

葛仙米多糖中单糖定性定量分析方法研究

Analysis of monosaccharide composition and content of
polysaccharide from Nostoc sphaeroides Kützinger extractive

周 熙¹ 王 希¹ 刘水平¹ 罗 诚¹
ZHOU Xi¹ WANG Xi¹ LIU Shui-ping¹ LUO Cheng¹
王宗成² 张瑞华³

WANG Zong-cheng² ZHUANG Rui-hua³

(1. 株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 412000; 2. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199;
3. 湖南炎帝生物工程有限公司, 湖南 株洲 412007)

(1. Zhuzhou Institute for Food and Drug Control, Zhuzhou, Hunan 412000, China; 2. College of
Chemical and Biological Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou,
Hunan 425199, China; 3. Hunan Yandi Bioengineering Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan 412007, China)

摘要:建立了柱前 PMP 衍生高效液相色谱法分离检测 6 种中性糖、2 种糖醛酸及 1 种糖胺的方法;考察了三氟乙酸(TFA)水解多糖的时间、温度以及三氟乙酸浓度对多糖水解的影响;采用液相色谱法分析葛仙米多糖提取物中的单糖组成。结果表明:甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖等 9 种单糖平均回收率为 81.08%~102.10%。相较于化学法,该方法准确可靠,线性关系良好,重复性和专属性好,可以很好地完成葛仙米多糖提取物中单糖的定性定量分析。

关键词:葛仙米;高效液相色谱法;柱前衍生化;多糖;单糖;含量分析

Abstract: A simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of eight kinds of neutral monosaccharides, two kinds of uronic acid and one kinds of glycosamine by precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) has been developed. The polysaccharides hydrolyzed effects of hydrolysis time, temperature and trifluoroacetic acid (TFA) concentration were investigated. HPLC were established for analyzing the monosaccharide composition and the content of polysaccharide from Nostoc sphaeroides Kützinger extractive. The results showed that the recoveries of nine kinds of monosaccharides, such as Man, GlcUA, Glc, Xyl, were 81.08%~102.1%. Compared with

the chemical method. The established method is accurate, goodlineal relation, reproducible and specific, which could be used for the determination of qualitative and quantitative analysis in Nostoc sphaeroides Kützinger extractive.

Keywords: Nostoc sphaeroides Kützinger extractive; HPLC; pre-column derivatization; Polysaccharides; Monosaccharide; content analysis

葛仙米学名拟球形念珠藻(Nostoc sphaeroides),发育成熟后呈蓝绿色胶质状,颗粒圆润,玲珑剔透^[1],为中国独有的淡水野生蓝藻,与发菜同属。葛仙米不含蓝藻毒素,是一种有较高药用和食用价值的经济蓝藻^[2],而且富含蛋白质及丰富的多糖^[3-5]。多糖类物质往往具有许多生物活性,葛仙米多糖主要成分为半乳糖、甘露糖和木糖,对 HCT116 细胞增殖具有很强的抑制活性^[3]。随着技术的进步和多糖研究的深入,葛仙米必将进一步在食品、保健食品及医疗行业发挥巨大作用^[6-7]。现有多糖测定的标准方法均为化学法:SN/T 4260—2015《出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚—硫酸法》、NY/T 1676—2008《食用菌中粗多糖含量的测定》等。这 2 种方法经过不断优化后,已经广泛用于植物、真菌等多糖的测定。但由于葛仙米中多糖含量高,而且黏度非常大,采用化学法分析时,多糖较难完全提取出来,测定结果不稳定,无法准确测定^[7-9]。

对葛仙米有效成分多糖进行检验方法研究及质量分析,可为企业原料规模化养殖、提取方法优化筛选、进一步的开发利用等提供试验依据,为食品药品监管部门对其质量及安全风险提供准确可靠的数据,为质量监控提供技术指标。

基金项目:湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目(编号:湘食药科 R201714)

作者简介:周熙,女,株洲市食品药品检验所高级工程师,本科。

通信作者:王宗成(1983—),湖南科技学院讲师,硕士。

E-mail:95310918@qq.com

收稿日期:2018-03-06

目前,有关葛仙米多糖的化学结构研究较少,其多糖的单糖组成是研究多糖生物活性的基础^[10-11]。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone,PMP)柱前衍生化高效液相色谱测定多糖含量的方法,目前被广泛用于各种多糖的单糖组分检测研究^[12]。气相色谱法亦可定性、定量分析多糖的组分和含量,一般是将多糖酸水解或甲醇醇解,再用衍生物法以增加其挥发性^[13]。相比化学法,色谱法灵敏度应更高、稳定性更好,可定性、定量分析多糖的组分和含量^[14]。但由于多糖的结构比较复杂,其水解前处理方法多样,水解条件各有不同,因此有必要找到稳定的前处理方法,与化学法测定多糖含量进行对比,同时对该方法的精密度、重现性、显色稳定性和加样回收率进行考察,为葛仙米多糖提取物中多糖含量的准确测定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

葛仙米多糖提取物:湖南炎帝生物工程有限公司。其中Y1与Y2为野生葛仙米,Y3~Y6分别为春夏秋冬4个季节的样品,样品信息见表1。

表 1 样品
Table 1 Sample

编号	来源	采样时间
Y1	湖北恩施野生	2017 年 7 月
Y2	湖北黄石野生	2017 年 7 月
Y3	人工养殖	2017 年 7 月
Y4	人工养殖	2017 年 12 月
Y5	人工养殖	2017 年 9 月
Y6	人工养殖	2018 年 3 月

1.2 仪器与设备

电子天平:MS205DU型,瑞士梅特勒-托利多国际贸易有限公司;

液相色谱仪:Thermo U3000型,美国赛默飞世尔科技公司;

pH计:FE-20型,瑞士梅特勒-托利多国际贸易有限公司。

1.3 HPLC 法定测定葛仙米多糖提取物的总糖含量

葛仙米多糖提取物的前处理水解条件经过单因素考察确定,参考相关文献资料^[15-17]主要考察水解温度高低、时间长短以及三氟乙酸对水解程度的影响;通过单因素的考察确定最佳的水解条件。

1.3.1 标准单糖溶液的配制及衍生 分别精密称取甘露糖、氨基葡萄糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖及岩藻糖标准品 100 mg 于 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得 9 种单糖的标准储备溶液。再配置成浓度分别为 0.1,0.5,1.0,1.5,2.0 mg/mL 的单糖混合标准溶液。分别取 50 μ L 的单糖标准液及不同浓度梯度的混合标准溶液,各加 0.6 mol/L 的 NaOH 溶液 50 μ L,置于 5 mL 的具塞试管中,漩涡混匀;再加 0.5 mol/L 的 PMP(0.435 5 g/5 mL)甲醇溶液 100 μ L,漩涡混匀,在 70 $^{\circ}$ C 的烘箱中避光反应 80 min,

取出避光冷却至室温,加 0.3 mol/L 的 HCl 溶液 100 μ L 中和,加水至 2 mL,再加等体积的氯仿,漩涡混匀,静置,弃去氯仿相,如此萃取 3 次。将水相用 0.45 μ m 微孔膜过滤后供 HPLC 进行分析,作为定性定量的依据^[15-18]。

1.3.2 葛仙米多糖提取物的水解 吸取 0.1 mL 质量分数为 5 mg/mL 的多糖样品溶液于 2 mL 的西林瓶中,加入浓度为 3 mol/L 的三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA)溶液 100 μ L,充 N₂封管,在 110 $^{\circ}$ C 的烘箱中水解 4 h;冷却后将水解液转移至 5 mL 的离心管中,并用 0.2 mL 甲醇冲洗转移残余水解液,加 0.2 mL 甲醇后用 N₂吹干,如此重复加甲醇并用 N₂吹干 3 次,去除 TFA,得水解样品。取本品水解的残渣,加入 50 μ L 超纯水溶解残渣,按照“1.3.1”方法进行衍生、中和、萃取,用 0.45 μ m 微孔膜过滤后,超声脱气,进行 HPLC 检测分析^[15-18]。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Welch Xtimate(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);流动相:以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(用 3 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 6.7)为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱(表 2);检测波长:260 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L。

表 2 梯度洗脱程序
Table 2 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	82.2	17.8
25	82.2	17.8
26	80.0	20.0
36	80.0	20.0
37	82.2	17.8
45	82.2	17.8

1.4 苯酚—硫酸法定测定葛仙米多糖提取物的总糖含量

1.4.1 溶液的配制 精确称取重蒸酚 25.0 g,加水溶解后,转移至 500 mL 的容量瓶中,稀释至刻度处,混匀,得到质量浓度为 5%的苯酚溶液,将其保存在 4 $^{\circ}$ C 中,备用。标准葡萄糖溶液配置:精准称取无水葡萄糖 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,加入蒸馏水至刻度处、摇匀,配成葡萄糖溶液浓度为 0.10 mg/mL,备用^[19]。

1.4.2 标曲的绘制 准确吸取葡萄糖标准溶液 0.00,0.10,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL 置于 25 mL 的离心管中,补加水至 2.0 mL,加入 5%的苯酚溶液 1.0 mL,混合均匀后,继续加入浓硫酸 10 mL,混匀后,沸水浴 2 min,冷却至室温,在 485 nm 波长处以试剂空白为参比,1 cm 比色皿测定吸光度值^[19]。以葡萄糖质量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标曲,见图 1。

1.4.3 样品中总糖的测定 称取 0.1 g 的葛仙米多糖提取物在水中溶解,定容至 100 mL(V₁)。准确吸取 2 mL(V₂)的葛仙米多糖提取物溶液置于 25 mL 的离心管中,加入 10 mL 无水乙醇,混匀,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中静置 4 h,离心(5 000 r/min,5 min),弃去上清液,残渣用 2 mL 80%乙醇洗涤,洗涤 3 遍,

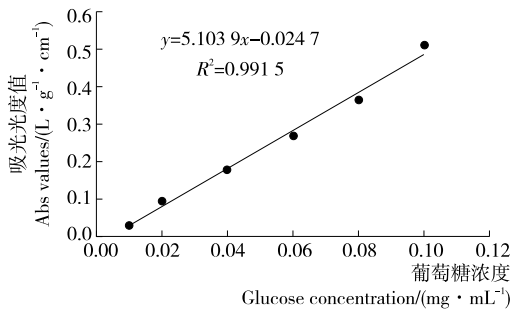


图 1 葡萄糖标准曲线
Figure 1 Standard curve of glucose

残渣溶解定容至 25 mL(V_3)^[19]。准确吸取前处理好的葛仙米多糖提取物 1.0 mL(V_4), 补加水至 2.0 mL, 然后照“1.4.2”方法测定吸光光度值, 依照标曲计算葛仙米多糖提取物的浓度, 按式(1)计算总糖含量^[19]。

$$X = \frac{m_1 \times V_1 \times V_3}{m_2 \times V_2 \times V_4 \times 1\ 000} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

X ——总糖含量, %;

m_1 ——样品中葡萄糖测定量, mg;

m_2 ——样品的质量, g;

V_1 ——样品提取液的定容体积, mL;

V_2 ——沉淀粗多糖所用溶液的体积, mL;

V_3 ——粗多糖溶液体积, mL;

V_4 ——测定样品溶液体积, mL。

2 结果与分析

2.1 单糖 PMP 衍生物的色谱图及线性关系

单糖 PMP 衍生物的标样图以及代表性样品单糖衍生图见图 2。表 3 表明: 甘露糖、氨基葡萄糖、鼠李糖以及葡萄糖醛酸等 9 种单糖的衍生物在 0.1~2.0 mg/mL 时线性关系良好。

2.2 葛仙米多糖水解单因素试验

2.2.1 水解时间的考察 按“1.3”水解衍生多糖样品, 分别考察水解 2, 3, 4, 5, 6 h 多糖的水解程度。最后结果如表 4 所示, 随着水解时间的延长, 单糖的总峰面积增加, 水解 4 h 时

表 3 单糖的标准曲线

Table 3 The monosaccharide of lineal relation

种类	线性关系	线性范围/ (mg · mL ⁻¹)	相关系数 R^2
甘露糖	$y = 40.21x$	0.107 0~2.140 0	0.999 6
氨基葡萄糖	$y = 26.344x - 0.384 5$	0.169 6~3.392 0	1.000 0
鼠李糖	$y = 24.808x - 0.432 5$	0.107 4~2.148 0	0.999 7
葡萄糖醛酸	$y = 26.527x - 1.032 9$	0.104 2~2.084 0	0.999 1
半乳糖醛酸	$y = 16.87x - 0.630 3$	0.124 6~2.492 0	0.998 4
葡萄糖	$y = 47.195x - 0.781$	0.165 8~3.316 0	1.000 0
半乳糖	$y = 43.511x - 0.23$	0.125 0~2.500 0	1.000 0
木糖	$y = 48.36x - 0.121 5$	0.099 6~1.992 0	1.000 0
岩藻糖	$y = 32.745x - 0.434 3$	0.085 4~1.708 0	0.999 8

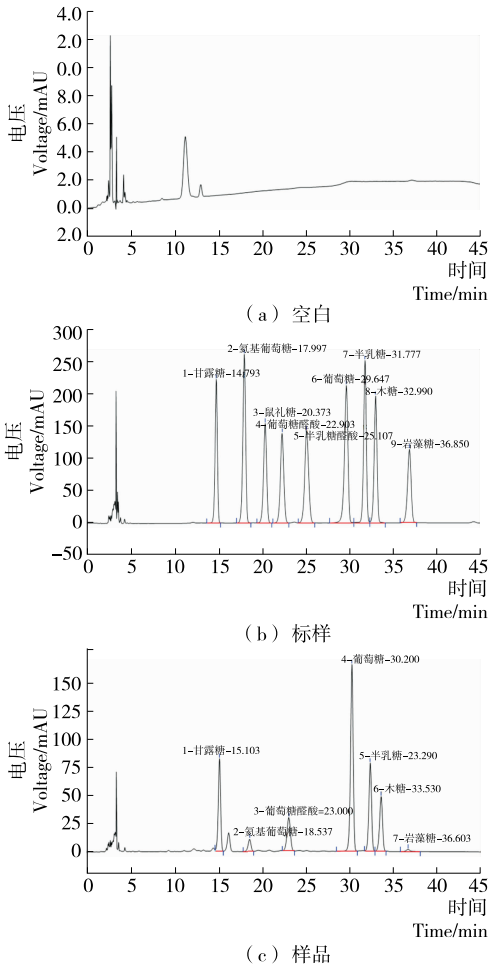


图 2 多糖水解样品和标样衍生物的 HPLC 分离效果图
Figure 2 Separation of polysaccharide hydrolysate and standards derivatives by HPLC

最大, 随后减少。由此可见, 水解 4 h 最佳。

2.2.2 TFA 浓度的考察 照“1.3”项, 水解衍生多糖样品, 分别考察不同浓度 TFA (2, 3, 4, 5, 6 mol/L) 对多糖水解的影响。如表 5 所示, 随 TFA 的浓度的增加, 单糖的总峰面积先增加然后降低, 当 TFA 的浓度为 3 mol/L 时水解衍生结果最佳。

2.2.3 水解温度的考察 照“1.3”项, 水解衍生多糖样品, 分别考察不同温度 (100, 110, 120 °C) 对多糖水解的影响, 如表 6 所示, 根据峰面积总和的大小, 确定 110 °C 最佳。

2.3 系统适用性试验

取“1.3.1”和“1.3.2”的对照品溶液和样品溶液, 按“1.3.3”的色谱条件进行分析, 同时做空白试验, 记录色谱图, 9 种单糖分离良好, 理论板数均不低于 5 000 (见图 2)。

2.4 方法学考察

2.4.1 仪器精密度 按“1.3.1”项下衍生混合标准溶液, 再依照“1.3.3”项下色谱条件进样, 连续进样 6 针, 计算其 RSD, 测定结果见表 7。结果表明仪器的精密度良好。

2.4.2 精密度试验 分别精密量取同一对照品溶液 50 μL, 置于 15 mL 离心管中, 共 6 份, 按“1.3.1”项下衍生条件处理。

然后,照“1.3.3”项下的色谱条件进行分析,计算甘露糖、氨基葡萄糖、鼠李糖以及葡萄糖醛酸等 9 种单糖衍生物的峰面积以及 RSD 值,测定结果见表 8。结果表明本试验精密度良好,说明样品水解衍生的处理方法可靠。

2.4.3 稳定性试验 精密量取同一对照品溶液 50 μ L,置于 15 mL 离心管中,按“1.3.1”项下衍生条件处理。放置在室温条件下,分别于 0,1,2,4,8,16,24,48 h,按照“1.3.3”的色谱

条件进行分析,计算 9 种单糖衍生物峰面积的 RSD 值,结果见表 9。结果表明衍生后 9 种单糖溶液 24 h 内均稳定。

2.4.4 重复性试验 吸取 5 mg/mL 的葛仙米多糖提取物样品溶液 0.1 mL,按“1.3.2”的试验方案,取样 6 份水解衍生处理,然后照按“1.3.3”的色谱条件进行分析,计算样品中主要 5 种单糖的 RSD,结果见表 10。其重复性尚可,葡萄糖醛酸以及木糖的 RSD 偏高,可能是水解后的稳定性稍差。

表 4 水解时间对单糖峰面积的影响
Table 4 The analysis of hydrolysis time ($n=5$)

衍生时间/h	峰面积/(mAU·min)						峰面积总和
	甘露糖	氨基葡萄糖	葡萄糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	
2	18.177	1.969	3.699	22.337	8.641	13.531	68.354
3	18.581	2.421	5.667	27.214	12.963	16.857	83.703
4	26.931	3.805	18.975	59.375	30.466	24.164	163.698
5	15.000	2.272	7.930	29.953	16.296	13.633	85.084
6	9.102	1.340	5.086	16.296	9.949	7.589	85.084

表 5 TFA 浓度对单糖峰面积的影响
Table 5 The analysis of TFA concentration ($n=6$)

TFA 浓度/ (mol·L ⁻¹)	峰面积/(mAU·min)						峰面积总和
	甘露糖	氨基葡萄糖	葡萄糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	
2	27.890	4.138	11.448	48.768	24.760	25.648	142.652
3	32.787	4.794	18.032	66.109	34.224	30.395	184.341
4	33.196	4.550	15.634	60.734	31.956	30.929	176.999
5	28.027	4.041	11.207	57.130	27.746	23.964	152.115
6	23.025	3.102	12.075	45.838	24.093	21.004	129.137

表 6 水解温度对单糖峰面积的影响
Table 6 The analysis of hydrolysis temperature ($n=3$)

水解温度/ ℃	峰面积/(mAU·min)						峰面积总和
	甘露糖	氨基葡萄糖	葡萄糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	
100	27.226	3.704	11.103	47.673	24.152	25.811	139.669
110	32.453	4.586	22.337	74.264	37.649	27.013	198.302
120	21.630	3.571	12.782	52.283	25.318	11.887	127.471

表 7 仪器精密度
Table 7 The precision of instrument

种类	峰面积/(mAU·min)						RSD/%
甘露糖	36.031	36.060	35.920	35.785	35.702	35.649	0.56
氨基葡萄糖	53.686	53.853	53.544	53.810	53.826	53.789	0.25
鼠李糖	35.578	35.545	35.301	35.154	35.004	34.898	0.92
葡萄糖醛酸	35.261	35.238	35.056	34.909	34.772	34.680	0.80
半乳糖醛酸	40.676	40.687	40.521	40.405	40.303	40.205	0.57
葡萄糖	56.084	56.079	55.820	55.613	55.474	55.399	0.62
半乳糖	48.771	48.896	48.629	48.666	48.627	48.604	0.27
木糖	43.423	43.368	42.765	42.977	42.849	42.819	0.78
岩藻糖	34.656	34.760	34.659	34.594	34.545	34.541	0.28

2.4.5 回收率试验 吸取 5 mg/mL 的葛仙米多糖提取物样品溶液 0.05 mL,同时每份样品中加入 0.05 mL 混合标准溶液(1 mg/L),按“1.3.2”的试验方案,取样 6 份水解衍生处理,然后照按“1.3.3”的色谱条件进行分析,计算样品中主要 9 种单糖的回收率,结果见表 11。回收率在 80%~110%时,葡萄糖与甘露糖的回收率偏低。

2.4.6 检出限试验 精密量取“1.3.2”项下的混合标准溶液(1 mg/L) 0.25 mL 置于 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。按“1.3.1”的衍生条件处理。然后,照“1.3.3”的色谱条件进行分析,以信噪比(S/N)为 3 计算 9 种单糖的检出限为 4.27~8.48 $\mu\text{g/mL}$ 。检出限计算结果见表 12,与化学法相比,HPLC 方法的检出限更低。

表 8 精密度试验
Table 8 The precision test ($n=6$)

种类	峰面积/(mAU·min)						RSD/%
甘露糖	15.733	15.743	15.742	15.705	15.704	15.703	0.13
氨基葡萄糖	24.159	24.174	24.223	24.214	24.208	24.207	0.10
鼠李糖	14.744	14.722	14.730	14.712	14.689	14.692	0.15
葡萄糖醛酸	14.679	14.650	14.634	14.587	14.556	14.538	0.38
半乳糖醛酸	23.416	23.349	23.334	23.287	23.271	23.233	0.28
葡萄糖	21.027	21.027	21.022	20.989	20.989	21.026	0.09
半乳糖	17.888	17.883	17.889	17.861	17.843	18.043	0.40
木糖	13.553	13.585	13.576	13.564	13.563	13.559	0.09
岩藻糖	15.733	15.743	15.742	15.705	15.704	15.703	0.13

表 9 稳定性试验
Table 9 The stability test ($n=7$)

种类	峰面积/(mAU·min)							RSD/%
	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h	48 h	
甘露糖	33.924	34.240	34.117	34.198	34.317	33.888	30.371	4.24
氨基葡萄糖	50.147	50.346	50.318	50.271	50.367	49.889	49.831	0.44
鼠李糖	32.528	33.010	32.806	32.917	33.097	32.803	28.002	5.74
葡萄糖醛酸	33.958	33.578	33.067	32.741	33.354	30.167	30.696	4.54
半乳糖醛酸	38.504	37.865	37.471	37.129	37.688	34.869	35.499	3.58
葡萄糖	52.835	53.245	53.022	53.183	53.217	52.953	49.610	2.51
半乳糖	46.307	46.472	46.404	46.451	46.532	46.202	44.370	1.68
木糖	41.266	41.649	41.395	41.764	41.616	41.064	38.031	3.22
岩藻糖	31.994	32.303	32.376	32.460	32.392	31.821	30.624	2.03
总峰面积	361.463	362.708	360.976	361.114	362.580	353.656	337.034	2.62

表 10 重复性试验
Table 10 The reproducibility test ($n=6$)

种类	峰面积/(mAU·min)						RSD/%
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	
甘露糖	31.764	28.909	29.351	28.932	30.525	33.837	6.38
氨基葡萄糖	4.717	4.258	4.310	3.999	4.073	4.807	7.63
葡萄糖醛酸	19.767	20.046	20.471	18.377	16.115	14.343	13.53
葡萄糖	64.837	66.328	66.880	64.971	58.846	57.241	6.47
半乳糖	36.494	33.624	33.856	32.977	32.240	29.328	7.07
木糖	28.410	23.593	23.421	23.134	31.072	29.951	13.63
总峰面积	185.989	176.758	178.289	172.390	172.871	169.507	5.84

表 11 回收率试验

Table 11 The recovery test ($n=6$)

种类	峰面积/(mAU·min)						RSD/%
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	
甘露糖	81.88	82.69	85.25	84.28	82.12	81.08	1.90
氨基葡萄糖	103.60	103.80	102.90	101.20	100.90	102.10	1.19
鼠李糖	99.90	99.5	99.40	100.90	98.90	100.20	0.70
葡萄糖醛酸	88.02	86.92	87.50	87.35	88.67	87.22	0.72
半乳糖醛酸	89.11	91.90	91.61	90.92	89.59	89.72	1.28
葡萄糖	81.21	79.86	80.66	81.05	80.15	80.09	0.69
半乳糖	87.96	85.07	866.02	85.00	86.46	85.33	1.31
木糖	89.96	90.13	88.39	88.12	89.21	89.10	0.91
岩藻糖	90.19	93.50	91.71	92.22	91.30	91.81	1.19

表 12 检出限

Table 12 The detection limit ($n=9$) $\mu\text{g/mL}$

种类	检出限	种类	检出限
甘露糖	2.6	葡萄糖	4.1
氨基葡萄糖	4.2	半乳糖	3.1
鼠李糖	2.7	木糖	2.5
葡萄糖醛酸	2.6	岩藻糖	2.1
半乳糖醛酸	3.1		

2.4.7 样品测定 按“2.2”的方法制备对照品溶液和供试品溶液(共 6 批样品),按“2.1”的色谱条件进行分析测定。以单糖的含量计算多糖的含量,选取 6 种主要的单糖来计算,即甘露糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖以及木糖,9 种单糖含量的计算结果见表 13、14。同样 6 批次样品用化学法测定总糖含量,结果见表 15。可以看出化学法测定结果整体数值偏高,平行试验结果差别较大。

表 13 HPLC 法样品测定结果

Table 13 The content determination of samples by HPLC ($n=6$)

种类	峰面积/(mAU·min)					
	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6
甘露糖	31.004	30.556	27.636	21.248	25.622	24.047
氨基葡萄糖	4.619	4.625	4.203	3.552	4.282	3.642
鼠李糖	0.000	0.874	0.469	0.000	0.000	0.000
葡萄糖醛酸	14.117	17.866	16.560	10.646	14.331	11.794
半乳糖醛酸	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
葡萄糖	62.065	62.652	55.418	46.727	58.610	58.755
半乳糖	32.338	33.992	30.349	21.665	28.450	25.882
木糖	25.959	28.342	22.936	13.160	19.403	19.573
岩藻糖	1.300	0.000	0.456	0.275	1.069	1.342
峰面积总和	171.402	178.907	158.027	117.273	151.767	145.035

表 14 HPLC 法单糖含量的计算结果

Table 14 The content determination of monosaccharide by HPLC ($n=6$) mg/mL

种类	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6
甘露糖	0.771 0	0.759 9	0.687 3	0.528 4	0.637 2	0.598 0
氨基葡萄糖	0.160 7	0.161 0	0.144 9	0.120 2	0.147 9	0.123 7
葡萄糖醛酸	0.571 1	0.571 1	0.571 1	0.571 1	0.571 1	0.571 1
葡萄糖	1.331 0	1.344 0	1.191 0	1.007 0	1.258 0	1.261 0
半乳糖	0.748 5	0.786 5	0.702 8	0.503 2	0.659 1	0.600 1
木糖	0.539 3	0.588 6	0.476 8	0.274 6	0.403 7	0.407 2
单糖总量	4.121 6	4.211 1	3.773 9	3.004 5	3.677 0	3.561 1
样品浓度	5.134 5	5.156 9	4.985 9	4.876 4	5.030 1	5.045 9
总糖含量(以单糖总量计算总糖)	80.27%	81.66%	75.69%	61.61%	73.10%	70.57%

表 15 化学法测定总糖含量的计算结果

Table 15 The content determination of polysaccharides by chemical method ($n=6$)

编号	取样量/ g	样品 吸光度	样品测定 质量/mg	多糖含量(以 葡萄糖计)/%	平均值/ %
Y-1	0.103 5	0.370 51	0.077 43	93.52	90.23
	0.104 9	0.347 73	0.072 97	86.95	
Y-2	0.104 2	0.377 43	0.078 79	94.52	91.67
	0.106 6	0.361 95	0.075 76	88.83	
Y-3	0.102 6	0.348 15	0.073 05	89.00	85.30
	0.100 7	0.310 81	0.065 74	81.60	
Y-4	0.113 4	0.301 29	0.063 87	70.40	72.41
	0.110 2	0.310 16	0.065 61	74.42	
Y-5	0.108 8	0.319 15	0.067 37	77.40	79.35
	0.110 1	0.340 81	0.071 61	81.31	
Y-6	0.109 3	0.300 92	0.063 80	72.96	78.12
	0.106 9	0.338 83	0.071 23	83.99	

2.5 单糖含量结果分析

柱前 PMP 衍生高效液相色谱法测多糖,以单糖总量计算多糖,存在操作步骤较多,数值整体偏低的问题。但相较于化学法,该方法准确可靠,线性关系良好,重复性和专属性好,可以很好地完成葛仙米多糖提取物中的单糖组成及定性定量分析。虽然化学法操作步骤简单、易行,但其测定值平行性差,检出限不高,结果的可靠性较低。另外,按照上述所建立的水解衍生方法,并针对此方法进行方法学考察,测定 6 批样品,同时与化学法进行了比较发现,其中野生的葛仙米多糖提取物多糖含量高于人工养殖的,夏秋季采样的葛仙米多糖提取物所测多糖含量亦高于其他季节,可能是夏季葛仙米生长旺盛,存储多糖含量较高。野生葛仙米的多糖提取物中的多糖含量明显高于养殖的,可能有以下几个原因:① 养殖的密度偏大;② 模拟野生环境可能有所欠缺;③ 经纬度的问题,日照、温度等有所影响。

3 结论

本试验采用三氟乙酸水解葛仙米多糖提取物,对水解条件进行了单因素考察。通过考察发现,在 110 ℃ 下,采用 3 mol/L 的三氟乙酸水解 4 h,其水解效果更好。然后,进行方法学验证,结果表明,相较于化学法新建立的分析方法可靠准确、灵敏度高,可同时用于 9 种单糖的分析,且分离效果较理想。样品测定结果显示,葛仙米多糖提取物中主要含有甘露糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖及木糖 6 种单糖,其中甘露糖、葡萄糖、半乳糖以及木糖含量较高,与莫开菊等^[15]报道的结果类似,通过对比,发现葛仙米多糖提取物中有一种单糖种类不一致,其文中报道含有阿拉伯糖。经加标试验确认,木糖与阿拉伯糖保留时间极为接近,样品中峰的保留时间与木糖衍生物一致,最终确认葛仙米多糖提取物中的单糖组成之一应是木糖。不足之处在于所测样品批次少,野生葛仙米的样品难以收集,没能比较不同月份以

及不同年份野生和人工养殖的葛仙米中多糖含量的差异,如有大样本的数据,更能找出其中的规律,为葛仙米的人工养殖提供科学的依据。

此外,现有研究表明葛仙米多糖的分子量与其生物活性存在直接关联,但由于多糖结构的复杂性,大部分研究都只是在一级结构上。而葛仙米多糖的研究起步较晚,相关的生物活性研究亦较少。确定葛仙米多糖单糖的组成和含量可以为进一步研究、开发葛仙米的相关活性提供理论基础^[3,10-11]。

参考文献

[1] 胡鸿钧,李尧英,魏印心,等. 中国淡水藻类[M]. 上海:上海科技出版社,1980: 49-57.

[2] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1983: 598-599

[3] 彭常安,宋玉华,李春雨. 微波提取葛仙米多糖及其抑癌作用研究[J]. 安徽农业科学,2012, 40(20): 10 606-10 608.

[4] 刘金龙. 葛仙米营养成分研究[J]. 中草药,2000, 31(11): 862.

[5] 汪兴平,程超. 野生葛仙米营养成分分析及评价[J]. 食品科学,2002, 23(8): 288-290.

[6] 田志环,焦传珍. 葛仙米研究现状及其开发前景[J]. 食品研究与开发,2007, 28(2): 170-172.

[7] 董群,郑丽伊,方积年,等. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志,1996, 31(9): 550-553.

[8] 苏颖,周选围. 改进苯酚-硫酸法快速测定虫草多糖含量[J]. 食品研究与开发,2008, 29(3): 118-121.

[9] 李卫彬,阳文辉,黄锁义,等. 当归总糖、还原糖和多糖的含量测定方法探讨[J]. 微量元素与健康研究,2008, 25(3): 46-47.

[10] VINCENT E C O, LIN Fang. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes[J]. Current Medicinal Chemistry, 2000, 7(7): 715-729.

[11] 莫开菊,谢笔钧,龚晨睿. 葛仙米多糖体内抑瘤及对免疫的影响[J]. 食品科学,2008, 29(4): 392-396.

[12] 刘国詮,余兆楼. 色谱柱技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006: 29-179.

[13] 王永华. 气相色谱分析应用[M]. 北京:科学出版社,2006: 105-146.

[14] MONTERO C M, DODERO M C R, SANCHEZ DAG, et al. Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: a review[J]. Chromatographia, 2004, 59 (1): 15-29.

[15] 莫开菊,赵娜,朱照武,等. 葛仙米多糖的单糖组成分析[J]. 食品科学,2015, 36(18): 89-92.

[16] 戴军,朱松,汤坚,等. PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报,2007, 26(2): 206-210.

[17] 秦亚东,汪荣斌,周娟娟,等. 白芍多糖中单糖的组成分析[J]. 中药材,2015, 38(11): 2 335-2 338.

[18] 商晓慧,曲晨龙,张建鹏,等. 海胆壳多糖的提取及 PMP 柱前衍生化高效液相分析[J]. 时珍国医国药,2015(4): 830-832.

[19] 白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京:中国中医药出版社,2011: 73-76.