

质量法和 HPLC 法相结合检测酶解后烟梗果胶质质量分数

施林燕¹, 许赣荣^{*1}, 金永明², 汤朝起²

(1.江南大学 生物工程学院,江苏无锡 214122; 2.上海烟草集团有限责任公司,上海 200082)

摘要: 将质量法和高效液相色谱法相结合,建立了适合于酶解后烟草样品中果胶质质量分数的检测方法。首先对酶解后的烟梗及梗丝样品进行酸解、过滤处理,所得到的固态样品的果胶酸用质量法检测,原质量法中被丢弃上清液中的半乳糖醛酸质量分数则采用 HPLC 法检测,将两种方法测定并换算得到的果胶质质量分数相加。结果显示:用 HPLC 法检测时,半乳糖醛酸检测结果的变异系数为 0.33%,平均回收率为 99.32%。该法测得的总果胶酸质量分数,其变异系数比用传统质量法检测果胶酸质量分数所得的变异系数有所降低。该方法果胶质提取更充分,酶解后烟梗及梗丝中各种形态的果胶质都能得到检测,具有检测结果更准确、方法简单、便于实际操作的优点。

关键词: 烟草;果胶质;质量法;高效液相色谱法;果胶酸;半乳糖醛酸

中图分类号:TS 452.2 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2012)12—1325—06

Detecting the Pectin in the Tobacco Stems after Enzymatic by Combing the Gravimetric Method with HPLC

SHI Lin-yan¹, XU Gan-rong^{*1}, JIN Yong-ming², TANG Zhao-qi²

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Shanghai Tobacco Group CO. LTD. Shanghai 200082, China)

Abstract: It combined the gravimetric method with HPLC to detect different kinds of pectin in the tobacco stems and cut-stems after enzymatic. Firstly, the sample of tobacco stems and cut-stems after enzymatic should be treated by acid hydrolysis and filtration. Then we detected the content of calcium pectinate in the solid samples by gravimetric method. The galacturonic acid in the supernatant that was discarded in the process of sample treatment will be tested by HPLC. These two parts of the content of pectin could be conversed and added together. The analytical results showed that the coefficient of variation was 0.33%, the average recovery of galacturonic acid was 99.32%. Using this method, the coefficient of variation of the content of the total pectin acid was lower than traditional gravimetric method. The pectin would be fully extracted. The detection method is comprehensive and with good reproducibility, and easy operations.

Keywords: tobacco, pectin weight-metering method, HPLC, pectin acid, galacturonic acid

收稿日期: 2011-09-20

基金项目: 上海烟草集团有限责任公司科技项目(SZBC W2010 00744)。

*通信作者: 许赣荣(1957—),男,江西赣州人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物工程方面的研究。E-mail:grxu123@126.com

烟草中的果胶是不受欢迎的组分而需要被酶解。酶解果胶的产物包括小分子物质,如半乳糖醛酸,该物质在常规的质量法中是水溶性的,存在于丢弃的上清液中而无法被检测。

现有的检测烟梗及梗丝中果胶质含量的方法有质量法、比色法、容量法、高效液相色谱法、酶解-流动分析法、离子色谱法等^[1-8]。每种检测方法各有特色,但在实践中发现,仅采用单一检测方法无法对生物酶处理过的烟梗及梗丝的果胶含量得到满意的结果。因为烟梗及梗丝酶解后将产生果胶酸及半乳糖醛酸,而仅用一种方法无法同时检测这两种产物。

高效液相色谱法是将烟梗果胶彻底水解成果胶酸的基本组成单位——半乳糖醛酸进行检测。只有将样品中的果胶尽可能地水解成半乳糖醛酸,才能通过 HPLC 法得到准确的结果。而烟梗中的还原糖、氨基酸,及其美拉德反应产物会对半乳糖醛酸的检测产生严重的干扰^[4-5]。

针对酶解后烟梗及梗丝中果胶质质量分数的检测,作者采用质量法检测固态样中的果胶酸钙质量分数,采用 HPLC 法检测原质量法中丢弃的上清液中的半乳糖醛酸质量分数,该半乳糖醛酸折算成果胶酸,然后将两种方法得到的果胶酸质量分数相加,进而得到总果胶酸质量分数。该方法检测全面,能较准确地反映出烟梗及梗丝酶解效果的好坏,结果较理想。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试剂 果胶酶:30 000 U/g,无锡市杰仁生物科技有限公司;乙腈:色谱纯,Merck;浓硫酸:分析纯,中国国药集团化学有限公司;盐酸、氨水和无水氯化钙:分析纯,中国国药集团化学有限公司,2008年福建生产的烟梗丝。

1.1.2 标样 半乳糖醛酸:色谱纯,中国国药集团化学有限公司。

1.1.3 仪器 Agilent-1200 型高效液相色谱仪:美国安捷伦公司;Carbomix H-NP 色谱柱:美国赛分科技有限公司;TGL-16M 型台式高速离心机:湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司;H2-2 型电热恒温振荡水槽:上海精宏实验设备有限公司;FA1004 型电子天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 烟梗丝的酶解方法:取适量烟梗丝,与酶液按料水比为 3:5 混匀,置于不锈钢罐中压紧,于 45~50 °C 水浴锅中酶解一定时间(常规下酶解时间为 6 h)。烟梗丝酶解结束后,快速热风烘干,保存。

1.2.2 检测方法 质量法和 HPLC 法相结合的检测方法的流程见图 1。

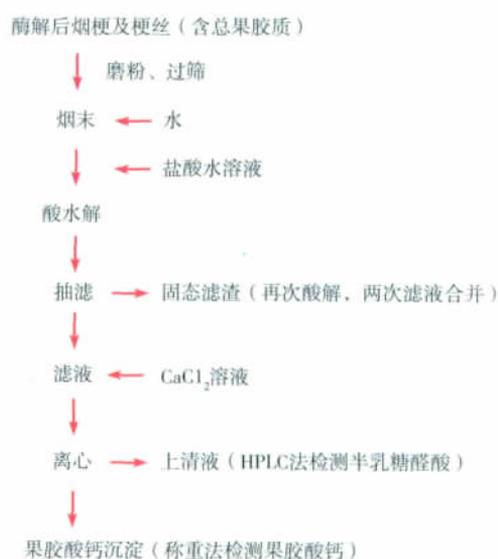


图 1 检测方法流程图

Fig.1 Flow-process diagram of the detection method

1.2.3 改进的质量法

有关检测条件和参数为^[9-11]:

1)称取 5 g 酶解并过筛的烟梗粉末加入到 200 mL 的烧杯中;

2)在上述盛有烟梗粉末的烧杯中加入 125 mL 水,加热到 80 °C,平衡 15 min;

3)在烟梗粉末与水的混合物中加入 10%的盐酸溶液,调整 pH 1.9;80 °C 下保持 2 h,趁热抽滤,滤渣再酸解或酶解一次;滤液合并,将得到的滤液转移到 500 mL 离心杯中;

4)在滤液中加入 25%氨水溶液,调整 pH 4.0,然后加入 10 mL 质量分数为 50%的 CaCl₂ 溶液;放置 1 h 后,3 500 r/min 离心 20 min;过滤离心后得上清液和果胶酸钙沉淀;

5)用 HPLC 法检测得到的上清液中半乳糖醛酸含量;

6)称重法测定果胶酸钙沉淀含量。

将步骤 5~6 所得到的果胶质质量分数换算成

果胶酸质量分数,相加后即得到酶解后烟梗及梗丝中总果胶酸的质量分数。

1.2.4 HPLC 检测色谱条件 色谱柱为 Car H-NP10:8% (10 μm,7.8 mm×300 mm);流动相为 2.5 mmol/L H₂SO₄,流速为 0.6 mL/min;柱温 55 °C。取上清液 2 mL 用 0.45 μm 膜过滤,取过滤液 10 μL 进样分析,以示差折光检测器检测。

1.2.5 半乳糖醛酸与果胶酸质量分数的换算

$$\text{果胶酸质量分数 } 1(\%) = \frac{0.923 \ 3m}{W} \times 100\%$$

式中,m 为果胶酸钙的质量,g;W 为提取用原料质量,g;0.923 3 为果胶酸钙换算成果胶酸的系数,其依据为果胶酸钙的实验式 C₁₇H₂₂O₁₆Ca,式中 Ca 含量 7.67%,果胶酸质量分数为 92.3%。

$$\text{果胶酸质量分数 } 2(\%) = \frac{176}{194} \times \text{半乳糖醛酸质量分数 } (\%)$$

其中,176 为 D-半乳糖醛酸的相对分子质量,半乳糖醛酸分子式为 C₆H₁₀O₇;194 为表示果胶酸的相对分子质量,果胶酸的分子式为 (C₆H₈O₆)_n。

$$\text{总果胶酸质量分数 } (\%) = \text{果胶酸质量分数 } 1(\%) + \text{果胶酸质量分数 } 2(\%)$$

2 结果与讨论

采用质量法与 HPLC 法相结合的方法,测定酶解烟草样品中的果胶质,有几个问题值得关注。其一是酶解后的烟草样品中被分解成半乳糖醛酸的量有多少,如果半乳糖醛酸的质量分数很低,则说明质量法的误差不会太大。另一个问题是采用 HPLC 法检测离心后上清液中的半乳糖醛酸时,该上清液样品中的杂质是否会对检测产生负面影响,最值得关注的是色谱图上半乳糖醛酸和其它杂质的峰是否可以完全分离。

2.1 工作曲线

标准品的配制:精确称取半乳糖醛酸标样 200.00 mg 于 100 mL 容量瓶中,定容摇匀,该溶液作为贮备液,按表 1 配置一系列标准品溶液。

取配制的半乳糖醛酸系列标准溶液上机测定,以标样的峰面积为纵坐标,以标样的质量浓度(mg/mL)为横坐标进行线性回归。半乳糖醛酸回归方程为:y=219 882x-231.13,r=0.9999。半乳糖醛酸的质量浓度在 20~2 000 mg/L 时,其相关系数为 0.999 9,见图 2。满足定量分析的要求。

表 1 半乳糖醛酸标准品溶液的配制

Tab.1 Standard sample of galacturonic acid

编号	标准品体积/mL	定容体积/mL	标样质量浓度/(mg/mL)
1	0.25	25	0.02
2	0.5	25	0.04
3	1.0	25	0.08
4	2.0	25	0.16
5	2.5	25	0.20
6	5.0	25	0.40
7	10.0	25	0.80
8	20.0	25	1.60
9	25.0	25	2.00

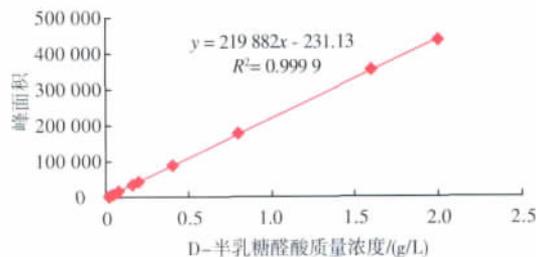


图 2 D-半乳糖醛酸标准曲线

Fig.2 D-galacturonic acid's standard curve

2.2 精密度

对单一质量浓度标准品进行 6 次平行试验;半乳糖醛酸峰面积的变异系数为 0.33%,保留时间变异系数 0.28%,见表 2。

表 2 半乳糖醛酸精密度测定结果

Tab.2 Precision of the method for the determination of galacturonic acid

测定次数	半乳糖醛酸峰面积	半乳糖醛酸保留时间/min
1	89 107.0	10.510
2	88 430.9	10.513
3	88 291.4	10.506
4	88 933.3	10.514
5	88 407.1	10.509
6	88 555.8	10.514
X	88 620.9	10.511
CV/%	0.33	0.28

2.3 半乳糖醛酸回收率

对上清液的同一样品中的半乳糖醛酸进行回收率试验,平均回收率为 99.32%,见表 3。

表 3 半乳糖醛酸回收率实验
Tab.3 Recovery of galacturonic acid

样品中质量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%
3.16	3.00	6.03	97.89	99.32
3.16	3.00	6.18	100.32	
3.16	3.00	6.14	99.68	
3.16	4.50	7.64	99.74	
3.16	4.50	7.64	99.74	
3.16	4.50	7.64	99.74	
3.16	6.00	9.09	99.24	
3.16	6.00	9.06	98.91	
3.16	6.00	9.03	98.58	

2.4 上清液半乳糖醛酸和其它杂质的 HPLC 分离效果

图 3 显示半乳糖醛酸获得了很好的分离效果,且分析速度快,仅在 12 min 内就完成了分析。

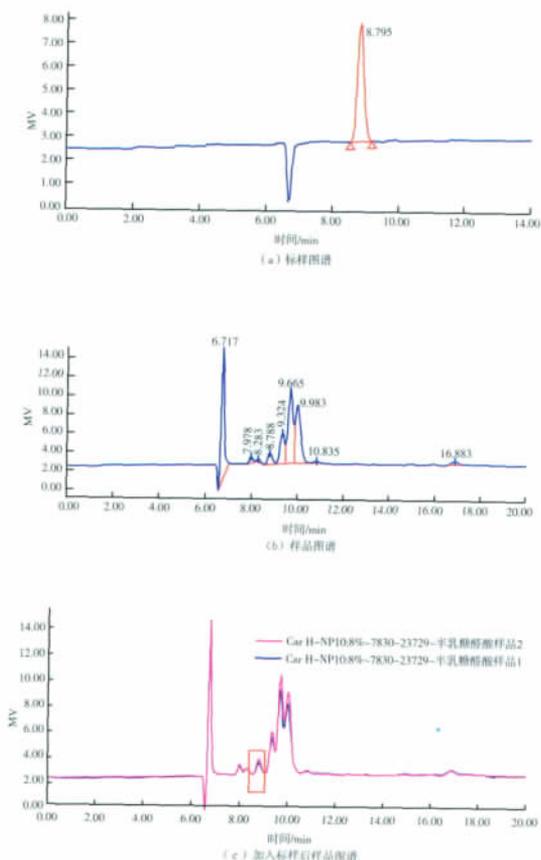


图 3 高效液相色谱法测定半乳糖醛酸色谱图
Fig.3 Detection of galacturonic acid by HPLC

2.5 质量法和 HPLC 法检测不同酶用量情况下总果胶酸质量分数

酶处理同一质量的烟梗丝时,所产生的半乳糖醛酸的量与所用的酶量成正相关关系。

酶解烟梗丝的酶用量分别为 0、20、50、100、200、300、400、500 U/g 烟梗丝,45 °C 酶解 6 h 后,烟梗丝经烘干、磨粉、过筛后,采用质量法和 HPLC 法相结合。用质量法检测果胶酸钙,用 HPLC 法检测半乳糖醛酸,将半乳糖醛酸质量分数换算成果胶酸钙含量,结果见表 4。

表 4 不同酶用量下果胶酸质量分数的检测

Tab.4 Detection of the content of the pectin acid by using different quantity of enzyme

酶用量/(U/g 烟梗丝)	质量法测得果胶酸质量分数/%	上清液中果胶酸质量分数/%	总果胶酸质量分数/%	上清液中果胶酸质量分数占总果胶酸质量分数的百分比/%
0	15.46	0	15.46	0
20	15.14	0.15	15.29	0.98
50	15.02	0.27	15.29	1.77
100	14.65	0.60	15.25	3.93
200	13.22	0.99	14.21	6.07
300	11.47	1.35	12.82	10.53
400	11.49	1.62	13.11	12.36
500	11.47	2.01	13.48	14.91

由表 4 可以看出,酶用量越大,上清液中果胶酸质量分数占总果胶酸质量分数的百分比越高。当酶用量达 500 U/g 烟梗丝时,上清液中果胶酸质量分数占总果胶酸质量分数的近 15%。由此可见,酶解程度越高,所产生的半乳糖醛酸的质量分数越高,这说明如果仅采用质量法来检测酶解样品,将会产生较大误差。采用两种方法相结合时,可大大减小测定误差。

2.6 质量法和 HPLC 法检测不同酶解时间下总果胶酸质量分数

酶解烟梗丝的时间分别为 0、1、2、3、4、5、6 h,酶用量为 300 U/g 烟梗丝,50 °C 酶解,酶解后烟梗丝烘干、磨粉、过筛,用质量法检测果胶酸钙,用 HPLC 法检测半乳糖醛酸,将半乳糖醛酸含量换算

成果胶酸钙质量分数,结果见表 5。

表 5 不同酶解时间下果胶酸质量分数的检测

Tab.5 Detection of the content of the pectin acid by different reaction time

酶解时间/h	质量法测得果胶酸质量分数/%	上清液中果胶酸质量分数/%	总果胶酸质量分数/%	上清液中果胶酸质量分数占总果胶酸质量分数的百分比/%
0	15.37	0	15.37	0
1	13.10	1.50	14.60	10.27
2	12.12	1.82	13.94	13.06
3	11.71	2.09	13.81	15.13
4	11.49	2.18	13.67	15.95
5	11.23	2.31	13.54	17.06
6	11.22	2.38	13.60	17.50

由表 5 可以看出,上清液中的果胶酸质量分数占总果胶酸质量分数的 10%以上,且随着酶解时间的增加,上清液中的果胶酸质量分数占总果胶酸质量分数的比值增大。故而,若按照传统质量法,将上清液弃之不测,则会对实验结果造成很大误差。

2.7 质量法和 HPLC 法检测果胶酸精密度实验

酶解烟梗丝的酶用量为 300 U/g 烟梗,采用 3:5 的料水比进行实验,酶解 6 h 后,烟梗丝经烘干、磨粉、过筛后,采用质量法和 HPLC 法相结合。用质量法检测果胶酸钙,用 HPLC 法检测半乳糖醛酸质量分数,将半乳糖醛酸质量分数换算成果胶酸钙质量分数。同一样品检测 6 次,结果见表 6。

由表 6 可以看出,固态样与液态样在同一实验条件下,固态样的果胶酸检测的变异系数比液态样大;而液态样的果胶酸检测的变异系数低于 5%,满足仪器分析变异系数<5%的要求。

半乳糖醛酸峰面积的变异系数为 0.33%,满足仪器分析变异系数<5%的要求。对同一样品中的半乳糖醛酸进行回收率试验,回收率达到了 95%以上。说明本试验的分析条件下测定半乳糖醛酸的方法可靠。

参考文献:

[1] 张学杰,郭科,苏艳玲. 果胶研究新进展[J]. 中国食品学报,2010,10(1):167-174.
 ZHANG Xue-jie, GUO Ke, SU Yan-ling. A review on the recent advance in pectin research[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010,10(1):167-174. (in Chinese)

表 6 质量法和 HPLC 法检测果胶酸精密度实验

Tab.6 Precision of the method for the determination of pectin acid

序号	固态样中的果胶酸质量分数/%	上清液中的果胶酸质量分数/%	总果胶酸质量分数/%
1	11.60	1.64	13.24
2	11.98	1.70	13.68
3	12.55	1.59	14.14
4	11.22	1.58	12.80
5	12.93	1.65	14.58
6	13.51	1.67	15.18
变异系数/%	6.37	2.58	5.74

由图 3 中的(b)图可以看出,D-半乳糖醛酸出峰时间为 8.778 min,与前一物质(出峰时间为 8.281 min)和后一物质(出峰时间为 9.324 min)能够较好地分离,且峰形良好。说明用 HPLC 法检测半乳糖醛酸的分离效果较好。图 3(c)图表明,加标后样品的出峰情况与未加标的样品相吻合,说明检测的样品中都含有半乳糖醛酸。

若将液态样与固态样中的果胶酸质量分数相加,得到总果胶酸质量分数,其变异系数比用传统质量法检测果胶酸质量分数所得的变异系数有所降低。故用本实验所用方法检测果胶酸质量分数比用传统质量法的检测误差变小。

3 结语

采用质量法检测固态样中的果胶酸钙质量分数,采用 HPLC 法检测原质量法中丢弃的上清液中的半乳糖醛酸质量分数,使得果胶酸提取更充分,酶解后烟梗及梗丝中各种形态的果胶质都能得到检测,再将两种方法测定并换算得到的果胶酸质量分数相加,使烟梗及梗丝中果胶质质量分数的检测更全面,检测误差变小。

- [2] 曹德菊,黄祥明,刘小刚,等. AAS法间接测定植物果胶含量的研究[J]. 安徽农业大学学报,2000,27(2):202-203.
CAO De-ju,HUANG Xiang-ming,LIU Xiao-gang,et al. Indirect determination of pectin content by AAS[J]. **Journal of Anhui Agricultural University**,2000,27(2):202-203. (in Chinese)
- [3] 马东萍,刘维涓,卫青,等. 3,5-二硝基水杨酸显色法测定烟草中的果胶[J]. 烟草科技,2006(8):38-41.
MA Dong-ping,LIU Wei-juan,WEI Qing,et al. Determination of pectin in tobacco with 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry [J]. **Tobacco Science & Technology**,2006(8):38-41. (in Chinese)
- [4] 吴玉萍,杨光宇,王东丹,等. 高效液相色谱法测定烟草中的果胶含量[J]. 光谱实验室,2004,21(1):183-185.
WU Yu-ping,YANG Guang-yu,WANG Dong-dan,et al. Determination of pectin in tobacco with high performance liquid chromatography[J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**,2004,21(1):183-185. (in Chinese)
- [5] 王岚,施红林,李忠,等. 高效液相色谱法测定烟草中淀粉和果胶含量[J]. 理化检验-化学分册,2006,42(3):174-178.
WANG Lan,SHI Hong-lin,LI Zhong,et al. HPLC determination of starch and pectin in tobacco [J]. **Physical Testing and Chemical Analysis**,2006,42(3):174-178. (in Chinese)
- [6] 王鹏,尚军,戴迎雪,等. 酶解-流动分析法测定烟草中果胶前处理方法的改进[J]. 烟草科技,2009(2):50-52.
WANG Peng,SHANG Jun,DAI Ying-xue,et al. Improvement on pretreatment for determining pectin in tobacco with enzymolysis-flowanalysis[J]. **Tobacco Science & Technology**,2009,(2):50-52. (in Chinese)
- [7] 饶巍,虞苏行,钟科军,等. 酶解-离子色谱法测定烟草中的果胶[J]. 化学研究,2010,21(3):72-74.
RAO Wei,TUO Su-xing,ZHONG Ke-jun,et al. Determination of pectin in tobacco by enzymolysis-ion chromatography [J]. **Chemical Research**,2010,21(3):72-74. (in Chinese)
- [8] 吴胜芳,王树英,陶冠军,等. 离子色谱法测定多糖水解液中的半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):86-88.
WU Sheng-fang,WANG Shu-ying,TAO Guan-jun,et al. Determination of galacturonic acid and glucuronic acid in the hydrolyzed polysaccharide solution by ion chromatography [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2005,24(4):86-88. (in Chinese)
- [9] 张槐苓,葛翠英. 烟草分析与检验[M]. 郑州:河南科技出版社,1994:67-99.
- [10] 任静波,王玉,刘民,等. 山楂片中果胶质的测定[J]. 锦州师范学院学报:自然科学版,2003,24(2):11-13.
REN Jing-bo,WANG Yu,LIU Min,et al. Measuring dpectin in hawthorn cake [J]. **Journal of Jinzhou Teachers College: Natural Sciences Edition**,2003,24(2):11-13. (in Chinese)
- [11] 董洁,郭立玮,文红梅,等. 中药水提液中果胶含量测定方法研究[J]. 现代中药研究与实践,2007,21(5):39-41.
DONG Jie,GUO Li-wei,WEN Hong-mei,et al. Study on the content of pectin in Chinese herbal decoction [J]. **Research and Practice on Chinese Medicines**,2007,21(5):39-41. (in Chinese)