

气相色谱-质谱联用法测定 植物组织中糖与糖醇

项萍, 唐喆

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:糖醇类物质广泛存在于植物组织中,是重要的初生代谢物,具有提供能量、清除自由基以及调节植物细胞渗透压等生理功能,其含量的变化直接反映了植物组织的生理状况。本研究以植物组织中含量极少的核糖醇作为内标物,采用气相色谱-质谱(GC/MS)选择离子监测(SIM)模式法测定枸杞样品根系和叶片中果糖(Flu)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、纤维醇(Ino)、甘露醇(Man)、山梨醇(Sor)、蔗糖(Suc)等7种常见的糖和糖醇含量。结果表明,除果糖的检出限为5.5 mg/L外,其他均在0.11 mg/L以下,相对标准偏差介于2.3%~4.9%之间。在枸杞组织中的应用检测表明,枸杞根中果糖、蔗糖和葡萄糖含量是叶子的2倍以上,而半乳糖和纤维醇的含量相当。

关键词:气相色谱-质谱法(GC/MS);内标法;糖与糖醇;乙酰化;选择离子监测(SIM);枸杞

中图分类号: O656.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2018)03-0360-06

doi: 10.7538/zpzb.2017.0075

Determination of Sugars and Sugar Alcohols in Plant Tissues by GC/MS

XIANG Ping, TANG Zhe

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Sugars and sugar alcohols are the most important primary metabolites in plant tissues, which provide energy, free radical scavenging and regulation of plant cell osmotic pressure and other physiological functions. Their equilibrium is directly associated with the physiological condition of plant tissues. For example, sorbitol and mannitol are two important derivatives of monosaccharides, which are mainly involved in the regulation of osmotic stress and important for plant growth and stress signaling. These sugar and sugar alcohols are usually detected by titration, spectrophotometric method, enzymatic analysis and chromatographic analysis. However, these chemicals in plant tissue are kept at low concentration. To enhance the sensitivity for plant endogenous

收稿日期:2017-04-14;修回日期:2017-07-24

基金项目:农业公益性行业科研专项(201303016)资助

作者简介:项萍(1984—),女(汉族),黑龙江人,硕士研究生,植物化学专业。E-mail: xiangp02@163.com

通信作者:唐喆(1988—),男(汉族),陕西商州人,实验师,从事植物免疫和化学研究。E-mail: tangzhe815@163.com

网络出版时间:2018-01-22;网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180119.1558.014.html>

sugars and sugar alcohols detection, gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) combined with selected ion monitoring (SIM) was established. 7 kinds of sugar and sugar alcohols, including of fructose (Flu), glucose (Glu), galactose (Gal), inositol (Ino), mannitol (Man), sucrose (Suc) and sorbitol (Sor) were detected in plant tissues at a low concentration. The result showed that fructose concentration was 5.5 mg/L, the others were below 0.11 mg/L, and the relative standard deviation (RSD) was between 2.3% and 4.9%. As an application, these chemicals in *Lycium chinensis* tissue were detected. The contents of sucrose and glucose in root were more than 2 times these of the leaves, while the galactose and inositol had no difference in the two tissues.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS); internal standard method; sugar and sugar alcohol; acetylation; selected ion monitoring (SIM); wolfberry

糖醇类物质广泛存在于自然界各种生物中,植物体内的糖醇具有提供能量、清除自由基以及调节植物细胞渗透压等生理功能^[1]。糖醇类物质是植物体内重要的初生代谢物,其含量的变化可直接反映植物组织的生理状况。枸杞作为西北半干旱地区常见的植物,不仅是常用的传统中药材,还是百姓喜爱的保健品。据研究报道,枸杞的果、叶、苗、根都含有多种营养和活性组分,其中以葡萄糖、阿拉伯糖为活性基础形成的水溶性多糖(LPB)^[2]为主。

糖与糖醇类物质的检测方法一般有容量法、分光光度法、酶分析法、色谱分析法等^[3-4],但由于植物组织中糖醇类物质的浓度相对较低,使用上述方法很难得到准确的含量,因此有必要建立一种快速且灵敏的糖醇类物质分析方法。气相色谱法的灵敏度高、分离能力强,能够有效地分离天然化合物中的同分异构体,并能够对痕量物质进行检测;质谱法能够准确地确定化合物的分子质量,并且推算化合物的分子式,对于鉴定有机物分子具有重要作用。目前,气相色谱-质谱(GC/MS)联用技术已广泛应用于各种检测中^[5-6],然而,糖醇类物质高温易分解或难以气化,在进行GC/MS分析前要对化合物进行衍生化处理。

本研究拟以7种常见的糖醇类物质作为目标化合物,经乙酰化处理后,以核糖醇作为内标物,采用GC/MS法测定枸杞叶片和根系中的含糖情况,希望为各种植物组织中糖和糖醇类物质的检测提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GC/MS-QP2010 气相色谱-质谱仪:日本岛津公司产品,配有Aoc-20i自动进样器、Rxi-5MS色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);MD200氮吹仪:杭州奥盛仪器有限公司产品;PL303电子天平:梅特勒-托利多上海有限公司产品;THZ-C-1全温振荡器:苏州培英实验设备有限公司产品。

果糖(Flu)、核糖醇(Ado)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、纤维醇(Ino)、甘露醇(Man)、山梨醇(Sor)、蔗糖(Suc)标准品:均为分析纯,美国Sigma公司产品;甲醇、氯仿、1-甲基咪唑、盐酸羟胺、乙酸酐、无水硫酸钠:均为分析纯,天津富宇精细化工有限公司产品。

1.2 乙酰化标准品的配制

精确称取各0.005、0.02、0.05、0.1、0.2 mg果糖、葡萄糖、半乳糖、纤维醇、甘露醇、山梨醇、蔗糖标准品,分别加入0.02 mg核糖醇,混匀,再加入少许的1-甲基咪唑悬浮;然后加入0.1 mL盐酸羟胺溶液,混匀后置于80℃水浴中振荡5 min,取出后加入0.15 mL乙酸酐,混匀,于室温下反应5 min;再加入1 mL氯仿萃取衍生化产物,然后用2倍体积水清洗4遍,有机相用无水硫酸钠干燥后,封装于色谱瓶中,即得质量浓度分别为5、20、50、100、200 mg/L的混合标准工作液,其中内标物核糖醇的浓度为20 mg/L。

1.3 样品提取以及乙酰化处理

对枸杞叶片与根系的单双糖及其可溶性糖醇类化合物进行GC/MS测定,具体步骤^[1]为:

取 0.2 g 枸杞鲜样,加入 0.02 mg 核糖醇作为内标,液氮环境中研磨成细碎粉末,加入 4 mL 甲醇-氯仿-水(12:5:3, V/V/V)碳水化合物抽提液,充分混匀,随后加入等体积水,混匀,静置片刻,将上清液过滤至试管中,氮气吹干,待其冷却后加入少许的 1-甲基咪唑悬浮;然后加入 0.1 mL 盐酸羟胺溶液,混匀后置于 80 °C 水浴中振荡 5 min,取出后加入 0.15 mL 乙酸酐,混匀后于室温下反应 5 min,加入 1 mL 氯仿萃取衍生化产物,用 2 倍体积水清洗 4 遍,有机相用无水硫酸钠干燥后,直接封装于色谱瓶中,待测。

1.4 实验条件

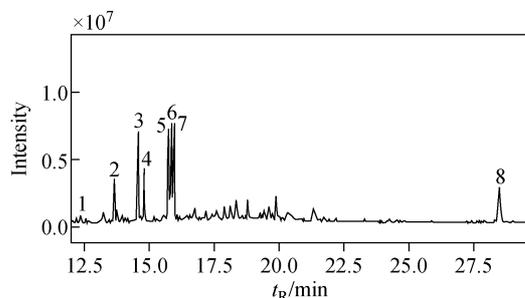
1.4.1 色谱条件 载气 He,流速 0.8 mL/min;清洗流速 3 mL/min,线速度 32.4 cm/s;升温程序:柱温 50 °C,保持 5 min,以 15 °C/min 升至 200 °C,以 10 °C/min 升至 280 °C,保持 20 min;进样口温度 250 °C;进样量 1 μ L。

1.4.2 质谱条件 轰击电压 70 eV,界面温度 280 °C,离子源温度 230 °C,检测器电压 0.9 kV,溶剂切割时间 3 min,质量扫描范围 m/z 35~900。

2 结果与分析

2.1 8 种乙酰糖的 Scan 模式定性分析

将乙酰化后的标准品通过单标进样确定每种物质的保留时间,进混标样后优化升温程序、调整测试参数,从而达到较好的分离效果,得到的总离子流图示于图 1。



注:1. 果糖;2. 核糖醇(内标物);3. 葡萄糖;4. 半乳糖;
5. 纤维醇;6. 甘露醇;7. 山梨醇;8. 蔗糖

图 1 8 种乙酰化的糖和糖醇的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of 8 acetylated sugars and sugar alcohols

2.2 SIM 模式定量分析

SIM 模式较 Scan 模式的灵敏度有很大提高^[7]。本研究根据 8 种乙酰化标准品 Scan 模式的质谱图,选定特征离子创建了 SIM 方法,并对混合标样进行分析,得到的离子流图示于图 2,乙酰化的糖和糖醇的 SIM 模式参考离子列于表 1。由于糖和糖醇类物质含有较多的羟基,乙酰化处理后形成的酰氧键极易断裂形成 m/z 43 碎片离子,且丰度较高,结合其他特征碎片和保留时间,可以高选择、高灵敏地检测糖和糖醇类物质的含量。

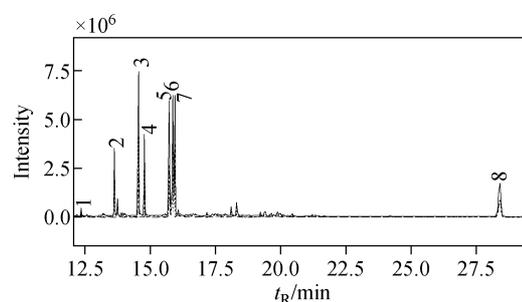


图 2 8 种乙酰化的糖和糖醇的 SIM 模式总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of 8 acetylated sugars and sugar alcohols at SIM mode

表 1 8 种乙酰化的糖和糖醇的 SIM 模式参考离子

Table 1 Reference ions of 8 acetylated sugars and sugar alcohols at SIM mode

峰号 Peak number	糖和糖醇 Sugars and sugar alcohols	保留时间 t_R /min	参考离子 Reference ions (m/z)
1	果糖	12.35	43,103,145
2	核糖醇	13.63	43,115,145
3	葡萄糖	14.56	43,145,103
4	半乳糖	14.79	43,145,103
5	纤维醇	15.74	43,168,126
6	甘露醇	15.87	43,115,139
7	山梨醇	15.96	43,115,145
8	蔗糖	28.58	43,169,211

2.3 SIM 方法的检出限、回收率和精密度

分别取 1.2 节配制的标准混合工作液,采

用 1.3 节方法对标准溶液乙酰化处理后,按 1.4 节条件上机测定。为了避免前处理过程导致的误差,选取植物组织中含量极少的核糖醇作为内标物,以其他标准品与核糖醇峰面积比 y 对 7 种标准物质量浓度与核糖醇比 x 做线性回归,以信噪比 3 计算检出限,信噪比 10 计算定量限,其结果列于表 2。可见,除果糖的检出限为 5.5 mg/L 外,其他糖和糖醇的检出限均

低于 0.11 mg/L。

选取一组枸杞根样品,在前处理前添加一定量的可溶性糖进行分析检测,重复测定 5 次,考察该方法在实际样品中的回收率与精密度,结果列于表 3。结果表明,回收率在 96.98%~103.62% 之间,相对标准偏差(RSD)为 2.3%~4.9%,该方法精密度良好,能够满足定量分析的要求。

表 2 乙酰化的糖和糖醇的工作曲线、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantification of 8 acetylated sugars and sugar alcohols

糖和糖醇 Sugars and sugar alcohols	工作曲线 Regression equations	相关系数 Correlation coefficients(R^2)	线性范围 Linear ranges/ (mg/L)	检出限 LODs/(mg/L)	定量限 LOQs/ (mg/L)
果糖	$y=0.027448x-0.0035671$	0.998354	10~100	5.51	18
葡萄糖	$y=0.884213x-0.013349$	0.999995	1~50	0.1	0.34
半乳糖	$y=0.870615x-0.001697$	0.999841	1~50	0.11	0.37
纤维醇	$y=1.066784x-0.063779$	0.998657	1~50	0.09	0.29
甘露醇	$y=1.214220x-0.042814$	0.997969	1~50	0.05	0.16
山梨醇	$y=1.176047x+0.046170$	0.998512	1~50	0.05	0.17
蔗糖	$y=1.185708x+0.006697$	0.999860	1~50	0.02	0.06

表 3 SIM 模式下方法的回收率和精密度

Table 3 Recoveries and precisions at SIM mode

糖和糖醇 Sugars and sugar alcohols	加入量 Addition/ (mg/g)	根样品含量 Root contents/ (mg/g)	样品测定量 Sample contents/ (mg/g)	回收率 Recoveries/%	相对标准偏差 RSDs/%
果糖	0.823	0.320	1.1222	98.18	2.3
葡萄糖	0.512	0.1452	0.681	103.62	2.7
半乳糖	0.260	0.0125	0.2798	102.68	3.1
纤维醇	0.620	0.0840	0.712	101.14	3.5
甘露醇	0.062	0.0018	0.062	97.17	2.3
山梨醇	0.052	0.0010	0.0514	96.98	4.9
蔗糖	2.322	1.4835	3.912	102.8	2.5

2.4 方法的应用

选取枸杞叶片与根系作为样本进行糖和糖醇的测定,结果列于表 4。可见,枸杞根中的果糖、葡萄糖和蔗糖含量约是叶片中的 2 倍,这是因为根主要参与植物无机离子和水的吸收,需要大量的能量,这些糖类可为根提供更多的能

量。半乳糖和纤维醇是植物细胞重要合成物的前体,其中,半乳糖是植物果胶类成分的重要组成部分,纤维醇可用于植物细胞壁的合成^[8-9],二者对枸杞的根和叶细胞具有同等重要的作用,二者的含量差异不大。山梨醇和甘露醇是单糖的重要衍生物,主要用于调节细胞渗透压,提高植

物抗性^[10-11],由于根处于复杂环境中,需要对渗透压有良好的调节能力,所以山梨醇和甘露醇的含量较高。

实际的枸杞样品测定结果和理论分析表明,本实验采用的 GC/MS 选择离子监测 (SIM) 模式可以准确地测定植物组织中的糖醇含量。虽然样品的乙酰化处理增加了前处

理步骤,但是操作简单,试剂为常规试剂,成本较低。同时,采用核糖醇作为内标物,有效地减小了误差。该方法可以去除背景干扰,得到清晰准确的色谱峰,比 GC/MS 法全扫描模式的灵敏度高,适合测定糖含量较低的植物组织。

表 4 枸杞叶片与根系中的糖和糖醇含量 (mg/g)

Table 4 Contents of sugars and sugar alcohols in leaves and roots of *Lycium chinensis* (mg/g)

样品名称 Samples	果糖 Fructose	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	纤维醇 Inositol	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbitol	蔗糖 Sucrose	总量 Total amounts
根样 1	0.312	0.1382	0.0123	0.0813	0.0015	0.0008	1.4922	2.0383
根样 2	0.3566	0.1666	0.01685	0.1195	0.0001	0.0019	1.9299	2.59145
根样 3	0.3318	0.1299	0.014	0.1405	0.0054	0.0073	2.9131	3.542
叶片 1	0.1007	0.0675	0.0268	0.1313	0	0	0.7422	1.0685
叶片 2	0.1141	0.0458	0.0034	0.0421	0	0	0.4135	0.6189
叶片 3	0.1229	0.0734	0.003	0.0699	0	0	0.6545	0.9237

3 结论

本研究采用 GC/MS 法 SIM 模式快速分析测定乙酰糖和乙酰糖醇,以枸杞的根和叶片为例进行了准确的定量分析。为了避免乙酰化过程影响测定结果,选择核糖醇作为内标物进行定量分析,同时 SIM 模式降低了基质干扰、提高了灵敏度。该方法可为糖和糖醇类物质的检测提供参考依据。

参考文献:

- [1] 胡磊,郭蓓,陆海,等. 植物组织中糖与糖醇乙酰化及毛细管气相色谱分析[J]. 植物学报, 2004, 21(6): 689-699.
HU Lei, GUO Bei, LU Hai, et al. Gas chromatographic analysis of sugar and sugar alcohol derivatives through 1-methylimidazole catalyzed acetylation[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2004, 21(6): 689-699(in Chinese).
- [2] 如克亚·加帕尔,孙玉敬,钟烈州,等. 枸杞植物化学成分及其生物活性的研究进展[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 161-172.
RUKEYA Jiapaer, SUN Yujing, ZHONG Liezhou, et al. A review of phytochemical composition and bio-active of *Lycium barbarum* Fruit

(Goji)[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology, 2013, 13(8): 161-172(in Chinese).

- [3] 杨柳,王建立,王淑英,等. 糖类物质测定方法评价[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(4): 68-71.
YANG Liu, WANG Jianli, WANG Shuying, et al. A review on determination methods of sugar content[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2009, 24(4): 68-71(in Chinese).
- [4] 谭芳,刘甜. 烟草中糖类物质测定方法评价[J]. 延边大学学报:自然科学版, 2013, 39(1): 37-40.
TAN Fang, LIU Tian. Appraisal on determination of sugars in tobacco[J]. Journal of Yanbian University: Natural Science, 2013, 39(1): 37-40 (in Chinese).
- [5] KATONA Z F, SASS P, MOLNÁR-PERL I. Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 847(1/2): 91-102.
- [6] FAN H, FAN W, XU Y. Characterization of key odorants in Chinese chixiang aroma-type liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural &

- Food Chemistry, 2015, 63(14): 3 660.
- [7] ZHONG W J, WANG D H, XU X W, et al. A gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 50 phenols in wastewater using deconvolution technology[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(3): 275-284.
- [8] 郁有健,沈秀萍,曹家树. 植物细胞壁同聚半乳糖醛酸的代谢与功能[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(1):93-98.
YU Youjian, SHEN Xiuping, CAO Jiashu. The metabolism and function of homogalacturonan in plant cell wall[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2014, 36(1): 93-98(in Chinese).
- [9] 张梦,谢益民,杨海涛,等. 肌醇在植物体内的代谢概述——肌醇作为细胞壁木聚糖和果胶前驱物的代谢途径[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(5):106-114.
ZHANG Meng, XIE Yimin, YANG Haitao, et al. Myo-inositol metamolism as the precursor of xylan and pectin in plants[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2013, 33(5): 106-114(in Chinese).
- [10] 孟艳玲,刘林,白涛,等. 干旱胁迫下外源山梨醇对平邑甜茶耐旱性影响[J]. 北方园艺, 2009, (5):69-70.
MENG Yanling, LIU Lin, BAI Tao, et al. The effect of exogenous sorbitol on drought tolerance of malus hupehensis under drought stress[J]. Northern Horticulture, 2009, (5): 69-70 (in Chinese).
- [11] TARI I, KISS G, DEÉR A K, et al. Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(4): 677-683.