

高效液相色谱内标法分离和测定植物中的单糖

刘云惠

(河北农业大学生物技术中心, 河北 保定 071001)

摘要 建立了一种以 β -吡啶乙酸为内标物, 用高效液相色谱内标法直接分离和测定植物中游离糖的新方法。木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和棉子糖的分离在 18 min 内完成, 检出限分别达到 1.8 μg 、2.3 μg 、2.7 μg 、1.8 μg 、3.5 μg 、4.1 μg 和 4.3 μg 。线性范围为 5 $\mu\text{g/L}$ ~750 $\mu\text{g/L}$ 。研究了流动相中乙腈的浓度、pH 值对分离 7 种糖和 β -吡啶乙酸的影响。方法用于枣和苹果样品的测定并进行回收率试验, 结果为木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖的 5 次测定的回收率分别为 97.4%~102.1%、97.3%~101.8%、98.7%~102.2%、97.7%~102.5%, RSD 分别为 1.66%~3.45%、1.54%~3.01%、1.29%~2.91%、1.09%~2.65%。

关键词 高效液相色谱法; 内标法; 单糖; β -吡啶乙酸; 植物

中图分类号 O658

文献标识码 A

文章编号 1000-871X(2000)06-0556-03

1 前言

单糖以游离态存在于自然界, 主要分布在植物组织、汁液、果皮和蜂蜜等中。单糖在植物、动物和微生物等的机体构成上除了提供维持生命过程和繁殖所需要的能量外^[1] 在控制、调节细胞的分裂和生长, 增强人体免疫功能, 以及抗癌、抗菌、抗病毒等方面都起着重要作用。

由于单糖存在于植物果实中且结构复杂, 进行分离纯化以及纯度鉴别较困难, 因而必须寻求高效分离和高灵敏的检测方法。用纸色谱法、气相色谱法、柱色谱法^[2,3] 对植物中单糖和低聚糖进行分析测定已有报道, 但操作复杂, 测定准确度不高。用高效液相色谱内标法直接分离和测定植物样品中的单糖和低聚糖未见报道。本文以 β -吡啶乙酸为内标物, 乙腈-水作流动相, 利用高效液相色谱法对苹果、枣、花芽等样品中的木糖(Xyl)、果糖(Fru)、葡萄糖(Glu)、蔗糖(Suc)、麦芽糖(Mal)、乳糖(Lac)和棉子糖(Raf)进行直接分离和测定, 检出限达到 4.3 μg 以下, 回收率为 97.3%~102.5%, RSD 在 3.45% 以下。方法高效快速、价廉, 重复性好, 结果准确。

2 实验部分

2.1 仪器和色谱条件

Waters 高效液相色谱仪, 实验所用的配置为 510 输液泵, U6K 进样器, 410 示差检测器, 810 色谱工作站, 碳水化合物柱(carbohydrate column), 填料为球型硅胶, 粒径 4 μm , 4.6 mm i. d. \times 250 mm(美

国 Waters 公司)。流动相为乙腈-水(体积比为 75:25, pH 7.5), 等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 5 μL 。

2.2 试剂

果糖、葡萄糖、乳糖(分析纯, 上海试剂二厂), 木糖、麦芽糖(生化试剂, 沈阳试剂三厂), 蔗糖(分析纯, 天津化学试剂一厂), β -吡啶乙酸(分析纯, 瑞士进口, 天津泰精细化学品有限公司分装), 棉子糖(生化试剂, 北京化学公司), 乙腈(色谱纯, 天津医药公司) 水为三次去离子水。

2.3 标准溶液的配制

准确称取一定量的 β -吡啶乙酸, 用水配制成 2.0 mmol/L 的 β -吡啶乙酸内标溶液, 备用。准确称取上述各种糖, 用 β -吡啶乙酸内标溶液溶解、定容, 得到一系列不同浓度的糖(含相同内标)的标准溶液。对各种浓度的糖的标准溶液进行 HPLC 分析, 每种浓度重复 3 次。

2.4 样品制备

取植物样品 0.5 g, 在冰浴中研磨成匀浆, 低温下以 27 000 g 离心 20 min。其上清液经 0.45 μm 滤膜过滤^[4]。滤液用 β -吡啶乙酸备用液定容, 供高效液相色谱分析。

3 结果与讨论

3.1 色谱分析条件的选择

3.1.1 流动相配比的选择 图 1 为本试验条件下, 以 β -吡啶乙酸为内标的 7 种糖的混合标准品色谱图, 图 2 为流动相中乙腈的体积分数对分离糖和 β -

吡啶乙酸的影响。由图 2 可以看出,当乙腈的体积分数低于 60% 时,7 种糖不能分离;当乙腈的体积分数为 60%~78% 时,分离效率(R_s)值明显增大。也就是说,7 种糖随着乙腈的体积分数的增大,分离效率明显增大;当乙腈的体积分数高于 80% 时,流动相的极性增大,对麦芽糖、乳糖分离有影响,也造成 β -吡啶乙酸的分离效率开始下降,7 种糖和 β -吡啶乙酸的色谱峰重叠。本文选择了 75% 乙腈和 25% 的水组成的二元体系作为流动相。

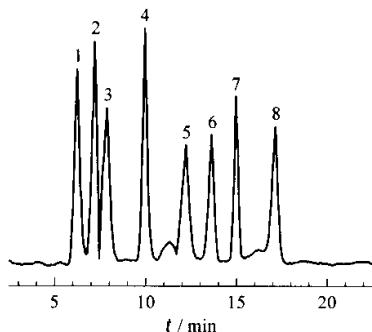


图 1 7 种糖的混合标准品色谱图

Fig. 1 The chromatogram of mixed standards of sugars

1. Xyl; 2. Fru; 3. Glu; 4. Suc; 5. Mal; 6. Lac; 7. β -indolyacetic acid; 8. Raf.

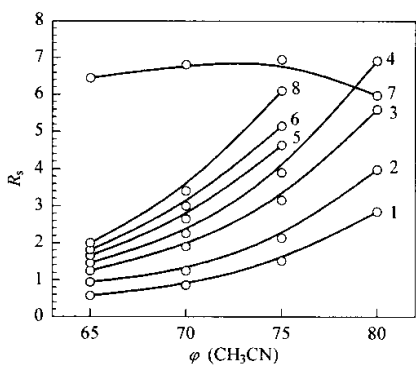


图 2 流动相中乙腈的体积分数对糖、 β -吡啶乙酸分离的影响

Fig. 2 Effect of CH_3CN volume fraction in mobile phase on the separation of sugars and β -indolyacetic acid

曲线序号与图 1 中峰号相同(The numbers are the same as in Fig. 1)

3.1.2 流动相 pH 值的影响 由图 3 可以看出,流动相的 pH 值对糖的保留影响较大。当 $\text{pH} < 6$ 时,糖达不到基线分离; β -吡啶乙酸随着 pH 值的升高,分离效率明显增大,色谱峰尖锐,对称性好;当 $\text{pH} >$

8 时,吡啶乙酸和棉子糖色谱峰重叠。因此本文选择了流动相 pH 值为 7.5。

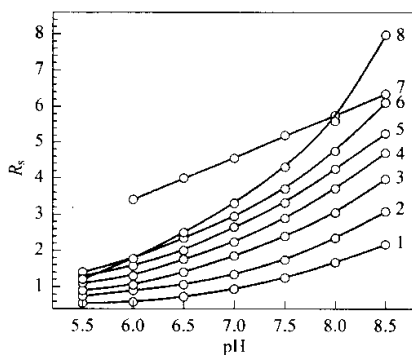


图 3 流动相 pH 值对糖、 β -吡啶乙酸保留的影响

Fig. 3 Effect of pH of mobile phase on the separation of monosaccharides and β -indolyacetic acid
曲线序号见图 1 (The numbers are the same as in Fig. 1)

3.2 工作曲线、检出限和线性范围

用 2.0 mmol/L β -吡啶乙酸溶液配制不同浓度的 7 种糖的标准混合液,按选定条件分别作色谱图。然后对每张色谱图中的各种糖和 β -吡啶乙酸的色谱峰积分,得到其面积。以每种糖的质量浓度(C_i , $\mu\text{g/L}$)对面积比值(A_i/A_β) $\times A_\beta$ (任一种糖的色谱峰面积 A_β ; β -吡啶乙酸色谱峰的面积)绘制各种糖的标准工作曲线,在 0.8 $\mu\text{g/L}$ ~950 $\mu\text{g/L}$ 范围内对木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖测定值进行线性回归,相关系数分别为 0.999 8, 0.999 9, 0.999 7, 0.999 9。在 5.0 $\mu\text{g/L}$ ~750 $\mu\text{g/L}$ 范围内对麦芽糖、乳糖和棉子糖测定值进行线性回归,相关系数分别为 0.999 2, 0.998 7, 0.998 3。说明各糖在该质量浓度范围内工作曲线保持线性。此范围足以满足植物样品中单糖和低聚糖测定的需要。

按照 ICPAC,对空白样品进行 10 次测定,各组分检出限($S/N = 3$)分别为木糖 1.8 μg 、果糖 2.3 μg 、葡萄糖 2.7 μg 、蔗糖 1.8 μg 、麦芽糖 3.5 μg 、乳糖 4.1 μg 、棉子糖 4.3 μg 。

3.3 样品测定结果和回收率

按“2.4”项制备样品并进行 HPLC 测定,利用回归方程得到不同植物样品中各糖的质量比。用本文实验条件,在植物样品滤液中加入已知量的木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖进行回收试验。表 1 列出植物样品中各糖的质量比和回收率,其中每个样品测定结果均为 5 次测定平均值。

表 1 植物样品测定结果和回收率(n = 5)
Table 1 Determination results of plant samples and recoveries(n = 5)

样品 Sample	糖 Sugar	本底值 Background ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	RSD (%)	加入量 Added ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	回收量 Recovered ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	回收率 Recovery (%)
富士苹果 Fuji apple	Fru	43.24	1.54	25.238	24.543	97.3
	Glu	49.68	2.73	18.521	19.001	102.6
	Suc	30.81	2.65	23.714	23.157	97.7
国光苹果 Guoguang apple	Fru	22.57	3.09	25.238	24.656	98.0
	Glu	34.71	1.29	18.521	18.722	101.1
	Suc	59.22	2.04	23.714	23.401	98.7
	Xyl	4.47	3.45	15.000	15.318	102.1
枣 1 号 Jujube No1	Fru	50.31	1.67	43.120	42.978	99.7
	Glu	14.93	2.91	60.561	59.800	98.7
	Suc	27.15	2.35	30.000	30.758	102.5
枣 2 号 Jujube No2	Xyl	7.601	1.66	15.000	14.613	97.4
	Fru	31.89	1.97	43.120	43.913	101.8
	Glu	19.23	2.48	6.561	59.913	98.9
	Suc	26.04	1.09	30.00	30.312	101.0

参考文献 :

[1] ZHANG Guo-zher(张国珍). Food biochemistry (食品生物化学). Beijing :Agricultural Press(北京 :农业出版社),1992. 22-60

[2] GAO Wa ,ZHANG Xin ,KONG Xiang-hui et al(高娃 ,张欣 ,孔祥辉 ,等). Chinese Journal of

Biotechnology(生物技术),1998 ,8(2):44-46

[3] GAN Bin-bir(甘宾宾). Chinese Journal of Chromatography(色谱),1999 ,17(1):87-88

[4] CHEN Guan-hua ,LIU Yun-hu(陈冠华 ,刘云惠). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1998 ,26(8):945-949

Separation and Determination of Monosaccharides with High Performance Liquid Chromatography by Using Internal Standard Method

LIU Yun-hui

(Biotechnology Center ,Agricultural University of Hebei , Baoding 071001 , China)

Abstract : A new approach by which free plant monosaccharides were separated directly and determined with high performance liquid chromatography by using internal standard method was established and β -indolylicetic acid was selected as the internal standard substance. The separation time for xylose(Xyl) , fructose(Fru) , glucose(Glu) , sucrose(Suc) , maltose(Mal) , lactose(Lac) and raffinose(Raf) was within 18 min and the detection limits were 1.8 μg , 2.3 μg , 2.7 μg , 1.8 μg , 3.5 μg , 4.1 μg and 4.3 μg respectively while the linear dynamics varied within the range of 5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ -750 $\mu\text{g}/\text{L}$. In this work , the effects of the concentration of CH_3CN and pH values in the mobile phase to the separation of the 7 sugars and β -indolylicetic acid were studied as well . The method can be used to the determinations of jujube apple samples. Moreover , the recovery experiment was also conducted. The results showed that the relative standard deviations of 5 determinations to Xyl , Fru , Glu and Suc were 1.66%-3.45% , 1.54%-3.01% , 1.29%-2.91% , 1.09%-2.65% and the recoveries were 97.4%-102.1% , 97.3%-101.8% , 98.7%-102.2% , 97.7%-102.5% , respectively.

Key words : high performance liquid chromatography ; internal standard method ; monosaccharide ; β -indolylicetic acid ; plant