

SCIEX 液质联用技术测定果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇的应用

SCIEX LC-MS/MS Application Technology on Detection of Fructose, Glucose, Sucrose and Sorbitol

孙晓靖, 程海燕, 李立军, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心(上海), 中国

引言

传统检测单糖、双糖的分析方法有化学法、光谱法、GC-MS、HPLC等方法。其中化学法无法准确测定单种糖的含量;光谱法的工作繁琐、误差比较大;GC-MS方法需要进行衍生化反应,前处理复杂,不利于快速分析;HPLC法虽然相比其他方法灵敏度好、检测速度快、适用范围广,但也存在检出限较低、抗干扰能力差,尤其对于食品中低浓度的单糖、双糖很难进行精确的测定,无法满足现阶段对食品检测快速、灵敏、准确的要求。LC-MS/MS技术通过质谱的高选择性和高灵敏度能够降低目标物的检出限、提高检测的重现性。

由于糖类为水溶性化合物,在常规的C18色谱柱上没有保留,而采用其他填料的亲水色谱柱也很难得到太好的峰形或分离度。因此,选取一款合适的分析糖的色谱柱是液质分析糖的实验关键点。目前专门测试糖的糖柱通常为液相柱,需要用到100%纯水相来作为流动相,并且流速通常高于1 mL/min,这样的色谱条件对于大多数的质谱离子源来说都无法实现化合物的有效离子化,或者只有通过分流才能实现,但是分流后将损失仪器的检测灵敏度,失去了使用液质联用仪测试糖的提高灵敏度的目的。

SCIEX 的 LC-MS/MS液质联用系统的一大特点就是强大的TurboV™离子源技术,离子源的加热能够达到750°C,ESI源耐受流速范围5 μ L/min~3.0 mL/min,APCI源耐受流速范围50 μ L/min~3.0 mL/min,因此可以直接使用HPLC糖柱在SCIEX液质联用仪上进行测试,即实现了好的分离效果,又提高了检测灵敏度。本实验使用SCIEX Triple Quad™ 4500 质谱系统同时测定梨中的葡萄糖、果糖、蔗糖和山梨醇四种糖,实验方法简单、灵敏度高、选择性好。

实验思路

1. 配制果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准曲线,测试四种水溶性糖的最低检出限;
2. 测试砀山酥梨果实中四种水溶性糖的含量,了解梨中四种糖的比例关系。

样品处理

1. 移取果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准品,用纯水稀释,配制50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL和10 μ g/mL的标准溶液。
2. 梨果实中可溶性糖的提取。

梨果实中糖的提取

材料:砀山酥梨(采集于南京农业大学江浦园艺实验站)

将样品去皮削成小块,液氮速冻后储存于-80冰箱。称取2g样品,加液氮研磨后,加入80%乙醇7 mL混匀。在37°C水浴中恒温30 min,超声提取15 min,10000 r/min离心15 min。将上清液移入25 mL容量瓶。重复提取3次,最后加入80%乙醇定容至25 mL。取2 mL溶液旋转蒸发,用1 mL水溶解蒸干后的固体,溶解时用超声波处理,尽量溶解完全。溶液离心后,用0.22 μ m水系滤膜处理,即可用于测定。

实验过程中发现此前处理过程提取出的糖样品在液质仪器上的响应信号过高,最终样品又用纯水稀释10倍和1000倍分别上机测试。

色谱方法

色谱柱:Hi-Plex Ca, 300 \times 7.7 mm;

流动相:100%纯水洗脱

流速:1 mL/min; 柱温:85°C;

进样量:10 μ L

质谱方法

SCIEX Triple Quad™ 4500 质谱系统



扫描方式：MRM采集方式

离子源：APCI Negative

离子源参数

CUR：气帘气25.00 psi

NC：离子化电流 -2.00 uA

TEM：加热温度 400.00 °C

GS1：喷雾气 75psi

CAD：碰撞气 Medium

表1. MRM离子对信息。

Q1	Q3	ID	DP	CE
179	88.9	Fructose 1	-18	-12
179	59	Fructose 2	-18	-23
179	88.9	Glucose 1	-25	-11
179	59	Glucose 2	-25	-25
341.1	88.9	Sucrose 1	-82	-25
341.1	179	Sucrose 2	-82	-21
181	88.9	Sorbitol 1	-57	-18
181	100.9	Sorbitol 2	-57	-20

结果与讨论

1、色谱条件的选择

本实验选择使用液相糖分析柱Hi-Plex Ca, 300 × 7.7 mm, 1 mL/min 纯水流动相, 对果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇四种糖进行分离, 其中果糖和葡萄糖为同分异构体, 用该色谱柱可以得到很好的分离, 每种化合物的峰形都很对称, 峰形较

好。图1为1 ppm (µg/mL) 果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准品的TIC总离子流色谱图。

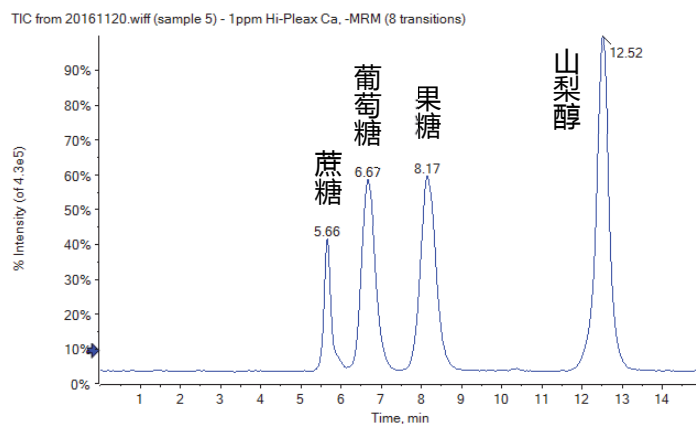


图1. 1 ppm (µg/mL) 果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准品用Hi-Plex Ca柱测试的TIC总离子流色谱图。

实验中也测试了液质色谱柱Phenomenex Luna NH₂, 3 µm, 150 × 2 mm, 该色谱柱也能得到较好的峰形, 但整体灵敏度比Hi-Plex Ca糖柱低一半, 图2为1 ppm (ng/mL) 果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准品用Luna NH₂柱测试的XIC提取离子流色谱图。如若没有专门的糖柱也可以使用此款氨基柱做可溶性糖的分析。

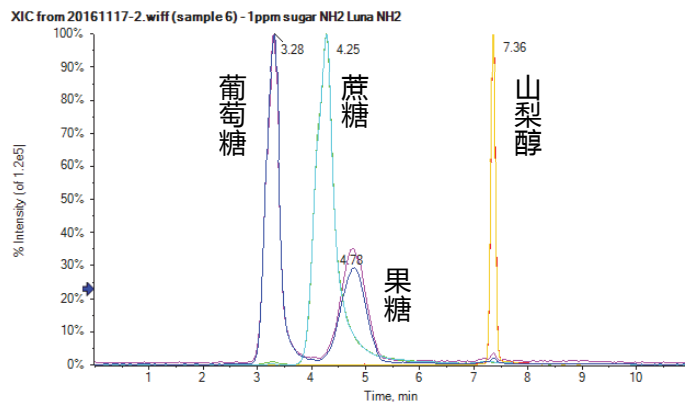


图2. 1 ppm (µg/mL) 果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准品用Luna NH₂柱测试的XIC提取离子流色谱图。

2、质谱条件的选择

糖类化合物分子中只含有C、H、O原子, 极性中等, 适合用APCI源分析, 而结构中含有-OH羟基, 更容易失去H形成[M-H]⁻脱氢离子, 但糖类的热稳定性不好, 高温下易分解和碳化, 因此最终优化后的质谱条件加热温度为400°C。

3、样品提取条件的优化

本实验中样品提取过程基于以前使用液相检测时的灵敏度而开发，因此在使用80%乙醇水对样品提取之后，通过旋转蒸发再用纯水复溶的过程将80%乙醇水溶剂替换成纯水。

而采用液质联用技术方法检测灵敏度比液相提高1000倍以上，样品浓度无需过高，因此在原有的提取步骤之后，只需用纯水将样品稀释10倍以上，过滤膜即可上机测试。既可以降低样品的基质效应，又大大缩短了样品前处理所需时间。

4、线性范围

用纯水逐级稀释果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇标准工作溶液至50ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 μg/mL、5 μg/mL 和 10 μg/mL，分别进样，以峰面积对浓度做标准曲线。图3、图4、图5、图6为四种糖的线性范围及线性相关系数R。

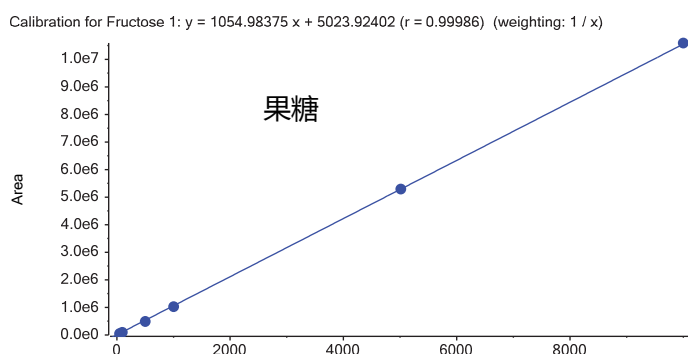


图3. 果糖标准曲线，线性范围50 ng/mL ~ 10 μg/mL，线性回归系数 $r=0.99986$ 。

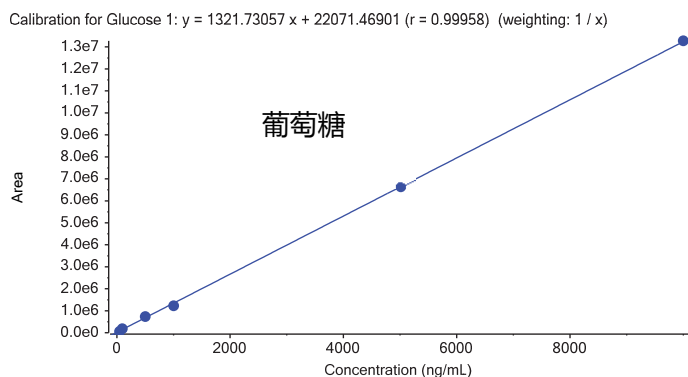


图4. 葡萄糖标准曲线，线性范围50ng/mL ~ 10 μg/mL，线性回归系数 $r=0.99958$ 。

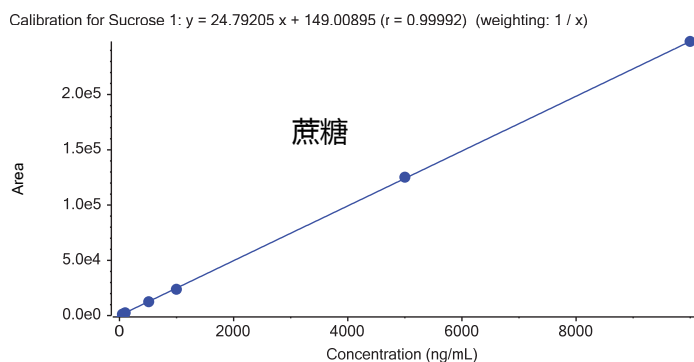


图5. 蔗糖标准曲线，线性范围50ng/mL ~ 10 μg/mL，线性回归系数 $r=0.99987$ 。

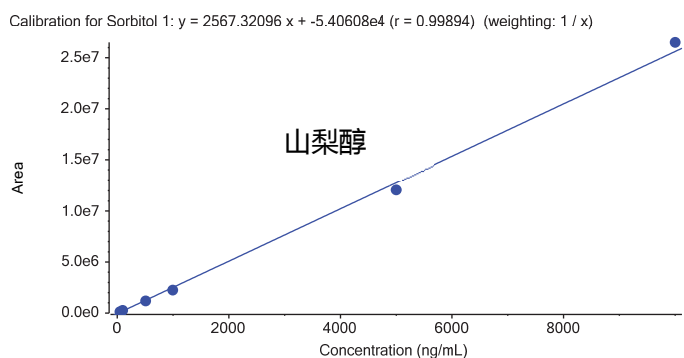


图6. 山梨醇标准曲线，线性范围50ng/mL ~ 10 μg/mL，线性回归系数 $r=0.99894$ 。

5、定量限

计算50 ng/mL 果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇的信噪比。图7为每个化合物的信号和噪音的峰峰比计算值。

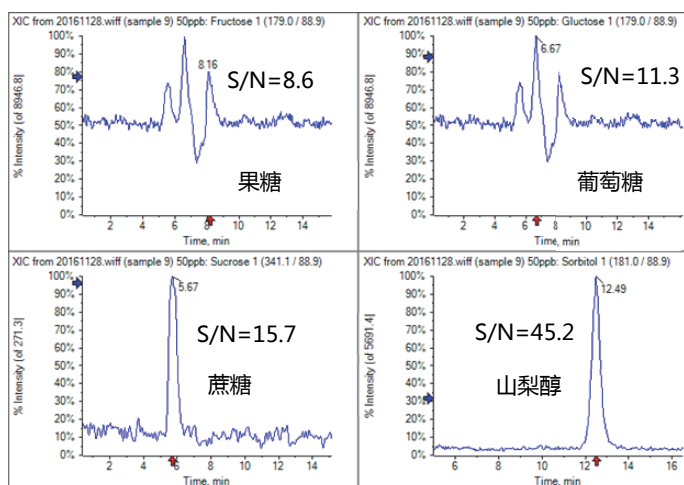


图7. 50 ng/mL 果糖S/N=8.6；50 ng/mL 葡萄糖S/N=11.3；50 ng/mL 蔗糖S/N=15.7；50 ng/mL 山梨醇S/N=45.2。

从信噪比计算值推测，果糖和葡萄糖的定量限为50 ng/mL；蔗糖定量限低于50 ng/mL，约为30 ng/mL；山梨醇定量限约为10ng/mL。

6、样品结果

实验中的砀山酥梨采集于南京农业大学江浦园艺实验站，经过特殊的栽培处理条件，采集处理后1h、5h、9h、13h、17h和21h（小时）6个时间点的样品，分别以S-1、S-2、S-3、S-4、S-5和S-6表示，每个样品平行处理2次，纯水稀释1000倍上机测试，取两次测试结果的平均值，得到样品中果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇的含量结果，如表2。

表2. 样品中果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇的含量

浓度 (ng/mL)	果糖	葡萄糖	蔗糖	山梨醇
S-1 (1h)	330	248	202	1015
S-2 (5h)	391	264	229	1121
S-3 (9h)	486	280	276	1230
S-4 (13h)	2076	1191	1394	5385
S-5 (17h)	4897	2679	2836	12990
S-6 (21h)	4300	2542	1378	9021

从测试结果发现随着栽培处理时间的增长，梨样品中4种糖的含量也在逐渐增大，S-5样品即栽培处理经17小时梨样品中四种糖含量达到了最大值，到21小时梨中的含糖量开始下降。比较砀山酥梨S-5样品中四种糖的含量，发现山梨醇的含量最高，是果糖含量的2.5倍，是葡萄糖和蔗糖的约5倍。山梨醇甜度与葡萄糖相当，但能给人以浓厚感，在梨、桃、苹果中广泛分布，在人体内不转化为葡萄糖，不受胰岛素的控制，适合糖尿病人使用。

以S-5样品为例，按照前处理的称样量推算，假设一个砀山酥梨质量为500 g，去皮去核净重约400 g，那么吃一个梨摄入的糖量为果糖12g、葡萄糖7g、蔗糖7g、山梨醇32g。但如果以S-1样品为例，吃一个梨所摄入的糖量每种都不足S-5样品的十分之一。可见不同的栽培处理条件对于水果中糖分的积累影响非常之大。本实验样品与市售水果差异较大，实验结果仅供科研，不能作为日常饮食参考。

总结

本实验通过SCIEX LC-MS/MS技术同时检测了果糖、葡萄糖、蔗糖和山梨醇四种可溶性糖，实验中测试了不同的色谱柱对灵敏度的影响，最终选择了HPLC糖柱来分析。利用了SCIEX Turbo V™离子源强大的耐高流速的特点，在SCIEX Triple Quad™ 4500系统上直接使用了HPLC色谱条件，100%纯水1mL/min流速下做液质分析，依然得到了良好的检测灵敏度。方法的定量限≤50ng/mL。

以砀山酥梨为样品进行了可溶性糖的提取前处理，用该液质方法进行糖含量检测，检测结果显示经过不同时间的栽培处理梨中糖分含量差异很大，以含糖量最高时的梨样品为例，推算出此时1个梨果实中约含果糖12g、葡萄糖7g、蔗糖7g、山梨醇32g。

SCIEX LC-MS/MS系统具有稳定耐用易维护，灵敏度高和重现性好等特点，Turbo V™离子源技术使质谱检测耐受不同的液相流速，方法建立和开发更加简便，即使是HPLC的高流速纯水方法依然能够得到很好的检测效果。

Answers for Science. Knowledge for Life.™

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2017 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-7032-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-24197200
传真：021-24197333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-85100200
传真：020-38760835

微博：@SCIEX