

半微柱液相色谱分离与激光 共振拉曼检测法分析果汁中的单糖*

丁明玉

小泉均 铃木义仁

(清华大学化学系 北京 100084)

(山梨大学工学部化学生物工学科 日本国甲府市 400)

提 要 用4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰肼作衍生化试剂将还原单糖衍生化后在内径1.5mm的半微柱上进行RP-HPLC分离,同时以488.0nm的Ar⁺激光作激发光源,在检测波数1136cm⁻¹下测定衍生物的共振拉曼散射强度。方法具有很高的选择性和灵敏度,葡萄糖的检测下限为10ng,可用于食品和生物样品中单糖的分析。

关键词 高效液相色谱法,激光共振拉曼检测,单糖,果汁

分类号 O658/Q5

1 前言

糖本身在通常的紫外区无吸收,在200nm以下的远紫外区又受流动相的背景吸收以及样品中杂质的干扰,因此多采用折射率(RI)法检测。但是,RI检测灵敏度低且不能用于梯度淋洗。通过衍生化使糖类变成具有紫外吸收的物质^[1]或荧光物质^[2-4]是提高糖类HPLC检测灵敏度的主要手段,但有的衍生化操作繁琐,有的方法选择性仍不很高。

4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰(DABSYL)肼是近几年开发出来的羰基化合物拉曼衍生化试剂,与还原性单糖分子中的羰基反应生成其腙类衍生物^[5]。该衍生物在波长460nm处具有最大吸收。本文用488.0nm的氩离子(Ar⁺)激光作激发光源,测定了此衍生物的共振拉曼散射强度。该方法具有很高的灵敏度和选择性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

所用HPLC/拉曼检测装置由日本分光的TRI ROTAR V型高压泵和日本电子的JRS-400T激光拉曼分光光度仪构成。在条件实验中采用Multir330二极管阵列紫外-可见光检测器。

半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glu)、甘露糖(Man)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、核糖(Rib)等6种还原糖及果糖的标准溶液均配制成甲醇溶液。所用衍生化试剂4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰(DABSYL)肼由DABSYL-Cl与肼为原料合成,并经过提纯,使用时配制成乙腈溶液。

2.2 实验方法

取糖混合标准溶液(各种糖均含100mg/L)1mL,加2g/L DABSYL肼的乙腈溶液1mL。加入2mol/L三氯乙酸的甲醇溶液50μL作催化剂,在带旋转装置的60℃水浴上反应90min。然后加入25%乙醛酸水溶液10μL,在相同条件下继续反应5min。冷却后再加1mol/L碳酸钠水溶液0.5mL。因衍生化反应在密闭反应容器中进行,且各种试剂均为准确加入,故反应完毕后不必重新定容。用0.45μm滤膜过滤后,量取1μL加入HPLC仪中,在检测波数为1136cm⁻¹下检测共振拉曼散射强度。

进行果汁样品分析时先将果汁样品用0.45μm的滤膜过滤,取滤液0.5mL,加25mL甲醇,减压蒸干。残渣用1mL或一定体积的甲醇溶解后,按上述方法进行衍生化、HPLC分离以及共振拉曼检测。

2.3 分析条件

用于糖分离的色谱柱为Inertsil ODS-2(250mm × 1.5mm i.d.),柱温为室温,流动相为乙腈-水(31:69, V/V),流速100μL/min,进样量1μL。

拉曼检测采用3μL的半微量荧光流动池,氩离子激光激发波长488.0nm,功率500mW,检测波数为1136cm⁻¹。

3 结果与讨论

3.1 分离条件的优化

参考文献[5],由衍生化反应的实验条件确定本实验方法的最佳条件。加热有利于反应的进行,但它却受试剂的挥发性及衍生化物的稳定性的限制。各单糖的衍生化反应所需时间不同,最短的只需30min,最长的需90min。

在本实验条件下,还原糖的DABSYL衍生物在

* 本文收稿日期:1996-08-25,修回日期:1996-10-05

25 min 内流出色谱柱, 但过剩的衍生化试剂在色谱柱上的吸附很强, 60 min 左右才流出色谱柱, 此时的色谱图如图 1-a 所示。为了缩短分离时间, 在衍生化反应完成后加入稍微过量的乙醛酸与过剩的衍生化试剂反应。乙醛酸在该柱上的保留值很小, 过量的乙醛酸在糖类之前流出色谱柱, 不会干扰糖的分离, 但

乙醛酸与衍生化试剂生成的乙醛酸 DABSYL 衍生物与己糖(半乳糖、葡萄糖和甘露糖)的 DABSYL 衍生物不能分离。当加入碳酸钠使乙醛酸 DABSYL 衍生物变成羧酸盐后, 此羧酸盐很快流出色谱柱, 不再干扰己糖的分离。除去过剩的衍生化试剂, 可使分析时间缩短一半, 此时的色谱图如图 1-b 所示。

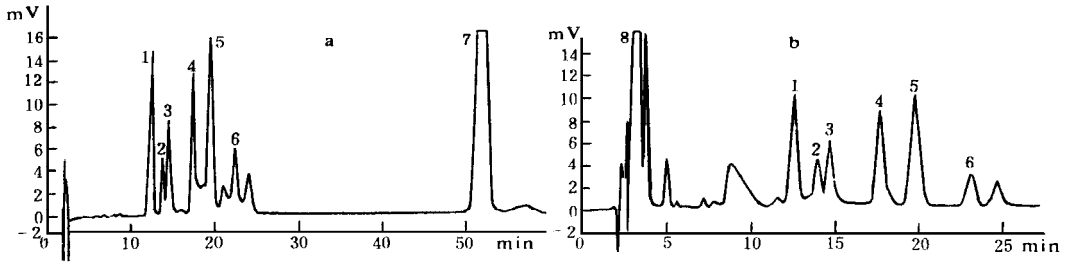


图 1 还原糖衍生物的紫外光检测色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the derivatives of reducing sugars by UV detection

a. 过剩衍生化试剂除去前, b. 用乙醛酸除去过剩衍生化试剂后。

a. excess derivatization reagent have not been removed, b. excess derivatization reagent have been removed by adding glyoxylic acid.

1. Gal, 2. Glu, 3. Man, 4. Ara, 5. Xyl, 6. Rib, 7. DH, 8. glyoxylic acid.

3.2 激光共振拉曼检测

只有那些具有与单色激光产生共振的吸收带的分子才能产生共振拉曼散射, 因此选择性很高。另外, 共振效应使拉曼散射强度明显增大, 从而使检测灵敏度得到改善。还原糖 DABSYL 胍衍生物的共振拉曼散射光来自于 DABSYL 的分子结构。当以氩离子(488.0nm)激光进行激发时, 其共振拉曼光谱上 1136cm^{-1} 的拉曼散射不仅强度大, 而且在此波数前后各约 200cm^{-1} 的范围内没有来自流动相的背景干扰, 本实验将检测波数设定为 1136cm^{-1} 。用共振拉曼检测得到的单糖混合物的色谱图见图 2。6 种还原糖混合物衍生化后, 再进行半微柱 HPLC 分离和激光共振拉曼检测, 用色谱峰高作工作曲线。在 $25\sim 200\text{mg/L}$ 范围内工作曲线呈良好的线性。各还原糖的工作曲线斜率(相对灵敏度)明显不同: 0.514 (Gal), 0.174 (Glu), 0.279 (Man), 0.422 (Ara), 0.484 (Xyl), 0.121 (Rib)。因为共振拉曼散射的产生与糖的分子结构无关, 因此工作曲线的斜率不同只受峰的展宽和衍生化效率的影响。如果单单考虑峰的展宽的影响, 从柱中流出越晚的糖, 其斜率应该越小, 但实际上并非如此。同样, 虽然峰面积不受峰展宽的影响, 但 6 种糖的峰面积测定值也存在明显的差异。另外, 属酮糖的果糖不同于其它 6 种还原糖, 几乎不被衍生化。以上结果表明, 造成各还原糖灵敏度不同的主要原因是它们的反应效率不同。

3.3 果汁中糖的定量

拉曼检测法应用于纯果汁(苹果汁、橙汁和葡萄汁)中糖的分析, 所分析的 3 种果汁中只含有葡萄糖。苹果汁和橙汁的色谱图示于图 3。

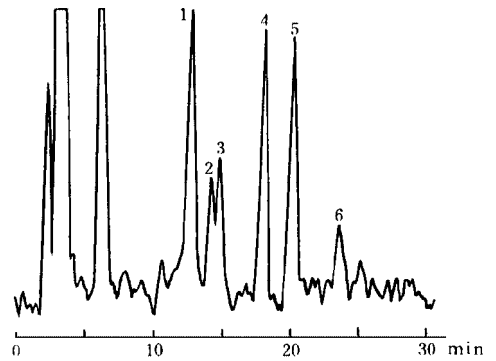


图 2 还原糖衍生物的激光共振拉曼检测色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the derivatives of reducing sugars by laser resonance Raman detection.

1. Gal, 2. Glu, 3. Man, 4. Ara, 5. Xyl, 6. Rib.

为了比较, 我们同时采用 RI 法进行了上述 3 种果汁的定量分析。果汁样品过滤后直接注入糖分析柱(岛津, Shim-pac PNH₂-10), 以乙腈-水(80: 20)作流动相(流速 1mL/min) 进行分离, 用 RI 法检测。

两种方法的分析结果见表 1, 所得结果基本一致。

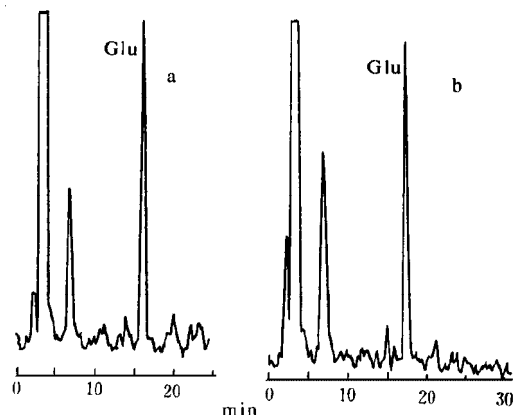


图 3 苹果汁(a)和桔子汁(b)中还原糖的激光共振拉曼检测色谱图

Fig. 3 Chromatograms of reducing sugar in apple juice (a) and orange juice (b) by laser resonance Raman detection

RI 检测灵敏度低, 因此 HPLC 分离/RI 检测只适用于糖含量高的样品。拉曼检测灵敏度比 RI 检测

高两个数量级, 本方法中葡萄糖的拉曼检测下限为 10ng (5.5pmol)。高选择性是拉曼检测法的一个重要特征, 本法所分析的果汁样品中含有大量的有机酸, 尽管有机酸也能与衍生化试剂反应, 但不干扰糖的分离与检测。

表 1 果汁中葡萄糖的分析结果(g/L)

Table 1 Analytical results of glucose in juices (g/L)		
果汁	拉曼检测	折射率检测
Juice	Raman detection	RI detection
苹果汁(Apple juice)	25.2 ± 1.3	28.7 ± 0.9
橙汁(Orange juice)	24.2 ± 1.2	21.1 ± 0.7
葡萄汁(Grape juice)	90.1 ± 2.8	91.2 ± 2.7

参 考 文 献

- 1 Grinble G K, Barker H M, Taylor R H. *Anal Biochem*, 1983; 128: 422
- 2 Kato T, Kinoshita T. *Anal Biochem*, 1980; 106: 238
- 3 Umegae Y, Nohta H, Ohkura Y. *Anal Sci*, 1989; 5: 675
- 4 Hull S R, Turco S J. *Anal Biochem*, 1985; 146: 143
- 5 Lin J K, Wu S S. *Anal Chem*, 1987; 59: 1320

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Reducing Sugars in Fruit Juices with Laser Resonance Raman Detection

Ding Mingyu

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing, 100084)

Koizumi Hitoshi and Suzuki Yoshito

(Department of Chemistry and Biotechnology, Yamanashi University, Yamanashi 400, Japan)

Abstract A liquid chromatographic method using semimicrocolumn separation combined with laser resonance Raman detection was developed for the determination of monosaccharides in fruit juices. Reducing sugars (galactose, glucose, mannose, arabinose, xylose and ribose) were derivatized with 4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl (DABSYL) hydrazine. The derivatives of the monosaccharides exhibited strong resonance Raman scattering at 1136cm^{-1} when Ar^+ laser emission line 488.0nm was used. A semimicrocolumn Inertsil ODS-2 (250mm × 1.5mm i.d.) was used to the separation of the monosaccharide derivatives. The saccharides eluted with in 25min. However the excess DABSYL hydrazine was retained strongly with a retention time of about 60min. In order to reduce the longer analysis time, the excess DABSYL hydrazine was removed by adding glyoxylic acid and then Na_2CO_3 aqueous solution when the derivatization reaction was finished. As a result, the analysis time was reduced to about a half of its initial run time. The sensitivity of resonance Raman detection greater two orders of magnitude than refractive index (RI) detection. The detection limit of glucose is 10ng (5.5pmol). The high selectivity of Raman detection came from the facts that only the interested compounds in a given sample was derived with the Raman labeling reagent and that only the characteristic Raman bands of the derivatives were selectively detected. In this work, in spite of the coexisting large quantities of organic acids in fruit juice, the determined values of glucose agreed well with those obtained by RI detection without any derivatization procedure.

Key words high performance liquid chromatography, laser resonance Raman detection, monosaccharide, fruit juice