分(苹果、桃、梨不必去皮, 石榴取果实部分), 取适量(约 15 g), 用手工压汁器压汁后冷藏备用。

1.2.2 样品配制 测定用的样品为标准样品和果汁样品 2 类。标准样品为葡萄糖、果糖和蔗糖, 分别取约 10 mg(不需要称量)于 5 mm 的核磁管中, 加入 0.5 mL 重水, 用于测定<sup>1</sup>H NMR 谱, 以确定各糖的特征峰; 果汁类样品取 0.4 mL(400 μL), 加入 0.1 mL 重水, 再加入约 10 mg 邻苯二甲酸氢钾(准确称量), 溶解、摇匀后测定<sup>1</sup>H NMR 谱。

1.2.3 葡萄糖、果糖和蔗糖的主要构型及<sup>1</sup>H NMR 谱特征峰的确认 参照阎政礼<sup>[1-2]</sup>等的方法, 分别将一定量的葡萄糖、果糖和蔗糖的标准样溶解于 D<sub>2</sub>O 中, 测定其<sup>1</sup>H NMR 谱图, 根据<sup>1</sup>H NMR 谱找出各糖的特征峰, 然后将 3 种糖的标准样按 1 : 1 : 1 混

合, 再测定一次<sup>1</sup>H NMR 谱, 根据各单糖的<sup>1</sup>H NMR 特征, 在混合后的样品<sup>1</sup>H NMR 谱中找出各自的特征峰, 最终确定定量测定的特征峰。

1.2.4 定量计算公式<sup>[15-16]</sup> 利用吸收峰面积与氢质子数成正比, 通过加入标准物作内标, 可以准确求出苹果原汁中葡萄糖、果糖和蔗糖含量(mg)。葡萄糖的积分值为 α-D-吡喃葡萄糖及 β-D-吡喃葡萄糖的端基质子积分值之和。果糖积分值为 β-D-吡喃果糖、α-D-呋喃果糖和 β-D-呋喃果糖 3 种构型积分值之和, 果糖 4 个峰正好包含了果糖 3 种构型每种构型 2 个质子, 因此, 计算果糖含量时应除以 2。蔗糖的积分值即为 α-D-吡喃葡萄糖环上 1-H 的积分值。

$$WS=\frac{As/ns\times Ms}{Ar/nr\times Mr}\times Wr$$

(1)

式中: WS: 样品质量; As: 样品质子吸收峰面积; ns: 样品吸收峰所包含质子数。Wr: 加入的内标物(邻苯二甲酸氢钾)标准质量; Ar: 邻苯二甲酸氢钾质子吸收峰面积; nr: 邻苯二甲酸氢钾吸收峰所包含质子数。Ms: 样品摩尔质量; Mr: 标准摩尔质量; 其中 S 为果糖和蔗糖; r 为邻苯二甲酸氢钾。M<sub>葡萄糖</sub> = 180, M<sub>果糖</sub> = 180, M<sub>蔗糖</sub> = 342, M<sub>邻苯二甲酸氢钾</sub> = 204。

1.2.5 高效液相色谱条件 参照吴基任<sup>[19]</sup>、张英<sup>[20]</sup>等的方法, 采用国标中的 RID 法进行测定。Waters 600 高效液相色谱仪, 色谱柱: Inertsol NH<sub>2</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 80% 乙腈, 流速为 1.4 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 35℃; 进样量为 10 μL; 2414 示差检测器温度 40℃。

2 结果与分析

2.1 测定方法的选择及改进

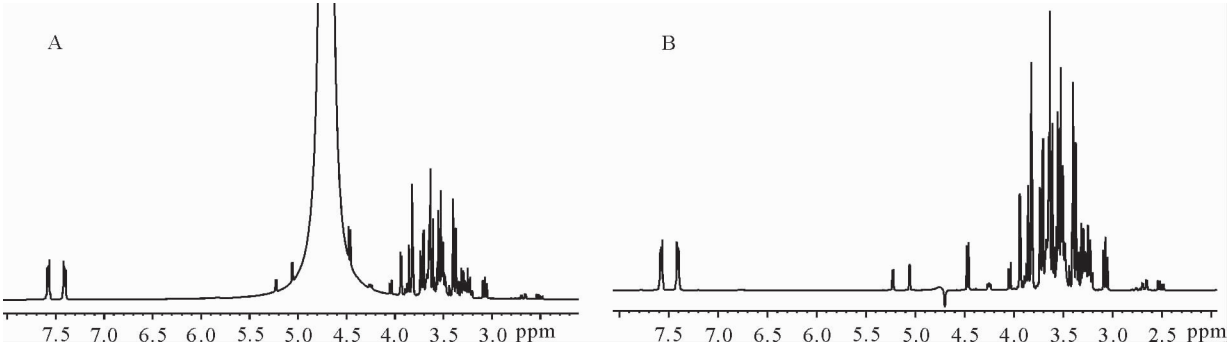
将制好的样充分振摇, 放置 10 min, 待溶液形成稳定构型后, 按照<sup>1</sup>H-NMR 测定的普通方法进行测定, 温度 295~298 K, SF 500.13 MHz, SW 20 ppm, NS 64, DS 2, D1 10 s, 每个样品测定 6 次。谱图处理时以 TMS 确定化学位移零点。结果发现, 因样品中的水较多(约 90% 的 H<sub>2</sub>O 和 10% 的 D<sub>2</sub>O), 出现的水峰大且宽, 对蔗糖、葡萄糖的定量测定的特征峰有一定的影响, 不能进行正常的定量计算, 因此, 采用一种全新的去水峰的方法进行测定, 消除了水峰的影响(图 1), 完全可以满足定量分析的要求。该研究中的所有定量测定均按此法操作。

2.2 精密度测定

将静宁县产富士苹果汁样品进行 5 次平行测定, 按照定量公式计算果汁中葡萄糖、果糖、蔗糖的百分含量, 取 5 次平均值, 计算平均值、标准偏差和

相对标准偏差(表 1)。可以看出:葡萄糖、蔗糖和果糖测定结果的相对标准偏差分别为 1.09%、3.61%、3.71%,多次测定结果接近,相对标准偏差

亦在允许范围内,说明仪器运行稳定,测定方法可靠,定量测定的精密度高。



A:传统方法(对照);B:去水峰后

图 1 富士苹果(乾县)的<sup>1</sup>H NMR 谱图

Fig. 1 Fuji apple (Qianxian County) <sup>1</sup>H NMR spectra

表 1 精密度测定结果

名称	测定结果/(g·100 mL <sup>-1</sup> )					平均值 /(g·100 mL <sup>-1</sup> )	标准 偏差	相对标准 偏差/%
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次			
葡萄糖	16.040	16.047	15.751	15.684	16.006	15.906	0.174	1.09
蔗糖	3.724	3.879	3.548	3.601	3.780	3.706	0.134	3.61
果糖	21.417	21.634	20.313	20.182	21.876	21.084	0.783	3.71

2.3 回收率试验

取乾县产富士苹果 2 作为测定样品,处理方法同 1.2.2 中样品处理。测试时,每个苹果原汁样品添加标准前取 3 组样品(各 600 μL),每组各测定 3 次,取 3 次测定的平均值为每一组的测定结果,最后取 3 组测定的平均值为样品中葡萄糖、蔗糖和果糖的含量。然后另取 3 组样品,分别添加邻苯二甲酸

氢钾和葡萄糖、蔗糖和果糖标准品,同上方法分别测定 3 次,计算总的 3 种单糖含量,取葡萄糖、果糖和蔗糖添加前后的量的均值,计算 3 种主要糖的回收率,结果(表 2)表明,葡萄糖回收率为 98.00%,蔗糖为 97.31%,果糖回收率为 98.75%,回收率较好,达到了满意的回收目的,表明核磁共振法测定果汁准确度高,分析测定结果可靠性强。

表 2 回收率测定结果

名称	测定结果/mg			测定结果 平均值/mg	添加前量 /mg	添加量 /mg	回收率 /%
	1	2	3				
葡萄糖	20.08	21.82	20.93	20.94	11.63	9.5	98.00
蔗糖	25.29	26.66	25.99	25.98	19.46	6.7	97.31
果糖	73.01	73.16	73.58	73.25	65.35	8.0	98.75

2.4 样品测定结果

每种样品取样 3 次,进行 NMR 测定时,每个样测定 6 次,取其均值。随机取 3 种样品进行高效液相色谱测定,并与 NMR 测定的结果进行比较。不同果汁中 3 种糖含量的测定结果(表 3)可看出,3 种样品的 NMR 测定结果与高效液相色谱的测定相吻合,无明显差异。临潼区产石榴中含微量的蔗糖,3 个品种的梨中也含少量的蔗糖。NMR 法测定的果汁中葡萄糖、果糖和蔗糖的含量结果可代表它们的实际含量,核磁共振法可应用于果汁中葡萄糖、果糖

和蔗糖含量的同时测定。

3 结论与讨论

在前人<sup>[12-13]</sup>研究的基础上,采用了去水峰技术,排除了果汁中水对葡萄糖和蔗糖中定量测定用的特征峰的干扰,葡萄糖、蔗糖和果糖的回收率达到了 98.00%、97.31%和 98.75%,标准偏差 0.174%、0.134%和 0.783%,可达到定量分析的要求。利用核磁共振法对不同果汁中的 3 种主要的糖进行了含量测定,并与高效液相色谱法的测定结果进行了比

较,结果表明,该核磁共振法方法操作简便,样品用量少,定性鉴定和定量分析同步完成,其他物质和杂质无干扰,无须进行分离,分析速度快,精密度可以达到 HPLC 法水平。特别是核磁共振定量法不依

赖于被测物的高纯标准对照品即可进行定量分析,定量分析的困难程度和成本大为降低,只需一般可溶于溶解试样的溶剂的内标就可完成定量分析,这是 HPLC 法所不及。

表 3 果汁中葡萄糖、果糖和蔗糖含量的测定结果

Table 3 Contents of glucose, fructose and sucrose in some fruit juices by NMR method

样品及产地	测定编号	果汁中含量/(g·100 mL <sup>-1</sup> )		
		葡萄糖	蔗糖	果糖
静宁县富士苹果	LH-WY-2	3.53	0.82	4.69
乾县富士苹果 1	ZHL-109-1-1	3.36	2.14	5.66
乾县富士苹果 2	ZHL-1203-9	3.49(3.41)	4.33(4.28)	12.21(12.14)
临潼区石榴	ZHL-1203-1	5.75(5.81)	微量(微量)	10.20(10.28)
洛川县富士苹果	LH-WY-3	4.37(4.42)	2.95(3.12)	8.59(8.71)
礼泉县富士苹果	ZHL-109-2-1	4.83	2.05	6.64
水蜜桃	LH-WY-4	1.34	8.72	9.14
油桃	LH-WY-5	2.23	11.90	15.72
鸭梨	LH-WY-6	0.67	0.23	3.71
皇冠梨	LH-WY-7	1.21	0.12	2.67
密梨	LH-WY-8	1.99	0.08	3.20

注:括号中数据为液相色谱法测定结果。

参考文献:

[1] 张国珍. 食品生物化学(农产品加工专业用)[M]. 北京:农业出版社,1992.

[2] 中国营养学会. 中国居民膳食指南[M]. 拉萨:西藏人民出版社,2008:6.

[3] 王光磁. 食品营养学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:2.

[4] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:9.

[5] 蔡威. 食物营养学[M]. 上海:上海交通大学出版社,2006:9.

[6] GB/T5009.7-2003. 食品中还原糖的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003

[7] GB/T22221-2008. 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008

[8] 王艳颖,胡文忠,庞坤,等. 高效液相色谱—蒸发光散射法测定苹果中可溶性糖的含量[J]. 食品与发酵工业,2008,34(6):129-131.

[9] 马柏林,邓师勇,张北生,等. 鸡骨草化学成分的研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(5):152-153.

MA B L, DENG S Y, ZHANG B S, *et al.* Chemical constituents of *Abrus cantoniensis*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(5):152-153. (in Chinese)

[10] 高锦明,张靛灵. 中国沙棘果实黄酮成分的研究[J]. 西北林学院学报,1999,14(3):52-55.

GAO J M,ZHANG A L. Flavonoids from *Hippophae Rhamnoides* L. subsp. *sinensis*[J]. Journal of Northwest Forestry University,1999,14(3):52-55. (in Chinese)

[11] 郑志锋,邹局春,陈浪,等. 核桃壳木质素的<sup>1</sup>H-NMR 分析[J]. 西北林学院学报,2007,22(2):131-133.

ZHENG Z F, ZOU J C, CHEN L,*et al.* Analysis of walnut shell lignin by <sup>1</sup>H-NMR[J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(2):131-133. (in Chinese)

[12] 阎政礼,杨明生,冯志明. 苹果原汁中葡萄糖、果糖和蔗糖 NMR 定量分析[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2011,8(1):86-89.

YAN Z L, YANG M S, FENG Z M. Quantitative analysis of glucose, fructose and sucrose in the raw juice of apple by Nuclear Magnetic Resonance [J]. J. Hunan Normal Univ. : Med. Sci. , 2011,8(1):86-89. (in Chinese)

[13] 阎政礼,杨明生,李添宝,等. 蜂蜜中葡萄糖、果糖和蔗糖 NMR 定量分析研究[J]. 食品科学,2009,30(14):253-255.

YAN Z L, YANG M S, LI T B, *et al.* Quantitative analysis of glucose, fructose and sucrose in honey by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Food Science, 2009,30(14):253-255. (in Chinese)

[14] 于小波,相秉仁,王国华,等. 核磁共振法测定硫酸依替米星含量[J]. 中国抗生素杂志,2011,36(8):610-614.

[15] 朱咏梅,徐景士,袁建军,等. 核磁共振法测定盐酸大观霉素含量[J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2010,34(4):387-390.

ZHU Y M, XU J S, YUAN J J, *et al.* The determination of spectinomycin hydrochloride by NMR [J]. Journal of Jiangxi Normal University: Natural Science Edition, 2010,34(4):387-390. (in Chinese)

[16] 张烨,刘小鹏,张友杰. 水溶性维生素核磁共振定量分析的研究[J]. 波谱学杂志,2011,28(3):357-365.

[17] 沙沂,李文,申会恩. 克拉霉素胶囊的 NMR 定量方法研究[J]. 波谱学杂志,2009,26(3):308-315.

[18] 高令杰,赵天增. 低分子量聚酯的<sup>13</sup>C NMR[J]. 波谱学杂志,1990,7(1):49-54.

[19] 吴基任. HPLC-ELSD 测定饮料中果糖、葡萄糖、蔗糖和乳糖的含量[J]. 热带农业科学,2013,33(6):55-58.

[20] 张英,石雪萍,张卫明. HPLC-ELSD 法与 HPLC-RID 法检测蜂蜜中糖分的比较[J]. 中国野生植物资源,2009,28(1):43-47.

ZHANG Y,SHI X P,ZHANG W M. Comparison of HPLC-ELSD and HPLC-RID methods in detecting the sugar of honey[J]. Chinese Wild Plant Resources,2009,28(1):43-47. (in Chinese)