

衍生化-气相色谱法测定大豆提取液中的多糖含量

薛连海 邓 民 何建中

(吉林化工学院 吉林 132022)

摘 要 讨论了采用衍生化-萃取法处理含有大豆多糖的大豆提取液样品, 采用填充柱气相色谱法测定了提取液样品中的大豆多糖的方法。结果表明, 该法简便可靠, 回收率大于 98%, 相对标准偏差小于 4%。

关键词 大豆 多糖 衍生化 气相色谱法

Determining Holoside in Soybean by Derivatization-Gas Chromatography

Xue Lianhai, Deng Min, He Jianzhong

(Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022)

Abstract In this paper, the method for determining holoside in the soybean extract using packed column gas chromatography and the method of the deriving—extracting the sample are discussed. The results showed that the method is handy and dependable. The recovery is more than 98% and the relative standard deviation of the method is smaller than 4%.

Key words Soybean, Holoside, Derivatization, Gas chromatography

近年来, 对多糖的研究在分子生物学和细胞生物学领域愈来愈引起人们的重视。通过对天然植物中多糖的提取、分离、改造、提高活性、亲和性、特异性和生物利用度, 使得这一高分子聚合物在生命科学领域的研究有了重大进展。例如: 香菇多糖, 在医学上作为免疫调节剂来治疗肿瘤、肝炎等疾病^[1]。大豆多糖的提取方法为: 大豆—水溶液提取—精制—浓缩—干燥—大豆多糖^[2]。无论是在天然植物中提取、分离、精制多糖的生产工艺中, 还是在多糖的应用研究中, 对多糖的分析方法是必需的。概括起来糖的分析方法主要有四种(1)化学分析法^[3]: 该方法只能测定出总糖和还原糖的含量, 无法测定出不同种类糖的含量和定性分析, 而且样品具有颜色或其它还原性物质时, 对分析结果的准确度影响很大, 用于多糖的生产工艺及应用研究中不够理想; (2)、纸层析或板层析法^[3]: 该方法在定性定量分析上也不够理想; (3)高效液相色谱法^[3]: 采用胺基柱, 示差折光检测器, 乙晴: 水=70:30(体积比)为流动相测定多糖, 是一种较理想的方法。但仪器昂贵, 分析费用较高不利于普及; (4)气相色谱法^[4]: 以往的方法是以吡啶为溶剂, 将糖衍生化为挥发性三甲基硅醚衍生物, 然后进行气相色谱分析。而气相色谱法中, 使用吡啶为溶剂时存在着吡啶毒性较大危害环境和分析工作者健康, 吡啶极性大使溶剂峰拖尾造成定量不够准确, 要求无水操作及样品在吡啶中难溶解使操作繁琐等缺点。本文讨论了以二甲

薛连海 男, 44 岁, 教授, 主要从事精细化学品化学与技术、工业分析方面的工作。

2002-12-16 收稿, 2003-01-20 修回

基亚砷和环乙烷为溶剂,以六甲基二硅氮烷和三甲基氯硅烷为衍生化试剂,以环己烷为萃取剂,用衍生化-萃取法处理多糖样品,采用填充柱气相色谱法测定了大豆提取液中的多糖含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GC-16A 气相色谱仪(岛津);色谱柱为 $\Phi 3\text{mm} \times 1\text{m}$ 玻璃柱(岛津);固定相为 Shimalite W(60-80 目)涂 OV-17 固定液,液担比为 1.5%(日本信和化工株式会社)。环乙烷、二甲基亚砷、六甲基二硅氮烷、三甲基氯硅烷、肌醇、阿戊糖、鼠李糖、果糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖均为分析纯试剂。

1.2 标准样品的配制

(各物质的质量均折成 100%计)糖标准样:依次取蔗糖、棉籽糖、水苏糖各 500mg 左右(称准到 0.001g)于 100mL 容量瓶中加水溶解并定容到刻度。每次取 2.0mL 分别置于 25 支 5mL 的具塞比色管中,在真空度为 0.09MPa,温度为 60°C 蒸发至干,以每组 5 支比色管分成五组备用。二甲基亚砷标准样:取 500mg 肌醇(称准到 0.001g)于 100mL 容量瓶中,加入二甲基亚砷溶解并定容到刻度,配成含肌醇 5mg/mL 的二甲基亚砷标准样。

1.3 色谱条件

进样温度为 320°C;检测器(FID)温度为 300°C;柱温 120°C(保持 1min)升温到 330°C(保持 8min),升温速率为 20°C/min; N_2 为载气(40mL/min);进样为 1.0 μL 。

1.4 最佳衍生化-萃取条件的确定

在室温下,取上述三组标样,依次加入 1.0mL 二甲基亚砷标准液,1.0mL 环己烷。

1.4.1 衍生化试剂用量对色谱峰面积的影响 取第一组标样,依次加入衍生化试剂 2.4、2.7、3.0、3.3、3.6mL $V(\text{六甲基二硅氮烷}):V(\text{三甲基氯硅烷})=2:1$,振荡时间为 10min,静止时间为 1h,依次进样测定色谱峰面积。

1.4.2 静止时间对色谱峰面积的影响 取第二组标样,依次加入衍生化试剂 3.0mL,振荡时间为 10min,静止时间分别为 30、40、50、60、70min,依次进样测定色谱峰面积。

1.4.3 振荡时间对色谱峰面积的影响 取第三组标样,依次加入衍生化试剂 3.0mL,振荡时间分别为 4、6、8、10、12min,静止时间为 1h,依次进样测定色谱峰面积。

由以上单因素影响实验结果可知,当衍生化试剂用量为 2.7mL 以上时,静止时间为 40min 以上时,振荡时间为 8min 以上时,样品中各组分的色谱峰面积达到最大值。因此,最佳衍生化—萃取条件确定为衍生化试剂用量为 3.0mL $V(\text{六甲基二硅氮烷}):V(\text{三甲基氯硅烷})=2:1$,静止时间为 50min,振荡时间为 10min。取上层液进样 1.0 μL 。

1.5 定性定量方法

已知物对照法定性,内标法(肌醇为内标物)定量。

2 结果与讨论

2.1 相对校正因子、保留时间和方法回收率的测定与计算

分别取第四、五组糖标样,衍生化后进样三次,取平均值分别计算各组分的相对校正因子、

保留时间和回收率。肌醇、蔗糖、棉子糖、水苏糖的保留时间分别为 5.88、8.39、10.99、14.51min, 相对校正因子分别为 1.00、1.50、2.15、3.44。蔗糖、棉籽糖、水苏糖的回收率分别为 99.1%、98.5%、98.2%。

2.2 空白实验、大豆多糖样品的测定及相对标准偏差的计算

空白实验结果表明, 溶剂和其它试剂均可从进样开始 2min 内流出色谱柱。每次取 1.0mL 大豆低聚糖提取液分别置于 5 支 5 mL 的具塞比色管中, 在 0.09MPa 真空度和 60°C 下蒸发至干, 经衍生化—萃取处理, 在上述色谱条件下进样三次, 取平均值计算。测得的大豆多糖提取液样品的色谱图见图 1(图 1 中, 纵坐标为色谱峰高, 单位为 mV。横坐标为时间单位为 min)。大豆多糖提取液样品中蔗糖、棉子糖、水苏糖含量分别为 12.4、2.3、10.8mg/mL。相对标准偏差分别为 2.5%、2.9%、3.9%。

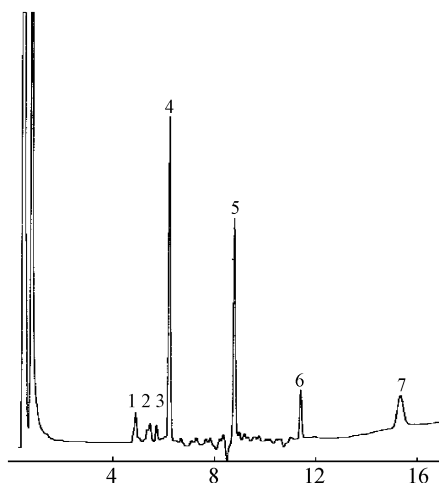


图 1 大豆多糖提取液的色谱图

Fig.1 Chromatogram of soybean extract

图 1 中, 1-阿戊糖, 2-鼠李糖, 3-果糖, 4-肌醇, 5-蔗糖, 6-棉子糖, 7-水苏糖

2.3 讨论

样品中多糖总量大于 80mg 时, 本方法的回收率明显下降, 因此, 样品中的总糖量定为小于等于 40mg; 衍生化产物在 FID 上燃烧时, 生成的二氧化硅附着在检测器的收集极上, 导致检测器灵敏度下降, 因此, 每测定 50~60 个样品后, 应当用丙酮或乙醇清洗检测器的收集极; 虽然采用液相色谱法也可以测定大豆多糖提取液中的多糖含量, 方法的回收率和相对标准偏差与本方法相当, 分析时间为 25 min, 但是, 由于仪器昂贵, 分析费用高而不利于普及。采用本方法样品需进行衍生化, 分析时间为 75 min, 但由于仪器便宜, 分析费用低易于普及, 而且拓宽了气相色谱的应用范围。

参考文献

- [1] 左耀明, 叶士伶. 食品科学, 2001, 22(2): 56~58.
- [2] 崔洪斌 编 著. 大豆生物活性物质的开发与应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1993: 96~104.
- [3] 黄伟坤 编 著. 食品检验分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 246~297.
- [4] 薛连海, 王建刚. 食品科学, 2001, 22(2): 61~63.