

doi: 10.11838/sfsc.1673-6257.18156

离子色谱法测定土壤中单糖含量

李国强^{1*}, 谭卓杰¹, 李韵仪¹, 罗 钉², 王 林³, 李焕勇³

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东 佛山 528000; 2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 3. 暨南大学分析测试中心, 广东 广州 510632)

摘要: 采用糖分离柱 (CarboPAC^R TM PA10, 2 × 250 mm), 以 12.5 mmol · L⁻¹ NaOH 溶液作为流动相, Au 为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极的脉冲积分安培离子色谱法, 分离检测了土壤中单糖成分含量。实验结果表明, 土壤中含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖、果糖, 检出限为 0.4 ~ 4.3 μg · L⁻¹, 加标回收率在 97.8% ~ 115.1% 之间。方法适用于土壤样品中多种单糖成分的测定。

关键词: 离子色谱法; 脉冲安培检测; 土壤; 单糖

糖作为土壤中碳水化合物的组成之一, 是土壤有机质的重要组分, 能够在促进土壤形成良好团聚结构的同时为微生物的活动提供有效的碳源, 对土壤的质量有重要的影响^[1]。目前, 糖的测定主要是通过气相色谱-质谱^[2-3]、气相色谱^[4-6]、液相色谱^[7-8]、液相色谱-质谱^[9-10]以及毛细管电泳^[11-12]等方法来进行, 均需要衍生处理。采用离子色谱法测定具有快速方便、灵敏度高、选择性好等优点, 本研究通过优化检测条件可方便、快速地对土壤中的单糖进行分析。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

ICS-2500 型色谱仪 (美国), 主要配置: 含在线脱气装置的四元梯度泵 GP50、柱温箱 LC30、淋洗液自动发生器 EG50、电化学检测器 ED50 (Au 为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极)、糖分离柱 (CarboPAC^R TM PA10, 2 × 250 mm)、糖保护柱 (CarboPAC^R TM PA10, 2 × 50 mm)、氨基酸捕集柱 (AminoPAC^R Trap, 2 × 50 mm)、色谱工作站 Chromeleon

6.0、一次性滤头 (0.2 μm)、移液枪 (Eppendorf, 10、100、1 000 μL 各一支)。

250 mmol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 (美国)、超纯水 (Millipore 超纯水系统制备)、单糖标准物质 (鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、果糖, 德国)。

1.2 标准溶液及工作曲线溶液的配制

分别称取 5.0 mg 的鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖, 用 15 mL 超纯水溶解后定容至 50 mL 容量瓶中, 制得浓度为 100.0 mg · L⁻¹ 的各对照品储备液。再用超纯水配制质量浓度分别为 0.0、50.0、100.0、250.0、500.0 μg · L⁻¹ 的各工作曲线溶液。

1.3 检测电位

在脉冲安培检测器上电极间使用的脉冲电位波形见表 1, 其中在 200 ~ 400 ms 之间是积分检测时间, 410 ~ 420 ms 之间是电极表面的清洗时间。

1.4 样品处理^[3, 13]

土壤样品先冷冻干燥, 然后用玛瑙研钵研磨, 研磨后的样品过筛 (孔径 0.180 mm), 称取样品 4.0 mg, 加入 4 mol · L⁻¹ 的三氟乙酸 1.0 mL, 封口, 在 90 °C 条件下水解反应 60 min, 离心后将上清液移至试管中, 沉淀洗涤 3 次后合并上清液, 然后通氮气吹干, 加 1.0 mL 水溶解并用 0.4 mol · L⁻¹ KOH 调 pH 值至 6, 离心后将上清液及沉淀洗涤液合并后通氮气吹干, 用水溶解后定容至 50 mL, 上机测定。

收稿日期: 2018-04-24; 录用日期: 2018-08-11

基金项目: 广东省自然科学基金 (2016A030310079); 暨南大学科研培育与创新基金 (21615305); 佛山科学技术学院高层次人才科研启动项目 (gg040971); 广东省研究生示范课程建设项目 (2016SFKC_43)。

作者简介: 李国强 (1981-), 男, 山东昌乐人, 副教授, 博士, 主要从事仪器分析研究。E-mail: 5777979@qq.com。同时为通讯作者。

表 1 Au 电极和 Ag/AgCl 电极之间的电位随时间的变化

时间 (ms)	0	200	400	410	420	430	440	450
电位 (V)	0.10	0.10	0.10	-2.00	-2.00	0.60	-0.10	-0.10
积分		开始	结束					

2 结果与分析

2.1 流动相对单糖分离的影响

在流速和温度保持不变的条件下, 调节淋洗液 NaOH 溶液的浓度分别为 2.5、7.5、12.5、17.5、25.0 mmol · L⁻¹, 在糖分离柱 (CarboPAC[®] TM PA10, 2 × 250 mm) 上分析含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖和果糖等 7 种单糖的标准溶液。

随着淋洗液 NaOH 浓度的增大, 各种糖的保留时间都有所减小, 峰形变窄, 半乳糖和葡萄糖的分离效果变差, 甘露糖与木糖无法分离而合并成一个峰。综合考虑各种糖的分离情况, 选用 12.5 mmol · L⁻¹ NaOH 溶液作为分离的流动相。淋洗液 NaOH 对糖保留时间的影响结果见图 1。

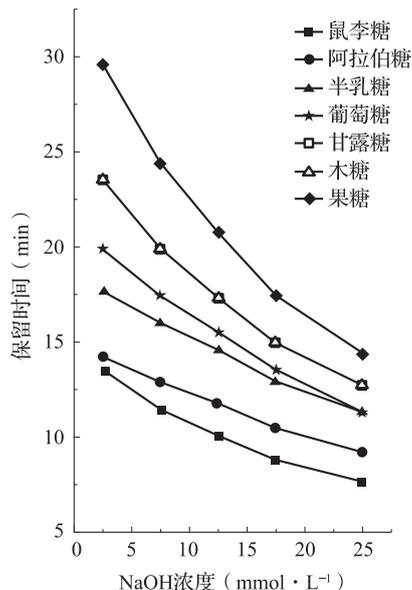


图 1 NaOH 对糖保留时间的影响

2.2 流速对单糖分离的影响

在流动相组成和温度保持不变的条件下, 调节流动相流速分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mL · min⁻¹, 在糖分离柱上考察上述 7 种单糖的混合标准溶液的分离情况。

随流动相流速增大, 保留时间减小, 峰形变

窄, 甘露糖与木糖无法分离而合并成一个峰; 流速减小时有利于甘露糖与木糖的分离但作用较弱, 而流速减小时分析时间明显延长。综合考虑各种糖的分离情况, 选取 0.20 mL · min⁻¹ 作为分析流速。流速对糖保留时间的影响结果见图 2。

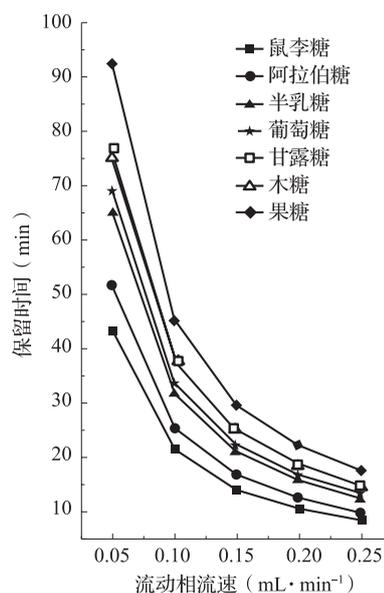


图 2 流速对糖保留时间的影响

2.3 温度对单糖分离的影响

在流速和流动相组成保持不变的条件下, 分别在 23、27、30、35、40、45℃ 的柱温条件下, 考察各单糖混合标准溶液的分离情况。

温度增加时, 保留时间减小, 半乳糖和葡萄糖的分离效果变差, 甘露糖与木糖无法分离而合并成一个峰, 40℃ 以上时半乳糖和葡萄糖重叠成一个峰。因此, 选择 30℃ 作为分离时的最佳柱温。温度对糖保留时间的影响结果见图 3。

综上所述, 综合考虑流速、柱温、流动相组成等以上各种因素对分析效果与分析时间等的影响, 确定分析单糖的最佳条件为: 淋洗液 NaOH 的浓度 12.5 mmol · L⁻¹、柱温为 30℃、流速为 0.20 mL · min⁻¹。

2.4 工作曲线绘制及检出限

按照优化的离子色谱条件, 将工作曲线溶液依次进样测定, 以各单糖标准的浓度单位为横坐标

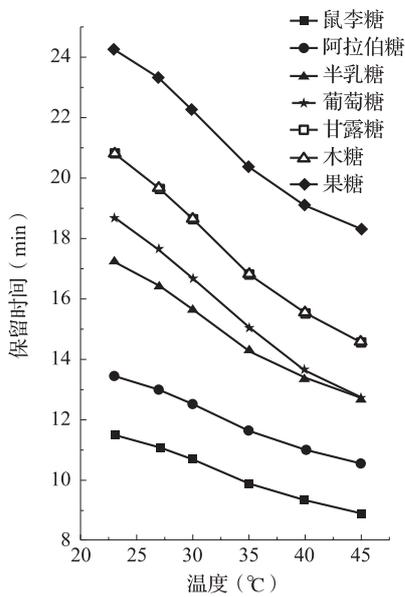


图3 温度对糖保留时间的影响

($x, \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 采用色谱峰的峰高作为纵坐标 (y, nC), 绘制单糖的标准工作曲线, 在优化的分离条件下, 甘露糖和木糖无法分离, 因相同浓度的甘露糖和木糖其色谱峰高比约为 1 : 1^[14], 故将二者作为一个单峰, 将两种单糖等比例配制混合标准溶液 (每种糖浓度为 0.0、50.0、100.0、250.0、500.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 以单糖的浓度对应甘露糖和木糖合并色谱峰峰高绘制工作曲线。

在优化的分离条件下测定各单糖的工作曲线溶液, 绘制其工作曲线回归方程, 见表 2。采用对标准样品连续 5 次进样分析考察精密度, 单糖各峰保留时间差别在 0.20 min 以内, 峰高相对标准偏差在 0.46% ~ 1.63% 之间, 方法重复性较好。

表 2 标准样品的离子色谱工作曲线、相关系数

单糖	线性回归方程	相关系数 r	检测限 ($S/N=3$) $\rho (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
鼠李糖	$y=0.0309\rho+0.1035$	0.9999	0.5
阿拉伯糖	$y=0.0253\rho+0.0822$	0.9999	1.5
半乳糖	$y=0.0076\rho+0.1104$	0.9998	1.2
葡萄糖	$y=0.0025\rho+0.1190$	0.9992	0.4
甘露糖和木糖	$y=0.0278\rho+0.0721$	0.9999	1.7
果糖	$y=0.0067\rho+0.0161$	0.9998	4.3

2.5 土壤样品分析

在优化后的分离条件下, 即流动相浓度为 12.5

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、流速为 0.20 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下进样分析, 检测得到的土壤样品水解液的离子色谱图见图 4, 单糖标准色谱图见图 5。结果表明, 土壤样品中含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖、果糖, 图中各峰分离情况较好, 满足定量要求。土壤样品水解液中单糖的相对含量参见表 3。

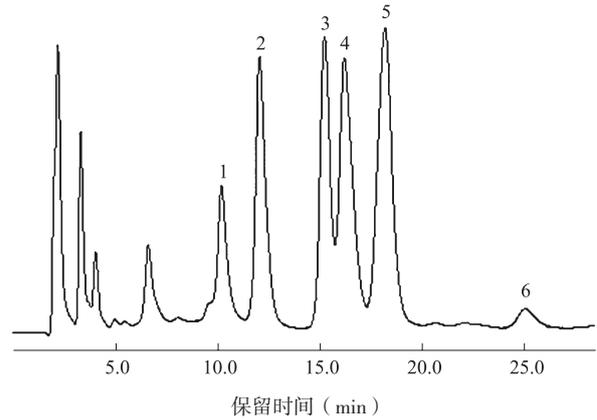


图4 土壤样品的离子色谱图

注: 1: 鼠李糖, 2: 阿拉伯糖, 3: 半乳糖, 4: 葡萄糖, 5: 甘露糖和木糖, 6: 果糖。

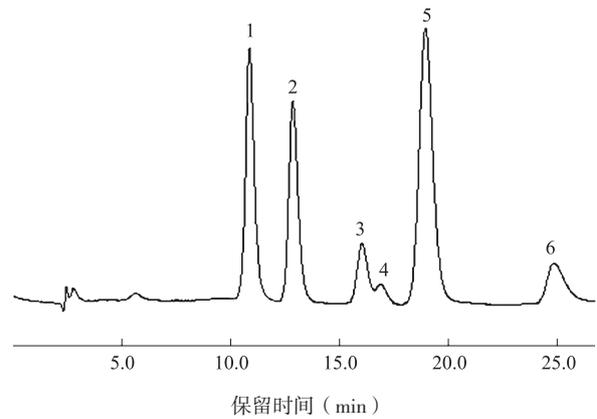


图5 7种单糖混合标准溶液的离子色谱图

注: 1: 鼠李糖, 2: 阿拉伯糖, 3: 半乳糖, 4: 葡萄糖, 5: 甘露糖和木糖, 6: 果糖。

由表 3 可知, 土壤样品中含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和木糖、果糖, 其中半乳糖和葡萄糖含量较高, 其次是阿拉伯糖、甘露糖和木糖, 鼠李糖和果糖含量相对较低。

2.6 回收试验

选择 3 个土壤样品对其进行单糖的回收试验, 因甘露糖和木糖无法分开, 故该两种单糖采用合并的方法计算。从表 4 可知, 土壤样品中各单糖的加标回收率在 97.8% ~ 115.1% 之间。

表 3 土壤样品中单糖的相对含量

单糖	峰高 (nC)			检测值 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)			含量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 1	样品 2	样品 3	样品 1	样品 2	样品 3
鼠李糖	0.467	0.525	0.498	11.76	13.64	12.77	147.00	170.50	159.63
阿拉伯糖	0.922	1.043	1.116	33.19	37.98	40.86	414.88	474.75	510.75
半乳糖	1.014	1.187	1.245	118.89	141.66	149.29	1 486.13	1 770.75	1 866.13
葡萄糖	0.936	1.024	0.994	326.80	362.00	350.00	4 085.00	4 525.00	4 375.00
甘露糖和木糖	1.039	1.320	1.299	34.78	44.89	44.13	434.75	561.13	551.63
果糖	0.066	0.079	0.053	7.45	9.39	5.51	93.13	117.38	68.88

表 4 土壤样品中单糖的回收率

单糖	土壤中原有量 ρ_0 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)			加入量 ρ_A ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	检测量 ρ_F ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)			回收率 R (%)		
	样品 1	样品 2	样品 3		样品 1	样品 2	样品 3	样品 1	样品 2	样品 3
鼠李糖	11.76	13.64	12.77	100	109.68	116.33	113.82	97.9	102.7	101.0
阿拉伯糖	33.19	37.98	40.86	100	138.61	140.01	139.77	105.4	102.0	98.9
半乳糖	118.89	141.66	149.29	100	223.13	243.47	248.92	104.2	101.8	99.6
葡萄糖	326.80	362.00	350.00	100	441.92	466.33	459.72	115.1	104.3	109.7
甘露糖和木糖	34.78	44.89	44.13	200	236.01	242.57	243.66	100.6	98.8	99.8
果糖	7.45	9.39	5.51	100	105.48	117.26	103.27	98.0	107.9	97.8

3 结论

本研究建立了基于积分安培离子色谱法同时测定土壤中单糖含量的分析方法,分别考察了不同流动相、柱温、流速因素对单糖的分离效果。利用优化后的色谱条件检测土壤样品水解液中的单糖,因甘露糖和木糖色谱峰保留时间一致,故采用合并计算,其余5种单糖均能很好分离,方法耗时较短,30 min内即实现多种单糖的分离。该方法简单快捷,可广泛应用于土壤样品中单糖组成分析。

参考文献:

[1] Ball B C, Cheshire M V, Robertson E A G, et al. Carbohydrate composition in relation to structural stability, compactibility and plasticity of two soils in a long-term experiment [J]. Soil & Tillage Research, 1996, 39 (3-4): 143-160.

[2] Soria A C, Sanz M L, Villamiel M. Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC-MS [J]. Food Chemistry, 2009, 114 (2): 758-762.

[3] Zweckmair T, Schiehsler S, Rosenau T, et al. Improved

quantification of monosaccharides in complex lignocellulosic biomass matrices: A gas chromatography-mass spectrometry based approach [J]. Carbohydrate Research, 2017, 446-447: 7-12.

[4] 王彦中, 穆惠玲, 仇津苹. 气相色谱测定土壤中的糖 [J]. 色谱, 1994, 12 (6): 438-439.

[5] Rumpel C, Dignac M F. Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction-acetylation [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38 (6): 1478-1481.

[6] Wang X, Zhang L, Wu J, et al. Improvement of simultaneous determination of neutral monosaccharides and uronic acids by gas chromatography [J]. Food Chemistry, 2017, 220: 198-207.

[7] 袁梦, 马玉晨. 高效液相色谱-示差折光法测定蜂蜜中三种还原糖含量 [J]. 食品与发酵科技, 2015, 51 (1): 87-90.

[8] Yan J, Shi S, Wang H, et al. Neutral monosaccharide composition analysis of plant-derived oligo- and polysaccharides by high performance liquid chromatography [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 1273-1280.

[9] Ghfar A A, Wabaidur S M, Ahmed A Y, et al. Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in

- dates using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2015, 176: 487–492.
- [10] Pauk V, Pluháček T, Havlíček V, et al. Ultra-high performance supercritical fluid chromatography–mass spectrometry procedure for analysis of monosaccharides from plant gum binders [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 989: 112–120.
- [11] Sérgio M S, Armando C D, Valdemar I E. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the assessment of monosaccharide in soil using acid hydrolysis [J]. *Talanta*, 2007, 72 (1): 165–171.
- [12] Hu Y Y, Wang T, Yang X B, et al. Analysis of compositional monosaccharides in fungus polysaccharides by capillary zone electrophoresis [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 102: 481–488.
- [13] 张威, 何红波, 张明, 等. 糖腈乙酰酯衍生气相色谱法测定土壤水解性单糖 [J]. *土壤通报*, 2008, 39 (4): 913–916.
- [14] 欧云付, 尹平河, 赵玲. 半叶马尾藻粗糖中单糖的离子色谱法分析 [J]. *色谱*, 2006, 24 (4): 411–413.

Study of monosaccharides in soil by Ion Chromatography

LI Guo-qiang^{1*}, TAN Zhuo-jie¹, LI Yun-yi¹, LUO Ding², WANG Lin³, LI Huan-yong³ (1. College of Food Science and Engineering, Foshan university, Foshan Guangdong 528000; 2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou Guangdong 510632; 3. Analytical and Testing Center, Jinan University, Guangzhou Guangdong 510632)

Abstract: Pulsed integrated amperometric ion chromatography was applied to determine monosaccharides in soil samples. CarboPAC^R TM PA10 column was used as the separation column, NaOH solution (12.5 mmol · L⁻¹) was used as mobile phase, the Au and Ag/AgCl were used as working electrode and reference electrode respectively. Soil samples contained rhamnose, arabia sugar, galactose, glucose, mannose and xylose, fructose. The limit of quantification was between 0.4 ~ 4.3 μg · L⁻¹. Values of recovery found by standard addition method were in the range of 97.8% ~ 115.1%. The method is suitable for the determination of monosaccharides in soil samples.

Key words: Ion Chromatography; pulsed amperometric detector; soil; monosaccharides