

植物原料中糖的测定方法

陆熙娴 秦特夫

(中国林科院木材工业研究所)

摘 要

本研究采用薄层色谱法、气相色谱法和离子交换色谱法对5种植物原料中的糖进行定量分析。结果表明:薄层色谱法具有操作方便的特点,但因展开次数较多而引起误差偏大。气相色谱法分离效果好,检出灵敏度高,但需制备衍生物,操作较为繁琐。离子交换色谱法具有简单、快速、准确的特点,特别适宜于大批量样品的单糖定量测定。但由于所使用的DA-XA阴离子交换树脂价格昂贵,目前国内尚难推广。综上所述,气相色谱法是目前可广泛使用的较为理想的检测植物原料中单糖的分析方法。

一、前言

植物原料中综纤维素是多聚糖的总称,其主要组成是纤维素和半纤维素。综纤维素在充分水解条件下能水解成木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖等多种单糖。

在制浆造纸和人造板生产过程中,定量测定综纤维素中各种单糖的含量,用以确定在不同反应条件下的化学组成变化,进而探讨有关的反应方式和反应机理有着重要意义。但是,由于这些单糖极性很强,结构相似,用一般的化学分析方法分离较为困难。随着色谱分析技术的发展,单糖的分离和测定已从最初的纸层色谱法发展到薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法和离子交换色谱法等多种方法。但各种方法对样品的处理并不相同,因而在进行分析时上述各种方法均有各自的特点。本文选用5种植物原料分别采用薄层色谱法、气相色谱法和离子交换色谱法测定综纤维素的糖基组成,通过对结果的分析对比,寻求最佳的测定方法。

二、实验方法

1. 试样制备

为了便于进行分析对比,本实验选用了针叶树材马尾松、落叶松、阔叶树材红桦、青杨,以及棉秆等5种较典型的植物原料进行测试。试材采集记录见参考文献[1]。试样的采集与制备参照“中国林业科学研究院木材化学成分分析方法暂行标准草案”进行。

2. 气相色谱法(GC)

(1) 综纤维素的水解

植物原料经制备后,按GB 2671-10-81造纸原料综纤维素含量的测定方法制备成综纤维素。然后将所得综纤维素按GB 2677-8-81造纸原料木素含量的测定方法将综纤维素完全水解成单糖。

(2) 水解液的中和及衍生物的制备

移取50毫升综纤维素水解液于100毫升烧杯中,用固体氢氧化钡调节pH至5~5.3(调节时pH值不允许超过6.5,否则单糖将会被破坏),离心除去硫酸钡沉淀。移取25毫

升清液于100毫升圆底烧瓶中,加入肌醇作内标,与硼氢化钠混合后于室温下间歇摇荡两小时,使糖还原成糖醇。加入适量冰醋酸以除去过量的硼氢化钠(至气泡不再产生为止)。将反应后的样品在旋转蒸发器中进行浓缩,浓缩时水浴温度应小于40℃。当浓缩至膏状时加入10毫升甲醇混合、蒸干,再加10毫升甲醇,再蒸干。将装有剩余物的圆底烧瓶置于105℃烘箱中干燥15分钟至水分全部除去。在冷却后的圆底烧瓶中加入乙醇和硫酸,在水浴(温度60—65℃)中反应至剩余物完全溶解。取出烧瓶冷却5分钟,慢慢倒入约70毫升冰水混合物(30毫升水、40克冰)于烧瓶中,然后将混合物转移到250毫升分液漏斗中,分别用25、15、10毫升二氯甲烷分三次分离。将分离后得到的二氯甲烷蒸干,加1毫升水清洗,待蒸干后加入2毫升二氯甲烷溶解剩余物,摇匀后备用。

(3) 标准样制备

称取定量的木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖,按上述方法制备成标准衍生物。

(4) 气相色谱

仪器:日本岛津GC—7 AG气相色谱仪

条件:色谱柱3%ECNSS—M(2M×3mm, Chrom W80目),柱温200℃,氢焰离子化检测器,检测温度230℃,载气N₂流量60ml/min, H₂流量0.7ml/min,空气流量0.6ml/min,进样量0.2μl(相当于0.5 μg单糖)。

3. 薄层色谱法(TLC)

(1) 水解液的中和与浓缩

综纤维素水解方法与使用气相色谱法的水解方法相同。移取50毫升水解液用氢氧化钡中和至pH=5~5.3,经离心后取清液20毫升在旋转蒸发器中浓缩(水浴温度≤55℃),当浓缩至0.5毫升左右时用注射器移入2毫升容量瓶中,用蒸馏水定容。

(2) 薄层板的制备

选用青岛硅胶。用缓冲剂和CMC把硅胶

调匀,用手动涂布机涂布。玻璃板为20×15×0.2厘米,薄层厚度为0.25毫米,于室温下风干,点样前在105—110℃活化1小时。

(3) 点样量

用微量注射器点样,点样量为3μl(重约30μg)。

(4) 展开剂

经几种不同的展开剂进行对比后,确定以醋酸丁脂:乙醇(95%):吡啶:水=8:2:2:1的展开剂展开效果最佳。

(5) 展开方式

采用多次单向上行法进行分离,展开前先用展开剂蒸汽饱和薄层板,一般需展开8—9次。

(6) 薄层扫描

仪器:日本岛津CS—910型双波长薄层扫描仪。

条件:采用双波长线性扫描反射法,光源:钨灯,波长:λ_S=395nm, λ_R=700nm。

(7) 标准样品的配制

称取AR级葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖和木糖各1.000克,溶于100毫升70%乙醇溶液中,定容至100毫升,配制成各含单糖为1%的混合标准溶液。

(8) 测定

在活化后的薄层板上用微量注射器分别点上混合标准溶液和样品溶液各3μl,上行展开9次,经显色后用单点外标法测定。扫描结果用岛津C—RIA数据处理机打印出来。

4. 离子交换色谱法(IEC)

(1) 综纤维素的水解

称取绝干试样200毫克,加2毫升75%硫酸,搅拌均匀后在水浴(30±0.5℃)中反应1小时,然后加入56毫升蒸馏水,在120±1℃,压力为0.103MPa容器中反应1小时,冷却后用G₃玻璃砂芯坩埚过滤,滤液即待测液。

(2) 离子交换色谱

离子交换色谱流程见图1。

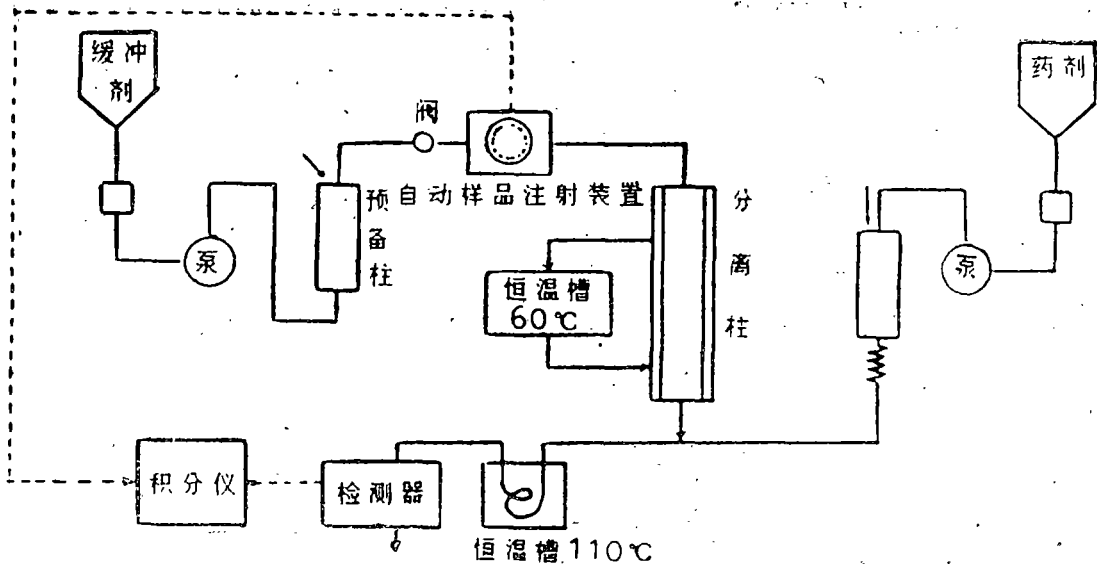


图1 离子交换色谱流程图

测试条件: Dowex 1×4 (0.9×5厘米) 预柱, Durum DA—XA (20u) 硼酸盐型阴离子交换树脂填充的分离柱 (0.32×40厘米), 洗提溶剂0.475M四硼酸钾缓冲溶液 (pH=9.2), 温度60℃, 洗提速度40ml/h, 压力20—30大气压。加料体积5—20μl (约0.1—0.4μg单糖), 用聚四氟乙烯柱 (0.5×30厘米) 为检测柱, 温度110℃。检测器是 Waters M440。

三、结果与讨论

以不同分析方法测出的单糖含量列于表2。由表2可见, 在阔叶树材中, 以葡萄糖和木糖的含量最高, 其余3种糖含量甚少。针叶树材则是葡萄糖、甘露糖含量较高, 木糖次之, 半乳糖和阿拉伯糖最少。棉秆的糖基组成与阔叶树材相似。

表2 三种测试方法的分析结果

含量 (%) 单糖 样品	葡萄糖			半乳糖			甘露糖			阿拉伯糖			木糖			残留木素		总计		
	IEC	GC	TLC	IEC	GC	TLC	IEC	GC	TLC	IEC	GC	TLC	IEC	GC	TLC	酸不溶木素	酸溶木素	IEC	GC	TLC
落叶松	68.4	63.6	32.6	1.3	3.0	0.4	13.5	14.6	20.6	0.8	1.5	9.4	6.2	8.6	9.4	3.6	4.77	97.9	99.1	80.0
马尾松	66.2	64.1	31.3	1.2	3.6	5.0	12.2	15.1	7.5	0.9	1.7	5.3	6.2	7.9	11.4	3.2	4.02	92.9	98.5	66.7
背杨	67.2	56.8	48.5	0	3.3	3.3	2.4	5.5	4.1	0	2.4	3.2	15.4	18.9	16.3	2.1	4.56	91.7	93.4	82.1
红桦	57.5	47.2	35.7	1.1	4.2	1.1	1.4	5.5	3.2	0	3.3	1.5	22.8	26.8	27.8	2.66	5.41	90.9	95.0	77.3
棉秆	59.6	55.7	50.6	0.8	2.5	0.1	1.1	3.9	6.4	0.3	3.1	0.4	18.2	20.0	19.9	4.23	4.06	88.3	93.4	85.7

在三种测定方法中, 离子交换色谱的分离效果最好, 但检测灵敏度略低于气相色谱, 尤其是对木糖和甘露糖、半乳糖的测定更是如此。这从图2至图4中的各图谱的峰高之比可以对比出。在进样量均为0.4μg左

右时, 用气相色谱法测定的谱图峰高均高于用离子交换色谱法测定的各相应峰高。但它操作简便, 分离效果好, 速度快, 尤其在大批样品分析时可以自动连续进样, 故在进行植物样品的单糖组分研究时仍是一种很

好的方法。但由于阴离子交换树脂Durrum DA—XA价格高昂,故目前难以在国内推广使用。

气相色谱法的分离效果尽管没有离子交换色谱法的高,但已能将要测定的五种单糖较好地分离开,且灵敏度较高,这从所测定的样品的五种单糖与综纤维素中残留的酸不溶木素与酸溶木素之和可近似于100%,即水解前的综纤维素总量可以看出。其中以测定针叶树材为最好,阔叶树

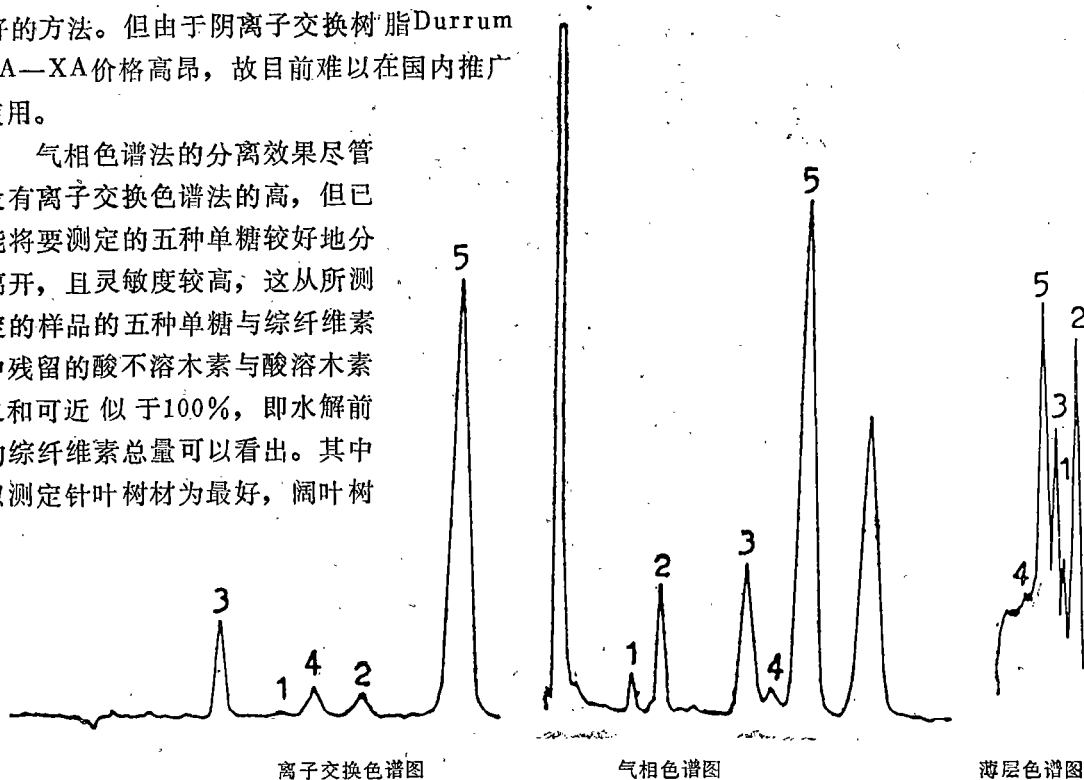


图2 落叶松综纤维素色谱图

1—阿拉伯糖 2—木糖 3—甘露糖 4—半乳糖 5—葡萄糖

材次之,棉秆最差。

薄层色谱法虽然能将五种单糖分开,但分离效果和检测灵敏度均低于上述两种方法,故所得结果偏低。这主要是因为薄层色谱法受点样量和展开次数的影响,产生较大的误差所致。

由上述讨论可见,尽管气相色谱法在制备衍生物时较为繁琐,但其再现性、灵敏度较好,分离效果也能满

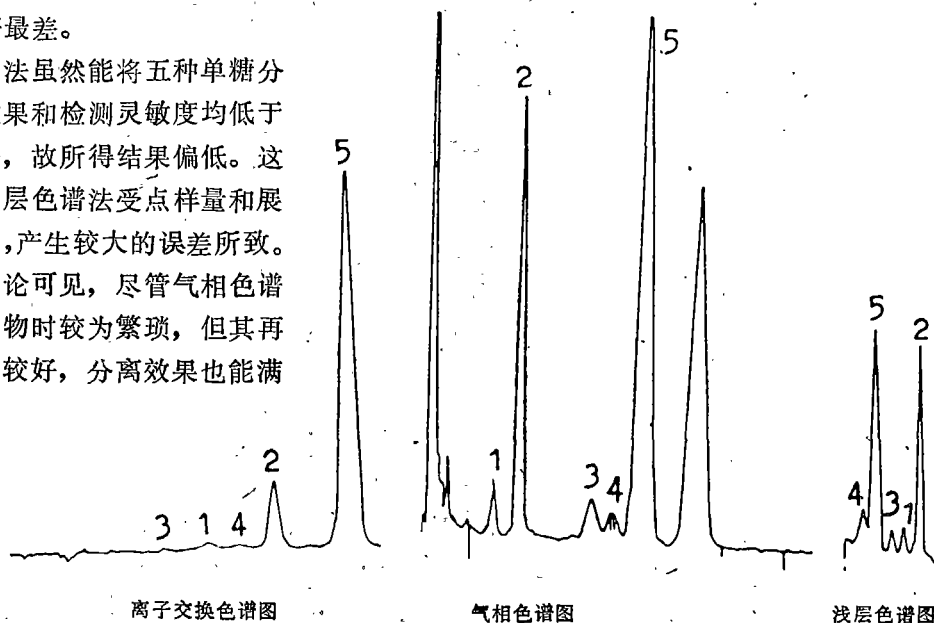


图3 红杉综纤维素色谱图

1—阿拉伯糖 2—木糖 3—甘露糖 4—半乳糖 5—葡萄糖

足分析要求,且便于推广应用,是目前用于分离和测定综纤维素糖基组成的较理想的分析方法。

四、结论

经三种方法对五种植物原料的综纤维素

水解后的糖基组成测定, 结果表明气相色谱法具有检测灵敏度高, 再现性好和较好的分离效果等优点, 是目前可广泛使用的较为理想的检测植物原料中单糖的分析方法。

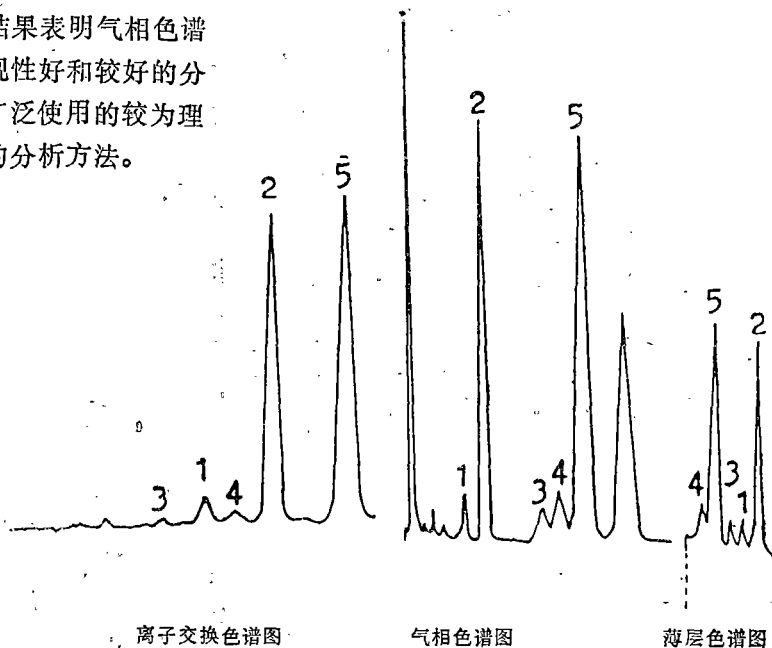


图4 棉秆综纤维索色谱图

1—阿拉伯糖 2—木糖 3—甘露糖 4—半乳糖 5—葡萄糖

参考文献

- [1] 陆熙娴、秦特夫, 1989, 几种植物原料在氧化降解过程中化学组分的变化, 木材工业, Vol3, No. 2, 26.
- [2] 王丽清等, 1981, 木材糖类薄层定量的研究, 南京林产工业学院学报(3)84—90.
- [3] Borchardt, L.G. and Piper, C.V., 1970, A Gas Chromatographic Method for Carbohydrates as Alditol-Acetates, Tappi, 53(2): 257.
- [4] Crowell, E.P. and Burnett, B.B., 1967, Analytical Chemistry, 39—121.
- [5] Puls J., —, Analysis of the degradation pattern of oligomers and polymers from lignocelluloses, Analytical chemical Acta.
- [6] Tappi, 1975, T249 pm—75 Carbohydrate composition of extractive-free wood and pulp by gas-liquid chromatography

The Methods for Measuring the Sugars in some Plant Materials

Liu Xixian, Qin Tefu

(Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry)

Abstract

The sugars in five plant materials have been quantitatively analysed with Thin-Layer Chromatography(TLC), Gas Chromatography(GC), and Ion Exchange Chromatography(IEC). The experiments show that each method has its own advantages and disadvantages. TLC is easy to operate, but the result is not accuracy enough because of developing samples so often during the test. GC is characterized in not only a better effect on seperating sugars from sample but also a higher measuring sensitivity, its shortcoming is trivial to operate. Of the three methods, IEC is regraded as the best one for simply operation, fast determination and accurate result, but the method is not practical because of the higher cost of DA—XA anion resin.