

贵州省团体标准
《贵州茶叶可溶性糖的检测
气相色谱氢火焰离子化法》

编制说明

T/GZTPA

广东省科学院测试分析研究所
(中国广州分析测试中心)

二〇二一年十月

目 录

1 工作简况.....	3
2 主要工作过程.....	4
第一阶段：查阅资料.....	4
第二阶段：确定检测参数.....	4
第三阶段：标准起草.....	5
第四阶段：方法验证.....	5
第五阶段：征求意见.....	5
第六阶段：送审稿.....	5
3 标准的编写原则.....	5
4 标准技术内容及确定依据.....	6
4.1 标准曲线配制.....	6
4.2 气相色谱条件的确定.....	7
4.3 样品前处理条件的确定.....	9
4.4 方法回收率及精密度.....	10
4.5 准确度.....	11
4.6 检出限.....	11
4.7 方法的实用性.....	11
5 对《贵州茶叶可溶性糖的检测 气相色谱氢火焰离子化法》标准的基本评价.....	12
6 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系.....	12
7 作为强制性标准或推荐性标准的建议.....	12
8 专利及涉及知识产权情况.....	12
9 重大分歧意见的处理经过.....	13
10 贯彻标准的要求和措施建议.....	13
11 废止现行有关标准的建议.....	13
12 推广应用的预期效果.....	13
13 参考文献.....	14

《贵州茶叶可溶性糖的检测 气相色谱氢火焰离子化法》

编制说明

（征求意见稿）

1 工作简况

茶叶中的糖类物质占干物质的 20~25%，除构成细胞壁的纤维素、木质素、果胶质外，还有部分游离糖、结合态糖脂、蛋白糖等多糖，是茶叶中三大自然物质之一。茶叶中可溶性糖类中主要单糖是阿拉伯糖、葡萄糖、果糖，还有半乳糖、甘露糖等，含量为 0.1~1%，双糖有蔗糖、麦芽糖，三糖有棉子糖。茶叶中可溶性糖是茶叶甜味成分之一。成品茶中可溶性总糖的含量因地区、品种、茶类不同的制茶技术而异，采摘鲜叶的老嫩度不同，含糖量也不同。比如：六大茶类中，乌龙茶的可溶性糖含量最高。其次，茶叶中糖类的存在与转化对成品茶的香气、滋味、汤色等都有直接的影响，加工过程中糖类的分解缩合反应不断进行，所以其糖含量是动态变化的，而且不同的加工工艺内在的化学反应不同，糖的变化也不同。因此。检测茶叶中可溶性糖成分至关重要。

目前，可溶性糖的检测方法主要包括薄层色谱法、酶法、高效液相色谱法、气相色谱质谱联用法和毛细管电泳法。但薄层色谱法和酶法适用范围不广，而高效液相色谱结合 ELSD 或 RID 检测器在可溶性糖检测中应用较广，但在分离多种糖组分方面仍存有一定的局限性，容易受到多组分分离度的影响。当前方法仅侧重于少数单糖的定

量分析，茶叶中多种可溶性糖的同时检测缺少统一的提取方法和分析方法。鉴于茶叶可溶性糖在茶叶品质和茶树生长发育过程中的重要性，建立茶叶中多种可溶性糖同时检测方法，将有利于进一步推进茶叶品质化学和从糖生物学角度研究茶树生长发育和胁迫响应机制的前期和基础工作。

气相色谱法有由于色谱分离效果较好，且氢火焰离子化检测器较为稳定和普遍，是同时检测茶叶多种可溶性糖的有效手段之一，可克服当前方法由于分离度不够、物质成分单一、方法稳定性差等系列问题。

2 主要工作过程

接到贵州省团体标准制定项目后，成立了向章敏为首席专家的标准起草小组，中国广州分析测试中心相关人员为工作组成员，制定了工作方案，具体步骤如下：

第一阶段：查阅资料

2021年2月至3月，查阅资料，了解农业部相关的标准、公告、法律法规。收集国内相关可溶性糖的提取和测定方法。比较研究国内现有的不同测定方法的优缺点，为标准的起草作了充分的准备。为确定方法分析步骤、仪器测试条件及方法技术参数的评价，本单位实验室进行了大量的方法研究、验证实验和数据统计、为标准的起草提供了可靠的第一手资料。

第二阶段：确定检测参数

2021年4月至5月，根据现有资料，确定了可溶性糖的主要五种成分，并购买标准品进行测试；通过对分析方法相关参数的优化了，确定的了分析茶叶五种可溶性糖的最佳分析条件。

第三阶段：标准起草

2021年6月，根据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写规则》，结合现有参考文献及我单位制定的地方标准，研究起草了标准草稿。

第四阶段：方法验证

2021年7月，单位起草好标准草稿后，对本行业检测水平高的单位进行了方法的验证。

第五阶段：征求意见

方法验证后，根据验证的结果和反馈的意见，起草了征求意见稿，最后形成了送审稿。

第六阶段：送审稿

3 标准的编写原则

本标准的编写制定过程中以提高测试方法选择性、精密度、灵敏度、准确度和分析效率，并且适合大范围推广为总原则。力求反映科学技术的先进成果和先进经验，同时不把标准的水平定的很高。使用性能的普遍性包括方法精密度、准确度、灵敏度等方面能满足要求，同时气相色谱仪的拥有量和使用量亦与日俱增，在确保标准保持技术上的先进性的同时，又具有经济上的合理性。遵循了标准制定过程中

的先进性、经济性和适用性原则。

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与同体系标准及相关的各种基础标准以及配套使用的取样、试剂规格等标准相衔接，遵循了政策和协调统一性原则。

在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

4、标准技术内容及确定依据

4.1 标准曲线配制

分别准确称取五种水溶性标准物质（精确至 $\pm 0.0002\text{g}$ ），用 1:1 (V:V) 的乙腈：水溶液配置一系列可溶性糖标准溶液，其中果糖 10 mg/mL；葡萄糖 20 mg/mL；山梨糖醇 4 mg/mL；肌糖 4 mg/mL；蔗糖 40 mg/mL，随后稀释成 5 个不同浓度（果糖 5~1000 mg/L；葡萄糖 10~2000 mg/L；山梨糖醇 2~400 mg/L；肌糖 2~400 mg/L；蔗糖 20~4000 mg/L）的混合标准品，且每个浓度重复三次，加入等量内标后分别进行衍生化处理，再进行气相色谱-氢火焰离子化检测器进行检测。以标准物质峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标（Y），以标准物质的量与内标量的比值为横坐标（X）进行回归分析，得到回归方程及相关参数，其五种可溶性标准曲线如下图 1。

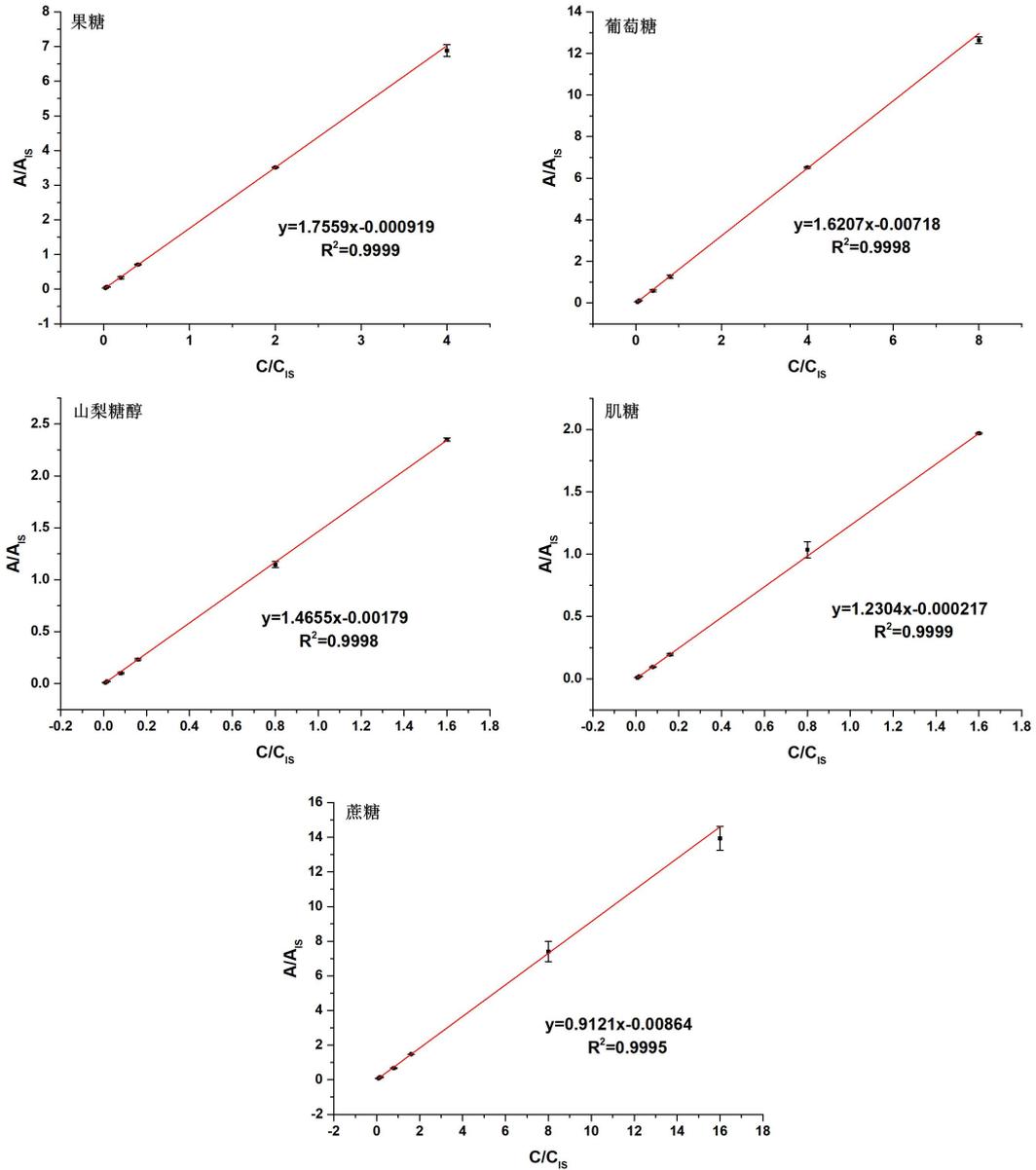


图1 五种可溶性糖线性标准曲线

4.2 气相色谱条件的确定

4.2.1 色谱柱的选择:

5种可溶性糖在玻璃毛细管柱上具有很好的保留,而且各成分的保留性质差别较大,物质比较好分离,因此采用了实验室常规使用的(5%苯基)-甲基聚硅氧烷(HP-5)柱,60 m×250 μm,0.25 μm 石英毛

细管柱或相当，色谱图如下图 2:

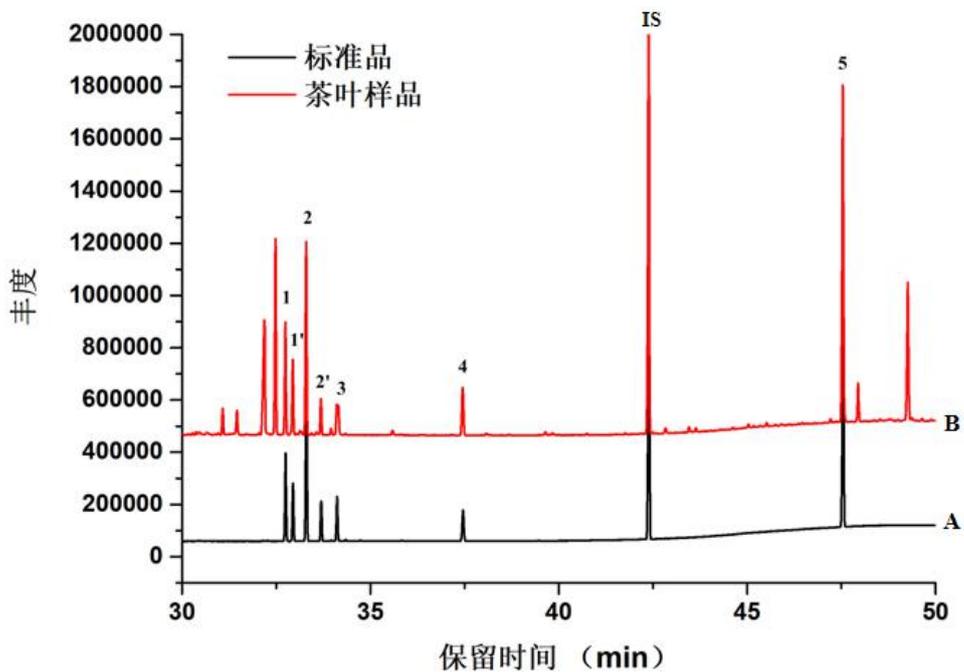


图 2 五种可溶性糖的气相色谱图
(图中 A 为标准品色谱图, B 为实际样品色谱图, 1,1'为果糖, 2,2'为葡萄糖, 3 为山梨糖醇, 4 为肌糖, 5 为蔗糖, IS 为内标苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷)

4.2.2 检测器的选择

氢火焰离子化检测器 (FID), 是一种高灵敏度通用型检测器, 它几乎对所有的含碳有机物都有响应; 质谱检测器 (MS) 具有灵敏度高, 专一性好, 准确度高等特点。较适合与微量及痕量分析。FID 和 MS 都是通用型检测器, 但 FID 更为稳定和普及, 且线性范围较大, 可克服当前方法由于分离度不够、物质成分单一、方法稳定性差等系列问题。

4.2.3 仪器条件选择

由于需要测定复杂基质中的目标化合物, 为了将目标化合物与基质干扰进行分离, 调整柱温箱程序升温条件, 使出峰时间在 60 min 内流出, 以保证分析灵敏度的同时, 使干扰尽量分离。采用程序升温

目的是因为在检测样品中，尽量使样品中的杂质洗脱出色谱柱，而不影响下一针的分离检测。确定条件：

- 1、色谱柱（HP-5, 60 m×250 μm , 0.25 μm ）；
- 2、进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$ ，进样 1 μL ，分流比 10:1，柱流量（1 mL/min）；
- 3、程序升温：80 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min，然后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 240 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 5 min，再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度上升至 300 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 15 min；
- 4、检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$ ，氢气（40 mL/min），空气（400 mL/min），尾吹（60 mL/min）。

在上述操作条件下，待仪器稳定后，连续注入数针标样溶液，直至相邻两针各目标成分峰面积与内标物峰面积比的相对变化小于 1.0%时。按照标准溶液、试样溶液的顺序进行测定。

4.2.4 内标物的选择

内标物的选择原则是内标物与待测物不发生反应且内标物保留时间上没有杂质的检出。本文选用了苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷作为内标。在实际样品的检测中，应该先称取一定质量试样，在没有加入内标的情况下对样品进行检测，分析在内标物出峰保留时间上是否有杂质出现，再选择添加内标物的样品确定内标保留时间。

4.3 样品前处理条件的确定

4.3.1 提取溶剂的选择

为了获得最佳的提取效率，在相同振荡条件下比较了水与 50% (V/V)的乙腈溶液萃取体系之间的萃取效率。结果表明，两种方法的萃取效率类似，但考虑到后续试验操作中需要将溶剂吹干后才能进行衍

生化反应的因素，因此选择 50% (V/V) 的乙腈水溶液为萃取剂。

4.3.2 提取方式的确定

为了获得最佳的提取方式与提取时间，分别比较了超声与振荡两种方式在不同时间条件下的提取效率与方法重现性。结果表明，提取时间为 30 min 时基本达到稳定，且超声与振荡两种提取方式的提取效率类似，但超声提取的重现性稍差，可能原因是振荡能充分地把提取溶剂与茶粉末混匀，提高了对样品的浸润性。此外，超声提取的噪音较大。综合以上因素，选择振荡提取方式，提取时间为 30 min。

4.3.3 净化条件的确定

茶叶中的水溶性糖提取后，通常需用 C18 固相萃取柱进行净化，这样可以提高色谱柱的柱效，减少杂质对目标峰的干扰。本标准比较了固相萃取净化与未净化条件下的信噪比差异及杂质干扰情况。结果表明，两种方法得到的水溶性糖目标峰都没有被干扰，对应的信噪比差异不大，表明 C18 净化方法无明显作用。因此可不经固相萃取柱净化，这样简化了分析步骤，提高了分析效率，同时节省了分析费用。

4.4 方法回收率及精密度

前处理之前添加一定量的可溶性糖，按照相同的前处理条件进行分析检测，重复 5 次，其回收率与精密度结果见附表 B。结果表明，该方法回收率较高，精密度较好，达到了定量分析的要求，因此利用硅烷化反应、气相色谱法定量测定茶叶中可溶性糖的含量能够满足检测的定量要求，是一种简便、快速、实用的茶叶可溶性糖检测方法。

4.5 准确度

根据《化学分析中不确定度的评估指南》，准确度为测定平均值与真值的相符程度。准确度的测定为某一稳定样品中加入已知量的标准物质（将标准物质的量作为真值）称加标样品；同时测定样品和加标样品；加标样品扣除样品值后与标准物质的误差即为该方法的准确度。

4.6 检出限

根据 GB/T 5009.1—2003 色谱法（附录 A 检验方法中技术参数和数据处理）根据公式计算检出限：

$$\text{检出限} = \frac{\text{最低相应值}}{b} = \frac{S}{b}$$

式中：

b——标准曲线回归方程中的斜率，响应值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ；

S——为仪器噪音的 3 倍，即仪器能辨认的最小的物质信号，结果见表 5。

按照上述检出限计算方法（即 3 倍噪音高度）计算得到方法检出限见附表 B。

4.7 方法的实用性

采用如实施例 1 的方法分别对贵州不同类型茶叶（抹茶、红茶、白茶、绿茶）进行实际样品检测分析。首先，直接采用溶剂提取，然后进行衍生化处理，并与气相色谱-氢火焰离子化检器相结合，实现了简便、准确、快速、高效的茶叶中多种可溶性糖的同时检测，其检测结果见表 2。

表 2 不同类型茶叶可溶性糖含量

化合物名称	抹茶 (%)	红茶 (%)	白茶 (%)	绿茶 (%)
果糖	0.380±0.029	0.270±0.021	0.110±0.005	0.041±0.009

葡萄糖	0.460±0.014	0.220±0.007	0.068±0.007	0.049±0.010
山梨糖醇	0.150±0.011	0.330±0.001	0.180±0.001	0.076±0.014
肌糖	0.190±0.008	0.140±0.007	0.200±0.005	0.085±0.006
蔗糖	1.670±0.096	0.012±0.007	0.055±0.001	0.160±0.007

注：上述数据为三次测量平均值±标准偏差（SD）

由上述表 2 可知，4 种不同类型茶叶样品均检测到 5 种可溶性糖成分，其中抹茶中可溶性糖含量相比其他类型茶叶要高，且蔗糖含量明显高于其他可溶性糖成分，其次是红茶含量，而绿茶可溶性糖成分相对偏低，上述实施例说明本方法实用性。

5 对《贵州茶叶可溶性糖的检测 气相色谱氢火焰离子化法》标准的基本评价

本方法是利用有机物在氢火焰离子化检测器上的响应进行测定。利用经过衍生化后的可溶性糖在程序升温条件下得到更好的分离效果。另外气相色谱仪目前在我省已经非常普及，有利于标准的推广和普及。

6 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。

7 作为强制性标准或推荐性标准的建议

建议将《贵州茶叶可溶性糖的检测 气相色谱氢火焰离子化法》作为推荐性贵州省地方标准颁布实施。

8 专利及涉及知识产权情况

本标准的制定内容未涉及专利的知识产权。

9 重大分歧意见的处理经过

本标准在标准的起草过程充分征求政府监管部门及相关单位和专家意见和建议，通过共同讨论、协商，达成致。没有重大分歧意见。

10 贯彻标准的要求和措施建议

8.1 在目前各级政府非常重视食品质量与安全的前提下，在各级政府部门的农资产品的抽查、检查中应积极利用和创造各种渠道宣贯本标准。

8.2 举办质量监督检验、科研、生产等相关人员参加的标准宣贯培训班。

11 废止现行有关标准的建议

本标准为首次制定，无废止现行有关标准的建议。

12 推广应用的预期效果

通过贵州省地方标准《贵州茶叶可溶性糖的检测 气相色谱氢火焰离子化法》的制定、发布实施、推广应用，可以满足我省各级政府部门茶叶产品的抽查、检查的检测需要，保障广大人民群众食品安全。

13 参考文献

- [1] 邓国栋, 郁建平, 郑宝山. TLC 法测定茶叶多糖的单糖组成研究. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(6):703-705.
- [2] 曾晓雄, 李雅萍, 孙怡, 叶红, 刘俊, 向小丽, 王克其. 高效液相色谱法测定茶叶中游离糖的含量. 分析化学, 2007, 35(6):930.
- [3] 袁勇, 黄建安, 李银花, 陈金华, 袁玲, 刘仲华. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定茶叶中单糖和双糖. 茶叶科学, 2010, 30(6):435-439.
- [4] 葛菁, 庞磊, 李叶云, 江昌俊. 茶树可溶性糖含量的 HPLC-ELSD 检测及其与茶树抗寒性的相关分析. 安徽农业大学学报, 2013, 40(3):470-473.
- [5] 陈琦, 李立, 吴雪原, 储晓刚, 许姗姗, 李德军, 胡坚. 高效液相色谱-蒸发光检测器法检测茶叶中掺杂糖类物质. 茶业通报, 2015, 37(1):26-29.
- [6] 黄明军, 杨新河, 覃彩芹, 刘仲华, 毛清黎, 吕帮玉. HPLC-ELSD 法测定黑茶中单糖和双糖的含量. 食品工业, 2017, 38(1):306-310.
- [7] Lv Y, Yang X B, Zhao Y, Ruan Y, Yang Y, Wang Z Z. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. Food Chemistry, 2009, 112(3):742-746.
- [8] Kausar T, Akram K, Kwon J. Comparative effects of irradiation, fumigation, and storage on the free amino acids and sugar contents of green, black and oolong teas. Radiation Physics and Chemistry, 2013, 86(5):96-101.
- [9] Clarke M B, Bezabeh D Z, Howard C T. Determination of carbohydrates in tobacco products by liquid chromatography mass spectrometry /mass spectrometry: a comparison with ion chromatography and application to product discrimination. Journal of [10] Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(6):1975-1981.
- [10] Mantovani V, Galeotti F, Maccari F, Volpi N. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides and polysaccharides. Electrophoresis, 2018, 39(1):179-189.
- [11] GB/T 1250-1989 极限数值的标示方法和判定方法
- [12] GB/T 4946-2008 气相色谱法术语
- [13] GB/T 8170-2008 数值修约规则
- [14] 中华人民共和国国家标准 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第一部份：标准的结构和编写规则》
- [15] 中华人民共和国国家标准 GB/T 1.4《标准编写第四部份：化学分析方法》
- [16]《统计学在化学分析测量中的应用》韩永志《全国分析测试体系的建立与完善》项目办公室 2004年10月
- [17] 中华人民共和国国家标准 测试方法的精密度 通过实验室间试验确定标准测试方法的重复性和再现性[S] GB/T6379-2004, 北京: 中国标准出版社 1986.
- [18]《化学分析中不确定度的评估指南》北京: 中国计量出版社 2002.
-