

文章编号:1673-1689(2005)06-0088-04

纸层析法定量检测麦芽糖基 β - 环状糊精

崔波, 金征宇*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 建立了以纸层析法定量检测麦芽糖基 β - 环状糊精含量的方法. 通过实验确定了适宜的展开剂, 组成为 $V(\text{正丙醇}) : V(\text{正丁醇}) : V(\text{水}) = 5 : 3 : 4$; 适宜洗脱剂为 0.1 mol/L 的盐酸溶液. 洗脱时间为 14 h . 回收实验表明当点样量在 $150 \sim 250 \mu\text{g}$ 时测定结果准确可靠. 重复性实验的变异系数为 3.58% . 纸层析法与 HPLC 法相比较, 测定结果的相对误差为 -3.99% . 实验证明, 纸层析法可作为测定麦芽糖基 β - 环状糊精的常规方法.

关键词: 麦芽糖基 β - 环状糊精; 纸层析; 检测

中图分类号: O 658.1

文献标识码: A

Quantitative Determination of Maltosyl(α -1 $\rightarrow$ 6) β -Cyclodextrins with Paper Chromatography

CUI Bo, JIN Zheng-yu*

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Quantitative determination of maltosyl (α -1 $\rightarrow$ 6) β -cyclodextrins with paper chromatography was studied. The optimum mobile phase was 1-propanol-1-butanol-water(5 : 3 : 4) and the spot was eluted with 0.1 mol/LHCL for about 14 hours. When the sample dose was in the range of $150 \sim 250 \mu\text{g}$, the determination result was quite reliable from the recovery test. The variation coefficient of repeated test was 3.58% . The relative error of the determination results was 3.99% compared with the HPLC method. The results showed that the paper chromatography could be considered as the common used and economic method for maltosyl(α -1 $\rightarrow$ 6) β -cyclodextrins determination.

Key words: maltosyl(α -1 $\rightarrow$ 6) β -cyclodextrins; paper chromatography; determination

麦芽糖基 β - 环状糊精(maltosyl(α -1 $\rightarrow$ 6) β -cyclodextrins, Mal- β -CD)是 β - 环状糊精在其某个葡萄糖残基的第六位碳原子的羟基上偶联两个葡萄糖残基的衍生化产物^[1], 在水中溶解度为 151 g/dL , 大大高于其对应的 β - 环状糊精的溶解度 1.85 g/dL (β - 环状糊精的低水溶性使其应用受到限制)^[2], 在食品、医药、农药、精细化工、分析检测等

行业有广泛的用途^[3~6]. Mal- β -CD 等环状糊精的衍生物和改性产物已成为国外开发和研究的热点^[7~10], 国内尚未有此方面的研究报导. 测定环状糊精的常规方法是硫酸-酚法, Mal- β -CD 测定尚无标准方法. 由于制备 Mal- β -CD 的反应体系中反应产物较为复杂, 使得实验室对产物的定量测定较为困难, 须借助于高效液相色谱(HPLC), 但高效液相

收稿日期: 2004-10-26; 修回日期: 2004-12-12.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2004018)资助课题; * 责任作者.

作者简介: 崔波(1971-), 男, 山东诸城人, 副教授, 食品科学与工程博士研究生.

色谱分析费用较高且色谱柱较难制备,纸层析作为一种经典的糖类分析方法,操作简便、灵敏度高,可以广泛应用于实验室研究.作者通过系统研究,建立了一种 Mal- β -CD 的纸层析分析法,为 Mal- β -CD 的生产和应用提供了一种经济可靠的分离测定方法.

1 材料与方法

1.1 材料

Mal- β -CD:粗品,作者所在实验室自制.

1.2 仪器与试剂

试剂:所有化学试剂均为分析纯(AR);标准 Mal- β -CD:购自 Sigma 公司;紫外分光光度计 UV2001;Waters 600 高效液相色谱仪;K-2301 示差折光检测器;Hypersil NH₂ 柱.

1.3 溶液

1.3.1 纸层析展开剂

- 1) V(正丁醇):V(乙醇):V(水)=10:1:2
- 2) V(正丁醇):V(乙醇):V(水)=12:3:5
- 3) V(正丙醇):V(正丁醇):V(水)=5:3:4
- 4) V(正丙醇):V(吡啶):V(水)=6:4:3
- 5) V(体积分数 75%异丙醇):V(乙醇)=9:1

1.3.2 显色剂 采用 0.5 g/dL 的碘丙酮溶液,用时现配^[11].

1.4 实验方法

1.4.1 糖的测定 采用硫酸-苯酚法^[12].

1.4.2 Mal- β -CD 的定量测定 用纸层析定量分析样品时,在滤纸条上分别点样品和标准样品两个点.其中标准样品点作为为参照点,另一个为定量测量点.将点样后的滤纸条在展开剂内展开、热风吹干,并从两个点样点距离的中间将其剪为两条滤纸.带参照点的一条在显色剂中显色,以确定 Malt- β -CD 的准确位置,将另一条滤纸条上与此显色斑点对应的部分剪下并剪成碎片,放入洗脱液中室温洗脱,洗脱后用硫酸-苯酚法测定其中的各成分质量分数.

1.4.3 高效液相色谱检测条件 柱规格:D 4.6 mm×250 mm;流动相:V(乙腈):V(水)=60:40,体积流量 1 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μ L.

2 结果与讨论

2.1 点样量的确定

在同一张层析纸上依次点 Malt- β -CD 标样 25, 50,75,100,150,200,250 μ g,热风吹干,显色,观察斑点情况.点样量太少,显色不明显,无法正确确定组分的位置;点样量太多,造成拖尾,影响样品分

离.实验在点样量达 150 μ g 时显色效果较好.

2.2 展开剂的选择

为了选择合适的展开剂,选用了 5 种展开剂,观察不同展开剂对混合样在层析纸上的展开效果.取 25 mg/mL 的 Mal- β -CD 标样及 25 mg/mL 的 Mal- β -CD 和 25 mg/mL 的 β -CD 的混合样各点样 6 μ L,分别用 5 种不同的展开剂下行展开,晾干后同样用显色剂显色,结果见表 1.

表 1 不同展开剂的展开效果		
Tab. 1 Irrigatingresults of different carriers		
展开剂	展开时间/h	效果
(1)	12	斑点较扩散,有脱尾现象
(2)	12	无法分开
(3)	12	斑点清晰,分离效果较好
(4)	12	斑点稍扩散,分离效果不太好
(5)	12	有拖尾,分离效果稍差

经比较,展开剂(3)效果比较好,所以后面的实验使用的展开剂均为 V(正丙醇):V(正丁醇):V(水)=5:3:4.

2.3 标准曲线的绘制

将 Mal- β -CD 标样配制成 0.04 mg/mL 的溶液,利用硫酸-苯酚法测量吸光度 A,绘制吸光度与标样体积的工作曲线,结果见图 1.

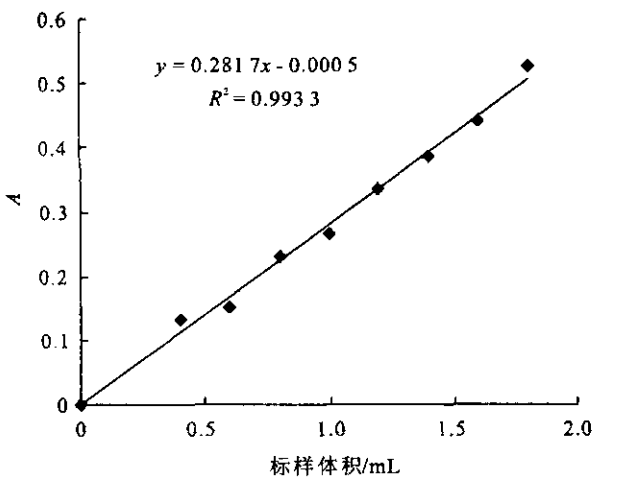


图 1 标样的吸光度曲线

Fig. 1 Standard curve

2.4 洗脱剂的选择

洗脱的关键在于将层析纸上的已分离的 Mal- β -CD 完全洗脱下来.选择分别以水、冰醋酸、体积分数 75%的乙醇溶液、0.1 mol/L 的盐酸溶液等作为洗脱剂,洗脱方法为:

- 1)将点有 150 μ g 样的滤纸片剪碎放于 5 mL 不同的洗脱剂中,常温洗脱 24 h,同时用同面积的

未点样的滤纸作对照；

2) 定量吸取洗脱液放于洁净的试管中,以各自的对照作为空白,490 nm 波长下用硫酸-苯酚法测定其中的环糊精含量。

由表 2 可见,不同洗脱剂的洗脱效果不同,比较 24 h 的比色结果,0.1 mol/L 的盐酸溶液的洗脱效果较好,下面的实验即用 0.1 mol/L 的盐酸溶液作为洗脱剂。

表 2 不同洗脱剂的洗脱效果

Tab. 2 Elution results with different eluants				
洗脱剂	水	冰乙酸	体积分数 75%乙醇	0.1 mol/L 盐酸
A	0.159	0.132	0.194	0.224

2.5 洗脱时间的确定

利用上述方法,以 0.1mol/L 的盐酸溶液作为洗脱剂,测定不同时间洗脱液的吸光度.每隔 2 h 测定一次,至 24 h 为止,结果见图 2。

由图 2 可以看出,随着时间的延长,Mal-β-CD 的洗脱效果线性提高,12~14 h 达到洗脱最优值,因此,可将其洗脱时间定为 14 h。

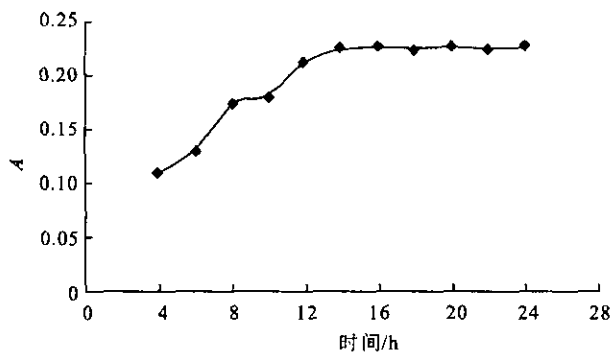


图 2 洗脱时间对吸光度的影响

Fig. 2 Effect of elution time on absorbancy

2.6 回收实验

由于前述实验中,吸光度与洗脱剂和洗脱时间的关系是在点样后直接洗脱的情况下做出的,并未进行样品的展开,须用已知质量浓度的 Mal-β-CD 样品进行点样、展开、显色、洗脱、检测等全过程的实验,即回收实验,以验证实验的准确度.回收率和相对误差见表 3,测定结果和实际含量关系见图 3。

回收率= $\frac{\text{测定质量}}{\text{样品实际质量}} \times 100\%$

相对误差= $\frac{(\text{样品实际质量} - \text{测定质量})}{\text{样品实际质量}} \times 100\%$

由表 3 和图 3(图中样品质量浓度均为 25 mg/mL,横坐标为不同点样量)可知,样品质量在 150~250 μg 时,测定结果和实际含量有较好的线性对应关系.点样时样品质量达到 300 μg 以上时,误差非

常大,测定结果比实际数据损失很多,可能是因为样品过大在纸层析时出现拖尾,样品不能完全分开,剪取斑点时造成损失.因此,实际测定点样时样品质量以 150~250 μg 为宜。

表 3 纸层析法测定 Mal-β-CD 的回收率和相对误差

Tab. 3 Recovery and relative error of Mal-β-CD determination with paper chromatography

点样量/ μL	样品质量/ μg	测定结果/ (mg/mL)	回收 率/%	相对 误差/%
6	150	23.77	95.09	-4.91
8	200	23.67	94.66	-5.77
10	250	23.47	93.88	-6.12
12	300	21.91	87.64	-12.36
14	350	20.33	81.33	-18.67

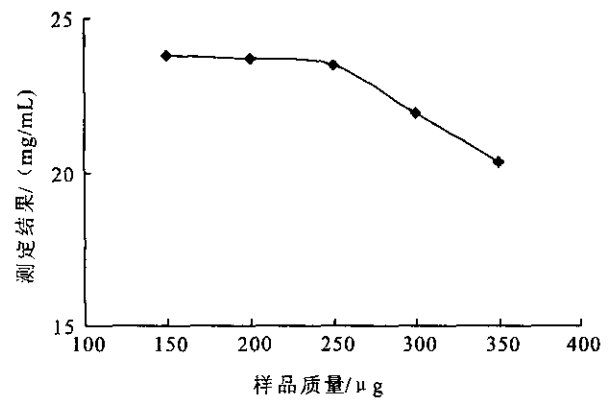


图 3 纸层析测定中样品实际含量与测定结果的关系

Fig. 3 The relationship between sample concentration and determination result

2.7 重现性实验

在同一层析纸上用标准样点 10 个,每个样 150 μg,展开后测定每个 Mal-β-CD 斑点的样品量,进行重现性实验,结果如表 4。

表 4 纸层析法测定 Mal-β-CD 的重现性

Tab. 4 Reproducibility of Mal-β-CD determination with paper chromatography method

测定 次数	测定结果/ μg	平均值/ μg	标准 偏差	变异 系数/%
1	142.71	140.89	5.0439	3.58
2	151.23			
3	141.13			
4	131.67			
5	142.54			
6	137.95			
7	142.03			
8	140.78			
9	136.54			
10	142.33			

根据表 4 结果,该重复性实验的变异系数为 3.58%,小于 10%,有较好的重复性和精确度,可以作为定性定量测定 Mal- β -CD 的一种经济可靠的常规方法.

2.8 与 HPLC 法比较

取实验室制备的样品进行定量测定,并与 HPLC 法测定结果,进行比较,结果见表 5.

表 5 应用纸层析法和 HPLC 法对样品的测定结果
Tab.5 Determination results of paper chromatography and HPLC

纸色谱 测定结果	HPLC 法 测定结果	相对误差 (相对 HPLC 法)
16.86%	17.56%	-3.99%

两种方法之间的相对误差为-3.99%,纸层析可以替代 HPLC 法作为 Mal- β -CD 在生产和应用中的一种经济可靠的检测方法.

3 结论

1) 纸层析法可以用于样品中 Mal- β -CD 的定量检测.下行展开剂为 V(正丙醇):V(正丁醇):V(水)=5:3:4,展开时间 12 h;以 0.1 mol/L 的盐酸溶液作为洗脱剂,洗脱 14 h.点样时样品的质量应在 150~250 μ g 之间,此时结果比较准确.

2) 纸层析法准确性和重复性都较好,可以替代 HPLC 作为 Mal- β -CD 在生产和应用中的一种经济可靠的常规检测方法.

参考文献:

[1] Sumio Kitahata, Yoshimichi Yoshimura, Shigetaka Okada. Formation of 6-O- α -maltosyl-cyclomalto-oligosaccharides from α -maltosyl fluoride and cyclomalto-olig-osaccharides by pullulanase[J]. **Carbohydrate Research**,1987,159:303—313.

[2] 程池. 歧化环糊精的研究进展[J]. 食品与发酵工业,1992,(3):77—80.

[3] Takeshi Furuta, Hidefumi Yoshii,Takashi Kobayashi, *et al.* Powdery encapsulation of d-lim-onene by kneading with mixed powders of β -cyclodextrin and maltodextrin at low water content[J]. **Biosci Biotech Biochem**,1994,58(5):847—850.

[4] Kevin B, Rebecca M, Cindy B S, *et al.* Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of β -cyclodextrin alone or in combination with phosphates[J]. **J Agric Food Chem**, 1996,44:2591—2594.

[5] Seiki Tanada, Takeo Nakamura, Naohito Kawasaki, *et al.* Inclusion of volatile organic compounds into natural cyclodextrins and their branched cyclodextrins in the gaseous phase[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**,1997,186:180—184.

[6] Noriko Ajisara, Koji Hara, Katsuhiko Mikuni, *et al.* Effects of branched cyclodextrins on the solubility and stability of terpenes[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2000,64(4):731—734.

[7] Yoshiyuki Sakano, Mutsumi Sano, Tsuneo Kobayashi. Preparation and enzymatic hydrolysis of maltosyl- α -cyclodextrin [J]. **Agric Biol Chem**, 1985,49(12):3391—3398.

[8] Shoichi Kobayashi, Kohichi Nakashima,Masaomi Arahira. Production and some properties of branched cyclomalto-oligo-saccharides[J]. **Carbohydrate Research**,1989,192:223—231.

[9] Yasuyo Okada,Kyoko Koizumi, Sumio Kitahata. Separation and characterization of five positional isomers of trimaltosyl-cyclomaltoheptaose(trimaltosyl- β -cyclodextrin)[J]. **Carbohydrate Research**,1994,254:1—13.

[10] Noriyasu Watanabe. A novel method to produce branched α -cyclodextrins: pullula-nase-glucoamylase-mixed method[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**,1997, 83(1):43—47.

[11] Shoichi Kobayashi ,Naoto Shibuya,Betty Young, *et al.* The preparation of 6- α -D-glucopyranosylcyclohexaamylose[J]. **Carbohydrate Research**,1984, 126:215—224.

[12] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.

[13] 王兰,肖冬光. 纸层析分离洗脱法定量测定海藻糖[J]. 生物技术,2002,12(3):27—29.

(责任编辑:朱 明)