



# 离子色谱-积分脉冲安培检测法测定 D-核糖

燕会丹<sup>1</sup>, 夏金梅<sup>2\*</sup>, 许晨<sup>2</sup>, 李军<sup>1</sup>, 钟添华<sup>2</sup>

(1.厦门大学化学化工学院, 厦门 361005; 2.国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:** 采用离子色谱-积分脉冲安培检测法(IC-IPAD)测定D-核糖, 采用CarboPac™ PA10色谱柱进行分离, 60 mmol/L NaOH溶液为淋洗液, 流速0.6 mL/min, 柱温30℃, ED3000安培检测器, Au工作电极, Ti对电极, Ag/AgCl复合参比电极。以外标法定量, D-核糖质量浓度为3.60~43.2 mg/L范围内峰面积呈良好的线性关系( $R^2=0.9999$ ), 检出限及定量限分别为0.200、0.620 ng, 精密度的相对标准偏差(RSD)为0.524%, 平均回收率为101%。因此, IC-IPAD可用于D-核糖含量的测定, 且操作简便、无需衍生、分离效果好、灵敏度高。

**关键词:** D-核糖; 离子色谱-积分脉冲安培检测法; 糖类检测

中图分类号: O 657.7<sup>+</sup>5 文献标志码: A 文章编号: 1005-9989(2015)04-0344-04

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2015.04.067

## Determination of D-ribose by ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection

YAN Hui-dan<sup>1</sup>, XIA Jin-mei<sup>2\*</sup>, XU Chen<sup>2</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, ZHONG Tian-hua<sup>2</sup>

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005;  
2.Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005)

**Abstract:** An analytical method was proposed and established for determination of D-ribose by ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection (IC-IPAD). The separation was performed on a 250 mm×4 mm CarboPac™ PA10 column at 30℃ by HPLC equipped with an ED3000 detector. The mobile phase was 60 mmol/L sodium hydroxide with a flow rate of 0.6 mL/min. The quantification was performed by an external standard approach. The concentration linear range for D-ribose was 3.60~43.2 mg/L ( $R^2=0.9999$ ). The relative standard deviation of precision was 0.524%. The detection and quantification limits for D-ribose were 0.200 ng and 0.620 ng, respectively. The average recovery ratio for D-ribose was 101%. IC-IPAD was proved to be suitable for the determination of D-ribose with its convenience, rapidness, and sensitivity.

**Key words:** D-ribose; ion chromatography with integrated pulsed amperometric; determination of saccharide

收稿日期: 2014-10-31

\*通讯作者

基金项目: 海洋公益性专项(201105029); 国家重大科学仪器专项(2013YQ170525); 厦门市海洋经济发展专项资金项目(13CZP003HJ05)。

作者简介: 燕会丹(1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事核糖标准品的研究工作。



D-核糖是一种天然的五碳糖,存在于自然界所有的活细胞中,在细胞的能量代谢中起着重要作用。D-核糖是核酸和某些维生素、辅酶的重要成分<sup>[1]</sup>,可用于治疗心肌缺血,提高心脏对局部缺血的耐性和改善心脏功能,广泛应用于医药、化妆品、健康食品以及动物饲料领域<sup>[2]</sup>,在提高人们的健康水平方面发挥着重要作用。D-核糖的定量检测方法主要有比色法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4-6]</sup>、毛细管电泳法<sup>[7]</sup>,气相色谱法等。比色法即苔黑酚法(地衣酚法),此种方法操作复杂,检测灵敏度低。气相色谱法要求样品具有良好的挥发性和热稳定性,而糖类化合物不能在高温下直接挥发,需对样品进行衍生处理,致使操作繁琐,且在高温条件下分析可能导致样品分解;高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)依据配置的检测器不同,有HPLC-示差检测法、HPLC-蒸发光散射检测法及HPLC-紫外检测法。示差折光检测器灵敏度低且不适用于梯度洗脱,D-核糖基本无紫外吸收因而紫外检测器的应用受到限制,蒸发光散射检测器灵敏度不高,其检出限多在 $\mu\text{g}$ 级,且其响应值与被测物质的浓度成复杂的非线性关系,定量不方便<sup>[8]</sup>。

近年来,一种新的离子色谱-积分脉冲安培检测法<sup>[9-10]</sup>用于糖类化合物的分离检测,该方法无需衍生、操作简捷、灵敏度高(检出限可低至 $\text{pg}$ 级)、分离效果好,可直接用于糖类检测。目前,我国国家标准中尚未确定D-核糖的检测方法,本文采用离子色谱-积分脉冲安培检测法(IC-IPAD)对D-核糖进行定量分析和方法学研究,为D-核糖标准品的准确定量建立技术基础,同时也可作为食品、保健品中D-核糖的质量检测及监控提供新的技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

ICS-3000型离子色谱仪:美国Dionex公司,包括四元梯度泵,ED3000电化学检测器(Au工作电极, Ti对电极, Ag/AgCl复合参比电极),变色龙6.8色谱工作站;RU-T-15型超纯水机:上海楚定分析仪器有限公司;XS105型电子分析天平:瑞士Mettler集团;分析柱Dionex CarboPac™ PA10色谱柱(250 mm × 4 mm)。

NaOH:美国Fisher Scientific公司;D-核糖对照品:中国药品生物制品检定所;D-核糖样品:

市售。

### 1.2 实验方法

色谱条件:采用CarboPac™ PA10色谱柱(250 mm × 4 mm),淋洗液:60 mmol/L NaOH溶液,流速:0.6 mL/min,柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ ,进样量:25  $\mu\text{L}$ 。

样品处理方法:市售D-核糖样品经针剂活性炭脱色后,过001 × 7型阳树脂和201 × 7型阴树脂混合树脂(1:2, v/v)脱盐,减压浓缩,重结晶干燥得D-核糖样品。

标准储备液的配制:准确称取D-核糖对照品9.00 mg于50.0 mL容量瓶中,用超纯水溶解并定容,摇匀得180 mg/L的标准储备液,置4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存备用。

样品溶液配制:准确称取适量D-核糖样品,超纯水溶解,转移并定容于容量瓶中。依照不同的实验配制不同浓度的样品。

含量计算方法:采用外标法计算含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

糖类分子具有电化学活性且能在强碱中呈离子化状态,中性糖类的 $\text{pK}_a$ 在12~14之间,在强碱性条件下呈弱酸性,会部分或全部以阴离子形式存在,因而可在阴离子交换柱上被保留并得到分离。NaOH或NaOH和NaAc混合液是糖类检测中常用的淋洗液,D-核糖为中性糖,采用NaOH溶液便可以洗脱<sup>[11]</sup>,因此,本论文采用NaOH溶液作为淋洗液,通过预实验,初步确定色谱条件,以此为基础,进行色谱条件的研究与优化。

2.1.1 淋洗液浓度的选择 选择色谱柱温30 $^{\circ}\text{C}$ ,流速0.6 mL/min,进样量25  $\mu\text{L}$ 的条件,考察不同浓度NaOH(10~150 mmol/L)对D-核糖洗脱能力的影响,结果表明D-核糖保留时间随淋洗液浓度的升高而逐渐减小,峰面积逐渐增大,NaOH浓度高于60 mmol/L时峰面积基本稳定,NaOH浓度在30~80 mmol/L范围内,理论塔板数大于5000,考虑到色谱柱使用寿命,兼顾分析时间和峰型,选择60 mmol/L的NaOH作为淋洗液。

2.1.2 色谱柱温和流速的选择 选择NaOH淋洗液浓度为60 mmol/L,流速为0.6 mL/min,进样量为25  $\mu\text{L}$ 的条件,考察不同柱温(25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ )对D-核糖色谱过程的影响,结果表明,随着柱温的升高,D-核糖保留时间变短,峰面积增大,实验过程中发现柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 时峰面积和保留时间比较



稳定, 色谱系统重现性良好, 因此柱温选择30。

保持NaOH淋洗液浓度为60 mmol/L, 柱温为30, 进样量为25 μL的条件, 考察不同淋洗液流速(0.5、0.6、0.7、0.8 mL/min)对D-核糖洗脱的影响, 结果表明, 随着流速的增加, D-核糖保留时间减小, 峰面积减小, 理论塔板数减小。综合考虑分析时间和柱压, 选择淋洗液流速为0.6 mL/min。

经实验考察, 最终选择D-核糖检测的色谱条件为: NaOH淋洗液浓度60 mmol/L, 流速0.6 mL/min, 柱温30, 进样量25 μL。该条件下检测D-核糖, 峰形良好, 保留时间适中, 色谱图见图1。

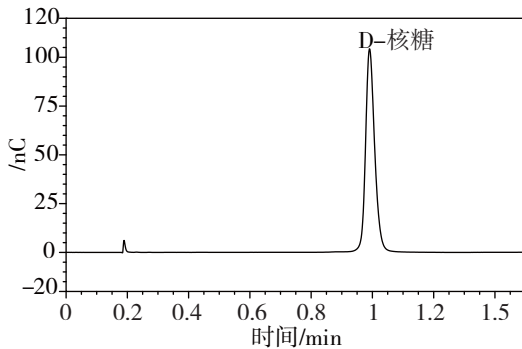


图1 D-核糖色谱图

### 2.2 工作曲线的线性范围

准确移取D-核糖标准储备液, 稀释成3.60、7.20、14.4、28.8、43.2 mg/L的系列标准工作溶液。分别进样25 μL, 测定峰面积, 每个浓度重复进样3次, 以峰面积平均值(nC·min)为纵坐标(y), 质量浓度(mg/L)为横坐标(x), 作图。峰面积与D-核糖质量浓度进行线性拟合, 得线性回归方程:  $y=2.3978x+0.8922$ , 相关系数 $R^2=0.9999$ 。在3.60~43.2 mg/L范围内, D-核糖质量浓度与峰面积线性良好。

### 2.3 精密度实验

取浓度为14.4 mg/L的D-核糖标准储备溶液, 每次进样25 μL, 连续进样6次, 记录每次峰面积, 计算峰面积的相对标准偏差(RSD), 测定的峰面积的RSD为0.524%, 表明本方法精密度良好, 可满足检测要求。

### 2.4 检出限和定量限

取1.2中配制的最低浓度的D-核糖标准溶液, 不断稀释配制一系列低浓度D-核糖标准工作溶液样品, 进样25 μL进行检测分析。以基线噪音3倍峰高(S/N=3)为检出限, 以基线噪音10倍峰高(S/

N=10)为定量限, 测得D-核糖的检出限(LOD)为0.00800 mg/L(0.200ng), 定量限(LOQ)为0.0250 mg/L(0.620 ng)。

### 2.5 方法回收率

加标回收率, 是对所建立样品分析方法适用性和方法系统误差的检验, 常采用下列公式计算:

$$\text{加标回收率}(\%) = (\text{加标样品测定值} - \text{样品测定值}) / \text{加标量} \times 100$$

根据公式, 以样品质量浓度表示的加标回收率公式为:

$$P(\%) = (C_2 \times V_2 - C_1 \times V_1) / (C_0 \times V_0) \times 100$$

式中: P为加标回收率;

$C_0$ 为加标用标准溶液质量浓度;

$C_1$ 为供试样品质量浓度;

$C_2$ 为加标后试样质量浓度;

$V_0$ 为加标体积;

$V_1$ 为试样体积;

$V_2$ 为加标后试样体积。

本实验取等体积的供试样品溶液和标准工作溶液进行加标检测, 忽略溶液混合前后体积的变化量, 则公式可简化为:

$$P(\%) = (2C_2 - C_1) / C_0 \times 100$$

按1.2节所述方法配制D-核糖样品溶液, 分别等体积加入其浓度的80%、100%、120%的D-核糖对照品, 每个浓度各3份, 考察D-核糖标准加标回收率, 实验结果见表1, 测得D-核糖的回收率为100%~101%, RSD为0.320%, 表明该方法准确度良好。

表1 加标回收率实验结果

实验号	因素			回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	$C_1$ (mg/L)	$C_0$ (mg/L)	$C_2$ (mg/L)			
1	22.4	18.2	20.4	101	101	0.524
2	22.4	18.2	20.3	100		
3	22.4	18.2	20.3	100		
4	22.4	22.1	22.4	101		
5	22.4	22.1	22.4	101		
6	22.4	22.1	22.3	101		
7	22.4	27.1	24.8	100		
8	22.4	27.1	24.9	101		
9	22.4	27.1	24.7	100		

### 2.6 样品纯度测定

按1.2节所述方法, 配制3份D-核糖样品溶液, 稀释成适当浓度溶液后, 每份样品进样3次,



以外标法定量,实验结果见表2,测得3份样品的质量分数分别为100%、99.8%、99.8%。纯化的D-核糖样品纯度高,达到对照品的纯度水平。

表2 样品测定结果

配制值/(mg/L)	检测值/(mg/L)	质量分数/%	平均质量分数/%
18.0	18.1	101	
18.0	17.9	99.4	100
18.0	18.1	101	
18.2	18.3	101	
18.2	18.2	100	99.8
18.2	18.0	98.9	
18.1	18.0	99.4	
18.1	18.2	101	99.8
18.1	18.0	99.4	

## 2.7 样品分析

2.7.1 D-核糖及杂质的分离 采用考察确定的色谱条件对D-核糖粗品进行检测,获得的色谱图如图2所示。从图2中可以看出,该色谱条件可以很好地分离粗品中的D-核糖和杂质,且粗品中的D-核糖含量和标注含量相当,可帮助我们辨别粗品质量的优劣。

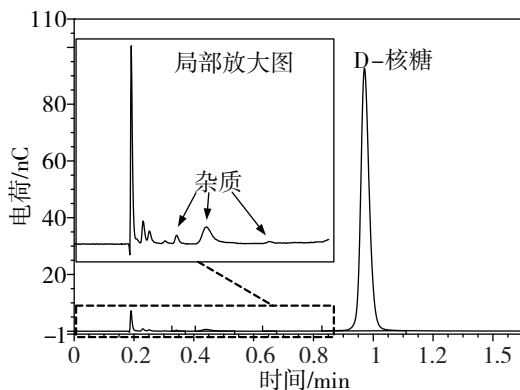


图2 D-核糖粗品色谱图

2.7.2 D-核糖样品与原料的分离 D-核糖的生产方法之一是采用L-阿拉伯糖、D-木糖的化学合成<sup>[12]</sup>法,因此,D-核糖样品中也可能含有未转化的L-阿拉伯糖、D-木糖。为了使D-核糖的

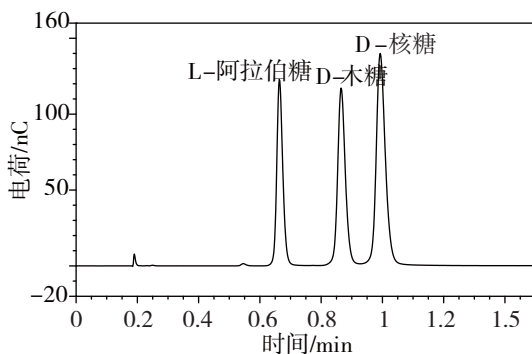


图3 L-阿拉伯糖、D-木糖、D-核糖混合物色谱图

检测方法有更广泛的实用性,需要考察其对D-核糖、L-阿拉伯糖、D-木糖的分离效果。采用考察确定的色谱条件对由此生产方法得到的D-核糖原料进行分析检测,实验结果如图3。从图3中可以看出,NaOH淋洗液浓度60 mmol/L,流速0.6 mL/min,柱温30℃,进样量25 μL的色谱条件下,D-核糖、L-阿拉伯糖、D-木糖可以实现基线分离,表明该检测方法可以同时检测D-核糖、L-阿拉伯糖和D-木糖,可用于监测原料中D-核糖的含量。

## 3 结论

采用IC-IPAD法检测D-核糖,该方法操作简便,精密度好,准确度高。所建立的方法用于检测含杂质的样品,获得了满意的结果,可作为D-核糖标准品的定值方法,同时也可作为保健食品中D-核糖产品的质量控制和安全评价提供准确、可靠的分析方法。

### 参考文献:

- [1] 于文兵,严政,高丽丽,等.核糖与运动能力[J].南京体育学院学报,2002,3(1):1-8
- [2] 杨新超,刘建军,赵祥颖.D-核糖的性质、生产及应用[J].中山大学学报,2005,44:197-202
- [3] 彭彦峰,吴兆亮,李英杰.分光光度法测定微生物发酵液中D-核糖浓度及其机理[J].分析化学,2002,30(8):975-977
- [4] DE MUYNCK C, BEAUPREZ J, SOETAERT W, et al. Boric Acid as a Mobile Phase Additive for High Performance Liquid Chromatography Separation of Ribose, Arabinose and Ribulose[J]. Journal of Chromatography A,2006,1101(1):115-121
- [5] 杨兴斌,赵燕,周四元,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J].分析化学,2005,33(9):1287-1290
- [6] SHAO Y, ALLURI R, MUMMERT M, et al. A Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Glucosamine in Pharmaceutical Formulations[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2004,35(3):625-631
- [7] SUN B, MILLER G, LEE W Y, et al. Analytical Method Development for Directed Enzyme Evolution Research: A High Throughput High-performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Ribose and Ribitol and a Capillary Electrophoresis Method for the Separation of Ribose Enantiomers[J]. Journal of Chromatography A,2013,1271(1):163-169
- [8] 王巧娥,丁明玉.蒸发光散射检测技术研究进展[J].分析测试学报,2006,25(6):126-132



# 胡萝卜不同部位Vc与叶绿素含量的测定分析

杨国俊<sup>1</sup>, 李 宁<sup>2\*</sup>, 赵 琼<sup>2</sup>, 李浩哲<sup>2</sup>, 谢 伟<sup>2</sup>, 齐巧莎<sup>2</sup>  
(1.河南医学高等专科学校, 郑州 451191 ;  
2.河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002)

摘要: 采用分光光度法测定胡萝卜不同部位Vc与叶绿素的含量, 分析胡萝卜上段、中段、下段以及外层、中层、内层Vc与叶绿素含量差异。结果表明, 胡萝卜叶绿素含量在上中下3段及内中外3层间无差异; Vc含量在上中下3段间无差异, 但在内中外3层间存在差异: 中层 > 内层 > 外层。

关键词: 胡萝卜; 叶绿素; Vc; 分光光度法

中图分类号: TS 255.1 文献标志码: A 文章编号: 1005-9989(2015)04-0348-04

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2015.04.068

## Determination of chlorophyll, Vc content in different areas of carrots

YANG Guo-jun<sup>1</sup>, LI Ning<sup>2\*</sup>, ZHAO Qiong<sup>2</sup>, LI Hao-zhe<sup>2</sup>, XIE Wei<sup>2</sup>, QI Qiao-sha<sup>2</sup>

(1.Henan Medical College, Zhengzhou 451191; 2.Food Science and Technology College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: The spectrophotometric method is used to determine the content of chlorophyll and vitamin c in different parts of carrot. The content of chlorophyll and Vc in carrot upper, middle and lower segments and the outer, middle and inner was explored. The results showed that Vc content are differences in different parts of carrot. And on outer, middle and inner sections, vitamin c content was middle>inner>outer.

Key words: carrot; chlorophyll; Vc; spectrophotometric method

胡萝卜具有很高的营养价值,  $\beta$ -胡萝卜素 具有V<sub>A</sub>活性, 被人体摄取后可转变为V<sub>A</sub>, 对防

收稿日期: 2014-11-17

\*通讯作者

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目(142102310089)。

作者简介: 杨国俊(1968—), 男, 河南周口人, 硕士, 副教授, 主要从事营养与食品卫生的研究工作。

[9] CATALDI T R I, CAMPA C, DE BENEDETTO G E. Carbohydrate Analysis by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection: The Potential is still Growing[J]. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000, 368(8): 739-758

[10] 潘媛媛, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 高效阴离子交换色谱-

脉冲安培检测法分析啤酒和麦汁中的糖[J]. 色谱, 2008, 26(5): 626-630

[11] 牟世芬, 于泓, 蔡亚岐. 糖的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析[J]. 色谱, 2009, 27(5): 667-674

[12] 郭欣然. 发酵液中D-核糖分离纯化过程研究[D]. 天津: 河北工业大学, 2003