

测定麦芽糖浆中麦芽糖含量的新方法

高瑞莲

(食品科学与工程系)

摘要 本文着重研究了采用层析法(纸上层析、薄层层析)分离麦芽糖浆中的麦芽糖,洗脱后用蒽酮比色法测定其含量的新方法。

关键词 麦芽糖浆;纸上层析;薄层层析;蒽酮比色;含量

0 前言

麦芽糖浆是一种麦芽糖含量高,而葡萄糖含量较低的淀粉糖浆,麦芽糖的含量是评价麦芽糖浆质量的一个非常重要的指标,一般的测定方法均为测定还原糖的方法,故测量结果偏高。只能运用高压液相色谱仪才能准确测定其含量,而一般工厂是难具备这一条件的。因此,作者通过试验,得到一种既能准确测定又适合于工厂使用的新方法。此法系采用层析法分离麦芽糖浆中的麦芽糖,并将其洗脱后用蒽酮比色法测其含量。层析法具有分离效率高,又能把性质极相类似的组分彼此分离,而后可分别加以测定的特点。同时,分光光度法具有灵敏、准确、快速及选择性好等特点(测定的相对误差约2%—5%,所测得溶液浓度下限可达 10^{-5} — 10^{-6} mol/L)。

层析分离的步骤如下:

选择合适的层析纸或制备合适的薄层板→对称地点样→平衡、展开→纸或板的一半用显色剂显色,另一半作洗脱、定量用。

1 实验器材与方法

1.1 实验器材

主要的仪器与药品 层析缸或带有玻璃底板的钟罩;微量注射器;玻璃喷雾器;电吹风;800型沉淀离心机;二孔恒温水浴;721型分光光度计;层析纸;层析板。

展开剂 正丁醇:乙醇:水=5:3:2;乙酸乙酯:甲醇:冰醋酸:水=15:3:2:2。

显色剂 银盐显色剂:5mol/L氨水:0.1mol/L AgNO₃=1:1;二苯胺显色剂:称取二苯胺1g、苯胺1.1ml溶于100ml丙酮中,缓缓加入浓磷酸,边加边搅拌至生成的乳状沉淀刚溶解为止,约9.0ml。

2.0%标准糖溶液(20μg/μL):准确称取干燥的分析纯葡萄糖、西德麦芽糖标样及德国麦芽三糖标样各500mg,溶解后定容到25ml。

0.1%蒽酮溶液:准确称取100mg分析纯蒽酮溶于100ml优级纯的浓硫酸中(现用现配)。

1.2 实验方法

· 本文1990年10月17日收到。

1.2.1 糖的蒽酮比色与标准曲线的绘制^[1,2] 己糖在浓硫酸的作用下生成羟甲基糠醛,它与蒽酮 $C_6H_4COC_6H_4CH_2$ 作用生成一种蓝绿色的物质,且在10—100 μg 范围内其颜色的深浅与己糖的量成正比。

用微量注射器准确吸取2.0%标准麦芽糖液0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50 μl 分别点在直径为1.2cm的圆形滤纸上,分别在未点样之处穿一根长线,放入8支预先已准确加入2.00ml蒸馏水的具塞比色管中,在60℃的恒温水浴中准确浸泡15min。拉线将滤纸片离开液面,再分别用0.50ml蒸馏水洗滤纸片,滤干后取出。各加4.00ml蒽酮溶液(比色管预先放在冰水中),摇匀后加塞,然后浸入沸水浴中,从沸腾开始,准确加热10min,取出立即用冷水冷却,然后在室温下放置10min,在620nm的波长下^[1],用空白溶液作参比液进行比色,测出其光密度后,计算回归方程及绘制标准曲线。

用同样方法绘制葡萄糖和麦芽三糖的标准曲线。

1.2.2 麦芽糖浆的纸上层析

点样 按层析缸高度和点样个数将新华滤纸(层析纸)裁成适当大小,用铅笔距纸边2.5cm处划一直线(称为原线)。线上每隔2.0cm标上一个点(称为原点)。然后用微量注射器分别吸取样品稀释液及三个标准糖液各2.00 μl 点在同一张层析纸上,且左右对称,点的直径以0.3—0.5cm为宜。

平衡 将点好样的层析纸缝成一个圆筒(注意二边要留有一定空隙)放在层析缸中,用展开剂蒸汽饱和2h。

展开(上行法多次展开)^[3] 平衡结束后,将点样的一端浸入展开剂中(1cm为宜)即进行展开,当溶剂前沿到达层析纸顶端0.5—1.0cm时取出,用电风吹干,再平衡、展开直至麦芽糖与葡萄糖、麦芽三糖完全分开为止。

显色(喷雾法)与比色 将层析好的层析纸剪下一半悬挂好,用装有显色剂的喷雾器离层析纸约30cm处进行喷雾,使纸恰好润湿为止。在105℃的恒温干燥箱中烘干到斑点出现为止(也可用热风吹干到斑点出现为止)。按对称关系在另一半未显色的层析纸下画出麦芽糖斑点的位置与大小,将其适当放大剪下,按标准曲线绘制的步骤将麦芽糖斑洗脱、比色测出其光密度,(同时在空白处剪下相同面积的滤纸片作测定的空白对照用)。从标准曲线上查得麦芽糖量。最后按下式算出麦芽糖的百分含量。

$$\text{麦芽糖}(\% \text{BX}) = \frac{\gamma \times 10^{-6}}{W \times V_1 / V_0 \times {}^\circ\text{BX}} \times 100$$

式中

γ ——由样品光密度从标准曲线上查出的麦芽糖 μg 数

W ——样品量

V_1 ——样品稀释后的体积

V_0 ——层析时吸取稀释样液的体积

${}^\circ\text{BX}$ ——麦芽糖浆的锤度

1.2.3 麦芽糖浆的薄层层析

薄层板的制备^[4] 称取市售青岛海洋化工厂的化学纯硅胶G7g放入玻璃研钵中,加16—18ml无机盐或硼酸^[5]的水溶液调成糊状(先润湿后调匀),立即倾倒在20×20cm干洁的玻璃板

上,用涂铺器或特制的玻璃棒除去过多的硅胶G^[4],让其自然干燥后放入100—110℃的恒温干燥箱中“活化”1h,而后放入干燥器中,供一周内使用。

点样 先将自制层析板修整一下,后在层析板底端2.0cm处划出原线与原点。

点样器与点样方法同纸上层析,但点样时力求操作迅速,防止薄层吸湿而降低活性影响分离效果。点的直径一般不大于0.2—0.3cm。

展开(上行法)^[3] 将点好样的层析板放置在已用展开剂饱和30min的方型层析缸中,待展开剂前沿离顶端0.5—1.0cm处取出,在室温下挥干溶剂。

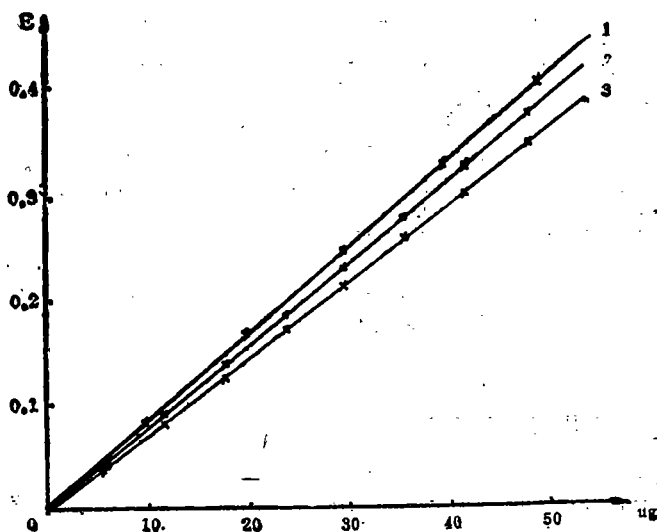
显色(喷雾法)与比色 喷雾前将干洁的玻璃板用夹子夹在已展开的层析板上,玻璃板的大小正好为层析板的1/2。喷雾时切勿使薄层吹散。喷雾后的层析板在105℃下烘干到斑点出现为止,按对称关系将另一半未显色的层析板上麦芽糖斑点的位置与大小画出,并将其适当放大刮下,放入预先已准确加入2.0ml蒸馏水的离心管中,在60℃恒温水浴中准确浸泡15min并不断振摇,稍冷后在1500r/min的下离心分离2min,轻轻取出过滤,再用0.50ml蒸馏水洗涤。滤液一并于10ml具塞比色管中,加4.0ml蒽酮溶液显色并在620nm的波长下比色(同时在空白处刮下相同面积的硅胶G作空白对照),测出其光密度,再在标准曲线上查出麦芽糖的量,最后算出麦芽糖的百分含量。

1.2.4 回收率试验 以50μg标准麦芽糖溶液分别按1.2.2, 1.2.3的程序测出麦芽糖量并算出其回收率。

2 结果与讨论

2.1 麦芽糖标准曲线及其回归方程

见图1。



1——用于直接测定 $y = 0.00820x + 0.0050$

2——用于薄层层析 $y = 0.008063x - 0.0032$

3——用于纸上层析 $y = 0.00755x - 0.0067$

图1 麦芽糖标准曲线

三曲线的相关系数分别为0.9997, 0.9995, 0.9998。

在制作糖的标准曲线时,按理完全可以将不同量的标准糖液直接放入各比色管中,显色后进行比色即可,但考虑到样品中麦芽糖含量测定是在层析分离后才进行,糖的洗脱是否完全直接影响结果的准确度。为消除系统误差,在绘制标准曲线时也将标准糖液分别点在层析纸或层析板上,洗脱后还需将纸或薄层硅胶G与糖液分开,否则加入蒽酮溶液后会相应地出现黑色或混浊,影响比色,这是蒽酮溶液中有浓硫酸之故。

糖的洗脱应采用少量多次,才能完全洗脱,但洗液多了糖液就变稀,加入同样多的蒽酮溶液会造成蒽酮溶解度降低而析出,使溶液变浑而影响比色。经试验,蒽酮溶液与糖液的体积之比以1.5—2.0为宜。故洗脱用水不宜多,但洗脱后的纸或硅胶G再用少量蒸馏水至少洗涤一次,否则因糖分损失而使结果偏低。试验后采用2.50ml蒸馏水如前恒温浸泡洗脱糖斑,离心分离后(用纸层析时取出滤纸片)吸出1.50ml清液,加3.00ml蒽酮溶液显色与比色,既方便又准确。相应地糖浆层析后的糖斑也按此洗脱。虽已如此,但所得曲线2、3的斜率仍低于曲线1的斜率,这是由于糖斑洗脱不完全之故。曲线2的斜率大于曲线3的斜率,说明薄层层析后的糖斑比纸层析后的糖斑容易洗脱下来,但洗脱都不完全。

实验还得出用于薄层层析葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖三条标准曲线的斜率分别为0.00810、0.00807、0.00800。由此可见,这三条曲线的斜率非常接近,绘制在同一张坐标纸上,几乎会重合成一条直线。(用于纸上层析的也同样如此,仅斜率稍低)。这并非是偶然的巧合,可以从这些糖的结构与它们在浓硫酸中水解成葡萄糖的性质得到充分的解释。例如一分子麦芽糖是由二个D-葡萄糖单元通过 α -1,4糖甙键相结合而成,水解后即成二分子D-葡萄糖;一分子麦芽三糖可水解成三分子D-葡萄糖,故与葡萄糖相同重量的麦芽糖或麦芽三糖在浓硫酸中水解后得的葡萄糖分子个数应完全相同。所以在相同条件下制得的标准曲线其斜率就应该相同。(实测结果略有高低,是由于实验误差而引起的)。依此类推,在相同条件下的麦芽四糖、麦芽五糖……(低聚糖范围内)标准曲线的斜率与葡萄糖或麦芽糖标准曲线的斜率也应该相同。由此可得出在蒽酮比色法中葡萄糖标准曲线可以代替麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖……标准曲线(低聚糖范围内)。这样既省时又省钱,更可在无标准麦芽糖或麦芽三糖、四糖、五糖等的情况下仍能比较准确测出各种麦芽糖的含量。例如同一样品经薄层层析后用麦芽糖标准曲线测得麦芽糖为51.9%,而用葡萄糖标准曲线代替麦芽糖标准曲线后测得的麦芽糖含量为51.7%,其相对偏差仅为0.2%,如减小实验误差,其结果会更接近,相对误差也会相应减小。

2.2 麦芽糖浆的纸上层析

层析纸的选择 生产中的工艺控制分析可用新华2号或3号滤纸,成品质量评定则需用4号或5号滤纸。

展开剂的选择 适用糖分离的溶剂系统有正丁醇系统、吡啶系统、酚水系统等^[3]。经试验确定正丁醇系统,用正丁醇:乙醇:水=5:3:2作为麦芽糖浆层析分离的展开剂,分离后的斑点比较集中又较圆整。其它系统则出现不是斑点大就是斑点不圆整。

展开次数的选择 每展开一次约需8h(滤纸为15×24cm,2h平衡,6h展开)。经多次展开证实糖浆中糖的种类越多, R_f 值越接近就越难分离,需展开的次数也越多。要使麦芽糖浆中麦芽糖与葡萄糖、麦芽三糖完全分离,则需展开2—3次。

显色剂的选择 能使糖显色的显色剂很多,有银盐显色剂、邻苯二甲酸苯胺显色剂、二苯胺显色剂等^[3]。经试验决定用银盐与二苯胺显色剂,其显色既灵敏又明显且不易褪色。

显色后确认麦芽糖与葡萄糖和麦芽三糖已完全分离时,按对称关系在另一半未显色的层析纸上画出麦芽糖斑点的位置与大小,将其适当放大剪下,按标准曲线绘制的步骤将麦芽糖斑洗脱,比色测出其光密度,并在标准曲线上查出麦芽糖的量,最后算出麦芽糖含量。如测定某食品厂二份麦芽糖浆各经三次平行试验测得其麦芽糖的平均含量分别为51.5%、53.3%,各自的相对偏差分别为0.78%、0.078%及0.75%、0.38%、1.50%。

从实验中还可知,同一样品的平行试验最好在同一次展开中进行,这样可以提高其精密度。

2.3 麦芽糖浆的薄层层析

薄层板的制备 需要吸附剂与粘合剂。常用吸附剂为硅胶或氧化铝。硅胶适用于酸性和中性物质的分离,麦芽糖浆呈酸性,故采用硅胶作吸附剂。另外,糖是多羟基化合物,极性较强而易被吸附,因而常用含无机盐的水溶液(例如3.0%磷酸二氢钠)调浆制板以降低硅胶薄层的吸附能力,且使斑点集中,从而提高分离效果,有时也采用0.1mol 硼酸溶液调浆制成一定pH薄层。常用的粘合剂有煅石膏、羟甲基纤维素钠(CMC)和淀粉。试剂硅胶G中已含煅石膏。所涂薄层仍不够牢固,不能用铅笔划线作记号,用CMC或淀粉为粘合剂则薄层较牢固,可用铅笔写字。考虑到层析分离后用蒽酮比色法测定麦芽糖含量时,因CMC或淀粉均属多糖,会被蒽酮溶液中的浓硫酸水解成还原性糖类而影响测定结果(结果偏高),故在制板时不能加CMC或淀粉以增强薄层的牢度。为弥补此缺陷,可用一条2.0cm宽的纸条放在层析板的下端,纸条沿线每隔2.0cm处标上点而代替原线和原点,效果尚可。硅胶G薄层板也有成品供应。

点样 用微量注射器分别吸取2.0%的标准葡萄糖溶液、麦芽糖溶液、麦芽三糖溶液及3.0%样品溶液各2.0 μ l,分别对称地点在层析板上。

展开 如在溶剂蒸汽未饱和层析缸时就开始展开或层析缸未密封而漏气时都会产生“边缘效应”^[3],使薄层两边物质的 R_f 值要比中间的高。为减轻和消除边缘效应可在层析缸内壁贴上浸润了展开剂的滤纸,使层析缸内溶剂蒸汽的饱和度增加。

展开方式采用上行法,当展开剂上升到距顶端0.5—1.0cm时取出薄层板,凉干。

适用于糖薄层层析的展开剂也有多种,经采用乙酸乙酯:甲醇:冰醋酸:水=15:3:2:2及氯仿:甲醇=3:2进行试验,结果是前者比后者更理想。麦芽糖浆经一次展开,需用2h左右就能将麦芽糖与葡萄糖、麦芽三糖分离开,比纸层析的时间大为缩短,层析后的斑点也比较集中且圆整。

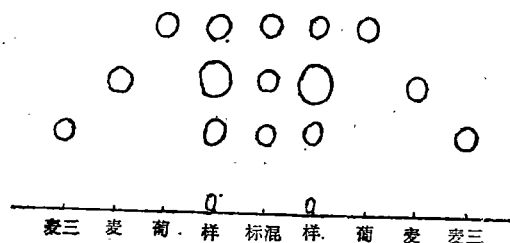


图2 麦芽糖浆的薄层层析图(一次展开1:40)

上述两份麦芽糖浆各经三次平行试验后。测得其麦芽糖的平均含量分别为51.9%、53.6%,各自的相对偏差分别为1.0%、0.4%、0.6%及0.8%、0.6%、0.2%与纸上层析分离后

测得的平均含量颇为接近。

应注意的是,点样量太大会使斑点呈上下方向的椭圆形,使分离不清而需增加展开次数;在刮取糖斑时要特别小心,以免丢失;比色测定时空白对照的薄层面积要与糖斑面积一致,否则将产生误差。

2.4 回收率试验

纸上层析与薄层层析各作三份平行试验,纸上层析的回收率分别为95.8%、97.2%、98.0%,平均为97.0%。薄层层析的回收率分别为96.2%、97.8%、98.5%。平均97.5%。

3 结 论

纸上层析与薄层层析在一定的条件下都可以把麦芽糖浆中的麦芽糖分离出来,且经蒽酮比色测得其含量颇为接近。但薄层层析具有分离次数少、分离时间短及糖斑比较集中,易于洗脱,回收率较高等特点,故采用薄层层析分离麦芽糖浆中的麦芽糖,洗脱后用蒽酮比色法测定麦芽糖含量的方法更切实可行。

在糖的蒽酮比色测定中,在完全相同的条件下,葡萄糖标准曲线可以代替麦芽糖、麦芽三糖、四糖、五糖……标准曲线(在低聚糖范围内)。

参 考 文 献

- 1 无锡轻工业学院,天津轻工业学院。食品分析。轻工业出版社,1983
- 2 蔡武城,袁厚积。生物物质常用化学分析法。科学出版社,1982
- 3 天津轻工业学院,无锡轻工业学院等。工业发酵分析。轻工业出版社,1980
- 4 陈耀祖,有机分析。高等教育出版社,1981
- 5 张维杰。复合多糖生化研究技术。上海科学技术出版社,1987
- 6 轻工院校《有机化学》编写组。有机化学。北京师范学院出版社,1988

A New Method for Determining the Content of the Matose in Maltose Syrup

Gao Ruilian

(Dept. of Food Sci. and Eng.)

Abstract This paper mainly studies the new method of separating maltose from maltose syrup with the paper chromatography or thin-layer chromatography. The content of the eluted maltose is determined by anthrone colorimetry.

Keywords Maltose syrup; Paper chromatography; Thin-layer chromatography; Anthrone colorimetry; Content.