

单糖与糖胺的水相乙酰化及其气相色谱测定

黄雪松

(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

关键词: 毛细管气相色谱; 单糖; 糖胺; 乙酰化

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2003)05-0527-01

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

岛津 GC-17 气相色谱仪, 配有氢焰检测器、HP 色谱工作站。所用 9 种单糖和 2 种糖胺标准品、甲基咪唑、醋酸酐、正辛醇均为 Sigma 公司产品, 硼氢化钠为 Aldrich 公司产品。

1.2 单糖与糖胺的还原

分别配制木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)、核糖(Rib)、鼠李糖(Rha)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、阿洛糖(All)、葡萄糖(Glu)、藻岩糖(Fuc)、葡萄糖胺(GluNH)、半乳糖胺(GalNH)标准溶液(100 mg/L)各 100 mL, 同时配制混合标准糖样(1 g/L), 加入阿洛糖为内标。将配制的标准糖液置于 -20 °C 冰箱中保存备用, 或加入 5% 的苯甲酸后置于 -4 °C 冰箱中存放备用。

取标准单糖及糖胺溶液各 5 mL, 分别加入 1 mL 阿洛糖为内标及 5 μ L 正辛醇作消泡剂, 加入新配制的 2% 硼氢化钠(用氨水配制) 0.2 mL, 于 40 °C 下保温 30 min, 使糖(或糖胺)完全还原为糖醇(或糖胺醇), 最后加入 0.4 mL 冰醋酸以中止过量的硼氢化钠继续作用。混合标准糖样同法操作还原。

1.3 糖醇与糖胺醇的乙酰化

取上述各种单糖、糖胺及混合标样的还原液各 0.2 mL, 加入 0.3 mL 甲基咪唑和 2 mL 醋酸酐, 在室温下乙酰化反应 10 min。加入 5 mL 蒸馏水以降解过量的醋酸酐。用流动自来水冷却至室温后, 加入 1 mL 二氯甲烷, 使之充分混合, 静置 10 min, 吸去上层水相后, 再加入 3 mL 蒸馏水, 同法操作, 弃水层, 重复操作 3 次。在所获下层二氯甲烷相中加入适量的无水硫酸钠脱水干燥后, 可直接用于测定乙酰化的单糖和糖胺。

1.4 气相色谱(GC)分析条件

DB-225 毛细管柱(15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m); 柱温: 初温 180 °C, 以 4 °C/min 升至 220 °C, 并在 220 °C 保温 30 min。进样量 2 μ L。载气为氦气, 流速为 2 mL/min。氢焰检测器, 检测器温度为 270 °C。

2 结果与讨论

2.1 标准糖样的色谱行为

受篇幅所限, 9 种单糖和 2 种糖胺的定性色谱图略。混合标准糖样的色谱图见图 1。从图 1 可看出: 所测 9 种单糖和 2 种糖胺都对应有一单一的色谱峰, 说明无副反应发生, 完全能满足单糖衍生化反应及气相色谱测定的要求。

本方法之所以能在水相中对单糖进行完全的乙酰化反应, 是因为使用了甲基咪唑作为乙酰化反应的催化剂, 否则在水相中是难以进行单糖乙酰化反应的。另外, 乙酰化反应完成后的反复水洗操作, 除去了乙酰化反应中的水溶性杂

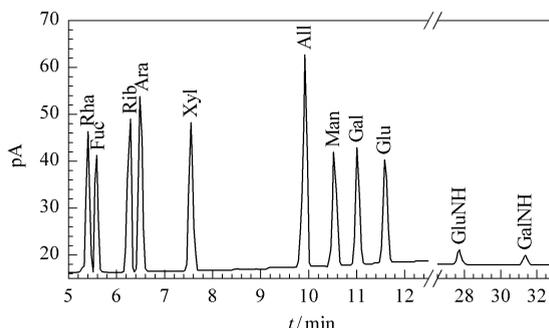


图 1 混合标样乙酰化的气相色谱图

质, 这也有利于气相色谱测定时减少杂质峰的产生。

本方法的另一优点是用阿洛糖作内标。内标与待测单糖经相同的还原、乙酰化等处理, 保证了实验条件的一致性, 减少了取样、进样、衍生化等产生的实验误差, 保证了结果的正确性。我们也曾用环己六醇作内标, 结果与阿洛糖一致。

2.2 方法的准确性、重复性及应用实例

利用 3 次 GC 测定值与实际值间的平均相对偏差表示本测定方法的准确度, 结果是: 葡萄糖 3.56%、木糖 3.80%、藻岩糖 1.33%、阿拉伯糖 -1.08%、核糖 3.00%、鼠李糖 3.80%、甘露糖 2.57%、半乳糖 3.98%、阿洛糖 4.25%、葡萄糖胺 4.96%、半乳糖胺 5.42%。由这些结果可以看出, 阿拉伯糖可产生负误差, 其余单糖和糖胺均产生正误差; 两种糖胺的测定误差较大, 这可能是由于其保留时间长、峰形较宽、选取峰面积时误差较大所致。

利用 GC 测定的相对标准偏差表示本测定方法的重复性 ($n = 3$), 结果是: 葡萄糖 3.92%、木糖 3.29%、藻岩糖 1.26%、阿拉伯糖 2.11%、核糖 3.55%、鼠李糖 1.62%、甘露糖 4.02%、半乳糖 1.75%、阿洛糖 2.64%、葡萄糖胺 6.54%、半乳糖胺 7.79%。其变化情况同准确度的变化。

我们采用本法成功地测定了金耳(*Tremella aurantialba*)、桃胶和一种海藻(*Sargassum patens*)等 10 多种植物多糖水解产物中单糖种类及其组成比例, 结果均比较理想。如在金耳多糖 I 中, 葡萄糖、甘露糖和木糖的质量分数依次为 2.5%、35.9% 和 16.9%, 并含有微量的阿拉伯糖、鼠李糖和藻岩糖。在海藻多糖 II 中, 藻岩糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖和半乳糖胺的质量分数依次为 35.29%、13.5%、12.91%、18.37%、4.82% 和 7.58%。

另外, 我们采用 HP-5(30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m) 毛细管柱也获得了类似的结果, 只是比 DB-225 柱用的时间稍长, 五碳糖的分离效果较差。