

利用差异衍生同步分析醛糖和酮糖

叶芳挺 严小军* 徐继林 陈海敏

(宁波大学,浙江省海洋生物工程重点实验室,宁波 315211)

摘 要 建立了一种可同时对醛、酮糖进行精确定性和定量分析的方法。以肌醇作为内标,用 80%乙醇超声提取,利用醋酸酐和 HMDS + TMCS(1:3)进行差异衍生,在 E 源下用 SM 模式进行 GC/MS 分析。结果表明:11 种标准单糖在 1~4 mg/L 范围内线性良好;仪器检出限:醛糖在 8.15~22.4 $\mu\text{g/L}$ 之间;酮糖为 2.32 $\mu\text{g/L}$ 和 3.47 $\mu\text{g/L}$;高、中、低 3 个量的平均回收率在 73.0%~95.7%,相对标准偏差在 3.1%~10.0%。对枸杞游离单糖进行测定,各单糖含量分别在 0.26~368.6 mg/g。该方法弥补了以前单糖分析中的缺陷,对既含有醛糖又含有酮糖的样品可同时进行精确的定性定量分析。

关键词 差异衍生,醛糖,酮糖,色谱,质谱

1 引言

单糖的组成分析是糖类学研究的基础,GC/MS 是目前应用最广泛对单糖的组成进行分析的方法,它具有分辨能力高、分析速度快和灵敏度高优点^[1,2]。但是由于糖本身没有足够的挥发性,因此分析前需预先转化成易挥发、对热稳定的衍生物。常用的糖衍生方法有三甲基硅醚衍生、糖腈乙酸酯衍生和糖醇乙酸酯衍生等等。这些方法各有优点又各有缺点:三甲基硅醚衍生产生的异构峰较多,给定性和定量带来一定困难;利用糖腈乙酸酯衍生酮糖衍生物则得不到色谱峰;糖醇乙酸酯衍生操作过于烦琐且葡萄糖和山梨糖经过还原均得到山梨醇,果糖经还原可变成山梨醇和甘露醇的混合物,这使得分析变得复杂^[3]。由于许多样品中醛糖和酮糖同时存在^[4,5],因此单独利用以上任一种衍生方法都无法得到完善的结果。本研究综合以上几种衍生方法的优点,通过差异性衍生方法设计了一种可同时对醛、酮糖进行定性和定量分析的方法。

2 实验方法

2.1 仪器与试剂

QP2010 气相色谱-质谱分析仪(日本 SHIMADZU 公司);30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 mm SPB-50 色谱柱(美国 SUPELCO 公司);冷冻干燥机(韩国 LSHIN 公司)等。单糖标准样:赤藓糖、果糖、岩藻糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖(美国 SIGMA-ALDRICH 公司),葡萄糖、山梨糖、半乳糖、核糖和内标肌醇;HMDS + TMCS, 3:1 (Sylon HT) Kit(美国 SUPELCO 公司);吡啶、醋酸酐等其他试剂为国产分析纯。产自宁夏的特级枸杞购买于宁波某市场。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配置 准确称取 50 mg 单糖标准品和内标肌醇,用去离子水定容到 1 mL,充分摇匀,配置成 50 g/L 的标准储备液,置于冰箱中冷冻保存。制作工作曲线时再取此储备液用去离子水配成其他浓度的标准溶液,再进行 GC/MS 分析。

2.2.2 提取及衍生处理 称取 20 mg 左右样品于 15 mL 试管中加 80%乙醇 5 mL 超声提取 15 min,重复两次,合并提取液,浓缩于 1.5 mL 样品瓶。向 1.5 mL 样品瓶中加入过量盐酸羟胺和 0.5 mL 吡啶密封混合均匀,90°C 水浴 30 min。水浴后各取两份 25 mL,一份加入等量醋酸酐 90°C 水浴 30 min,吹干用二氯甲烷定容至 0.5 mL,上机分析。另一份加入等量的 HMDS/TMCS(1:3) 80°C 水浴 1 h,吹干用正己烷定容至 0.5 mL,上机分析。

2004-11-02 收稿;2005-01-24 接受

本文系国家自然科学基金(Na 20472040)国家科技部新药博士基金(Na 2003AA2Z3511)资助项目

2.2.3 分析条件 色谱条件: 进样口温度 250℃, 载气为 99.999% 的高纯 He, 流速 1 mL/min, 初始柱前压 26.3 kPa, 柱温度 100℃ (3.5 min) $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$ 160℃ (20 min) $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$ 200℃ (15 min) $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280℃ (5 min)。分流进样 1 μL (分流比 9:6)。MS 条件: 用电子轰击 (electron impact, EI) 源分析, 电子能量为 70 eV, 离子源温度 200℃, 接口温度 250℃。选取全程离子碎片扫描 (SCAN) 模式时, 质量扫描范围为 50~600, 溶剂延迟 3.5 min。选取特征离子碎片扫描 (SM) 模式时, 醛糖和酮糖分别按表 1 选择各单糖的特征碎片离子, 每一组特征碎片离子中, 第一个离子作为定量时的目标离子 (表 1 中黑体), 后两个离子作为定性时的参考离子 (表 1 中斜体部分)。

3 结果与讨论

3.1 差异衍生处理下标准单糖的定性分析

实验结果表明, 用 E 源分析, 在吡啶醋酸酐衍生下醛糖和内标 (肌醇) 在 SPB-50 柱上得到良好分离 (图 1A), 无异构峰出现。酮糖在该衍生方法下没有出峰。在 HMDS + TMCS 衍生 (三甲基硅醚衍生) 下酮糖和肌醇在同一柱上也有较好分离 (图 1B), 醛糖在该衍生方法下有峰重叠。从图 1A 和图 1B 中可以看到, 无论是吡啶醋酸酐衍生, 还是三甲基硅醚衍生, 单糖的出峰顺序与碳数有关。碳数越少出峰越早; 不同碳数的出峰相距较远; 同碳数的出峰时间相近。其中鼠李糖和岩藻糖较为特殊, 这两种糖虽为六碳糖, 但其最后一个碳上没有连羟基, 与葡萄糖等六碳糖的结构有所不同, 这可能就是这两种糖在五碳糖出峰时段出峰的原因。因此选用在三甲基硅醚衍生下对酮糖进行定量分析。其他糖则在吡啶醋酸酐衍生下进行定量分析。2 种衍生方法的一致性则用在 2 种衍生方法下都可分离的赤藓糖作为标准。在 SM 模式下, 本实验利用目标离子 (m/z 145) 和两个参考离子 (表 1 中斜体部分) 来共同确定样品中的目标单糖可避免与鬼峰混淆。

3.2 差异衍生处理下标准单糖的定量分析

表 1 为以各标准单糖衍生物所选定量目标离子的峰面积相对浓度所作工作曲线, 各组分在 1~4 mg/L 浓度范围内均呈良好的线形。其中果糖是根据双峰的面积和进行工作曲线制定, 并利用外标法计算出各组分的绝对回收率。所有单糖的回收率都在 73.0% 以上, 最高达到 90.2% (表 2)。标准相对偏差在 3.1%~10.0%。以对应信噪比为 3 的标准物浓度作为检出限^[6], 醛糖的检出限在 8.15~22.39, 而果糖和山梨糖的检出限分别为 3.47 和 2.32。用赤藓糖来检测差异衍生的一致性结果显示在高、中、低 3 个浓度下两种衍生的一致性都较好, 其 RSD 分别为 16.2%、8.3% 和 4.1%。

在用 GC/MS 对单糖进行定量分析中, 很多文献中都提到用肌醇作为定量的内标^[7], 肌醇为环状结构且有 6 个羟基与单糖的结构类似。但是, 肌醇以其磷脂形式作为信息传递系统广泛的存在于动植物细胞中^[8]。许多样品中都能测到肌醇^[9]。因此, 肌醇作为定量的内标是不合适的, 但可以作为定性的参考标准。此外如果能够找到合适的定量内标, 本方法的回收率应该还可以进一步提高。

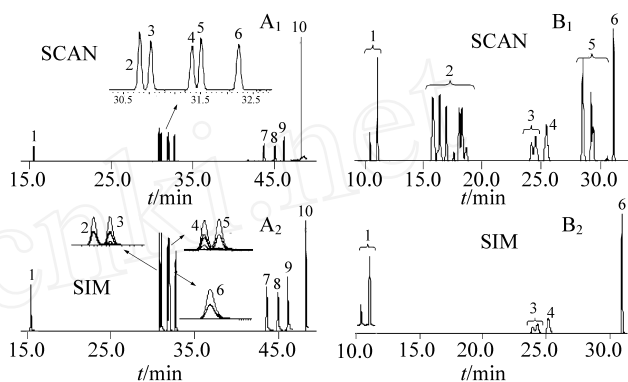


图 1 醛糖的糖腈乙酸酯衍生物在 SPB-50 柱上的色谱图 (A) 和酮糖的三甲基硅醚衍生物在 SPB-50 柱上的色谱图 (B)

Fig 1 The chromatograms of aldose derivatives on SPB-50 column under different monitor modes (A) and the chromatograms of ketose derivatives on SPB-50 column under different monitor modes (B)

A: 1. 赤藓糖 (erythrose); 2. 鼠李糖 (rhamnose); 3. 核糖 (ribose); 4. 阿拉伯糖 (arabinose); 5. 岩藻糖 (fucose); 6. 木糖 (xylose); 7. 甘露糖 (mannose); 8. 葡萄糖 (glucose); 9. 半乳糖 (galactose); 10. 肌醇 (inositol). B: 1. 赤藓糖 (erythrose); 2. 鼠李糖 (rhamnose)、核糖 (ribose)、阿拉伯糖 (arabinose)、岩藻糖 (fucose)、木糖 (xylose); 3. 果糖 (fructose); 4. 山梨糖 (sorbitose); 5. 甘露糖 (mannose)、葡萄糖 (glucose)、半乳糖 (galactose); 6. 肌醇 (inositol)。

表 1 单糖衍生物的质谱学性质及其线性方程
Table 1 The mass spectrometric characteristics and linearity of monosaccharide derivatives

	相对保留时间 Relative retention time	单糖 Monosaccharide	主要离子碎片 (m/z) Major ion fragments (m/z)						线性方程 Calibration equation	回归系数 r
醛糖 * Aldose	15.407	赤藓糖 Erythrose	145	103	141	112	99		$Y = 25490.67X$	0.999
	30.743	鼠李糖 Rhamnose	145	103	129	141	117		$Y = 52643.19X$	0.999
	30.958	核糖 Ribose	145	115	103	217	175		$Y = 47105.24X$	0.999
	31.742	阿拉伯糖 Arabinose	145	103	115	200	242		$Y = 43767.86X$	0.999
	31.909	岩藻糖 Fucose	145	103	129	141	117		$Y = 61042.62X$	0.999
	32.634	木糖 Xylose	145	103	115	200	242		$Y = 44723.14X$	0.999
	43.508	甘露糖 Mannose	145	103	115	212	187		$Y = 39750.1X$	0.999
	44.858	葡萄糖 Glucose	145	103	115	212	187		$Y = 41496.14X$	0.999
	46.026	半乳糖 Galactose	145	115	103	212	187		$Y = 32974.57X$	0.999
酮糖 ** Ketose	23.959	果糖 Fructose	217	103	147	307	422		$Y = 142066.3X$	0.999
	24.307									
	25.205	山李糖 Sorbose	217	103	147	307	422		$Y = 174630.3X$	0.999

*:用吡啶醋酸酐衍生 (derived by pyridine and acetic anhydride); **:三甲基硅醚衍生 (derived by silylating reagent)

表 2 单糖绝对回收率和精密度检验
Table 2 Absolute recovery and accuracy test of monosaccharides

	单糖 Monosaccharide	回收率 1 Recovery 1 (%)	回收率 2 Recovery 2 (%)	回收率 3 Recovery 3 (%)	$\bar{X}$	$\pm SD$	RSD (%)
醛糖 * Aldose	赤藓糖 Erythrose	75.1	70.5	73.4	73.0	± 2.32	3.1
	鼠李糖 Rhamnose	93.4	82.8	93.2	89.8	± 6.06	6.7
	核糖 Ribose	94.1	84.4	92.1	90.2	± 5.12	5.6
	阿拉伯糖 Arabinose	95.7	81.5	90.9	89.4	± 7.22	8.1
	岩藻糖 Fucose	93.3	84.0	92.5	89.9	± 5.15	5.7
	木糖 Xylose	93.5	80.3	90.7	88.2	± 6.96	7.9
	甘露糖 Mannose	78.4	74.7	81.6	78.2	± 3.45	4.4
	葡萄糖 Glucose	82.9	72.6	77.9	77.8	± 5.15	6.6
	半乳糖 Galactose	80.6	66.7	77.7	75.0	± 7.33	9.8
酮糖 ** Ketose	果糖 Fructose	72.8	85.6	88.3	82.2	± 8.28	10.0
	山李糖 Sorbose	78.8	90.8	87.6	85.7	± 6.21	7.2

*:同表 1 (the same as in Table 1); **:同表 1 (the same as in Table 1)

3.3 枸杞样品中游离单糖的种类和含量

取 20 mg枸杞样品按上述条件平行测定 3 次,各游离单糖含量见表 3。

表 3 枸杞中游离单糖的种类及含量
Table 3 The content of free monosaccharides in *Lyceum barbarum* L.

单糖 Monosaccharide	赤藓糖 Erythrose	核糖 Ribose	阿拉伯糖 Arabinose	木糖 Xylose	甘露糖 Mannose	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose
浓度 Conc. (mg/g)	0.58	0.26	21.54	0.38	1.26	368.6	230.8

References

1 Wang Jing(王 静), Wang Qing(王 晴), Xiang Wensheng(向文胜). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2001, 29 (2): 222~227

2 Xu Guiyun(徐桂芸), Chang Liwen(常理文), Fei Lihua(费丽华). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 1998, 26 (8): 922~926

3 Zhang Weijie(张惟杰). *Biochemistry Techniques in the Research of Carbon Complex* (糖复合物生化研究技术). Zhejiang (浙江): Zhejiang University Press(浙江大学出版社), 1999: 36~41

4 Fang Youlan(方幼兰), Liu Yanru(刘艳如), Lin Shaoqin(林少琴). *Journal of Fujian Normal University* (福建师范大学学报), 1995, 11(2): 67~73

- 5 Chen Hanqing(陈汉清), Wu Wenli(吴文礼), Lin Kunming(林昆明). *Journal of Fujian Agricultural University* (福建农业大学学报), 1994, 23 (4): 476~479
- 6 Keukens H J, Aerts M M L, Trag W A. *Assoc Off Anal Chem.*, 1992, 75 (2): 245~256
- 7 Wang Wei(王伟), Zou Qiaogen(邹巧根), Song Zhe(宋喆), Xiang Bingren(相秉仁). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), 2003, 23 (3): 219~221
- 8 Chen Sixue(陈思学), Jiao Xinzhì(焦新之). *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1994, 30 (6): 405~413
- 9 Maria L S, Mar V, Martinez C. *Food Chemistry*, 2004, 87 (3): 325~238

Determination of Aldoses and Ketoses by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry Using Differential Derivatization

Ye Fangting, Yan Xiaojun*, Xu Jilin, Chen Haimin

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract To establish a new method to determine aldoses and ketoses simultaneously, the monosaccharides were extracted with 80% ethanol after sonication for 15 min and this process was repeated three times. The extract was evaporated under vacuum. Sugar oximes were formed using hydroxylamine and pyridine under heating at 90°C for 30 min. After reaction, the sample was divided into two parts. One part was added by pyridine and acetic anhydride for derivatization at 90°C for 30 min, the other part was added by hexamethyldisiazane (HMDS) and trimethylchlorosilane (TMCS) for silylation reaction at 80°C for 1 h. The two parts were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) in selected ion monitoring (SIM) mode, and inositol was used as internal standard. Results indicate that the linearity is superior in 1~4 mg/L, the detection limit of aldoses is 8.15~22.39 µg/L, whereas ketoses from 2.32 µg/L to 3.47 µg/L. The average recovery rate is from 73.0% to 95.7% and the RSDs were 3.1%~10.0%. The free monosaccharides in *Lyceum barbarum* L. was determined by this method with the results of 0.26~368.6 mg/g.

Keywords Differential derivatization, aldose, ketose, gas chromatography/mass spectrometry

(Received 2 November 2004; accepted 24 January 2005)

《电化学方法原理和应用》

由北京大学邵元华、中国科学院长春应用化学研究所朱果逸、董献堆、张柏林翻译的 A. J. Bard 和 L. R. Faulkner 的《电化学方法 原理和应用》(第二版)已于 2005 年 5 月由化学工业出版社出版。

该书第一版于 1980 年出版以来,得到全世界电化学及电分析化学界广泛好评,被许多大学选作高年级和研究生的教科书。第二版在第一版基础上作了重要的增补,主要包括近年来快速发展的新领域:超微电极的应用、完整表面上的电化学现象、修饰电极、现代电子转移理论、扫描探针方法、液相色谱电化学联用方法(LCEC)、阻抗谱学、现代形式的脉冲伏安法和各种谱学电化学技术。

该书系统地论述了电化学的基本原理和各种电化学技术方法原理,适用于大学化学系高年级学生和研究生作为教材,也适用于非化学专业人员,例如涉及到采用各种电化学技术进行研究的领域——材料科学、环境科学和生命科学等,是从事电化学及电分析化学领域研究和应用的必备书。

该书获得化学工业出版社国外优秀科技著作出版专项基金资助,在翻译的过程中得到了汪尔康院士、陈洪渊院士、查全性院士以及董绍俊先生的大力支持和关怀,特别是汪尔康院士在百忙中为该书题写序言。

该书 16 开,571 页,114 万字,定价 80.00 元。详情可登录化学工业出版社网站查询(www.cip.com.cn)。