

文章编号:1673-1689(2005)04-0086-03

离子色谱法测定多糖水解液中的 半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸

吴胜芳, 王树英, 陶冠军, 孙元琳

(江南大学分析测试中心, 江苏无锡 214036)

摘要: 用离子色谱法建立一种简单、快速、准确、灵敏的半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸的测定方法。多糖水解液经过简单的中和、稀释、过滤后直接进样分析。半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸具有较高的分离度($R=4.2$); 两者在 $20\sim 200$ mg/L 质量浓度范围内都具有良好的线性, 其相关系数均为 $r=0.9990$; 重复性和回收率都满足了仪器分析要求; 两种化合物的检测限分别为 100 ng 和 50 ng。

关键词: 离子色谱; 半乳糖醛酸; 葡萄糖醛酸; 脉冲安培检测器

中图分类号: O 657.7

文献标识码: A

Determination of Galacturonic Acid and Glucuronic Acid in the Hydrolyzed Polysaccharide Solution by Ion Chromatography

WU Sheng-fang, WANG Shu-ying, TAO Guan-jun, SUN Yuan-lin

(The Analysis and Test Centre, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A simple, fast, accurate and highly sensitive method for the determination of galacturonic acid and glucuronic acid in the hydrolyzed polysaccharide solution by Ion Chromatography-PAD was established. After neutralization, dilution, and filtration, the hydrolyzed polysaccharide solution was injected directly. Galacturonic acid and glucuronic acid exhibited good resolution ($R=4.2$). Two linear regression equations of $y=27\ 469x+136\ 911$ ($r=0.9990$) and $y=66\ 379x+347\ 163$ ($r=0.9990$) were obtained for galacturonic and glucuronic acids, respectively. The linear ranges of the two compounds were $20\sim 200$ mg/L. The good accuracy and recovery rate met the demands of the instrument analysis. The limit of detection was $0.1\ \mu\text{g}$ and $0.05\ \mu\text{g}$, respectively.

Key words: ion chromatography(IC); galacturonic acid; glucuronic acid; pulse ampere detector (PAD)

自20世纪60年代以来,人们陆续发现了多糖具有多种生物活性,它不仅可以作为广谱免疫促进剂,还可以抗感染、抗放射、抗凝血、降血糖、预防和治疗肿瘤、艾滋病等^[1-5]。多糖的诸多生物活性都是由其一级结构决定的。多糖的一级结构分析是多糖

研究的基础。葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸等是大多数多糖组成中的重要部分,因此,建立一种快速、准确且样品处理简单的检测方法成了多糖基础研究中的重要课题。目前,已报道的糖醛酸类化合物测定方法主要有分光光度法^[6]、气相色谱法^[7]、液相色谱

收稿日期:2004-06-24; 修回日期:2004-07-23.

作者简介:吴胜芳(1976-),男,河北衡水人,助理工程师,工学硕士。

法^[8].分光光度法只能测定总的糖醛酸含量;气相色谱法需要对样品进行衍生化;液相色谱法对样品需量大且灵敏度低.

离子色谱法以其简单、快速、高选择性、高灵敏度等诸多优点,普遍应用于环保、电子、化工、食品、发酵、生化、医药等诸多领域.其检测对象不再仅仅是简单的无机阴阳离子,更多是有机离子和极性分子化合物的检测^[9],其检测效果也优越于其它的检测方法.作者对多糖水解液中的葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸的离子色谱法测定方法进行了研究,该方法具有简单、快速、灵敏度高、结果准确等优点,对多糖一级结构的分析有一定的参考价值.

1 材料与方 法

1.1 仪器

离子色谱仪: DIONEX 2010i, 美国戴安公司产品.

色谱条件: 糖分析柱: CarboPac PA1, PG1; 淋洗液: NaOH (0.15 mol/L)-NaAC (0.15 mol/L); 体积流量: 0.9 mL/min; 进样体积: 50 μ L; 检测器: 脉冲安培检测器, 金电极.

色谱工作站: 美国 ANASTAR 公司产品.

1.2 试剂

半乳糖醛酸, 葡萄糖醛酸: SIGMA 公司产品; 其它试剂均为分析纯或色谱纯试剂; 多糖水解液: 江南大学食品学院提供.

1.3 标准品及淋洗液的配制

1.3.1 标准品的配制 精确称取半乳糖醛酸标样 20.00 mg, 葡萄糖醛酸 20.00 mg 于 100 mL 容量瓶中, 定容摇匀. 该溶液作为储备液, 按表 1 配置一系列标准品溶液.

表 1 系列标准品溶液的配制

Tab. 1 Preparation of series of standard sample solutions

编号	吸取标准品		标样质量浓度/(mg/L)	
	体积/mL	定容 体积/mL	半乳糖醛酸	葡萄糖醛酸
1	2.5	25	20	20
2	5.0	25	40	40
3	10.0	25	80	80
4	20.0	25	160	160
5	25.0	25	200	200

1.3.2 淋洗液的配制 将质量分数为 50% 的 NaOH 溶液 12 mL 于 2000 mL 容量瓶中, 加入 40.8 g NaAC \cdot 3H₂O, 用煮沸过的去离子水溶解, 定容摇匀, 再用 0.45 μ m 的微孔膜过滤. 以防止淋洗液中存在干的 CO₂ 扰色谱分离与检测.

2 分析结果

2.1 色谱分离

图 1 中的 3 张色谱图分别为: (a) 标样图谱, (b) 样品 1 图谱, (c) 样品 2 图谱. 作者借鉴中性单糖的离子色谱法分析^[9], 考虑到羧基对酸性单糖在阴离子分析柱上的洗脱, 因此采取了淋洗强度较大的氢氧化钠-醋酸钠淋洗液体系. 由图 1 中的 (a) 图可以看出, 葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸获得了很好的分离效果 ($R=4.2$) 且分析速度快仅在 10 min 内就完成了分析. (b) 图和 (c) 图分别是两种不同的粗多糖水解液的色谱图. 多糖水解液中的中性单糖大部分在 4 min 之内即完全出峰且由于脉冲安培检测器具有优越的选择性使干扰因素大大降低, 提高了糖醛酸测定的准确度.

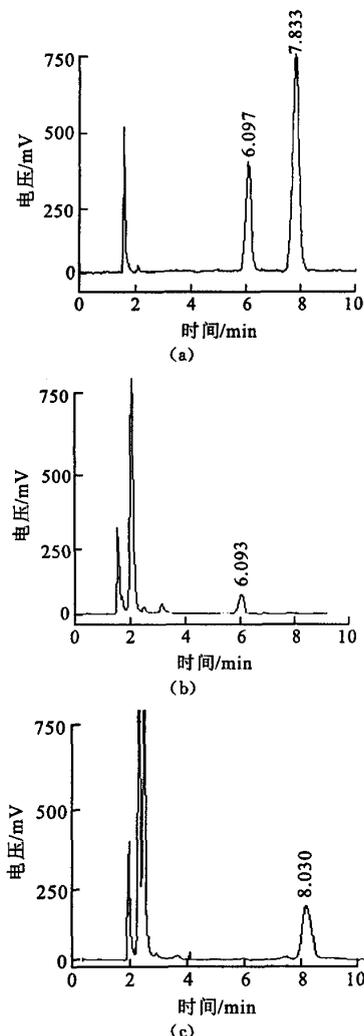


图 1 离子色谱法测定半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸色谱图

Fig. 1 IC chromatogram of galacturonic acid and gluconic acid

2.2 线性关系

取已配制系列混合标准品溶液上机测定,以标样的峰面积为纵坐标,以标样的质量浓度(mg/L)为横坐标进行线性回归。

半乳糖醛酸回归方程为: $y = 27\ 469x + 136\ 911$, $r = 0.999\ 0$ 。

葡萄糖醛酸回归方程为: $y = 66\ 379x + 347\ 163$, $r = 0.999\ 0$ 。

2.3 精密性

取标准品2溶液平行进样6次测得结果列于表2,分别计算峰面积和峰位的变异系数。

表2 半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸精密性测定结果

Tab. 2 The repeatability of the analysis result of galacturonic acid and glucuronic acid

测定次数	半乳糖醛酸峰面积	醛酸保留时间/min	葡萄糖峰面积	醛酸保留时间/min
1	1 244 315	6.157	2 973 994	7.883
2	1 239 819	6.103	2 939 708	7.823
3	1 212 694	6.123	2 896 310	7.847
4	1 188 128	6.133	2 889 141	7.847
5	1 220 136	6.100	2 899 749	7.817
6	1 201 347	6.133	2 892 618	7.870
X	1 217 739	6.125	2 915 253	7.848
CV/%	1.8	2.1	1.2	2.6

2.4 回收率实验

取已测定的不同质量浓度的样品溶液加入等体积的已知质量浓度的标准溶液混匀后上机测定,结果见表3。

2.5 检测限测定

将1#对照品溶液稀释测得标样色谱峰高大于二倍噪音时的最小进样量即检测限为:半乳糖醛酸100 ng,葡萄糖醛酸50 ng。

3 讨论

1) 葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸具有较高的分离

表3 半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸回收率实验

Tab. 3 The reproductive result of galacturonic acid and glucuronic acid by IC

样品	标样加入量/ μg	标样测定值/ μg	回收率/%	平均回收率/%
半乳糖醛酸	28.15	27.1	96.3	97.3
	22.10	21.6	97.7	
	16.05	15.7	97.8	
葡萄糖醛酸	41.65	41.2	98.9	98.9
	30.85	30.2	97.9	
	34.45	34.4	99.9	

度, $R = 4.2$, 远远高于 $R = 1.5$ 时分离度, 为基线分离 99.7%, 且远离中性糖的峰(中性单糖 $RT < 3$ min)。由于脉冲安培检测器的高选择性, 分析的干扰因素大为降低。

2) 半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸的质量浓度在 20~200 mg/L 时, 其相关系数均为 0.999 0。满足定量分析的要求。

3) 对单一质量浓度标准品进行 6 次平行试验; 半乳糖醛酸峰面积的变异系数为 1.8%, 保留时间变异系数 2.1%; 葡萄糖醛酸峰面积的变异系数为 1.2%, 保留时间变异系数为 2.6%。满足仪器分析变异系数 $< 5\%$ 的要求。

4) 对 3 种不同样品中的半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸进行回收率试验, 回收率达到了 95%。说明本试验的分析条件下测定半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸方法可靠。

5) 该方法样品处理简单, 多糖水解液只需中和和过滤即可上机测定, 而其它色谱法则需要繁琐的衍生化步骤或除酸步骤; 分析速度快, 样品分析可在 10 min 内完成; 选择性好(样品杂峰少), 多糖水解液中的中性单糖在 3 min 内出峰完全, 若采用梯度洗脱可以同时实现其单糖组成分析; 灵敏度高、重现性好结果准确。

参考文献:

- [1] 张倩, 江萍, 秦礼康, 等. 多糖功能进展[J]. 贵州农业科学, 1998, 26(4): 59-60.
- [2] 黄芳, 蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 90-98.
- [3] Sorivastava R, Kulshershta D K. Bioactive polysaccharides from plants[J]. *Phytochem*, 1989, 28 (11): 2877-2883.
- [4] Heijden R. Bioactive carbohydrate polymers[J]. *Carbohydr Eur*, 1998, 13: 48.
- [5] 董群, 房积年, 多糖在医药领域的应用[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(10): 649-652.
- [6] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330-334.
- [7] 陶乐平, 丁在富, 张部昌. 气相色谱在多糖结构测定中的应用[J]. 色谱, 1994, 12(5): 351-354.
- [8] 陆德培, 黄克武, 李荣春. 糖的高效液相色谱分析研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1982, 14(5): 501-506.
- [9] 牟世芬, 刘克纳. 离子色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

(责任编辑: 朱明)