

# 水果中有机酸及小分子糖类成分 液相色谱测定研究进展

陈山乔, 陈惠云, 孙志栋, 史婷婷, 杨萌, 张洪芹  
(宁波市农业科学研究院, 浙江宁波 315040)

**摘要:** 有机酸、单糖和小分子寡糖作为水果中酸味和甜味的主要呈味物质, 是水果采后保质减损研究中的重要指标, 而且有机酸和小分子糖类可用于表征水果在采后贮藏过程中的生理变化特征。有机酸和小分子糖在水果保鲜的研究中受到了广泛的关注。广义的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对于水果中有机酸和小分子糖的化学分析具有定量准确, 分析快速, 过程易于自动化等优点, 已经成为了主流的有机酸和小分子糖检测方法之一。本文就水果保鲜贮藏研究中 HPLC 测定有机酸和小分子糖的方法的诸多特点, 包括有机溶剂和固相萃取在样品前处理中的应用; 固定相填料在普适性和为特定种类化合物分析的特化; 根据分析物光谱性质进行检测器选择的指导方法, 进行了综述与展望。

**关键词:** 高效液相色谱 (HPLC); 有机酸; 单糖; 寡糖; 水果

文章编号: 1673-9078(2018)09-298-309

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.42

## Current Development in Analytical Methods for Organic Acids, Monosaccharides and Oligosaccharides in Fruits: A Review

CHEN Shan-qiao, CHEN Hui-yun, SUN Zhi-dong, SHI Ting-ting, YANG Meng, ZHANG Hong-qin  
(Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China)

**Abstract:** As the major flavor substances in fruit products, the contents of organic acids, monosaccharides and oligosaccharides are critical indexes in postharvest preservation. The physiological features of fruits in postharvest can be presented by contents of organic acids and small-molecular sugars. These substances had been emphatically concentrated in postharvest investigation. Due to the high efficiency and accessibility to automatic analysis, high performance liquid chromatography (HPLC) has occupied the mainstream of analytical methods for organic acids and small-molecular sugars. This review article summarized the features including: the introducing of organic solvent and solid phase extraction (SPE) in pretreatment; universal and specialized packing materials as stationary phase; selecting of detector according to spectrometry properties of analytes, of HPLC based analytical methods for organic acids and small-molecular sugars in the investigations about postharvest preservation of fruits.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); organic acid; monosaccharide; oligosaccharide; fruit

水果在我国农业产业中占有重要地位, 预计在 2017 年的水果总产量能够达到 279.4 万吨<sup>[1]</sup>。而与之相悖的是, 我国在农产品, 特别是容易变质的水果产品, 在贮藏流通环节中易造成产品的严重损耗。水果在采收后的相当长一段时间内, 依然保有活力并且进行着生理活动, 但是由于其营养和水分的供应基本上被切断, 所以水果有着独特的采后贮藏生理变化特性。

收稿日期: 2018-03-14

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2015BAD16B03); 宁波市公益类重大专项 (2016G11009)

作者简介: 陈山乔 (1987-), 男, 博士, 工程师, 研究方向: 食品加工与贮藏

通讯作者: 孙志栋 (1962-), 男, 教授级高工, 研究方向: 食品与生物工程

有机酸和糖类物质与水果在采后贮藏过程中的品质下降有着密切的关系, 这不仅是因为这些化合物是水果中主要的呈味物质<sup>[2]</sup>, 还在于水果的采后生理活动都有这两类物质的参与<sup>[3]</sup>。特别是随着化学计量学和系统生物学的发展, 结合通路数据库, 化合物定量分析能够对水果在贮藏中的生理变化特征有更深入的阐述。所以有机酸和糖类的测定对于研究水果贮藏保鲜至关重要。

定性和定量分析是对水果中有机酸和糖类研究的最初也是最重要的步骤之一。研究者们从很早开始就对食品基质中有机酸和糖类的分析表现出了兴趣, 其中分析化学家协会 (AOAC) 早在 1932 年<sup>[4]</sup>和 1936 年<sup>[5]</sup>分别刊发了食品中有机酸和单糖的官方测试方

法。由于常规的化学分析方法干扰严重,并且无法同时测定多个化合物等缺陷<sup>[6]</sup>,所以基于色谱法的有机酸和小分子糖类分析方法受到了越来越多的关注。薄层色谱<sup>[7]</sup>和气相色谱<sup>[8]</sup>等方法相继被运用其中,但是由于定量能力不足,以及衍生化过程中分析物产生的变构、分解导致误差加剧<sup>[9]</sup>等缺陷,使得高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的应用更显优势。而随着质谱离子源技术的发展,液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)的普遍应用,更是补足了HPLC的不足以及进一步发挥了其长处。基于此,本文对广义HPLC<sup>[10]</sup>测定有机酸、小分子糖类在水果保鲜研究中的应用进行了综述和展望。

## 1 水果中测定有机酸的HPLC和LC-MS方法

### 1.1 有机酸测定中的前处理

由于大多数水果的含水量高,除了少数种类外,普遍油脂含量较低,如表1所示,水果中使用HPLC法测定有机酸的流程中,前处理的方法相对简便。但是考虑色谱的分离效果,以及仪器的维护和耗材寿命,前处理相当重要。水或者水和有机溶剂混合溶液萃取是最常用的提取方法。例如《GB 5009.157-2016 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定》<sup>[11]</sup>和《AOAC Official Method 986.13 Quinic, Malic, and Citric Acids in Cranberry Juice Cocktail and Apple Juice》<sup>[12]</sup>选用了水提作为通用的有机酸提取方法,而D'Urso等<sup>[13]</sup>使用了4倍体积甲醇对野草莓(*Fragaria vesca*)进行了24h的提取。Souza等<sup>[14]</sup>运用10倍体积甲醇对番樱桃进行了24h的提取。为了增加萃取效率,通常会使用超声波对水果如覆盆子<sup>[15]</sup>和橄榄<sup>[16]</sup>进行辅助提取。由于直接水提取的方法会将有机酸以外的其他亲水性分子如蛋白质和多糖,带入提取溶液中,所以为了提高分析方法的专属性以及色谱柱维护考虑,水提方法通常会配合固相萃取(solid phase extraction, SPE)来去除杂质分子<sup>[12,17]</sup>,如Españ等<sup>[17]</sup>对桃汁进行了SPE净化后,能够直接进样分析。由于有机酸是含有羧基的酸性化合物,所以在有机溶剂萃取的过程中会将萃取溶剂酸化,使有机酸以小极性形态进入有机相以提高萃取效率<sup>[13,18,19]</sup>,如Urso等<sup>[13]</sup>使用了甲酸对提取溶剂进行了酸化,而Parets等<sup>[19]</sup>选择了盐酸对由水和丙酮组成的提取溶剂进行酸化,对蔓越橘中的有机酸进行了提取。综上所述,由表1中归纳所得,面向于最大范围的水果或食品基质的权威检测标准,更倾向于纯水提取以达到最大的普适性。相反的,针对于某一特

定水果的研究性论文所报道的提取方法,通常会根据具体的研究对象,使用不同的溶剂体系,以及超声,酸化等辅助手段。

### 1.2 有机酸的HPLC分离

目前已经有多种适用于甚至专门针对于水果中有机酸分离的HPLC柱产品,按照其填料类型和分离原理,可以分为反相(reverse phase, RP),亲水作用力(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)(其中包括氨基键合填料)以及离子色谱(ion chromatography, IC)填料。

有机酸在一定酸度环境下能够在离子形态和分子形态间相互转换,所以在色谱分配上有着较宽的极性适用度,因此RP-HPLC特别是以C18为键合基团的色谱柱填料有着很广泛的应用。值得一提的是最新的国家标准《GB 5009.157-2016 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定》<sup>[11]</sup>和AOAC发布的官方检测方法《AOAC Official Method 986.13 Quinic, Malic, and Citric Acids in Cranberry Juice Cocktail and Apple Juice》<sup>[12]</sup>都选择了使用C18键合的RP-HPLC进行了有机酸的分离。除此以外,也有为有机酸分离所特别优化的反相色谱柱被应用于水果的研究<sup>[13]</sup>,如刘晓雪等<sup>[20]</sup>使用了T3色谱柱对橘子和树莓中的有机酸进行了分离。这类经过了末端封闭或者担体加固的色谱柱,能够耐受高酸度和纯水流动相,为有机酸在固定相和流动相间提供了足够大的分配系数差异从而进一步提高分离效果。其中有研究<sup>[20]</sup>对多种不同填料的色谱柱在有机酸分析中的效果进行了评价和比较,发现特别优化的反相柱拥有最好的分离效果。而传统的C8填料,在苹果和柠檬的有机酸分析中,也有见诸报道<sup>[21]</sup>。

除了RP-HPLC外,属于广义HPLC<sup>[10]</sup>的IC也在水果中有机酸的分离中有着一定的应用。其中现行有效的两部农业部标准《NY/T 2277-2012 水果蔬菜中有机酸和阴离子的测定 离子色谱法》<sup>[22]</sup>和《NY/T 2796-2015 水果中有机酸的测定 离子色谱法》<sup>[23]</sup>分别采用了高效离子交换色谱(high performance anion/cation exchange chromatography, HPAEC/CEC)法和高效离子排斥色谱法(high performance ion exclusion chromatography, HPIEC)作为有机酸的分离方法。而离子色谱在研究性论文中的运用则相对较少,例如Schouten等<sup>[3]</sup>使用HPIEC法对番茄汁中苹果酸和柠檬酸进行了分离。除了离子色谱在耗材成本和普适性上均劣于反相色谱外,水果中除了有机酸外,还富含如氨基酸,糖醛酸,矿物质盐等其他离子容易对检测产生干扰也是其在水果有机酸分析中受到限制的可

能原因。然而得益于离子色谱在分离离子化合物时良好的分辨率，在分析标准中，离子色谱依然不失为一种实用的方法。

由于有机酸作为亲水性化合物，所以 Hilic 色谱也被成功应用于分离中<sup>[20,21,24]</sup>。但鉴于 Hilic 色谱的分离效率以及柱流失的问题<sup>[25]</sup>，这在水果有机酸的分析中运用并不广泛。

如表 1 所示，RP-HPLC 法和 IC 法是最主流的有机酸分离方法，两者皆有被正式公布的官方检测标准所选用，其中引用 RP 分离模式的文献占据了最大的数量，虽然 RP 色谱在有机酸的分离中存在着专属性不高等缺点，但是通过下述的质谱检测器的补足，此类方法在研究领域中拥有最广泛的应用。在使用非质谱检测器的分析方法中，HPIEC 法通常有着更高的灵敏度和分辨率<sup>[26]</sup>。Hilic 色谱由于上述的柱流失原因造成的重现性下降<sup>[25]</sup>，使用并不广泛，但如果借助 LC-MS 的定性能力，在一定程度上能够克服这个缺陷。

### 1.3 有机酸的 HPLC 分析法中的检测器

由于大多数有机酸有紫外吸收，所以广义的紫外检测器包括紫外-可见检测器 (UV-VIS)，和光电二极管阵列检测器 (diode array detector, DAD) 在反相色谱分离时应用广泛，其中包括上述的国家和国际标准<sup>[11,12]</sup>。为了能够尽量多的覆盖到各种有机酸的紫外吸收，检测波长通常被设置为末端吸收的 210 nm 附近<sup>[15,18,27]</sup>，而对于一些在特定波长有强吸收的有机酸，也有研究会针对性地设置检测波长，如 Shwartz 等<sup>[24]</sup>设置 254 nm 对石榴中的抗坏血酸进行了检测。此外在 IC 和 Hilic 分离之后紫外检测器也常常被使用到<sup>[28]</sup>。经过表 1 中检测方法的汇总比较，可见虽然紫外检测器的应用广泛，然而其精密度和检测限 (LOD) 以及 (LOQ) 相比于其他检测器，特别是质谱检测器，存在很大劣势。

在基于 IC 的检测中，除了 UV 外，电化学检测器 (electrochemical detect, ECD)<sup>[3]</sup>及其子集电导检测器 (conductivity detector, CD)<sup>[22]</sup>也有运用。而且得益于 CD 的高灵敏度以及和 IC 的高契合度，农业部的推荐标准，《NY/T 2277-2012 水果蔬菜中有机酸和阴离子的测定 离子色谱法》<sup>[22]</sup>和《NY/T 2796-2015 水果中有机酸的测定 离子色谱法》<sup>[23]</sup>，选用了 CD 作为检测方法。如表 1 所示，ECD 检测器在灵敏度上达到了质谱的水平，然而考虑适用范围的原因，ECD 类检

测器的使用更加侧重在有机酸检测标准中。

随着离子源技术的发展，各种类型的质谱检测器 (mass spectrometry detector, MSD) 逐渐进入研究者的视野中。LC-MS 将质谱 (mass spectrometry, MS) 直接作为 HPLC 的检测器，结合了 HPLC 的高分离能力和 MS 的高灵敏度、高分辨率以及高定性能力，具有远胜于常规 HPLC 的分析能力。由于前述的紫外检测器通常设置的波长靠近末端吸收，对检测带来了巨大的干扰，所以 RP-HPLC 分析水果有机酸时，MSD 成为极其优秀的检测器。关于 RP-HPLC-MS 的研究，有着大量的报道。

作为最常规的有机质谱离子源，水果有机酸的分析中，电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI) 占据了主流地位，但是其他类型的离子源，例如大气压光化学离子源 (atmospheric pressure photoionization source, APPI)<sup>[19]</sup>也有文献报道。由于有机酸拥有解离出 H<sup>+</sup>成为酸根负离子的能力，本综述所引用的所有文献报道中，对有机酸的检测，均选择负离子模式。和离子源的选择不同，质量分析器在选择上呈现了更大的多样化，如三重四级杆 (triple quadrupole detector, TQD)<sup>[13,20,21]</sup>，离子阱 (ion trap, IT)<sup>[19,29]</sup>以及高精度的轨道阱质谱 (orbitrap)<sup>[13]</sup>。得益于 MSD 能够有效检测色谱端的共流出被分析物，所以 LC-MS 法检测中，常规的 C18 也能有很好的分析效果<sup>[13,14,17,19,20,29]</sup>。Hilic 柱在搭配 MSD 检测时，由于 MSD 的定性能力，对柱流失造成的保留时间偏移有着更高的纠正能力<sup>[21]</sup>。虽然 LC-MS 有着诸多优点，但是其普及还面临着很多问题，首当其冲的便是其高昂的设备价格和运维成本，以及对操作人员有着更高的培训要求，这可能就是有机酸检测标准中没有选用 LC-MS 方法的原因。

综上所述，UV-VIS 和 DAD 这两种基于化合物的紫外吸收特性的检测器有最低的成本以及无损检测的优点，除了有单独的广泛应用外，还常常和 MSD 联用以对 LC-MS 的检测形成补充。MSD 由于离子抑制的原因，通常搭配 RP-HPLC 或者 Hilic-HPLC 使用。特别是 Hilic，如前述，MSD 的定性能力能够对保留时间偏移进行纠正。同时，MSD 的检出限和精密度都比常规的检测器更高。然而运维成本一直是其固有缺陷。而 CD 和 ECD 通常与 IC 结合使用，其中原因除了 IC 的流动相对此类检测器干扰最小外，成熟的商业解决方案的存在也是原因之一。

表1 水果中有机酸高效液相色谱法检测文献汇总

Table 1 Summary of collected references reporting organic acid evaluation by HPLC

| 基质          | 分析物  | 前处理           | 色谱柱   | 流动相                     | 检测器类型 | 检测器和参数          | 方法学评价  | 文献性质 | 引用   |
|-------------|--|---------------|-------|-------------------------|-------|-----------------|--|------|------|
| 混合蔓越橘汁, 苹果汁 | 奎尼酸, 苹果酸, 柠檬酸  | SPE           | RP    | 磷酸缓冲液, 等度               | 光谱    | UV, 214 nm      | 未报道  | 标准   | [12] |
| 柑橘汁, 番石榴汁   | 抗坏血酸, 异抗坏血酸  | EDTA+偏磷酸水溶液提取 | RP    | 0.01%~0.2%甲酸, 等度        | 质谱    | ESI-, IT        | LOQ*=1.8 µg/mL, LOD**=0.6 µg/mL  | 研究论文 | [29] |
| 番樱桃         | 奎尼酸, 没食子酸, 绿原酸, 咖啡酸, 丁香酸, 香豆酸, 阿魏酸                           | 甲醇提取          | RP    | 甲醇+水, 梯度                | 质谱    | ESI-, Q-TOF     | 未报道  | 研究论文 | [14] |
| 野草莓         | 没食子酸, 香豆酸  | 甲酸+甲醇         | RP    | 甲酸水+乙腈, 梯度              | 质谱    | ESI-, orbitrap  | 没食子酸: $r^2=0.9982$ , LOD=0.030 mg/mL, LOQ=0.090 mg/mL, 批内精密度#=3.43%, 批间精密度#=3.56%<br>香豆酸: $r^2=0.9998$ , LOD=0.005 mg/mL, LOQ=0.009 mg/mL, 批内精密度#=1.01%, 批间精密度#=1.97%  | 研究论文 | [13] |
| 蔓越橘         | 没食子酸, 尿黑酸, 原儿茶酸, 龙胆酸, 水杨酸, 绿原酸, 香草酸, 咖啡酸, 丁香酸, 香豆酸, 阿魏酸, 芥子酸 | 丙酮+水+盐酸, 超声   | RP    | 甲酸水+甲醇, 梯度              | 质谱    | APPI, ESI-, TQD | LOD=0.5~75 µg/kg, LOQ=2~247 µg/kg, 精密度=2.2%~11.2%, 精确度#=2.5%~11.2%   | 研究论文 | [19] |
| 桃           | 葡萄糖酸, 草酸, 苹果酸, 柠檬酸, 富马酸                                      | SPE           | RP    | 0.1%水溶液+甲醇, 梯度          | 质谱    | ESI-, TQD       | 葡萄糖酸: $r^2=0.9955$ , LOD=0.05 µg/mL, LOQ=0.08 µg/mL<br>草酸: $r^2=0.9979$ , LOD=0.83 µg/mL, LOQ=0.96 µg/mL<br>苹果酸: $r^2=0.9937$ , LOD=0.12µg/mL, LOQ=0.36 µg/mL<br>柠檬酸: $r^2=0.9968$ , LOD=0.15 µg/mL, LOQ=0.41 µg/mL<br>葡萄糖酸: $r^2=0.9983$ , LOD=0.10 µg/mL, LOQ=0.32 µg/mL | 研究论文 | [17] |
| 番茄          | 苹果酸, 柠檬酸, 丙二酸, 马来酸   | 75%乙醇提取       | 阴离子交换 | 1~60 mM NaOH 溶液, 梯度     | 电化学   | CD              | 未报道  | 研究论文 | [3]  |
| 石榴          | 抗坏血酸   | 水提取           | Hilic | 0.1%磷酸, 等度              | 光谱    | UV, 254 nm      | 未报道  | 研究论文 | [24] |
| 杨桃          | 草酸, 酒石酸, 丙酮酸, 苹果酸, 抗坏血酸, 柠檬酸                                 | 磷酸二氢钾+甲醇提取    | RP    | 磷酸二氢钾 (pH=3) +1% 甲醇, 等度 | 光谱    | DAD, 215 nm     | 检出限=0.5~4.5 mg/L   | 学位论文 | [18] |

转下页

接上页

|                     |   |              |           |                      |        |                            |  |           |
|---------------------|---|--------------|-----------|----------------------|--------|----------------------------|--|-----------|
| 柑橘, 树莓              | 富马酸, 马来酸, 琥珀酸, 苹果酸, 酒石酸, 柠檬酸                  | 乙醇水提取, SPE   | RP, Hilic | 0.1%加酸水+0.1%甲酸乙腈, 梯度 | 质谱     | ESI-, TQD                  | 检出限=0.02~0.05 $\mu\text{g/mL}$ , 定量限=0.1~0.25 $\mu\text{g/m}$  | 学位论文 [20] |
| 苹果                  | 柠檬酸, 酒石酸, 苹果酸, 琥珀酸, 乙酸, 草酸                    | 水提, 超声波      | HPIEC     | 硫酸溶液                 | 光谱     | UV, 210nm                  | 精密度=0.10%~1.59%, 重现性=1.79%~4.26%, 回收率=91.05%~105.18%   | 研究论文 [30] |
| 橄榄                  | 山楂酸, 桦木酸, 齐墩果酸, 乌苏酸                           | 乙醇提取, 超声波    | RP        | 甲酸水铵溶液+乙腈/甲醇, 等度     | 光谱, 质谱 | DAD, 210nm, ESI-, IT, QTOF | DAD: LOD=83~600 $\mu\text{g/mL}$ , 批间精密度=2.6%~10.8%<br>ESI-IT:LOD=3~455 $\mu\text{g/mL}$ , 批间精密度=3.4%~6.3% | 研究论文 [16] |
| 甜橙, 柠檬, 酸橙, 葡萄柚, 苹果 | 草酸, 酒石酸, 苹果酸, 乳酸, 抗坏血酸, 柠檬酸                   | 水提取          | RP        | 磷酸缓冲液+乙腈, 等度         | 光谱     | UV, 254nm, 214nm           | 检测限=0.1~8 mg/L   | 研究论文 [31] |
| 树莓                  | 草酸, 酒石酸, 抗坏血酸, 苹果酸, 柠檬酸                       | 水提取, 超声波     | Hilic     | 硫酸溶液                 | 光谱     | DAD, 210nm                 | 精密度=0.18%~0.9%, 回收率=97.86%~102.35%   | 研究论文 [15] |
| 枇杷                  | 草酸, 酒石酸, 苹果酸, 抗坏血酸, 乳酸, 乙酸, 柠檬酸, 琥珀酸, 富马酸     | 水提取, 超声波     | RP        | 磷酸缓冲液, 等度            | 光谱     | UV, 215nm                  | $r^2=0.99987\sim0.99999$   | 学位论文 [28] |
| 荔枝                  | 草酸, 酒石酸, 丙酮酸, 苹果酸, 莽草酸, 乳酸, 乙酸, 富马酸, 柠檬酸, 琥珀酸 | 水提取, 超声波     | RP        | 磷酸缓冲液, 等度            | 光谱     | UV, 213nm                  | 检出限=0.01~0.50 mg/L, 精密度=0.78%~1.54%  | 研究论文 [27] |
| 苹果汁, 柠檬汁            | 吡啶乙酸, 吡啶丁酸, 脱落酸, 奈乙酸                          | 甲醇+乙腈+水+甲酸提取 | RP        | 甲醇+水, 等度             | 光谱     | UV, 280nm                  | 检出限=0.05~0.1 $\mu\text{g/mL}$  | 学位论文 [21] |
| 食品                  | 酒石酸, 乳酸, 苹果酸, 柠檬酸, 丁二酸, 富马酸, 己二酸              | 水提取, SPE     | RP        | 磷酸缓冲液+水, 等度          | 光谱     | UV, 210nm                  | LOQ=1.25~2500 mg/kg  | 标准 [11]   |
| 水果, 蔬菜              | 山梨酸, 苯甲酸, 苹果酸, 琥珀酸, 柠檬酸                       | 水提取, 超声波     | HPAEC     | 氢氧化钾溶液, 梯度           | 电化学    | CD                         | 检出限=2.0~9.0 mg/kg  | 标准 [22]   |
| 新鲜水果                | 柠檬酸, 苹果酸, 酒石酸, 琥珀酸                            | 乙醇溶液提取, 超声波  | HPIEC     | 硫酸溶液                 | 电化学    | CD                         | 检出限=0.006 g/kg   | 标准 [23]   |

注: \*检测限; \*\*定量限; #以相对标准偏差 (RSD) 表示。

表2 水果中小分子糖高效液相色谱法检测文献汇总

Table 2 Summary of collected references reporting small-molecular saccharides evaluation by HPLC

| 基质                                 | 分析物  | 前处理                     | 色谱柱             | 流动相                                   | 检测器类型          | 检测器和参数                                 | 方法学评价   | 文献性质 | 引用   |
|------------------------------------|--|-------------------------|-----------------|---------------------------------------|----------------|--|---|------|------|
| 可可制品                               | 果糖, 鼠李糖, 阿拉伯糖, 半乳糖, 葡萄糖, 木糖, 甘露糖, 果糖, 半乳糖醛酸    | 甲醇水溶液提取, 盐酸/TFA 酸水解     | HPAEC           | NaOH 溶液, 梯度                           | 电化学            | PAD                                    | 回收率=47.17%~194.2%   | 研究论文 | [32] |
| 香蕉                                 | 果糖, 阿拉伯糖, 鼠李糖, 半乳糖, 葡萄糖, 木糖, 甘露糖               | 丙酮净化, TFA 水解/<br>胃蛋白酶水解 | HPAEC           | NaOH 溶液, 等度                           | 电化学            | PAD                                    | 未报道   | 研究论文 | [38] |
| 香蕉                                 | 葡萄糖, 果糖, 蔗糖                                    | 乙醇水溶液提取                 | HPAEC           | 乙酸钠溶液, 梯度                             | 电化学            | PAD                                    | 未报道   | 研究论文 | [42] |
| 椰枣                                 | 葡萄糖, 果糖, 蔗糖, 蔗果三糖, 蔗果四糖                        | 乙醇提取, 乙酸铅净化             | Hilic           | 甲酸水+乙腈, 梯度                            | 质谱             | ESI-, TQD                              | LOD=0.25~0.69 µg/mL,<br>LOQ=0.99~2.38 µg/mL,<br>重现性=0.73%~1.32%         | 研究论文 | [43] |
| 新鲜甘蔗                               | 葡萄糖, 果糖  | 水提取                     | HPAEC           | NaOH 溶液, 等度                           | 电化学            | PAD                                    | 精密度=5%  | 标准   | [50] |
| 番茄                                 | 蔗糖, 果糖   | 丙酮净化                    | Hilic           | 乙腈+水, 等度                              | 光学             | RI                                     | 未报道   | 研究论文 | [2]  |
| 沙棘, 宁夏枸杞, 黑果枸杞, 白刺                 | 甘露糖, 鼠李糖, 葡萄糖醛酸, 半乳糖醛酸, 葡萄糖, 半乳糖, 木糖, 阿拉伯糖     | TFA 水解, PMP 衍生化         | RP              | 磷酸缓冲液+乙腈                              | 光谱             | UV, 245 nm                             | 未报道   | 研究论文 | [33] |
| 蔷薇果                                | 鼠李糖, 半乳糖, 阿拉伯糖, 葡萄糖, 甘露糖, 果糖, 木糖, 半乳糖醛酸, 葡萄糖醛酸 | TFA 水解,                 | Hilic,<br>HPAEC | Hilic: 甲酸铵溶液+<br>乙腈。HPAEC:<br>NaOH 溶液 | 光学, 质谱,<br>电化学 | Hilic: ELSD,<br>ESI-, IT<br>HPAEC: PAD | 未报道   | 研究论文 | [34] |
| 甜瓜, 葡萄, 西瓜, 樱桃, 芒果, 桃, 草莓, 猕猴桃, 金橘 | 果糖, 半乳糖, 葡萄糖, 蔗糖, 乳糖, 麦芽糖, 棉子糖                 | 乙醇水提取, 超声波              | Hilic           | 水+乙腈                                  | 光学             | ELSD                                   | 未报道   | 研究论文 | [44] |
| 石榴                                 | 葡萄糖, 果糖  | 水提取                     | Hilic           | 0.1% 磷酸, 等度                           | 光谱             | UV, 254 nm                             | 未报道   | 研究论文 | [24] |
| 核桃                                 | 蔗糖, 葡萄糖, 果糖, 麦芽糖, 山梨糖醇                         | 庚烷+乙醇提取, 超声波            | HPAEC           | NaOH 溶液+乙酸<br>钠溶液, 梯度                 | 电化学            | PAD                                    | LOD=0.056~0.294<br>ng/mL,<br>LOQ=0.168~0.759<br>ng/mL, 回收率<br>=93%~109% | 研究论文 | [45] |
| 金橘                                 | 半乳糖, 葡萄糖, 半乳糖醛酸, 鼠李糖, 甘露糖                      | TFA 酸水解                 | Hilic           | 水+乙腈, 等度                              | 光学             | RI                                     | 未报道   | 研究论文 | [35] |

转下页

接上页

|     |  |                          |       |          |        |                  |   |      |      |
|-----|--|--------------------------|-------|----------|--------|------------------|---|------|------|
| 红枣  | 葡萄糖, 果糖, 甘露糖, 半乳糖, 鼠李糖, 木糖, 阿拉伯糖, 半乳糖醛酸, 蔗糖, 棉子糖, 水苏糖, 岩藻糖, 蔗果三糖, 蔗果四糖 | 乙醇水提取, 超声波               | 配体交换  | 水        | 质谱     | ESI+, IT         | 精密度=0.52%~8.33%                           | 学位论文 | [53] |
| 杨桃  | 葡萄糖, 果糖, 蔗糖  | 乙醇水提取                    | HPCEC | 水        | 光学     | RI               | 检出限=0.05 mg/L                             | 学位论文 | [18] |
| 葡萄  | 葡萄糖, 果糖  | 水提取                      | Hilic | 乙腈+水, 等度 | 光学     | RI               | 精密度=0.52%~1.22%,<br>回收率=99.81%~100.4%     | 研究论文 | [39] |
| 火龙果 | 甘露糖, 鼠李糖, 葡萄糖, 乳糖, 半乳糖, 阿拉伯糖   | 水提取, SPE, TFA 水解, PMP 衍生 | RP    | 乙腈+水, 等度 | 光谱     | DAD, 245 nm      | 未报道                                       | 研究论文 | [36] |
| 枇杷  | 果糖, 葡萄糖, 麦芽糖   | 乙醇水提取, 超声波               | Hilic | 乙腈+水, 等度 | 光学     | RI               | $r^2=0.99950\sim0.99960$                  | 学位论文 | [28] |
| 罗汉果 | 葡萄糖, 甘露糖, 果糖, 蔗糖, 棉籽糖  | 乙醇水提取, SPE, PMP 衍生       | RP    | 乙腈+水, 梯度 | 光谱, 光学 | UV, 245nm,<br>RI | 批内精密度<1.0%,<br>批间精密度<3%,<br>重现性=1.5%~3.0% | 研究论文 | [46] |
| 雪莲果 | 葡萄糖, 果糖, 蔗糖, 蔗果三糖, 蔗果四糖  | 乙腈水提取                    | Hilic | 乙腈+水, 等度 | 光学     | RI               | $r^2=0.9965\sim0.9995$                    | 研究论文 | [47] |
| 食品  | 果糖, 葡萄糖, 蔗糖, 麦芽糖, 乳糖   | 水提取, 乙酸锌-亚铁氰化钾净化         | Hilic | 乙腈+水, 等度 | 光学     | RI, ELSD         | 精密度<10%                                   | 标准   | [40] |

## 2 水果中测定小分子糖的 HPLC 和 LC-MS 方法

### 2.1 小分子糖测定中的前处理方法

水果中的小分子糖有两种存在形式,分别为组织中的游离糖,和多糖的组成部分。对于多糖中的单糖和寡糖单元,分析的前处理步骤之中需要将多糖水解,以得到游离状态的小分子糖。如表 2 所示,酸水解法是最常用的方法,其中三氟乙酸(TFA)<sup>[32-37]</sup>和盐酸(HCl)<sup>[32,38]</sup>都被用到。其中有研究<sup>[32]</sup>比较了 TFA 和 HCl 水解条件下单糖的回收率,发现在同样的水解参数下, TFA 的得率更高,但是单糖的分解依然存在。这一研究表明,在多糖水解的步骤中,条件的优化是至关重要的。另外,酶也被用于香蕉中多糖的水解<sup>[38]</sup>。

对于游离的小分子糖,水<sup>[39-41]</sup>和有机溶剂<sup>[13,18,24,42-47]</sup>提取是常用的前处理提取方法。与有机酸的前处理一样,超声波也能应用于辅助提取<sup>[40,41,44]</sup>。由于后述的小分子糖类的色谱分离经常会涉及到耐受性较低的色谱体系,所以对前处理过程中的净化除杂需要更高的要求。除了利用乙腈和甲醇等有机溶剂本身来进行蛋白质沉淀以外,乙酸铅<sup>[43]</sup>,铁氰化钾<sup>[40]</sup>和正丁醇<sup>[45]</sup>都有报道被用于蛋白质的脱除, SPE 也被使用来进行小分子糖类试样的净化<sup>[18,46]</sup>。在检测桃核中游离小分子糖类的研究<sup>[45]</sup>中庚烷和乙酸乙酯分别被用来进行脂质和酚类的脱除。

### 2.2 小分子糖类的 HPLC 分离

对水果中小分子糖类的广义 HPLC 分离,按照原理,和有机酸类似,可以分为 RP, Hilic 以及 IC。

小分子糖类作为多羟基化合物,拥有比较极端的亲水性,所以未经过衍生的小分子糖尚无 RP-HPLC 直接的分离的报道。但是经过 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生的小分子糖,由于极性的改变在反相填料上能够进行保留,所以经过 PMP 衍生步骤的小分子糖 HPLC 分析,大多选用成熟稳定的 C18 RP-HPLC<sup>[33,36,37,46]</sup>。

由于糖类的高亲水性, Hilic 是一种非常适合的色谱分离方法。除了常规的氨基柱和专用 Hilic 柱外,很多厂家都有推出为分离糖类针对性设计的 Hilic 原理色谱柱。无论是对于多糖的水解产物<sup>[34,35]</sup>还是组织中的游离糖<sup>[39,40,42,43,47]</sup>, Hilic 色谱都做到了成功的分离。其中国家标准《GB 5009.8-2016 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》<sup>[40]</sup>即选用了氨基柱进行单糖的分离。如表 2 所示, Hilic 色谱在研究中广泛用于小分子糖的分离,然而与其他

分离模式比较,汇总的文献中 Hilic 色谱能够同时检测的糖类较少,这可能是由于分离专属性不足所致。

IC,特别是高效离子交换色谱在水果小分子单糖的分析中也有着广泛的应用<sup>[32,34,41,42,45]</sup>。基于糖类分子在高碱性条件下能够转化为阴离子形态<sup>[48,49]</sup>,使用 IC 进行小分子糖分离时,必须选用强碱性流动相。其中 AOAC 官方分析方法《AOAC Official Method 2000.17 Determination of Trace Glucose and Fructose in Raw Cane Sugar》<sup>[50]</sup>将 HPAEC/CEC 定为果糖和葡萄糖的分离方法。

### 2.3 小分子糖的 HPLC 分析法中的检测器

由于大多数糖类分子在远离末端的波长下没有紫外吸收,所以对于未经衍生的小分子糖无法使用 UV-VIS 和 DAD 进行检测。对于经过 PMP 衍生后的糖分子,其在 245 nm 下有特征性的紫外吸收,所以对于 PMP 柱前衍生结合 RP-HPLC 分离的水果小分子糖类检测方法,均在 245 nm 下使用紫外检测器进行检测<sup>[33,36,37,46]</sup>。PMP 衍生既能使糖分子在反相固定相上得到保留,又能够使待分析物呈现紫外吸收,是一种低投入的高效分析方法。但是衍生化的过程往往会带来误差和额外的成本,而且只有还原性的糖才能被 PMP 衍生。

对于未衍生的水果小分子糖类,不依赖紫外吸收的检测器都有很好的表现。其中示差折光检测器(refractive index detector, RI)作为常见通用检测器,在小分子糖类的检测中应用广泛。而归纳比较收集到的文献发现,示差检测器在水果小分子糖类的分析中,都是配合 Hilic 色谱使用<sup>[2,35,39,42,47]</sup>。这可能是和 Hilic 分离过程中流动相组成较为简单,并且没有极端的酸碱度有关。由于 Hilic-HPLC 和高普及度的 RP-HPLC 差异仅仅在色谱柱和流动相组成上,不需要额外购置 HPLC 配件,所以 Hilic-RI 是很好的低成本水果小分子糖类分析手段。但是由于 RI 检测器的灵敏度低,并且无法使用梯度洗脱条件,使得研究者们对其他更高效的检测手段有着巨大的需求。

蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)是新一代的通用检测器。得益于其通过将待测分子以气态或气溶胶颗粒形态的散射光作为检测原理,ELSD 对没有发色基团的小分子糖类有着很好的适用性。其中前述的国家标准<sup>[40]</sup>将 ELSD 作为检测手段。和 RI 类似,使用 ELSD 的检测通常也会搭配 Hilic 分离进行<sup>[34,40,44]</sup>。这是因为 ELSD 的原理要求待测物质的挥发性必须低于流动相,并且流动相中需要尽量少的添加非挥发性物质所致<sup>[51]</sup>。相较于

RI, ELSD 在灵敏度和基线稳定性上有着更高的性能, 并且能够使用梯度洗脱模式, 但是 ELSD 除了较高的购置成本外, 在运行时需要额外的载气供应使得其并没有 RI 使用的广泛。

在结合 IC 分离小分子糖的研究中, 电化学检测器 (electrochemical detector, ECD) 特别是脉冲安培检测器 (pulsed amperometric detector, PAD) 得到了广泛的应用。例如前述的 AOAC 官方标准<sup>[50]</sup>就将 PAD 设为检测方法。整理文献发现, IC 和 PAD 通常都是配合使用<sup>[32,34,41,42,45,50]</sup>, 研究者们倾向于这种选择可能是由于在碳水化合物分析中, PAD 在强碱性的 IC 流动相环境中有着更好的信号响应, 并且通过脉冲多电位能够抑制被分析化合物在电极上的沉积所带来的基线漂移<sup>[52]</sup>。如表 2 所归纳, ECD 检测器的灵敏度和精密度媲美质谱检测器, 而仪器的购置和运维成本则接近常规的 HPLC, 这可能是 IC 和 ECD 在小分子糖分析中广受青睐的原因。

同样, MSD 在小分子糖的检测中也得到了应用<sup>[34,43,53]</sup>。如表 2 所示, 其中对于 ESI 离子源的离子化极性, 呈现了多样化, 正离子模式<sup>[53]</sup>和负离子模式<sup>[43]</sup>都有使用。在关于椰枣中单糖和寡糖的研究中<sup>[43]</sup>正离子模式和负离子模式被进行了比较, 发现负离子模式有着更多的信号响应。和 IR 以及 ELSD 一样, MSD 在水果小分子糖的检测中与 Hilic 色谱的配合使用最为常见。由于糖类通常存在多种同分异构体, 所以 MSD 在应用于糖类检测时, 通常会选用有多级质谱能力的 TQD<sup>[43]</sup>或者 IT<sup>[34,53]</sup>作为质量分析器。

综上所述, 小分子糖因其分子结构特点, 没有大的共轭体系, 无法表现出远离末端吸收的光谱特征, 所以 UV-VIS 检测器无法适用于其色谱分析。而 IR 检测器由于检测灵敏度有限, 以及无法适用色谱的梯度洗脱模式, 其应用也受到了限制。所以在未衍生的情况下小分子糖类液相分析中检测器的选择相对有机酸范围狭窄。另外, 由于单糖在组成寡糖时有多种接合位点和构象, 导致小分子寡糖就有相对复杂的结构, 所以在研究中, 高精度和多级的质谱检测器被广泛应用以提高定性能力。

### 3 结论与展望

随着色谱分析技术的发展, HPLC 方法对水果基质中少数特定种类的有机酸和单糖的测定已经趋于成熟, 且有多种国内外的检测标准可供研究者和工业界参考。在探索性研究中, 从目的和分析性能考虑, RP-HPLC-MS 和 Hilic-HPLC-MS 是最佳的检测手段, 不仅是因为其优秀的检测性能, 而且 MSD 能够提供

丰富的化合物结构信息, 甚至能够一定程度脱离对标准物质的依赖。而出于成本考虑, RP-HPLC 结合 UV 检测器并且在部分检测过程中进行柱前衍生化, 可以在不需要购置任何额外组件的情况下在常规 HPLC 上完成检测。在工业界的应用中, 被检测标准广泛采用, 并且有成熟的商业化整合方案的 HPEIC-PAD 检测有着最高的综合性价比。

对于这两类化合物, 未来的发展方向是提升总体的检测效率, 比如开发能够同时检测多种目标化合物的分析方法。为此, 在水果的研究中越来越多的用到, 不需要依赖分析物特定的化学结构特征, 并且可以对色谱分离中共流出问题和保留时间偏移问题形成互补性补偿的 LC-MS 方法。另外各种针对有机酸和糖类分析优化的新型色谱柱和填料也被设计出来。此外, 对于糖类来说, 由于其普遍存在同分异构体并且能够形成数量众多的寡聚体, 对于分析方法的定性能力有着更高的要求, 应用多级质谱和高精度质谱检测器对于常规检测器难以分析结构的小分子寡糖的定性定量也至关重要。

### 参考文献

- [1] 智研咨询集团.2017-2022 年中国水果市场运行态势及投资战略研究报告[M/OL].2017[2017-1] Zhiyan Consulting Group. 2017-2022 Annual report of fruit market and outlook in China [M/OL]. 2017[2017-1].
- [2] Melesse S, Sobratee N, Workneh T. Application of logistic regression statistical technique to evaluate tomato quality subjected to different pre- and post-harvest treatments [J]. Biol Agric Hortic, 2016, 32(4): 277-287
- [3] Schouten R E, Woltering E J, Tijskens L M M. Sugar and acid interconversion in tomato fruits based on biopsy sampling of locule gel and pericarp tissue [J]. Postharvest Biol Technol, 2016, 111:83-92
- [4] Aoacinternational. citric acid in dried milk [M]. 1932
- [5] Aoacinternational. Glucose in Cacao Products Sichert-Bleyer Method [M]. 1936
- [6] 李志英,段金凤,张海容.紫外分光光度法测定海红果中果糖的含量[J].现代食品科技,2007,91(1):93-95  
LI Zhi-ying, DUAN Jin-feng, ZHANG Hai-rong. Determination of fructose content in malus micromalus makino by uv-spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 91(1): 93-95
- [7] 江茶龙,谢晓梅,张玲,等.木瓜中有机酸和单宁酸类成分的薄层色谱法鉴定[J].安徽中医学院学报,2010,29(1): 58-60

- JIANG Cha-long, XIE Xiao-mei, ZHANG Ling, et al. Identification of organic acids and tannin in fructus chaenomelis by thin-layer chromatography [J]. Journal of Anhui TCM College, 2010, 29(1): 58-60
- [8] 陈功.谈黄水(或发酵液)中有机酸气相色谱测定的一些条件问题[J].广州食品工业科技,1988,3017
- CHEN Gong. Some problems in the analysis of organic acids in Danhuangshui (or the fermented product) with Gas Chromatography
- [9] XU F, ZOU L, ONG C N. Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010, 29(3): 269-280
- [10] Moldoveanu S C, David V. Chapter 5 - retention mechanisms in different HPLC types [M]. Essentials in Modern HPLC Separations. Elsevier, 2013: 145-90
- [11] GB 5009.157-2016, 食品安全国家标准 食品有机酸的测定 [S]
- GB 5009.157-2016, National food safety standard determination of organic acids in foods [S]
- [12] AOACINTERNATIONAL. Quinic, malic, and citric acids in cranberry juice cocktail and apple juice liquid chromatographic method [M]. 1986
- [13] D'URSO G, MALDINI M, PINTORE G, et al. Characterisation of *Fragaria vesca* fruit from Italy following a metabolomics approach through integrated mass spectrometry techniques [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 74387-95
- [14] De Souza M P, Bataglion G A, Da Silva F M A, et al. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS [J]. Food Res Int., 2016, 8387-94
- [15] 孙金旭,朱会霞,肖冬光.覆盆子中有机酸含量的测定[J].现代食品科技,2013,29(6):1374-1376
- SUN Jin-xu, ZHU Hui-xia, XIAO Dong-guang. Determination of the contents of organic acids of raspberry [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1374-1376
- [16] Olmo-Garc A L, Bajoub A, Fern Ndez-Guti Rrez A, et al. Evaluating the potential of LC coupled to three alternative detection systems (ESI-IT, APCI-TOF and DAD) for the targeted determination of triterpenic acids and dialcohols in olive tissues [J]. Talanta, 2016, 150355-66
- [17] Sand N-Espa A P, Mateo-Miranda M, L Pez-Goti C, et al. Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC-ESI-MS [J]. Food Chem., 2016, 192268-73
- [18] 李俊一.杨桃保鲜技术及其对糖、酸代谢影响的研究[D].广州:华南农业大学,2016
- LI Jun-yi. Study on the postharvest treatment and the sugar and acid metabolism of carambola fruit [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016
- [19] Parets L, Alechaga E, Nunez O, et al. Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural extracts [J]. Anal Methods, 2016, 8(22): 4363-4378
- [20] 刘晓雪.LC-MS 法测定果蔬中的有机酸[D].哈尔滨:黑龙江东方学院,2015
- LIU Xiao-xue. LC-MS Determination of organic acids in fruits and vegetables [D]. Harbin: East University of Heilongjiang, 2015
- [21] 徐林芳.高效液相色谱及质谱技术在植物激素和有机酸分析中的研究与应用[D].开封:河南大学,2016
- XU Lin-fang. Study and application of high performance liquid chromatography and mass spectrometry in the analysis of plant hormones and organic acids [D]. Kaifeng: Henan University, 2016
- [22] NY/T 2277-2012,水果蔬菜中有机酸和阴离子的测定 离子色谱法[S]
- NY/T 2277-2012, Determination of organic acids and anions in fruits and vegetables-Ion Chromatography [S]
- [23] NY/T 2796-2015,水果中有机酸的测定 离子色谱法[S]
- NY/T 2796-2015, Determination of organic acid in fruits-ion chromatography[S]
- [24] Shwartz E, Glazer I, Bar-Ya'Akov I, et al. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions [J]. Food Chem., 2009, 115(3): 965-973
- [25] Hudalla C, Boissel C, Cook J, et al. BEH Amide 柱:使碳水化合物化合物的分析更简单、快速、高效[J].食品安全导刊, 2010,7:40-41
- [26] 杨朝霞,王珣璆,李梅.有机酸分析方法之比较[J].啤酒科技,2009,9:17-20
- YANG Zhao-xia, WANG Xun-miu, LI Mei. Comparison of analytical methods for organic acids [J]. Beer Science and Technology, 2009, 9: 17-20
- [27] 黄桂颖,白卫东,杨幼慧,等.反相高效液相色谱法测定荔枝肉中 10 种有机酸[J].现代食品科技,2009,25(5):568-570

- HUANG Gui-ying, BAI Wei-dong, YANG You-hui, et al. Determination of ten organic acids in lychees by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(5): 568-570
- [28] 孙晓云.塘栖枇杷营养成分测定与气调包装保鲜技术的研究[D].杭州:浙江农林大学, 2015
- SUN Xiao-yun. The Determination of nutrients content in Tangqi loquat & feasibility study of modified atmosphere packaging on Tangqi Loquat [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2015
- [29] Boonpanrak S, Lalitmanat S, Suwanwong Y, et al. Analysis of ascorbic acid and isoascorbic acid in orange and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS [J]. *Food Anal Meth*, 2016, 9(6): 1616-1626
- [30] 郭燕,梁俊,李敏敏,等.高效液相色谱法测定苹果果实中的有机酸[J].*食品科学*,2012,33(2):227-230
- GUO Yan, LIANG Jun, LI Min-min, et al. Determination of organic acids in apple fruits by HPLC [J]. *Food Science*, 2012, 33(2): 227-230
- [31] Khosravi F. Determination of oxalic, citric, tartaric and malic acids in whole fruits by UPLC [J]. *International Journal of Life Sciences*, 2015, 9(5): 50-53
- [32] ARNOUS A, MEYER A S. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2008, 86(2): 79-86
- [33] NI W H, GAO T T, WANG H L, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(2): 529-535
- [34] Ognyanov M, Remoroza C, Schols H A, et al. Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L.) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 151:803-11
- [35] ZENG H, MIAO S, ZHANG Y, et al. Isolation, preliminary structural characterization and hypolipidemic effect of polysaccharide fractions from *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52:126-36
- [36] 秦复霞.火龙果多糖提取纯化及单糖组成检测[J].*南方农业*,2016,10(15):152-153,64
- QIN Fu-xia. Extraction and purification of polysaccharides from dragon fruit and determination of monosaccharide composition [J]. *South China Agriculture*, 2016, 10(15): 152-153, 64
- [37] 井泽良.真菌寡聚糖的制备分析及对葡萄采后诱导抗病的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006
- JING Ze-liang. The preparation, analysis and induced resistance to grapes of oligosaccharides [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2006
- [38] Bennett R N, Shiga T M, Hassimotto N M A, et al. Phenolics and antioxidant properties of fruit pulp and cell wall fractions of postharvest banana (*Musa acuminata* Juss.) cultivars [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(13): 7991-8003
- [39] 林江丽,朱亚娟,王金霞,等.HPLC 法测定鲜食葡萄采后贮藏过程中糖分的变化[J].*新疆大学学报(自然科学版)*,2014,3:258-260
- LIN Jiang-li, ZHU Ya-juan, WANG Jin-xia, et al. Determination of grape saccharide components in storage time by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition)*, 2014, 3: 258-260
- [40] GB 5009.8-2016.食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S]
- GB 5009.8-2016, Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose in national standard food safety [S]
- [41] NY/T 2279-2012,食用菌中岩藻糖、阿糖醇、海藻糖、甘露醇、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、核糖的测定 离子色谱法[S]
- [42] National Health and Family Planning Commission, China food and drug administration. national food safety standard determination of fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose in foods-high-performance liquid chromatography [M]. Beijing, 2017
- [43] Cruz-C Rdenas C I, Miranda-Ham M L, Castro-Concha L A, et al. Fructans and other water soluble carbohydrates in vegetative organs and fruits of different *Musa* spp. accessions [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 395
- [44] Ghfar A A, Wabaidur S M, Ahmed A Y B H, et al. Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Food Chem.*, 2015, 176:487-92
- [45] Shanmugavelan P, Kim S Y, Kim J B, et al. Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD [J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 380:112-7
- [46] Stanojevic M, Trifkovic J, Aksic M F, et al. Sugar profile of kernels as a marker of origin and ripening time of peach (*Prunus persicae* L.) [J]. *Plant Food Hum Nutr*, 2015, 70(4):

- 433-440
- [47] 王海英,马小军,莫长明,等.罗汉果果肉中糖类物质组成与含量分析[J].广西植物,2015,6:774-780  
WANG Hai-ying, MA Xiao-jun, MO Chang-ming, et al. Determination of sugar components and contents in fruit flesh of siraitia grosvenorii [J]. Guihaia, 2015, 6: 774-480
- [48] 郑名敏,李静威,荣廷昭,等.HPLC 法测定雪莲果在不同储藏条件下糖分组成的变化[J].食品科学,2009,30(8):190-193  
ZHENG Ming-min, LI Jing-wei, RONG Ting-zhao, et al. Determination of changes in sugar compositions of yacon under different storage conditions by HPLC [J]. Food Science, 2009, 30(8): 190-193
- [49] Suksom W, Wannachai W, Boonchiangma S, et al. Ion chromatographic analysis of monosaccharides and disaccharides in raw sugar [J]. Chromatographia, 2015, 78(13-14): 873-879
- [50] Jandik P, Cheng J, Avdalovic N. Analysis of amino acid-carbohydrate mixtures by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 60(3): 191-203
- [51] AOACINTERNATIONAL. Determination of tace glucose and fructose in raw cane sugar high-performance anion-exchange chromatography [M]. 2000
- [52] Lafosse M, Elfakir C, Morin-Allory L, et al. The advantages of evaporative light scattering detection in pharmaceutical analysis by high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography [J]. Journal of Separation Science, 1992, 15(5): 312-318
- [53] WEISS J. Detection methods in ion chromatography [M]. Handbook of Ion Chromatography. Weinheim, Germany; John Wiley & Sons, 2016
- [54] 安小楠.红枣低聚糖的 HPLC 分析及醇沉分离[D].保定:河北农业大学,2015  
AN Xiao-nan. Analysis of oligosaccharides in jujube by using HPLC and alcohol precipitation separation [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei Province, 2015