

· 技术方法 ·

植物组织中低聚糖乙酰化及毛细管气相色谱分析

谭玉朋¹, 李科^{1, 2}, 兰芹英³, 蒋湘宁^{1, 2*}, 盖颖^{1, 2*}

¹北京林业大学生命科学与技术学院, 北京 100083; ²国家林业局树木花卉育种生物工程重点开放实验室, 北京 100083

³中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303

摘要 建立一种用乙酰化衍生处理低聚糖并用毛细管气相色谱-FID进行分析的方法。以1-甲基咪唑为催化剂并以乙酸酐为乙酰化试剂, 同时对植物样品中蔗糖、棉子糖和水苏糖等低聚糖乙酰化产物进行毛细管气相色谱分离和FID检测。确定了低聚糖乙酰化衍生物的毛细管气相色谱分析条件, 并对低聚糖乙酰化反应条件及色谱分离条件进行了优化。结果表明, 在80–1 000 ng·μL⁻¹范围内线性关系良好, 蔗糖、棉子糖和水苏糖的相关系数(*R*)分别为0.995 2、0.995 7和0.987 7, 并且精准度与回收率均较高。使用该方法对低聚糖进行乙酰化反应重现性好、所需样品材料及试剂量少且污染毒害小, 能够得到理想的分离、检测和定量分析效果, 适用于少量植物组织中低聚糖的定量分析。该方法在食品、医药检测和基础科学研究领域均具有广泛的适用性及参考价值。

关键词 乙酰化, FID检测, 气相色谱, 低聚糖

谭玉朋, 李科, 兰芹英, 蒋湘宁, 盖颖 (2011). 植物组织中低聚糖乙酰化及毛细管气相色谱分析. 植物学报 46, 319–323.

低聚糖(oligosaccharide)又称寡糖, 是指2–10分子单糖经糖苷键连接成的低度聚合糖。主要包括: 低聚乳糖、低聚半乳糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖、帕拉金糖、低聚龙胆糖、大豆低聚糖、棉子糖和野芝麻四糖等。此类寡糖的共同特点是: 难以被胃肠消化吸收, 甜度和热量低, 基本不会使血糖和血脂升高。低聚糖可分为功能性低聚糖和普通低聚糖(汪建明等, 2000)。常见的低聚糖中, 蔗糖、乳糖和麦芽糖等属于普通低聚糖, 棉子糖、水苏糖、低聚果糖和低聚木糖等(因其具有某种特定的生理功能)则属于功能性低聚糖(郑建仙和耿立萍, 1997; 段文录, 2003)。二糖是最常见的低聚糖, 亦称双糖, 它是由2分子单糖经糖苷键连接而成。其中较重要的低聚糖——棉子糖是由葡萄糖、果糖和半乳糖组成; 水苏糖是由组成棉子糖的三糖加上1分子半乳糖组成。利用低聚糖类产品生产功能性食品不仅具有可操作性, 而且生产的食品功能性强, 可以满足不同层次消费者的需求(尤新, 2004; 蒋梅峰和林勤保, 2008)。开发营养、安全且无污染的功能性食品将是21世纪的必然趋势, 低聚糖现已成为食品、医药和科学研究等领域的热点及焦点。

低聚糖分析常用的方法主要有化学分析法、纸层析(或薄层层析法)、高效液相色谱法和气相色谱法(Hansson and Karlsson, 1993; 黄贤校等, 2006; 白英, 2006)。由于前3种方法重现性较差, 已逐渐被重现性好且灵敏度高的仪器分析方法(高效液相色谱法和气相色谱法)所取代。高效液相色谱法因其示差检测器灵敏度相对较低, 故仅适合用于分析低聚糖含量较高的材料(或可通过提高样品量来弥补其不足)(杨云等, 2005)。低聚糖由多个单糖分子聚合而成, 分子量较大, 用气相色谱仪进行分析时需先进行衍生化处理。硅烷化衍生化方法是常用于气相色谱分析的衍生化方法(薛连海, 2003; 李健等, 2003)。使用该方法衍生化低聚糖时, 一般反应时间较长, 且反应过程需在无水的环境中进行。此外, 该方法中使用的吡啶试剂毒性较大, 不仅危害人体健康, 而且还会污染环境, 且衍生化后易产生色谱峰拖尾现象, 给定性及定量分析带来一定的困难。综上所述, 分析微量植物样品中的微量功能性低聚糖材料的2–4分子低聚糖尚无比较理想的方法。

本文以1-甲基咪唑为催化剂, 乙酸酐为乙酰化试

收稿日期: 2010-04-21; 接受日期: 2011-03-16

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(No.NSF30630053)、引进国外先进林业创新技术 948 项目(No.948-4-C01)、北京林业大学新进教师科研启动基金项目(No.2010BLX03)和中国博士后科学基金(No.20090450015)

* 通讯作者: E-mail: gaiying@bjfu.edu.cn; jiangxn@bjfu.edu.cn

剂,对2—4分子低聚糖进行乙酰化衍生处理,并用气相色谱毛细管柱分离,采用火焰离子化检测(flame ionization detection, FID)。该方法操作简单,所需样品材料及试剂量少,衍生化反应时间短且反应完全,色谱分离时完全无拖尾,适用于微量植物样品中较低含量2—4分子低聚糖的快捷、精准定性和定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器和试剂

实验材料为中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部提供的海南坡垒(*Hopea chinensis* Merr. Et Chun)种子。

实验所用仪器包括Agilent Technologies 7890A GC System和Agilent ChemStation数据系统(Agilent, 美国)、分析天平、微量进样器和玻璃毛细管等。

实验试剂有二甲基亚砜、1-甲基咪唑、乙酸酐和乙酸乙酯(色谱纯)、蔗糖、棉子糖和水苏糖等标准品(均为分析纯)及硫酸钠(化学纯),购自Sigma公司或国内化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 标准样品的配制和样品的准备

1.2.1.1 标准样品与标准曲线样品的配制

精确称取蔗糖、棉子糖和水苏糖各50.00 mg(精确到0.001 g),用二甲基亚砜溶解并定容至50 mL,即配成浓度为1.0 g·L⁻¹的储备液;从各储备液中分别精确量取一定体积的溶液,适当稀释后配成一定浓度的单标溶液用于定性分析;分别量取一定体积的储备液,混合并定容后配成系列浓度(10、20、30、40、60、80、125、250、500、1 000 ng·μL⁻¹)的混合标样溶液,用于标准曲线、最低检测量、精密度和回收率等的实验。

量取每种浓度的标样各50 μL,置于1 mL的样品瓶管中,加入20 μL 1-甲基咪唑和50 μL 乙酸酐,室温下反应10分钟,再加入2—3倍体积水以去除未反应的乙酸酐,之后用50 μL 乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯萃取液脱水后量取1 μL进样分析(GC-FID分析)。设3次重复。获得标准曲线、精密度及回收率的实验结果。

1.2.1.2 植物材料样品的提取与衍生化

精确称取1.00 g(精确到0.001 g)海南坡垒种子,研磨

成粉末后用10 mL 80%的乙醇溶液60°C超声浸提30分钟,同时加入200 μg核糖醇为内标。将浸提液于1 000 ×g离心10分钟后,提取上清液,同样条件下再重复提取1次上清液,合并提取的上清液并将其减压浓缩后定容至1 mL。量取50 μL上述溶液置于1 mL的样品瓶中,依据标准曲线样品加入20 μL 1-甲基咪唑和50 μL 乙酸酐,于室温反应10分钟后,加入2—3倍体积水以去除未反应的乙酸酐,之后用50 μL 乙酸乙酯萃取。在乙酸乙酯萃取液中加入适量硫酸钠脱水后,量取1 μL进样分析(GC-FID分析)。

1.2.2 气相色谱分离检测条件

色谱柱为30 m×0.25 mm×0.25 μm HP-PLOT毛细管柱。柱箱温度为程序升温,250°C(保持1分钟),之后每分钟升高10°C,直至330°C(保持16分钟)。火焰离子化检测器温度设为340°C,进样口温度为340°C, N₂为载气,流速为1.0 mL·min⁻¹,进样1 μL,采用无分流进样。

2 结果与讨论

2.1 衍生化条件的优化

为获得乙酰化反应的最佳反应温度和反应时间,分别在室温、60°C和80°C条件下反应5、10、30、60分钟或更长时间。实验中使用12个样品瓶,每管中加入50 μL浓缩后的提取液,按照上述衍生化方法处理,分3组进行,分别在室温、60°C和80°C水浴中反应5、10、30和60分钟。各管达到预定反应时间后取出,依照标样衍生化过程进行水洗、萃取、脱水和进样分析。根据分析得到的色谱图结果确定最佳衍生化条件。

分析色谱图结果表明,室温反应5分钟得到的色谱峰面积偏小,说明反应不完全;60°C和80°C反应时样品颜色变深,水洗时样品出现沉淀,而且在反应6.2分钟时出现杂峰,影响了定量结果的准确性;室温反应10分钟时衍生化效果最好,无沉淀出现,色谱峰无拖尾,杂峰少且节省时间。

2.2 柱温和载气流量的确定

柱温高低、程序升温的速率及载气流速对峰的保留时间及峰形均影响很大。实验中较高的起始柱温度(250°C)、缓慢的升温速率(10°C·min⁻¹)及较大的载气

流速($1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)使得混合标样的出峰时间缩短、分离度提高且峰形良好。

2.3 色谱分离

在上述色谱分离条件下,蔗糖、棉子糖和水苏糖可完全分离,其保留时间分别为4.39、9.14和16.48分钟,混合标样色谱结果如图1所示。

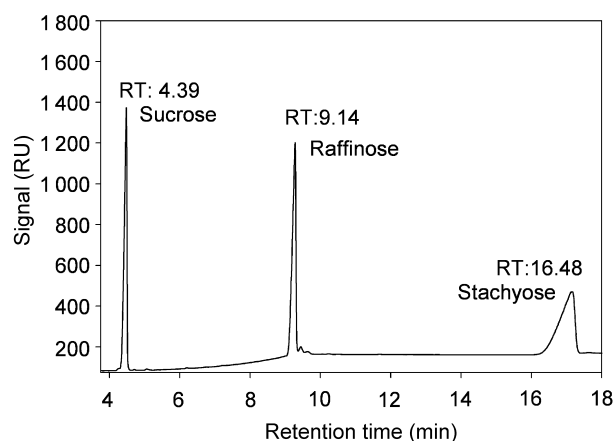


图1 蔗糖、棉子糖和水苏糖混合标样色谱分离图

Figure 1 Chromatogram of total ion current (TIC) of the acetylated oligosaccharides standards

从图1可以看出,在上述色谱条件下3种低聚糖的分离度极高,在该分离条件下可获得良好的分离效果。

2.4 标准曲线和最低检测限

量取用1.2.1.1节所述方法制备的标准系列样品进行分析测定,以色谱峰面积对标准溶液浓度进行线性回归得到标准曲线。结果表明,蔗糖、棉子糖和水苏糖在各自标准曲线浓度范围内浓度-响应信号线性关系良好,分别为 $Y=6.829\ 7X+67.554(R=0.995\ 2)$ 、 $Y=6.516\ 4X-16.529(R=0.995\ 7)$ 和 $Y=5.374\ 8X-130.75(R=0.987\ 7)$ (式中 Y 为色谱峰面积, X 为标准样品浓度, R 为回归系数)。蔗糖、棉子糖和水苏糖标样浓度线性范围分别为 $30\text{--}1\ 000\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $60\text{--}1\ 000\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $80\text{--}1\ 000\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;其最低检测量分别为20、40和80 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

2.5 精密度和回收率的测定

取 $250\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 混合标准样品测定5次,计算蔗糖、棉子糖和水苏糖的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),分别为0.11%、0.15%和0.23%,具有较好的重现性和精密度。

标准样品、植物样品和植物样品中添加标准样品分别经过提取和衍生化过程,并用仪器检测获得色谱峰面积,用标准曲线公式计算这些峰面积对应的进样量,分别记为 S_0 、 S_1 和 S_2 ,回收率 $= (S_2-S_1)/S_0\times 100\%$ 。

从结果可以看出(表1),蔗糖、棉子糖和水苏糖的平均添加回收率均在90.0%以上,其变异系数(coefficient of variation, CV)分别为2.22%、0.85%和0.85%,表明该方法的回收率较高,且稳定性好,具有较好的可行性,适用于低聚糖的分析检测。

2.6 样品测定

以海南坡垒种子为实验材料,使用1.2.1.2节所述方法,分别测定其不同发育时期和不同组织部位(子叶和胚轴)中蔗糖、棉子糖和水苏糖的含量,3次重复测定结果见表2。

从表1和表2可以看出,采用乙酰化衍生化方法处理并用GC-FID分析测定植物样品中蔗糖、棉子糖和水苏糖的含量,3次重复实验的重复性及标样的回收率均很高,对植物样品中目标组份糖的含量测定和分离效果良好,表明该方法适用于植物组织中低聚糖的分离鉴定。

徐鹏和徐德平(2009)以水为溶剂从枸杞(*Lycium chinense*)中提取糖类成分,经95%乙醇沉淀脱去蛋白质和多糖,再经打孔树脂分离得到低聚糖,之后通过离子交换和凝胶柱层析并经ESI-MS分析测定出2种低聚糖组分。本实验建立的分离测定方法与传统化学方法和柱层析法相比,均具有较大的优越性,主要表现在操作程序简单、可行性良好且使用试剂量少等方面。

3 结论

为确保样品衍生化反应完全,我们对衍生化条件进行了优化:室温下衍生化反应以10分钟为宜。本研究优化的色谱条件不仅能够将蔗糖、棉子糖和水苏糖完全

表1 蔗糖、棉子糖和水苏糖添加回收率

Table 1 Recovery rates of sucrose, raffinose and stachyose

Sucrose			Raffinose			Stachyose		
Spike (ng)	Detected concentration (ng)	Recovery rate (%)	Spike (ng)	Detected concentration (ng)	Recovery rate (%)	Spike (ng)	Detected concentration (ng)	Recovery rate (%)
50	49.1	98.1	50	48.15	96.3	50	46.9	93.8
100	102.2	102.2	100	94.7	94.7	100	94.5	94.5
200	197.4	98.7	200	191.6	95.8	200	185.8	92.9
		99.67 (average)			95.6(average)			93.73(average)

表2 海南坡垒种子不同组织部位中蔗糖、棉子糖和水苏糖的含量

Table 2 Contents of sucrose, raffinose and stachyose in various parts of *Hopea chinensis* seeds

Position	Date(month-day)	Sucrose (mg·g ⁻¹ DW)	Raffinose (mg·g ⁻¹ DW)	Stachyose (mg·g ⁻¹ DW)	
Cotyledon	03-30	1.063	0.801	Not detected	
		1.081	0.816	Not detected	
		1.058	0.830		
	Means±SD	1.067±0.012	0.816±0.014	—	
	04-19	0.781	0.964	Not detected	
		0.779	0.972	Not detected	
		0.785	0.966	Not detected	
	Means±SD	0.782±0.003	0.967±0.004	—	
	Embryonal axis	03-30	11.200	8.300	0.068
			11.020	8.450	0.065
10.988			8.270	0.073	
Means±SD		11.069±0.114	8.340±0.096	0.069±0.004	
04-19		4.550	4.400	0.069	
		4.510	4.480	0.072	
		4.672	4.330	0.081	
Means±SD		4.577±0.084	4.403±0.075	0.074±0.006	

分离，而且各组分在各自线性范围内的准确性、回收率和重现性等均较高，适合植物样品中较低含量蔗糖、棉子糖和水苏糖的定性及定量分析检测。本方法为气相色谱分析低聚糖提供了一种新的简便且可行的衍生化方法。

致谢 本研究在国家林业局树木花卉育种生物工程重点开放实验室、教育部树木花卉育种与基因工程实验室和林木育种国家工程实验室的帮助与支持下完成，在此向以上单位表示感谢。

参考文献

白英 (2006). 肉苁蓉低聚糖的分离纯化及组成分析. 食品科技 31(4), 32–33.
段文录 (2003). 寡糖的分离及结构研究. 商丘职业技术学院

学报 2(6), 35–38.
黄贤校, 谷克仁, 赵一凡 (2006). 大豆低聚糖研究概况. 粮食与食品工业 13(3), 27–29.
蒋梅峰, 林勤保 (2008). 大枣低聚糖的分离纯化及结构分析. 食品科学 29, 376–378.
李健, 刘宁, 吴艳华, 齐守国 (2003). 低聚糖分析技术研究. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版) 19, 75–79.
汪建明, 赵征, 王勇志 (2000). 低聚糖的分离与鉴定. 食品研究与开发 21(3), 3–5.
徐鹏, 徐德平 (2009). 枸杞低聚糖的分离与结构鉴定. 食品与发酵工业 35(6), 196–197.
薛连海 (2003). 气相色谱法测定大豆中低聚糖含量. 分析化学 31, 382–382.
杨云, 弓建红, 冯卫生, 马相斌 (2005). 大枣中性多糖的化学研究. 时珍国医国药 16, 1215–1216.
尤新 (2004). 功能性低聚糖的发展方针. 北京: 中国轻工业出

版社. pp. 48–52.

郑建仙, 耿立萍 (1997). 功能性低聚糖析论. 食品与发酵工业
23, 39–46.

Hansson GC, Karlsson H (1993). Gas chromatography and

gas chromatography-mass spectrometry of glycoprotein
oligosaccharides. In: Hounsell EF, ed. Methods in Molecular Biology, Vol. 14. Glycoprotein Analysis in Biomedicine. Totowa: Humana Press. pp. 47–54.

Capillary Gas Chromatographic Analysis of Oligosaccharide Derivatives in Plant Tissue

Yupeng Tan¹, Ke Li^{1, 2}, Qinying Lan³, Xiangning Jiang^{1, 2*}, Ying Gai^{1, 2*}

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

²The Key Laboratory of Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology of State Forestry Administration, Beijing 100083, China; ³Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Yunnan Mengla 666303, China

Abstract We introduce the establishment and optimization of capillary gas chromatography-flame ionization detection (FID) for analysis of acetylated oligosaccharides. Chemical and instrumental analysis of oligosaccharides requires derivating them into their derivatives. We used 1-methylimidazole as a catalyst and acetic anhydride as a reagent for acetylation of oligosaccharides. The acetylation and separation of acetylated products of sucrose, raffinose and stachyose were optimized and effectively separated by gas chromatography on a DB-15 capillary column and detected by an FID detector. The method is accurate, precise and has high recovery rate. The recovery rates for sucrose, raffinose and stachyose were all above 90%. The standard curves of oligosaccharide acetylated derivatives showed a high linearity in the range of 80 to 1 000 ng·μL⁻¹ concentrations. The linear correlation coefficients were 0.995 2 for sucrose, 0.995 7 for raffinose and 0.987 7 for stachyose. The method is suitable for analysis of target compounds in the food sciences, medicine and biological sciences, with the advantages of high reproducibility, minor sampling and chemical consumption and environmental friendliness.

Key words acetylation, FID detection, gas chromatography, oligosaccharides

Tan YP, Li K, Lan QY, Jiang XN, Gai Y (2011). Capillary gas chromatographic analysis of oligosaccharide derivatives in plant tissue. *Chin Bull Bot* 46, 319–323.

* Author for correspondence. E-mail: gaiying@bjfu.edu.cn; jiangxn@bjfu.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)