

柱前衍生化气相色谱法分析豌豆根尖粘液中的多糖

吴韶辉 蔡妙珍* 李似姣 朱美红 王江锋

(浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004)

摘 要 采用三氟乙酸水解豌豆根尖粘液中的多糖, 衍生化后用气相色谱分离测定 6 种单糖。实验表明, 根尖粘液用三氟乙酸水解并乙酰化, 采用 OV-17 石英毛细管色谱柱 (35 m × 0.32 mm, 0.33 μm), 利用气相色谱法对 6 种单糖进行分离测定, 6 种糖全部达到基线分离, 总分析时间为 42 min。用保留时间定性, 外标法定量。方法线性范围为 0.0025 ~ 2.5 g/L, 各标准曲线相关系数 $r > 0.9991$; 检出限 0.0216 ~ 0.1578 mg/L, 加样回收率为 96.7% ~ 107.4%。实验结果表明, 本方法可有效测定逆境胁迫下植物根尖粘液中的糖类物质。

关键词 粘液, 多糖, 柱前衍生, 气相色谱

1 引言

大部分植物根尖周围包被着一层粘液, 在根-土界面起着重要作用, 如有助于土壤团聚体形成^[1,2]、为微生物提供碳源、提高土壤水分和养分的有效性^[3]、以及缓解 Al^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子的毒性效应^[4]。粘液中糖类成分占 95% ~ 97%^[5], 主要由高分子量的多聚糖组成, 包括糖醛酸以及由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、木糖、阿拉伯糖等 6 种糖残基组成的复合多糖^[6]。多糖上带有大量羧基对根际金属阳离子具有持滞能力^[7,8], 以阻止毒害离子进入根系^[9]。可见, 多糖的这种功能与其中的组分尤其是酸性多糖的组分和含量密切相关。因此, 通过分析根尖粘液中多糖组分与含量, 可以明确粘液对根际毒害离子吸收、转化和迁移等生态化学行为的作用。

多糖是多羟基醛、酮、醇及它们的衍生物^[10], 由于其分子量很大, 因此分析多糖组成的主要方法一般是通过水解, 使多糖中连接单糖的糖苷键断裂, 释放出单糖^[11,12], 再通过柱前衍生化-气相色谱法分析其组成和含量。多糖水解方法主要有化学降解法、酶降解法和物理降解法。而相对于其它方法, 化学降解法反应快速、条件易控制、产率高。化学降解法通常利用酸对多糖的水解作用^[13], 其中利用三氟乙酸降解^[14], 水解液经减压蒸发除去三氟乙酸, 避免传统的中和步骤, 减少产物中的杂质。因此本实验模拟根际铝毒害环境, 以根尖有大量粘液的豌豆为材料, 采用能够保留根尖粘液的悬空法^[15]进行培养。根尖粘液收集后用三氟乙酸降解法水解, 柱前衍生化-气相色谱法分析粘液中的多糖成分, 取得较为满意的结果, 同时为逆境胁迫下植物根尖粘液多糖的研究提供简便、科学的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

GC7900 气相色谱仪配 FID 检测器 (上海天美科学仪器有限公司); 智能人工气候箱 (宁波赛福实验仪器厂); R201D- 旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司); FD-1B-50 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); MIKRO 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司)。

标准单糖: D-甘露糖, D-阿拉伯糖, D-木糖, D-半乳糖, D-葡萄糖, L-岩藻糖, 以上试剂均为优级纯生化试剂, 由美国 Sigma 公司提供; 乙酸乙酯为色谱纯, 三氟乙酸、醋酸酐、吡啶、无水 $MgSO_4$ 、HCl 均为分析纯。所用水为二次去离子水。

2.2 实验方法

2.2.1 粘液的收集与纯化 豌豆种子置于去离子水中浸泡, 至种子表皮饱满。在 0.1% H_2O_2 中浸泡 5 min 消毒, 去离子水漂洗 3 次。在智能人工气候箱中培养 (25 °C, 湿度 80%, 无光照), 萌发后进行悬

2008-08-12 收稿; 2008-10-14 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30800705) 和浙江省自然科学基金 (No. 304185) 资助项目

* E-mail: sky120@zjnu.cn

空培养,每 1 h 喷洒含有 Al^{3+} 的处理液, Al^{3+} 浓度分别为 0、30、90 和 270 $\mu\text{mol/L}$ (含 100 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+})。每 4~5 h 用毛细管吸取根冠周围的粘液,平均每管可收集 2~5 μL 粘液;再用洗耳球吹入离心管中。收集的粘液以 12000 r/min 离心 30 min,再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,除去粘液内细胞脱落物等杂质。

2.2.2 单糖标样的衍生化法 精确称取 0.25 g 单糖,加入 15 mL 无水吡啶,3 mL (过量) 乙酸酐,在室温氮气保护下搅拌 24 h。反应混合物在冰水浴中冷却,然后逐滴加入 15 mL 37% HCl 溶液用乙酸乙酯 (4 $\times$ 30 mL) 萃取 4 次,所得有机相用无水 MgSO_4 干燥,过滤,室温下减压蒸馏,得油状物定容到 10 mL,直接进行色谱分析。

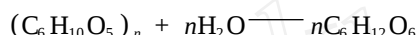
2.2.3 粘液多糖水解和衍生化法 粘液中加入 2.0 mol/L 三氟乙酸溶液 15 mL,在氮气保护下于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流 2 h。室温下减压蒸馏除去三氟乙酸, -40 $^{\circ}\text{C}$ 、10.5 mPa 下冷冻干燥得单糖固体。单糖衍生化参照 2.2.2 节的方法。

2.2.4 气相色谱条件 采用 OV-17 毛细管柱 (35 m $\times$ 0.32 mm, 0.33 μm), 进样器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 检测器 (FD) 温度为 280 $^{\circ}\text{C}$ 。采用程序升温: 200 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 24 min, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$, 恒温 18 min。载气为高纯氮, 流速 33 mL/min, 进样量 1.0 μL , 外标法定量分析。

3 结果与讨论

3.1 粘液多糖水解和单糖衍生化

本实验采用三氟乙酸催化粘液多糖水解,其水解方程简式如下:



水解得到的单糖进一步衍生化,即通过乙酸酐对单糖分子中的羟基进行反应生成酯类物质,例如葡萄糖的衍生化反应方程式:



3.2 色谱柱的选择及分离情况

单糖衍生化的气相色谱分析多采用毛细管色谱柱进行测定,由于单糖衍生物分子量接近,对色谱柱和分离条件要求比较高,因此选择了 DB-1 (15 m $\times$ 0.53 mm, 0.5 μm)、SE-54 (15 m $\times$ 0.25 mm, 0.33 μm) 和 OV-17 (35 m $\times$ 0.32 mm, 0.33 μm) 多根毛细管柱进行分离。作为溶剂的乙酸乙酯在 3 个不同极性的色谱柱中都能与组分较好地分离,但不论是恒温或者程序升温,DB-1 和 SE-54 在分析样品时都不能将糖样完全分离。其中 DB-1 只分离出 2 个峰,分别为木糖、岩藻糖和阿拉伯糖混合峰以及半乳糖、葡萄糖和甘露糖混合峰。SE-54 只分离得到 4 个峰,分别有单糖两两混合不能分开。而采用柱长更长的 OV-17,在相同条件下 6 种单糖得到很好的分离效果,基本都达到了基线分离 (图 1A)。采用本方法测定粘液也同样得到基线分离的效果,且分离情况不会受到杂质的影响 (图 1B)。

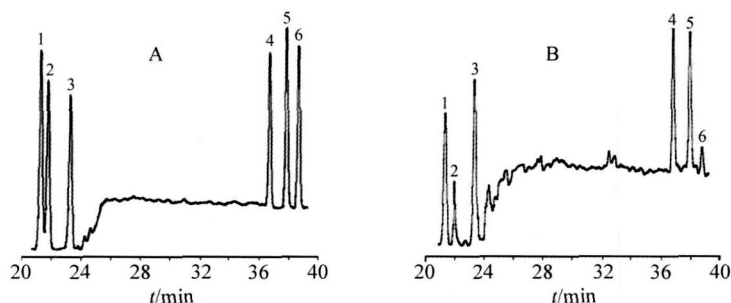


图 1 单糖乙酰化气相色谱图

Fig 1 Chromatogram of monosaccharides as alditol acetates

A. 6 种单糖标样谱图 (chromatogram of six standard monosaccharides); B. 根尖粘液样品谱图 (chromatogram of root mucilage samples). 1. 木糖 (xylose, Xyl); 2. 岩藻糖 (fucose, Fuc); 3. 阿拉伯糖 (arabinose, Ara); 4. 半乳糖 (galactose, Gal); 5. 葡萄糖 (glucose, Glu); 6. 甘露糖 (mannose, Man)。

3 3 单糖定性分析

在定性实验中,通过各个单糖相对于乙酸乙酯的保留时间定性,各个单糖的保留时间分别为木糖 21.4 min、岩藻糖 21.9 min、阿拉伯糖 23.4 min、半乳糖 37.0 min、葡萄糖 38.2 min 及甘露糖 39.0 min,结果如图 1A 所示。

3 4 标准曲线、检出限

木糖、岩藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖标准样品分别经 2.2.2 节衍生化后配成浓度为 0.0025、0.025、0.25、2.5 g/L 的标准溶液,按 2.2.4 节的色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,单糖含量为横坐标进行线性回归。结果表明,在 0.0025~2.5 g/L 范围内,单糖浓度与色谱峰面积有良好的线性关系,各单糖的回归方程的相关系数为 0.9991~0.9999 (表 1)。以信噪比 $S/N=2$ 计算,木糖、岩藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖的检出限分别为 0.0357、0.0464、0.0203、0.1578、0.0216 和 0.0245 mg/L。

表 1 6 种单糖衍生物的标准曲线、检出限和相对标准偏差 (mg/L)
Table 1 Linear relationship, detection limit and relative standard deviation of six monosaccharides(mg/L)

单糖 Monosaccharide	回归方程 Regression equation	相关系数 r	检出限 LOD (mg/L)	相对标准偏差 RSD (% , $n=7$)
木糖 Xylose	$y=9641.1x+323.5$	0.9996	0.0357	0.285
岩藻糖 Fucose	$y=7505.2x-180.4$	0.9999	0.0464	1.472
阿拉伯糖 Arabinose	$y=17515x-189.8$	0.9999	0.0203	2.379
半乳糖 Galactose	$y=13278x-1937.4$	0.9991	0.1578	0.648
葡萄糖 Glucose	$y=13752x-77.89$	0.9997	0.0216	1.627
甘露糖 Mannose	$y=32577x-638.0$	0.9997	0.0245	2.394

3 5 样品测定结果

通过喷洒不同浓度 Al^{3+} 培养液,诱导豌豆根尖粘液形成。粘液样品分别按照 2.2 的实验步骤进行水解和乙酰化,最后进行色谱分析。结果如表 3 所示,豌豆粘液中的单糖衍生物能够准确地分离出来 (图 1B),并且不同浓度 Al^{3+} 处理下单糖含量及其变化也能精确地测定出来 (表 2, $n=5$),平均标准偏差仅为 0.0041。结果表明,粘液中 ($Al^{3+}=0\text{ }\mu\text{mol/L}$)甘露糖含量最低,而半乳糖含量最高。各单糖成分 (岩藻糖除外)在 $90\text{ }\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理时都有所增加, $270\text{ }\mu\text{mol/L}$ Al^{3+} 处理时各单糖含量降低。

表 2 豌豆根尖粘液单糖衍生物的含量分析 (mg/L)
Table 2 Content of monosaccharides in pea mucilage (mg/L)

单糖 Monosaccharide	铝浓度 Aluminum concentration			
	0 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$	90 $\mu\text{mol/L}$	270 $\mu\text{mol/L}$
木糖 Xylose	0.192 $\pm$ 0.007	0.065 $\pm$ 0.003	0.234 $\pm$ 0.004	0.093 $\pm$ 0.004
岩藻糖 Fucose	0.126 $\pm$ 0.004	n d	0.085 $\pm$ 0.004	n d
阿拉伯糖 Arabinose	0.164 $\pm$ 0.006	0.095 $\pm$ 0.003	0.190 $\pm$ 0.004	0.095 $\pm$ 0.005
半乳糖 Galactose	0.291 $\pm$ 0.008	0.204 $\pm$ 0.004	0.297 $\pm$ 0.010	0.201 $\pm$ 0.003
葡萄糖 Glucose	0.141 $\pm$ 0.005	0.045 $\pm$ 0.002	0.290 $\pm$ 0.011	0.050 $\pm$ 0.001
甘露糖 Mannose	0.028 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001	0.032 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001

n d : 未检测 (not detected)。

3 6 回收率实验

在衍生化后的粘液处理样中,加入约 1 倍量的标准单糖衍生物,按 2.2.3 的步骤进行定量分析。利用峰面积计算 6 种单糖的回收率,结果表明,本方法回收率高,在 96.7%~107.4% 之间 (表 3);稳定性好,相对标准偏差介于 0.74%~3.72% 之间。本方法可快速、有效测定植物根尖粘液中的糖类物质。

表 3 粘液样品中单糖的回收率
Table 3 Recovery ratio of monosaccharides from samples

单糖 Monosaccharide	木糖 Xylose	岩藻糖 Fucose	阿拉伯糖 Arabinose	半乳糖 Galactose	葡萄糖 Glucose	甘露糖 Mannose
回收率 Recovery (%)	96.7 $\pm$ 3.6	102.2 $\pm$ 1.7	107.1 $\pm$ 3.4	98.1 $\pm$ 2.4	107.4 $\pm$ 0.8	98.7 $\pm$ 3.9
相对标准偏差 RSD (%)	3.72	1.66	3.17	2.45	0.74	3.65

References

- 1 Yang Zhi-Min (杨志敏), Wang Jin (汪 谨). *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), **2003**, 29(5): 361 ~ 366
- 2 Xiao Feng-Juan (肖凤娟), Zhang Xin-Jie (张欣杰). *Journal of the Hebei Academy of Sciences* (河北省科学院学报), **2003**, 20(2): 163 ~ 167
- 3 Moody S F, Clark A E, Bacic A. *Phytochemistry*, **1988**, 27: 2861 ~ 2875
- 4 Paull R E, Jones R L. *Plant Physiol*, **1975**, 56: 307 ~ 312
- 5 Moody S F, Clarke A E, Bacic A. *Phytochemistry*, **1988**, 27: 2857 ~ 2861
- 6 Roy S S, Mittra B, Shama S, Das T K, Babu C R. *Annals of Botany*, **2002**, 89: 293 ~ 299
- 7 Morel J L, Mench M, Guckert A. *Biology and Fertility of Soils*, **1986**, 2: 29 ~ 34
- 8 Jung C, Maeder V, Funk F, Frey B, Sticher H, Frossard E. *Plant and Soil*, **2003**, 252: 301 ~ 312
- 9 Archambault D J, Zhang G, Taylor G J. *Plant Physiol*, **1996**, 112: 1471 ~ 1478
- 10 Paull R E, Jones R L. *Plant Physiol*, **1975**, 56: 307 ~ 312
- 11 Deng Yong-Zhi (邓永智), Li Wen-Quan (李文权), Yuan Dong-Xing (袁东星). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(12): 1697 ~ 1701
- 12 De Ruiter G A, Schols H A. *Anal. Biochem.*, **1992**, 207(1): 176 ~ 185
- 13 Sun Yuan-Lin (孙元琳), Shen Rui-Ling (申瑞玲), Tang Jian (汤 坚), Gu Xiao-Hong (顾小红), Li De-Yuan (李德远). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(3): 348 ~ 352
- 14 Defaye D. *Chitin and Chitosan*. London: Elsevier Applied Science, **1989**: 415
- 15 Zhu M Y, Ahn S J, Matsumoto H. *Physiol. Plant*, **2003**, 117: 359 ~ 367

Determination of Polysaccharide in Pea Root Mucilage by Precolumn Derivatization and Capillary Gas Chromatography

WU Shao-Hui, CAI Miao-Zhen*, LI Si-Jiao, ZHU Mei-Hong, WANG Jiang-Feng
(College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004)

Abstract A novel gas chromatographic method was developed to determine six kinds of monosaccharide units hydrolyzed by trifluoroacetic acid from polysaccharide in pea root cap mucilage. The baseline separation of the monosaccharide units were achieved with a medium polar capillary column OV-17 (35 m $\times$ 0.32 mm, 0.33 μ m). The total analysis time was 42 min. Retention times were used to identify the individual sugar in the chromatogram and external standard method was used for quantitative analysis. The linear range of the method was 0.0025 - 2.5 g/L and the correlation coefficient were over 0.9991. Minimum detectable limit at a signal-to-noise of 2:1 was 0.0216 - 0.1578 mg/L. The recovery of the six kinds of standard mono sugars was 96.7% - 107.4%. The results indicated that this method was effective and quick in analyzing the components of sugars in the mucilage collected from plant root tips under adversity stress.

Keywords Mucilage, polysaccharide, derivatization, gas chromatography

(Received 12 August 2008; accepted 14 October 2008)