

文章编号: 1006-6144(2008)03-0270-05

## 薄层色谱-分光光度法测定纸张中单糖的研究

李继民<sup>\*1</sup>, 王彦吉<sup>2</sup>, 邹宁<sup>1</sup>, 姚丽娟<sup>1</sup>

(1. 中国刑警学院法医系, 沈阳 110035; 2. 中国人民公安大学, 北京 100038)

**摘要:**建立了薄层色谱-紫外可见分光光度法测定纸张样品水解液中单糖组成的方法。纸张样品水解后点样在以丙酮处理过的硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-乙酸-吡啶-水=7:20:12:7:6:5(体积比)为展开剂,以苯胺-草酸为显色剂,测定了单糖的  $R_f$  值。以 1-萘酚为显色剂,测定了纸张样品水解液中的单糖含量,方法的线性关系较好,5 种单糖的样品加标回收率为 96.10%~98.18%。该方法分离效果好,操作简便,可用于纸张样品水解液中 5 种单糖的同时测定,从而为法庭科学中纸张的检验提供依据。

**关键词:**单糖;纸张;薄层色谱法;紫外可见分光光度法

**中图分类号:**O658.1 **文献标识码:**A

纸张中的主要成分由纤维素和半纤维素组成。纸张水解后,在水解液中含有木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖等单糖。目前分离测定单糖的方法主要有高效液相色谱(HPLC)法<sup>[1-3]</sup>、气相色谱(GC)法<sup>[4,5]</sup>、薄层色谱(TLC)法<sup>[6]</sup>等。采用气相色谱法的主要困难是糖本身没有足够的挥发性,所以必须在气相色谱分析之前预先转化成易挥发、对热稳定的衍生物。另外由于糖的异构化,使色谱峰分析时每种糖产生几个峰,这往往影响组分的分离和定量。HPLC 具有分离速度快、分辨率高、分离效果好、重现性好、不破坏样品等优点。但糖类本身没有紫外吸收,只能采用示差折光检测器(RI)或蒸发光散射检测器(ELSD)检测。RI 分辨率低而 ELSD 虽然效果好但价格昂贵。另外,采用 HPLC 分析时,色谱柱的选择也比较困难。一般采用氨基柱但分离效果欠佳,而专用的糖柱又十分昂贵。

本文研究了薄层色谱分离,及分光光度法测定单糖的条件,建立了一种快速测定木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖的薄层色谱-分光光度法。本法分离效果好,操作简便,可用于纸张样品水解液中 5 种单糖的同时测定,从而为法庭科学中纸张的检验提供依据。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

UV-250 型紫外可见分光光度仪(日本,岛津公司);101-2B 型电热烘箱(江苏海门实验仪器厂);微量进样器(宁波市镇海玻璃仪器厂);玻璃层析缸。

D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、D-半乳糖(单糖均为生化试剂),硅胶 GF<sub>254</sub>(青岛海洋化工厂)、正丁醇、乙酸乙酯、异丙醇、乙酸、吡啶、硫酸、氢氧化钠、苯胺、草酸、磷酸二氢钠、丙酮等均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

#### 1.2 溶液的配制

**标准液配制:**准确称取 D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、D-半乳糖各 0.1 g(精确至 0.0001 g),分别溶于少量蒸馏水中,并定容于 100 mL 容量瓶中,摇匀备用,得五种单糖的标准液储备液。准确称

收稿日期: 2007-08-30 修回日期: 2007-10-17

基金项目: 国家高技术产业发展项目(No. 20012492)

\*通讯联系人: 李继民,男,副教授,研究方向:微量物证检验。

取 D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露糖、D-阿拉伯糖、D-半乳糖各 0.1 g (精确至 0.000 1 g), 共溶于少量蒸馏水中, 并定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀备用, 得混合单糖标准储备液。

显色剂 : 将 0.93 g 苯胺和 1.66 g 草酸溶于被水饱和的 100 mL 正丁醇中, 得苯胺-草酸溶液显色剂; 显色剂 : 精确称取 1-萘酚 2.5 g (精确至 0.0001 g) 置于 50 mL 容量瓶中, 用无水乙醇溶解稀释至刻度, 备用。

展开剂 : 正丁醇 乙酸乙酯 异丙醇 乙酸 吡啶 水 = 7 20 12 7 6 5 (体积比); 展开剂 : 正丁醇 丙酮 水 = 4 3 1 (体积比); 展开剂 : 乙酸乙酯 吡啶 无水乙醇 水 = 8 1 1 2 (体积比)。

### 1.3 薄层板的制备与活化

取硅胶 GF<sub>254</sub> 20 g 于玻璃研钵中, 将 170 mL 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠溶液分两次加入, 第一次加入 130~135 mL, 充分研磨后, 再加入剩余的溶液, 迅速小心研磨, 直至开始出现凝胶状, 立即均匀涂布在预先洗净并干燥的 20 × 15 cm 玻璃板上, 薄层板在常温下放置 15~20 min, 使水分蒸发, 吸附剂凝固, 然后将薄层板置于烘箱内于 110 °C 活化 1 h。冷却后, 再用丙酮处理薄层板, 处理后的薄层板置于 75 °C 的烘箱中烘干, 取出, 置于干燥器中备用<sup>[7]</sup>。

### 1.4 纸张样品的水解

将纸张样品剪碎, 风干 24 h 后, 准确称取干燥的纸张样品 0.3 g (准确至 0.0001 g) 置于 25 mL 试管中, 用 5 mL 移液管移取 3 mL 72% 硫酸于试管中, 插入尖头玻璃棒搅匀, 在 30 °C 水浴上加热 1 h。用 66 mL 蒸馏水分数次洗至 200 mL 烧杯中, 置于高压锅中, 120 °C 下再水解 1 h。冷却后, 加入 6 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为中性, 再减压蒸馏, 浓缩到一定体积, 备检。

### 1.5 定性分析

定量吸取单糖标准液、混合糖标准液、纸张样品水解液点样于同一块硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上, 将薄层板置于层析缸内, 用上行法展开 10 cm, 取出薄板, 挥干溶剂后, 将显色剂 均匀喷洒在薄层板上, 再置于烘箱中于 95~100 °C 下显色 30 min, 分别测定标准单糖样品和纸张水解液中的 R<sub>f</sub> 值。

### 1.6 定量分析

在紫外灯下, 分别将斑点从薄层板上刮下, 用 7 mL 水洗脱, 离心 15 min 后, 取 5 mL 定容至 10 mL, 然后取该溶液 2 mL 置于比色管中, 加入浓硫酸 5 mL, 摇匀, 置于 70 °C 水浴中反应 15 min, 放至室温, 加 1-萘酚乙醇溶液 3 mL, 摇匀放置 10 min, 用无水乙醇稀释至 25 mL, 摇匀。将水用同样的方法处理后做空白参比, 用 1 cm 比色池, 于 570 nm 处测其吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 展开剂的选择

试验了三种展开系统, 系统 为 正丁醇 乙酸乙酯 异丙醇 乙酸 吡啶 水 = 7 20 12 7 6 5 (体积比)、系统 为 正丁醇 丙酮 水 = 4 3 1 (体积比)、系统 为 乙酸乙酯 吡啶 无水乙醇 水 = 8 1 1 2 (体积比)。实验显示, 系统 中混合单糖中各单糖完全分离, 各单糖斑点集中无拖尾现象, 从薄层板上端到下端依次出现的斑点为木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。而展开剂 、展开剂 中混合单糖中单糖分离不完全, 单糖斑点较大有拖尾现象, 从薄层板上端到下端依次出现的斑点为木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。计算三种展开剂各单糖斑点的 R<sub>f</sub> 值, 结果见表 1。

表 1 不同展开剂条件下单糖的比移值 (n = 3)

Table 1 R<sub>f</sub> values of monosaccharide under different developing agents (n = 3)

Developing agents	Galactose	Glucose	Mannose	Arabinoase	Xylose
	0.244	0.334	0.390	0.502	0.594
	0.343	0.424	0.454	0.516	0.581
	0.303	0.354	0.377	0.483	0.513

由展层效果和表 1 的结果比较, 三种展开剂中展开剂 的展层效果最好。五种标准糖样品、单糖混合

样品及纸样水解液的分离情况示意图见图 1。

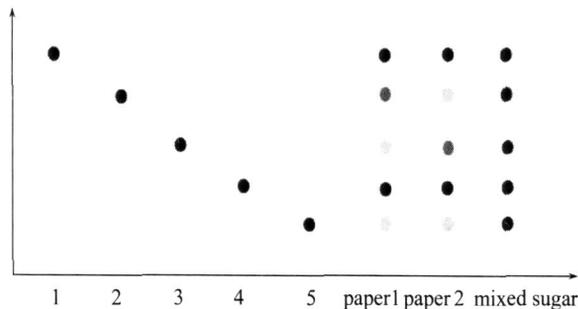


图 1 标准糖样品和纸张样品水解液分离情况

Fig. 1 Chromatogram of standard monosaccharoses and copy paper  
1: Xylose; 2: Arabinose; 3: Mannose; 4: Glucose; 5: Galactose.

纸张样品水解后的混合样品中含有木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等单糖成分,它们的比移值 ( $R_f$ ) 与标准糖样的比移值相同,但各种单糖显色后的颜色深浅不同,说明纸张中含有各种单糖的含量不同。

### 2.2 测定波长的选择

取两只比色管,一只中加入 2 mL 蒸馏水,另一只中加入 2 mL 单糖标准液,用上述实验方法处理后,在紫外可见分光光度仪上进行波长扫描,5 种单糖标准品溶液在 570 nm 处有最大吸收,因此选择 570 nm 做为测定波长。

### 2.3 线性范围和检出限

精密吸取上述 5 种单糖标准溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 置于比色管中,各加入 5 mL 浓硫酸,摇匀,置于 70 °C 水浴中反应 15 min,放至室温,各加入 1-萘酚乙醇溶液 3 mL,摇匀,放置 10 min,用无水乙醇稀释定容至 25 mL,摇匀。将水用同样的方法处理后做空白参比,用 1 cm 比色池,于 570 nm 处测其吸光度。以单糖的质量 (mg) 为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程、相关系数和线性范围见表 2。

表 2 单糖的回归方程、线性关系及检出限 (n = 6)

Table 2 Regression equations, correlation coefficients and detection limits of monosaccharides (n = 6)

Monosaccharide	Regression equations	$r$	Line arrange (mg · mL <sup>-1</sup> )	Limit of detection (ng)
Galactose	$Y = 1.5375X - 0.0144$	0.9991	0.10 ~ 1.00	35.6
Glucose	$Y = 1.5586X - 0.0196$	0.9998	0.10 ~ 1.00	21.5
Mannose	$Y = 1.5404X - 0.0184$	0.9989	0.10 ~ 1.00	29.7
Arabinose	$Y = 1.4162X + 0.0108$	0.9984	0.10 ~ 1.00	36.8
Xylose	$Y = 1.4119X + 0.0057$	0.9998	0.10 ~ 1.00	34.2

Y: peak area; X: sample amount, mg.

### 2.4 稳定性和精密度试验

精密吸取 5 种单糖混合液 4 μL,点样于同一块硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上,按 1.6 步骤进行吸光度测定。每隔 1 h 测定 1 次,连续测定 6 次,结果表明斑点在 6 h 内稳定,D-木糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖峰面积的相对标准偏差 (RSD) (n = 6) 分别为 2.27%、2.21%、2.16%、2.34%、1.86%。在同一薄层板和不同薄层板上平行点样 6 次,展开,测定结果显示,同板  $R_f$  值的 RSD (n = 6) 为 2.1% ~ 3.2%,异板  $R_f$  值的 RSD (n = 4) 为 2.9% ~ 4.3%,表明精密度较好。

### 2.5 加标回收率

精密移取纸张样品水解液 5 份,其中 2 份分别加入 5 种单糖标准品 2.000 mg,2 份分别加入 5 种单糖标准品 4.000 mg,另外 1 份作为样品空白,按照实验操作进行展开、紫外可见光谱法定量测定,半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖及木糖的平均回收率 (n = 3) 分别为 96.56%、98.18%、96.10%、96.94% 及

98.09%。

## 2.6 纸张样品的测定

将不同厂家生产的不同牌号复印纸样品水解后,按照上述方法进行薄层展开,分光光度法定量分析。结果见表3。

表3 不同厂家不同牌号复印纸样品中单糖的含量  
Table 3 The content of Monosaccharides in different copy paper samples

Brand	Content (%)				
	Galactose	Glucose	Mannose	Arabinose	Xylose
Gold FlagShip	1.43	57.54	2.71	1.25	10.18
Tianzhang	0.66	60.04	1.02	1.21	9.66
Xinqiu	1.69	55.34	2.13	0.84	14.13
Weier	1.51	54.57	1.98	2.64	11.24
Baiwang	0.46	65.62	0.89	1.23	7.58
Xingyunniao	0.58	64.19	1.02	1.47	8.85
Qingbrand	0.78	61.06	1.16	1.06	16.12
Bainian	2.17	46.58	4.78	2.61	9.93
Jingzhi	1.98	48.69	3.49	6.13	7.78
Hanzhang	3.12	44.23	2.71	5.62	13.01
Dongfan	1.24	52.56	1.45	3.04	10.91
Yongfeng	2.87	45.42	3.08	1.47	13.24
Linghang	4.61	44.96	2.58	5.18	7.95
Xuelian	1.37	58.19	1.15	8.13	5.36
Lianhua	5.69	39.89	3.24	2.46	12.53
Meiyin	3.25	47.74	1.28	2.47	13.26
Eyuxiao	6.13	31.58	5.12	4.17	9.83
Hongyu	5.36	28.83	6.73	1.28	14.74
Shendun	4.23	35.74	8.97	6.52	7.85
Taiyangshen	7.12	34.73	5.23	5.16	10.92
Jiamei	2.13	55.25	1.74	4.76	8.93
Jintaiyang	1.02	50.65	3.18	5.18	6.86
Oubiao	3.14	42.72	1.81	3.68	12.67
Antu	1.63	50.77	4.16	5.33	8.68

复印纸样品水解后主要含有半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖等单糖,从单糖的含量来看,纸张中主要含有葡萄糖和木糖,而其它的单糖含量相对较少。不同厂家生产的不同牌号纸张样品中半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖的含量存在较大差异,依此可达到鉴别不同厂家生产的不同牌号纸张样品的目的。

分析结果显示,尽管是同一厂家生产的纸张,由于采用不同的造纸原料,如针叶木浆、阔叶木浆、稻草浆、麦草浆、芦苇浆、甘蔗渣浆、竹浆、棉浆等,以及这些原料的混合浆进行抄造,导致纸张水解液中的各单糖含量不同,是同一厂家不同牌号纸张能够进行区别的主要依据。

## 参考文献:

- [1] SUN Yu-an(孙雨安), WANG Guo-qing(王国庆), ZHANG Ying-jun(张应军), YAN Ke-yu(阎克玉), LI Xing-bo(李兴波), XIE Bing(谢冰). Journal of Analytical Science(分析科学学报) [J], 2004, 20(5): 531.
- [2] YANG Xing-bin(杨兴斌), ZHAO Yan(赵燕), ZHOU Si-yuan(周四元), LIU Li(刘莉), WANG Hai-fang(王海芳), MEI Qi-bing(梅其炳). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2005, 33(9): 1287.
- [3] LI Yue-qi(李月琪), YAO Jian-Guo(姚建国), Yuki Hashi. Journal of Analytical Science(分析科学学报) [J], 2005, 21(6): 679.

- [4] HUANG Xue-song(黄雪松). Chinese Journal of Chromatography(色谱) [J], 2003, 21(5):527.
- [5] ZHAO Yan(赵燕), YANG Xing-bin(杨兴斌), LU Li-hua(路丽华), LI Xiao-ye(李晓晔), ZHANG Sheng-yong(张生勇). China New Medicine(中国新医药) [J], 2004, 3(10):21.
- [6] ZHANG Gui(张桂), LI Jun-ying(李俊英), CHEN Xue-wu(陈学武), MIAO Fang(苗芳), HOU Jian-ge(侯建革). PTCA(Part B:Chemical Analysis)(理化检验-化学分册) [J], 2002, 38(2):81.
- [7] CHEN Hui(陈惠), WANG Yuan(汪瑗), ZHU Ruo-hua(朱若华). Chinese Journal of Chromatography(色谱) [J], 2006, 24(1):69.

## Analysis of Monosaccharoses in Paper by Thin Layer Chromatography and Ultraviolet-visible Absorption Spectrometry

LI Ji-min<sup>\*1</sup>, WANG Yan-ji<sup>2</sup>, ZOU Ning<sup>1</sup>, YAO Li-juan<sup>1</sup>

(1. China Criminal Police College, Department of Forensic Medicine, Shenyang 110035;

2. Chinese People's Public Security University, Beijing 100038)

**Abstract:** The method for simultaneous determination of five monosaccharoses in the hydrolytic solution of paper by thin layer chromatography and ultraviolet-visible absorption spectrometry was developed. The mixture of n-butyl alcohol, ethylacetate, iso-butyl alcohol, acetic acid, pyridine and water (7:20:12:7:6:5, V/V) was used as developing agent on the TLCS silica gel plate for development. The hydrolytic solution of paper was spotted on the TLCS plate which was dealt with acetone. The  $R_f$  values of monosaccharose was determined using aniline-oxalic acid a color reagent. The quantitative analysis was performed by ultraviolet-visible absorption spectrometry with the use of naphthol as color reagent. Good linearities were obtained for Xylose, Arabinose, Mannose, Glucose and Galactose. The recoveries of the five monosaccharose for the spiked sample were 96.10% ~ 98.18%. The developed method has the advantages of high precision, high sensitivity and simple pretreatment. The method could be applicable to detect the five monosaccharoses in the hydrolytic solution of copy paper for forensic science.

**Key words:** Monosaccharose; Paper; Thin layer chromatography; UV-Vis spectrometry