

УДК 581.192:543.544

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА САХАРОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В. Г. НЕБЫТОВ, В. А. КАЛИНИН, В. А. ЗИНЧЕНКО, В. Я. ДАВИДОВ

(Кафедра химических средств защиты растений)

В настоящее время для определения сахаров в растительных образцах применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющий установить количественный состав этих сахаров, проводить их идентификацию [4, 6, 7]. В качестве адсорбента используются силикагель с привитыми путем химического модифицирования аминогруппами [5] и гидроксильированный силикагель с адсорбированными из элюента полиаминами [3, 8].

Цель настоящих исследований — модифицировать существующий метод анализа сахаров путем подбора более эффективных экстрагентов, способов очистки экстрактов и использования в качестве адсорбентов для ВЭЖХ гидроксильированных силикагелей, адсорбционно модифицированных пиперазином.

Предлагаемый метод основан на экстракции сахаров из растительных образцов смесью этанол — вода, ацетонитрил — вода, очистке экстракта на прелколонке и последующем определении состава и содержания сахаров методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Optilab-931 и детектора Optilab-902, чувст-

вительность $5 \times 10^{-6} \Delta Ri$. Применялись суспензионно заполненные с помощью оборудования SLP-100 колонки: Lichrosorb-NH₂, Lichrosorb Si-60, Silasorb-600; 4,6 мм × 250 мм; размер частиц 10 мкм; элюент — ацетонитрил чистый ТУ-09-5534-74, перегнанный над пятиокисью фосфора и очищенный на окиси алюминия, с заданным соотношением воды. Очистку экстракта осуществляли с помощью фильтров FH (Millipore corporation), диаметр пор 0,45 мкм и на хроматографической предколонке, представляющей собой стеклянную трубку, в основании которой находится фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, заполненной слоями адсорбентов R sil-C₁₈ и нейтральной окисью алюминия.

Набор сахаров: D-рибоза, D-ксилоза, L-арабиноза, D-фруктоза, D-манноза, D-галактоза, α-D-глюкогептоза, D-сахароза, D-мальтоза, лактоза, β-гентиобноза, α-D-мелибиноза, D-мелицитоза, рафиноза, стахиоза, D-глюкоза.

Стандартный раствор сахаров готовили при заданном соотношении раствора ацетонитрил — вода. Сахара были просушены в токе горячего воздуха, их навески бра-

ли с учетом количества воды, находящейся в гидратной форме.

Адсорбционное модифицирование силикагелей Lichrosorb Si-60 и Silasorb-600 осуществляли путем пропускания элюента с заданной концентрацией гексагидрата пиперазина (СТП 03-27-76). Момент установления адсорбционного равновесия в колонке фиксировали по стабильности базовой линии.

Для анализа брали образцы зерна и свежего растительного материала.

Навеску тонкоразмолотого зерна массой 5 г взвешивали на аналитических весах с погрешностью 0,0002 г (для определения сахаров брали две параллельные навески) и помещали в коническую 300 мл колбу. В нее добавляли 25 мл экстрагирующего раствора (этанол — 60 %, вода — 40 %) и ставили в ультразвуковую ванну на 10 мин, через каждые 2 мин ее вынимали и осторожно встряхивали. Затем колбу с экстрактом выдерживали в течение 30 мин при температуре 40° на водяной бане, периодически взбалтывая. Содержимое колбы переносили в центрифужные пробирки, промывая ее несколькими порциями указанного раствора. Экстракт центрифугировали на протяжении 15 мин при 3000 об/мин. Отцентрифугированный экстракт фильтровали через бумажный складчатый фильтр в фарфоровую чашку, осадок на фильтре и центрифужные пробирки промывали несколькими порциями смеси этанол — вода. Воду и спирт из фарфоровых чашек полностью удаляли, используя электросушитель.

Высушенный остаток в фарфоровой чашке растворяли в 10—50 мл смеси ацетонитрил — вода, соотношение смеси должно соответствовать составу элюента, количество ее зависит от содержания сахаров в навеске зерна. Затем тщательно обмывали стенки фарфоровой чашки, используя стеклянную палочку. Полученный раствор сахаров очищали от механических примесей, пропуская его через фильтры для агрессивных сред, диаметр пор 0,45 мкм. Для этой цели можно применять предколону с фильтром без адсорбентов.

Очищенный от механических примесей раствор сахаров вносили в хроматографическую предколону, заполненную адсорбентом R sil-C₁₈, и после пропускания экстракта с использованием вакуума вводили раствор сахаров для анализа в хроматограф.

Навеску свежего растительного образца массой от 1 до 15 г взвешивали на аналитических весах, погрешность не более 0,0002 г, помещали в центрифужную пробирку, в которую добавляли 10—30 мл экстрагирующего раствора (заданное соотношение ацетонитрил — вода должно соответствовать составу элюента). Количество навески и объем экстрагирующего раствора зависят от содержания сахаров в исследуемых образцах. Центрифужную пробирку ставили в стакан измельчителя тканей и гомогенизировали навеску в течение 15 мин при 10000 об. в 1 мин. Отцентрифугированный экстракт очищали от механических примесей на хроматографической предколоне (без адсорбентов) и вносили в заполненную адсорбентами R sil-C₁₈ и нейтральной окисью алюминия предко-

лонку. После пропускания через нее очищенный раствор сахаров вводили в хроматограф для анализа.

Количество сахаров определяли путем сравнения хроматограмм исследуемого образца и стандартного раствора сахаров. Опытный образец хроматографировали в тех же условиях, что и стандартный раствор сахаров; время удерживания того или иного сахара на хроматограмме стандартного раствора соответствовало времени удерживания сахара на хроматограмме опытного образца.

Вычисление проводили по формуле

$$x = \frac{H_1 \times M \times B_2 \times 100}{H_2 \times B_1 \times n},$$

где x — содержание сахара, % на массу навески; H_1 и H_2 — высота (площадь) пика соответственно на хроматограмме опытного образца и стандартного раствора сахаров; B_1 — количество заданного соотношения смеси ацетонитрил — вода, добавленной для разведения стандартного раствора сахаров, мл; B_2 — количество смеси ацетонитрил — вода, добавленной для разведения сахаров опытного образца, мл; M — навеска сахара в стандартном растворе сахаров, г; n — навеска опытного образца, г; 100 — коэффициент для пересчета, %.

Для пересчета на абсолютно сухое вещество полученный результат необходимо умножить на соответствующий коэффициент.

Данная формула верна при условии равенства объемов вводимых проб стандартного и опытного растворов сахаров (в наших исследованиях 20 мкл) и пропорциональности между площадью (высотой) пика и концентрацией сахаров (в заданном интервале концентраций от 0,1 до 2 мг·мл).

Обсуждение результатов

Для определения содержания сахаров лучше использовать свежий растительный материал, сразу же зафиксированный жидким азотом. Анализ образцов необходимо проводить в день отбора проб или очень строго соблюдать условия при их высушивании лиофилизацией.

Важное значение при определении количества сахаров имеет подбор смесей растворителей. Оценка последних на полноту экстракции сахаров из опытных образцов показала, что сахара лучше экстрагируются из зерна смесью 60 % этанол — 40 % вода. При экстракции сахаров из свежих растительных образцов состав растворителя ацетонитрил — вода определялся составом элюента.

Наличие высокочувствительного интерференционного рефрактометра Optilab-902 позволяет установить содержание сахаров в исследуемом образце в нанограммах (нижний предел детектирования сахаров — 10 нг), однако необходима большая масса навески, которая более достоверно соответствует выделенному среднему образцу и дает возможность определять содержание сахаров при более низкой чувствительности детектора, благодаря чему снижается дрейф базовой линии самописца (особенно при использовании недостаточно чистого

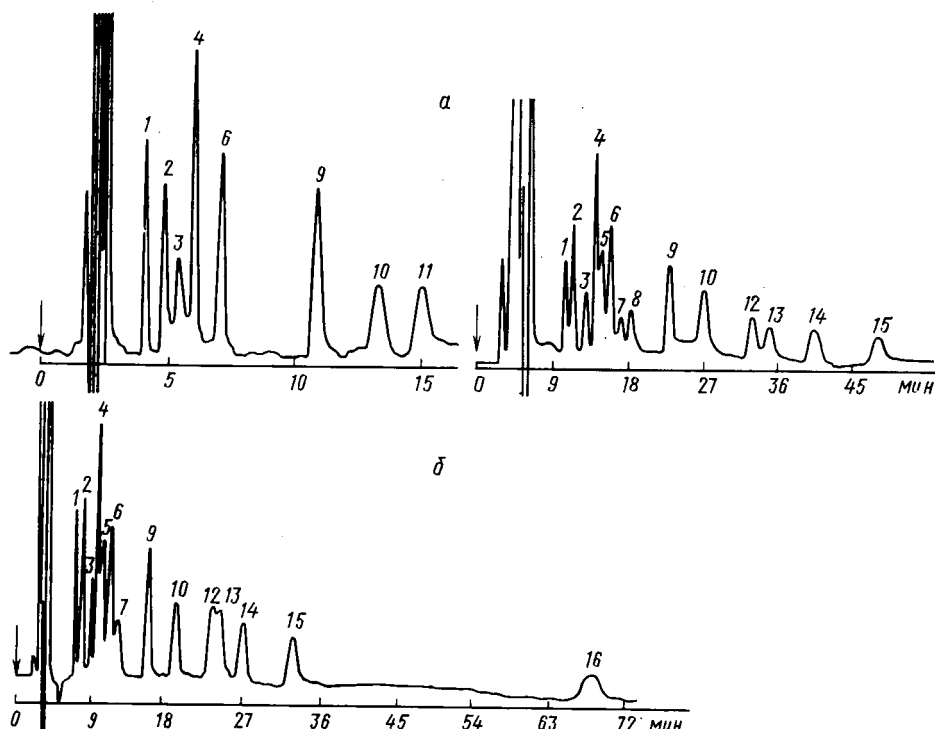


Рис. 1. Разделение модельных стандартных смесей сахаров.

а — колонка Lichrosorb NH₂; элюент — ацетонитрил 20%; температура 30°; скорость потока 1,0 мл/мин; концентрация сахара 0,2 мг/мл; *б* — колонка Lichrosorb Si-60; элюент тот же; модификатор гексагидрат пиперазина, 0,1 г на 100 мл элюента; температура 25°; скорость потока 1,1 мл/мин; концентрация сахара 0,38 мг/мл; *в* — колонка Silasorb-600; элюент — ацетонитрил 18%; модификатор — гексагидрат пиперазина, 0,14 г на 100 мл элюента; температура 25°; скорость потока 0,5 мл/мин; концентрация сахара 0,38 мг/мл (ацетонитрил в смеси с водой). 1 — рибоза; 2 — ксилроза; 3 — арабиноза; 4 — фруктоза; 5 — манноза; 6 — глюкоза; 7 — галактоза; 8 — глюкогептоза; 9 — сахароза; 10 — мальтоза; 11 — лактоза; 12 — гентриобиоза; 13 — мелибиоза; 14 — мелицитоза; 15 — рафиноза; 16 — стахиоза.

ацетонитрила) и увеличивается точность определения.

Кроме сахаров, в экстракте содержатся различные примеси, препятствующие дальнейшему определению сахаров и вызывающие перегрузку колонки, поэтому нами сравнивалась эффективность различных способов очистки экстракта сахаров: с помощью тех или иных химических соединений, с применением ионообменных смол и хроматографической предколонки, заполненной адсорбентами.

При использовании в качестве осадителей белков и аминокислот 4% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, 10% раствора молибденово-кислого аммония, 50% ТХУК, уксусной кислоты при pH 4,5, петролейного эфира от пигментов получены в целом удовлетворительные результаты очистки экстракта. Наиболее эффективным оказалось применение 50% ТХУК и 4% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, эти соединения давали слабый гидролиз сахаров. Менее эффективно применение ионообменных смол КУ-1, ЭДЭ-10П. Кроме того, в этом случае при наличии большого числа образцов, в которых необходимо быстро определить содержание сахаров, требуется много времени для приготовления колонок, перевода их в соответствующую форму, последующее их элюирование.

Из указанных выше способов очистки экстракта лучшие результаты дает исполь-

зование хроматографической предколонки, с помощью которой возможно с достаточной точностью отделить в экстракте различные примеси, препятствующие эффективному разделению сахаров. Наши исследования показали возможность прямого определения сахаров с предварительной очисткой экстракта от механических примесей на предколонке с фильтром (диаметр пор 0,45 мкм).

Выбор адсорбентов для хроматографической предколонки основывался на их способности избирательно удерживать соединения, которые отрицательно влияли на результаты разделения сахаров. В этой связи экспериментально подбирали модельный экстракт, содержащий стандартный раствор сахаров и вещества (белки, пигменты, аминокислоты), которые переходят в экстракт при экстрагировании навесок водно-этанольной смесью и смесью ацетонитрил — вода.

Толщина слоев адсорбентов подбиралась с учетом результатов очистки модельного экстракта и соответствия соотношений стандартных растворов сахаров до элюирования их через предколонку и после их элюирования (высота пиков модельного стандартного раствора сахаров должна соответствовать высотам пиков стандартного раствора сахаров после их элюирования через хроматографическую предколонку).

На рис. 1, где приведены хроматограммы разделения стандартных модельных

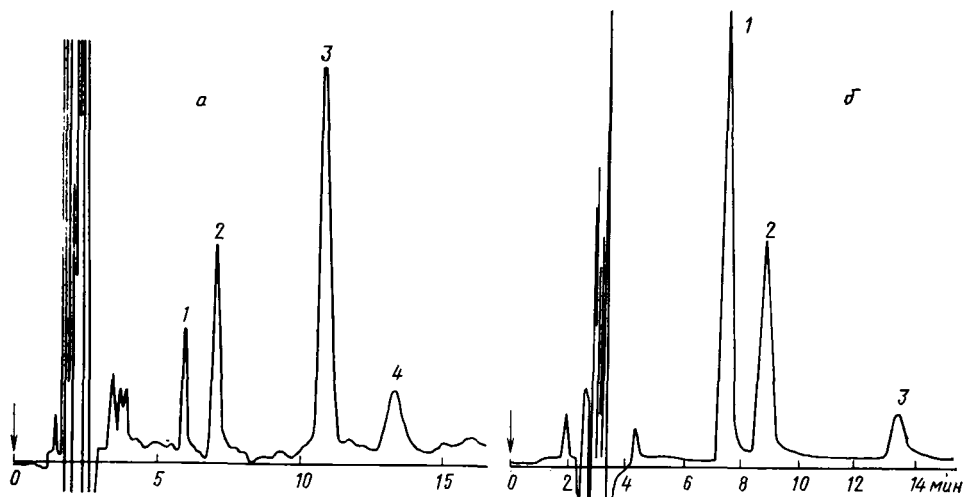


Рис. 2. Разделение сахаров, экстрагируемых из зерна (а) и стеблей (б) ячменя Московского 121.

Условия хроматографирования те же, что и на рис. 1, а.

Для а: 1 — фруктоза, 0,13%; 2 — глюкоза, 0,36%; 3 — сахароза, 0,87%; 4 — мальтоза, 0,36% на абсолютно сухую массу навески.
 Для б: 1 — фруктоза, 1,04%; 2 — глюкоза, 0,92%; 3 — сахароза, 0,32%; скорость потока — 0,9 мл/мин на абсолютно сухую массу навески.

смесей сахаров методом ВЭЖХ при использовании силикагеля с привитыми химическим модифицированием аминогруппами Lichrosorb-NH₂ и силикагелей Lichrosorb Si-60, Silasorb-600 с адсорбированными молекулами пиперазина из элюента, видно, что как химическое, так и адсорбционное модифицирование силикагелей позволяет с достаточной точностью разделить смеси сахаров из элюента, содержащего ацетонитрил и воду.

На рис. 2 даны результаты разделения

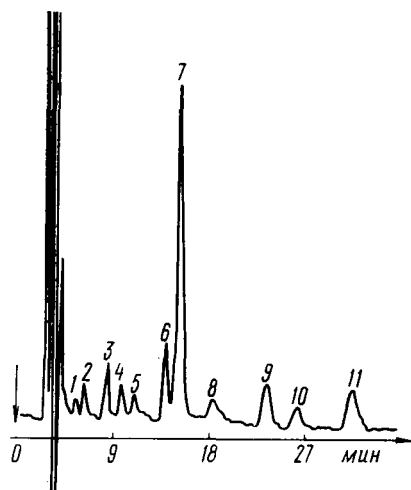


Рис. 3. Разделение сахаров зерна яровой пшеницы Московской 21.

Условия хроматографирования те же, что и на рис. 1, б.

1, 2, 6, 9 — неидентифицированные соединения; 3 — ксилитоза, 0,07%; 4 — фруктоза, 0,09%; 5 — глюкоза, 0,08%; 7 — сахароза, 0,69%; 8 — мальтоза, 0,10%; 11 — рафиноза, 0,34% на абсолютно сухую массу навески.

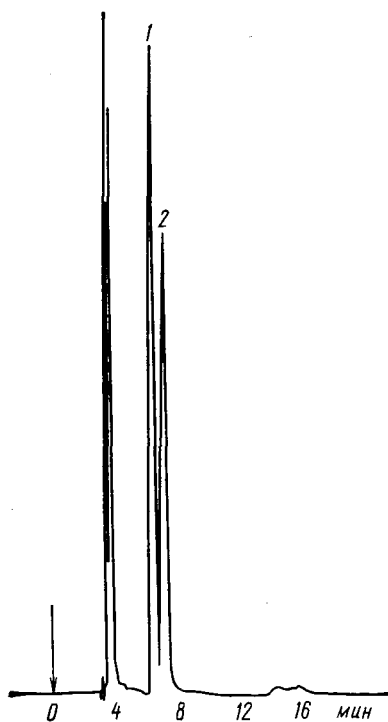


Рис. 4. Разделение сахаров томатов сорта Сонат.

Колонка Silasorb-600; элюент — ацетонитрил 20%; модификатор — гексагидрат пиперазина, 0,1 г на 100 мл элюента; температура 25°; скорость потока 0,8 мл/мин.

1 — фруктоза, 0,48%; 2 — глюкоза, 0,59% на сырую навеску.

и количественного определения сахаров, экстрагируемых из зерна и стеблей ячменя Московский 121.

Сравнение хроматограмм показывает, что разделение сахаров по предложенной методике на силикагеле с привитыми химическим модифицированием аминогруппами Lichrosorb-NH₂ достаточно эффективно для определения качественного и количественного состава сахаров.

На рис. 3 и 4 представлены хроматограммы разделения сахаров зерна пшеницы и томатов. Из них видно, что адсорбционное модифицирование силикагелей Lichrosorb Si-60, Silasorb-600 пиперазином позволяет разделять и количественно определять сахара в исследуемых образцах.

Поскольку не всегда удается подобрать хроматографические условия для одновременного разделения всех сахаров исследуемого образца, не исключено, что у сахаров близкого строения время удерживания совпадает, и на хроматограмме они представлены в виде неразделенного пика. Поэтому необходимо изменить параметры, оказывающие влияние на результаты разделения сахаров, — длину колонки, скорость потока, температуру, соотношение в элюенте ацетонитрила и воды, концентрацию модификатора — и неоднократно разделить исследуемый образец при измененных хроматографических условиях. Следует проводить идентификацию, добавляя в обра-

зец определенное количество сахаров, аналогичных предполагаемым, и по соответствующему увеличению пиков исследуемого образца судить о наличии тех или иных сахаров. Для того чтобы окончательно установить строение, интересующие нас сахара были препаративно выделены. Олигосахара идентифицировали, гидролизуя стандарт и исследуемый препаративно выделенный олигосахарид разбавленными кислотами или используя специфическую ферментную реакцию, и по продуктам гидролиза окончательно устанавливали его состав. Идентификацию моносахаров проводили общепринятыми методами [1, 2].

Таким образом, предложенный метод экстракции сахаров — очистки экстракта на хроматографической предколонке — позволяет определить качественный и количественный состав сахаров зерна ячменя и пшеницы, а также сахаров, экстрагируемых из стеблей ячменя и томатов.

Установлена возможность разделения сахаров, экстрагируемых из растительных образцов водно-этанольной смесью и смесью ацетонитрил — вода, как на химически модифицированном силикагеле Lichrosorb NH₂, так и на адсорбционно-модифицированных силикагелях Lichrosorb Si-60 и Silasorb-600 пиперазином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Кудряшов Л. И., Членов М. А. Радиационная химия углеводов. М.: Наука, 1978, с. 283. — 2. Advances in Carbohydrate Chem. a. Biochem. Vol. 1—36. N. Y., Acad. Press Inc., 1945—1979. — 3. Aitzemuller K. — J. Chromatogr., 1978, vol. 156, N 2, p. 354—358. — 4. Dunmire D. L., Otto S. E. — J. Assoc. Anal. Chem., vol. 62, 1979, p. 176—185. — 5. Ra-

J. Chromatogr., vol. 126, 1976, p. 731—740. — 6. Richmond M. L., Brando S. C. C., Gray J. J. — J. of Agric. a. Food Chem., 1981, vol. 29, N 1, p. 4—7. — 7. Yamanchi R., Kato K., Ueno Y. — J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1982, vol. 56, N 2, p. 123—125. — 8. Whelals B. B., White P. C. — J. Chromatogr., 1979, vol. 176, N 3, p. 421—426.

Статья поступила 19 июля 1983 г.

SUMMARY

The experiment determined sugars content in plant samples by method of high-performance liquid chromatography based on sugar extraction by water-ethanol and water-acetonitril mixtures, clean-up procedure on chromatographic pre-column and subsequent partition of sugars on silicagel with aminogroup Lichrosorb NH₂ combined by chemical modifyng and adsorption-modificaton silicagels Lichrosorb Si-60, Silasorb-600 by piperazine hexahydrate. Possibility is shown to determine sugars qualitatively and quantitatively both on silicagel with chemically combined amino group, and on adsorption-modification silicagels by piperazine hexahydrate.