

戊聚糖含量测定方法的优化

林 琳

(上海市产品质量监督检验所, 上海, 200233)

摘 要 谷物样品不进行预处理而采用 Douglas 法直接测定其中的戊聚糖含量在实际应用中存在很大的误差, 文中比较不同预处理方法对多种原料中戊聚糖含量测定结果的影响, 确定不同原料的最佳预处理方法, 对复杂体系水解后可能产生的单糖对测定结果的影响也进行了初步的研究。结果表明: 在实际情况下, 应用 Douglas 方法前必须对不同原料进行不同的预处理, 复杂体系经水解后可能产生的单糖中六碳糖对木糖的最大吸收峰几乎没有影响, 对谷物样品进行完全降解预处理, 所得检测结果与实际结果相差较小。另外, 研究发现对固体样品采用硫酸法和酶法进行预处理得到的结果准确度相当, 而对于液体样品酶法预处理明显优于其他方法。

关键词 道格拉斯法, 戊聚糖, 预处理

戊聚糖含量测定在戊聚糖性质及应用研究、谷物及谷物产品鉴定、谷物制品品质控制以及谷物深加工等领域中的应用非常广泛。测定方法主要有比色法^[1], 色谱法^[2,3]和(3)Duffau 蒸馏法^[4,5]。其中以 Douglas 法最简单、准确、常用。但是关于 Douglas 法中样品的预处理方法, 以及样品中其他物质对测定结果的影响却少见报道。

针对不同性质的原料样品, 本文就几种常用的预处理方法进行研究比较, 以期得到简单、准确、实用的预处理方法, 并就复杂体系经水解后产生的单糖对测定结果的影响进行初步研究。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

特二粉、工业麸皮, 无锡茂新面粉厂提供; 谷朊粉废水, 河南莲花味精有限公司提供; 桦木木聚糖, Sigma 公司; Laminex 木聚糖酶, 无锡杰能科生物工程有限公司; D-葡萄糖, D-半乳糖, L-阿拉伯糖, D-木糖, 乙酸, 盐酸, 硫酸, 间苯三酚, 乙醇。

1.2 主要设备

722 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂; UV1100 型紫外-可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; LXJ-II 型沉淀离心机, 上海医用分析仪器厂; JB50-D 型增力电动搅拌机, 上海标本模型厂; HHS4S 型电热恒温水浴锅, 上海天平仪器厂; FA1004 型电子天平, 上海天平仪器厂; PHS-4S 精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂。

1.3 实验原理

Douglas 法(又称间苯三酚法), 其原理是利用抽提试剂在高温条件下将待测样品中的戊聚糖(主成分为阿拉伯木聚糖)水解为阿拉伯糖和木糖, 再与间苯三酚显色, 测定试剂在 552 nm 和 510 nm 的吸光度, 根据吸光度计算阿拉伯糖及木糖单糖的含量, 再折算戊聚糖的含量。如果待测样品水解不充分, 则尚未分解的糖链并不与间苯三酚显色, 进而造成折算出的戊聚糖含量比实际含量偏小。

本试验将各种待测样品中的多糖完全水解, 再将水解液用间苯三酚法显色, 并以此法计算出的戊聚糖含量作为待测样品的标准戊聚糖含量。将各已知戊聚糖含量的样品配制成戊聚糖浓度为 5 mg/mL 的溶液, 以该溶液为待测样品, 经不同方法预处理后, 再用间苯三酚法显色。以此方法测定计算出的戊聚糖含量与标准戊聚糖含量作比对, 考察预处理效果。

1.4 实验方法

1.4.1 戊聚糖含量测定

采用 Douglas 法。抽提试剂: 2 g 间苯三酚, 10 mL 无水乙醇, 110 mL 冰醋酸, 2 mL 浓盐酸, 1 mL 葡萄糖(17.5 g/L); 2 mL 提取液于具塞比色管中, 加入 10 mL 抽提试剂, 混匀, 沸水浴中显色 25 min, 中间振荡 2 次, 552 及 510 nm 下测吸光度。

计算公式: $A = C \times \epsilon \times d$, 其中, C 为样品中戊聚糖浓度(mol/L); ϵ 为消光系数; d 为光路距; A 为吸光度。

1.4.2 检测最大吸收波长

分别将 D-葡萄糖, D-半乳糖, L-阿拉伯糖, D-木糖各 2 作为待测样品用上述间苯三酚法进行抽提, 显色, 反应液在 300~600 nm 进行吸收波长扫描。

1.4.3 预处理

第一作者: 硕士, 工程师。

收稿日期: 2004-12-14, 改回日期: 2005-05-10

完全水解方法:取固体样品 100 mg,或液体样品 10 mL 放入水解管中,加入 2 mol/L 的浓硫酸 10 mL 后抽真空封管,于 125℃ 条件下水解 12 h。水解液用碳酸钡中和,滤去沉淀,用去离子水洗涂沉淀 2 次,合并滤液,此样品再经间苯三酚法测定其戊聚糖含量,以此数据作为样品的标准戊聚糖含量。

酶法:取固体样品 100 mg,或液体样品 20 mL,加入 LAMINEX, XL 木聚糖酶,用去离子水将体系的酶活力调至 100GXU, pH 5.0, 55℃ 反应 10 min,以完全水解方法测得样品中戊聚糖含量为基准,计算出将样品中戊聚糖含量稀释至 5 mg/mL 的稀释比,用去离子水将提取液稀释至戊聚糖含量为 5 mg/mL。

硫酸法:取固体样品 100 mg,或液体样品 10mL 放入消化管中,加入 10 mL 的浓硫酸后,于 70℃ 条件下水解 4 h。水解液用质量分数 30% NaOH 溶液将 pH 调至 7.0。以完全水解方法测得样品中戊聚糖含量为基准,计算出将样品中戊聚糖含量稀释至 5 mg/mL 的稀释比,用去离子水将提取液稀释至戊聚糖含量为 5 mg/mL。

盐酸法:取固体样品 100 mg,或液体样品 10 mL 放入消化管中,加入浓盐酸 10 mL 后封管,于 60℃ 条件下水解 4 h。水解液用质量分数 30% NaOH 溶液将 pH 调至 7.0。以完全水解方法测得样品中戊聚糖含量为基准,计算出将样品中戊聚糖含量稀释至 5 mg/mL 的稀释比,用去离子水将提取液稀释至戊聚糖含量为 5 mg/mL。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理对戊聚糖检测结果的影响

表 1、表 2 中的数据是实际戊聚糖含量为 10 mg 的样品经不同方法预处理后,再用间苯三酚方法检测得出的检测值。由未经预处理样品(完全按照 Douglas 在 1981 年的《Food Chemistry》上发表的方法)的检测值与处理后样品的检测值比较可知,戊聚糖含量检测结果误差相当大,以桦树木聚糖,麸皮,面粉为例误差至少在 16.1% 以上,最高能达到 54.8%。这是因为 Douglas 原文中标准曲线的绘制、显色时间的考察等实验,使用的样品都是 D-木糖,并未对实际样品中戊聚糖的提取、降解作全面的分析,因而将未经预处理的实际样品直接用 Douglas 方法检测会造成较大的误差。

Douglas 法中将样品加抽提试剂在沸水浴中反应 25 min,这既是戊聚糖降解的过程,也是其和间苯三

酚显色的过程,如果通过延长沸水浴时间,来充分降解戊聚糖,会造成显色反应超过 25 min,而使显色部分退色,从而也会产生误差。所以在实际情况中,应用 Douglas 方法前必须对样品进行预处理。

2.2 固体样品的最佳预处理方法

如表 1 所示,对每组样品进行 6 次平均测试,结果发现对于固体样品如麸皮,面粉等用硫酸和酶法进行预处理准确度相当,且明显高于用盐酸进行预处理。其中硫酸法较酶法准确度略高,但精确度略差,表现在硫酸法相对标准偏差在 0.32%~0.97%,而酶法的相对标准偏差在 0.11%~0.18%。对于面粉的酶法和硫酸法处理而言,在 95% 的概率水平上, $t = 2.447$ 计算得到临界值 $\mu = 0.030$ 。则 $9.37 - 9.11 > 0.030$,从而说明这 2 种处理方法对面粉样品具有显著的选择性差异。另外硫酸法耗时长,步骤多,而且操作相对烦杂。同时由于硫酸法对实验操作的要求较高,误差主要来源于人为因素,所以误差的可控性以及实验结果的重现性较差。酶法对于固体样品是一种较为简单、快速的预处理方法,研究人员可根据不同的实际情况对预处理方法进行选择。

表 1 不同预处理方法对固体样品检测结果的影响

预处理方法	样品	测试平均值/mg	标准偏差	相对标准偏差/%	标准含量/mg
硫酸法	桦树木聚糖	9.66	0.093	0.97	10
	麸皮	9.49	0.067	0.71	10
	面粉	9.37	0.030	0.32	10
盐酸法	桦树木聚糖	9.61	0.018	0.19	10
	麸皮	8.77	0.049	0.56	10
	面粉	9.01	0.029	0.32	10
酶法	桦树木聚糖	9.67	0.012	0.12	10
	麸皮	9.03	0.016	0.18	10
	面粉	9.11	0.010	0.11	10
空白	桦树木聚糖	8.32	0.119	1.43	10
	麸皮	6.13	0.451	7.36	10
	面粉	7.25	0.128	1.77	10

2.3 液体样品的最佳预处理方法

如表 2 所示,对于液体样品如谷朊粉废水、面粉浆等酶法明显优于其他方法。首先其准确度较其他 2 种方法高,6 次平均测试的标准偏差分别为 0.026、0.049,相对标准偏差分别为 0.28%、0.527%,硫酸法及盐酸法预处理后的相对标准偏差均在 1.0% 以上,试验结果的重现性也较差。其次酶法的准确性也较高,酶法预处理后的测试值较标准值分别低 5.2% 以及 6.4%,其他方法处理后的误差在 15% 以上,另外未经预处理的样品测试值误差高达 22%。对于面

粉浆的酶法和硫酸法处理而言,在 95% 的概率水平上, $t=2.447$ 计算得到临界值 $\mu=0.030$ 。则 $8.18-9.36>0.030$,从而说明这 2 种处理方法对面粉样品具有显著的选择性差异。酶法还具有快速,简洁等特点。对于液体样品用浓酸进行直接降解,体系中酸的浓度会被不同程度的稀释,从而影响实验结果。因而对于液体样品最佳的预处理方法为酶法。

表 2 不同预处理方法对液体样品检测结果的影响

预处理方法	样品	测试平均值/mg	标准偏差	相对标准偏差/%	标准含量/mg
硫酸法	谷朊粉废水	8.32	0.107	1.28	10.00
	面粉浆	8.18	0.119	1.46	10.00
盐酸法	谷朊粉废水	8.47	0.136	1.61	10.00g
	面粉浆	8.52	0.087	1.02	10.00
酶法	谷朊粉废水	9.48	0.026	0.280	10.00
	面粉浆	9.36	0.049	0.527	10.00
空白	谷朊粉废水	7.79	0.220	2.84	10.00
	面粉浆	8.12	0.064	0.793	10.00

2.4 样品完全水解产生的其他单糖对检测结果的影响

谷物及谷物产品在经过预处理后,再与抽提试剂在沸水浴中反应 25 min,其中的淀粉以及其他多糖会不同程度地降解,产生葡萄糖,半乳糖等单糖,为考察这些单糖是否对试验结果产生影响,分别将 D-葡萄糖, D-半乳糖, L-阿拉伯糖, D-木糖各 2 作为待测样品用上述间苯三酚法进行抽提,显色,反应液在 300~600nm 进行吸收波长扫描。

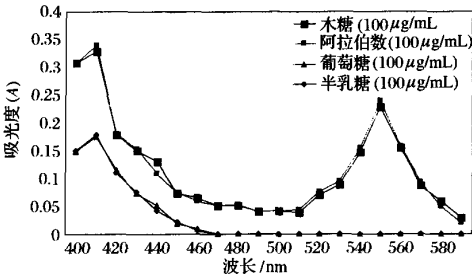


图 1 不同单糖的吸收光谱(400~600 nm)

结果如图 1 所示,所测定的五碳糖和六碳糖在 400~600nm 之间均有吸收峰,五碳糖除在 552nm 有最大吸收峰外,在 410nm 处还有一吸收峰,而六碳糖在 470~600nm 区域内均无吸收峰,在 410nm 处有一吸收峰,所以可在 552nm 处对五碳糖进行测定,而六碳糖在此处无吸收峰。在桦树木聚糖溶液中加入葡萄糖或半乳糖进行干扰,其检测结果与不加干扰结果一致,发现六碳糖对木糖的最大吸收峰几乎没有影响,所以在用 Douglas 法对戊聚糖含量进行测定时,

六碳糖对结果的影响非常小,因此在对实际样品进行预处理时,用浓硫酸对谷物样品进行完全降解,对检测结果不会产生较大的误差。

2.5 显色衰减实验结果

Hashimoto^[6]等人以及郑学玲^[7]等人分别于 1987 年和 2000 年对各种戊聚糖含量的测定方法进行比对,都认为 Douglas 法较其他方法操作简单,测定准确,但郑学玲^[7]等人 2000 年在对 Douglas 方法优化结果的报道时表示,沸水浴显色时间为 30 min,吸收波长为 552nm 检测结果误差最小。1981 年 Douglas 建立该检测方法时建议检测时间为沸水浴 25 min 后立即冷却检测,并强调检测时间会对实验结果产生较大的影响。实际的试验表明,沸水浴 25~30 min 时其 552 nm 和 510 nm 的吸光度确有峰值出现,但不稳定,30 min 后吸光度会明显衰减。

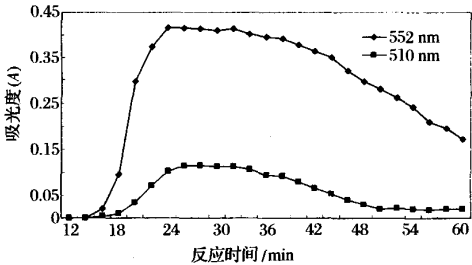


图 2 吸光度随时间变化图

如图 2 所示,反应至 25 min 时,吸光度达到最高值,溶液冷却后该值能稳定 32~33 min,其中 552 nm 处吸光度为 0.415 ± 0.004 (25~33 min), 510 nm 处吸光度为 0.114 ± 0.001 (25~32 min),随后开始逐渐衰减,因此 Douglas 方法的检测结果对实验操作的要求较高,对单一样品进行定量分析时有一定的可行性,但对大批量的样品进行检测(如优化工艺时的正交实验,凝胶色谱分离后对收集液的定量分析等)时,单波长检测具有明显的局限性,表现在单位时间内检测样品数量一定,吸光度的稳定时间限制了每批次的检测数量,因而延长了实验的时间跨度,同时也相应地增加了引入误差的因素如:样品的保存,不同抽提试剂的差异以及不同次实验间仪器的系统误差。因而被检测指标的稳定性对于减少实验误差具有相当重要的意义。在试验中,观察到虽然溶液在 552 nm 和 510 nm 下的吸光度随时间的衰减比例不一,但单位时间内两者吸光度变化的数值近似,因此将两者的差值对时间作分析(沸水浴 25 min 后),见图 3。

从图 3 中可知,1 mg/mL 的木糖标准溶液在沸

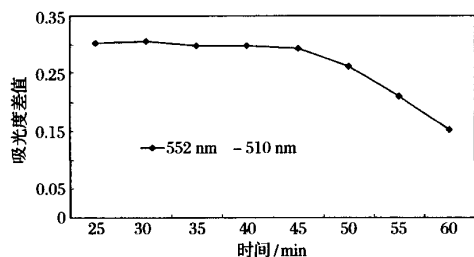


图3 552 nm 和 510 nm 吸光度差值稳定性图

水浴 25~45 min, 其 552 nm 和 510 nm 下测得的吸光度差基本稳定在 0.3 ± 0.005 , 有 20 min 左右的稳定期, 较单波长检测方法 7 min 的稳定期长近 3 倍, 因此双波长检测法对于大批量的戊聚糖样品检测具有相当的实际意义。为减少本论文同比实验之间的误差, 所有戊聚糖定量检测全部运用 Douglas 方法双波长检测, 检测时间在沸水浴 (25 min) 结束后 20 min 内。

3 结 论

(1) 完全按照 Douglas 的方法检测实际样品的戊聚糖含量误差相当大, 因此在实际应用中, 应对样品进行预处理。

(2) 对于固体样品如麸皮, 面粉等用硫酸法进行预处理其精确度较高, 但耗时长, 步骤多。硫酸法误差主要来源于人为因素, 可控性以及实验结果的重现性较差。但对于固体样品的预处理仍是一种较精确的方法; 酶法对固体样品进行预处理有简单, 快速等特点。

(3) 对于液体样品, 酶法明显优于其他方法。精确度较高, 快速, 简洁, 重现性也较高。

(4) 将样品完全水解后的六碳糖作为待测样品, 用上述间苯三酚法进行抽提, 显色, 反应液在 300~600 nm 进行吸收波长扫描, 结果表明在 470~600 nm

区域内无吸收峰, 说明六碳糖对木糖的最大吸收峰没有影响, 所以在用 Douglas 法对戊聚糖含量进行测定时, 六碳糖对结果的影响可忽略不计, 因此在对实际样品进行预处理时, 用浓酸对谷物样品进行完全降解, 对检测结果不会产生较大的误差。

(5) 木糖溶液经间苯三酚试剂显色后, 在 552 nm 下的吸光度, 510 nm 下的吸光度以及 552 nm 和 510 nm 吸光度的差值与不同浓度的木糖溶液均有一定的相关性, 其中 552 nm 和 510 nm 吸光度的差值与木糖浓度的线性相关性最高。

(6) 实验表明, Douglas 法对戊聚糖含量进行单波长测定, 沸水浴 25~30 min 时其 552 nm 和 510 nm 的吸光度虽出现峰值用双波长进行检测, 木糖标准溶液在沸水浴 25~45 min, 在 552 nm 和 510 nm 下测得的吸光度差基本稳定在 0.3 ± 0.005 , 有 20 min 左右的稳定期。因此双波长检测法对于大批量的戊聚糖样品检测具有相当的实际意义。

参 考 文 献

- 1 Douglas S G. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour[J]. Food Chemistry, 1981, 7: 139~145
- 2 Anthony B. A simple and rapid preparation of ralditol acetates for monosaccharide analysis [J]. Carbohydrate Research, 1983, 113: 291~299
- 3 潘亚非, 刑延宪. 米糠中戊聚糖气相色谱分析测定方法研究[J]. 动物营养学报, 1993, 3: 45~49
- 4 陈惠萍. 混合糠中戊聚糖的化学分析测定方法[J]. 动物营养学报, 1995, 3: 23~27
- 5 Cerning J, Guibot A. A specific for the determination of pentosans in cereal and cereal products[J]. Cereal Chem, 1972, 23(1): 177~184
- 6 Hashimoto S, Shogren M D, Pomeranz Y. Cereal pentosans: their estimation and significance I. Pentosans in the wheat and milled wheat products[J]. Cereal Chem, 1987, 64: 30~34
- 7 郑学玲. 小麦麸皮戊聚糖的分离制备, 理化性质及功能特性研究[D]. 江南大学硕士论文, 2002

The Study of Optimizing Method for Pentosans Determination

Lin Lin

(National Center of Supervision and Inspection on Food Quality, Shanghai, 200233, China)

ABSTRACT Measuring of pentosans is very important when detecting cereal samples. The typical pentosans determination method "Douglas" was applied directly without any special pretreatment of the samples, thus causing a big different between the real content of pentosans in the raw material and the test result from Douglas method. Dextrose which might produced during hydrolyzing the complex material had little influence on the results. Different pretreatments of the samples were compared, and the best feasible preparation for the different kinds of samples were obtained. The results displayed that different methods are needed before apply of Douglas method. For solid samples, both vitriol method and the enzyme method were work fine, while in the liquid samples, enzyme method was better.

Key words Douglas method, pentosans, preparation