

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.010

伍善广, 冯学珍, 陈颖, 等. 高效液相色谱法测定金钱菇多糖的单糖组成[J]. 广西植物, 2014, 34(2):179-182

Wu SG, Feng XZ, Chen Y, et al. Analysis of monosaccharide compositions of *Lentinus edodes* polysaccharide by HPLC[J]. *Guihaia*, 2014, 34(2):179-182

高效液相色谱法测定金钱菇多糖的单糖组成

伍善广¹, 冯学珍¹, 陈颖^{2*}, 蒙华琳¹, 陆苑¹

(1. 广西科技大学, 广西柳州 545006; 2. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520)

摘要: 采用高效液相色谱法, 测定金钱菇多糖的单糖组成。用超声辅助提取金钱菇多糖, 通过 1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP) 衍生水解后的单糖, 高效液相色谱法检测衍生物。结果表明: 金钱菇多糖由甘露糖(Man)、核糖(Rib)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl) 组成, 其摩尔为 1.00 : 0.90 : 0.91 : 28.03 : 1.58 : 0.11。该方法快速、简便、重现性好, 可用于测定金钱菇多糖的单糖组成。

关键词: 金钱菇; 单糖; 柱前衍生化; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)02-0179-04

Analysis of monosaccharide compositions of *Lentinus edodes* polysaccharide by HPLC

WU Shan-Guang¹, FENG Xue-Zhen¹, CHEN Ying^{2*},
MENG Hua-Lin¹, LU Yuan¹(1. *Guangxi University of Science and Technology*, Liuzhou 545006, China; 2. *Guangdong Food and Drug Vocational College*, Guangzhou 510520, China)

Abstract: Monosaccharide composition in *Lentinus edode* polysaccharides was determined by high performance liquid chromatography(HPLC). The *L. edodes* polysaccharide was extracted using ultrasonic-assisted extraction. Monosaccharide were derived by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP) and the PMP derivatives of monosaccharide were analyzed by HPLC. The results showed that *L. edodes* polysaccharide was composed of mannose, ribose, rhamnose, glucose, galactose and xylose and their molar ratio was about 1.00 : 0.90 : 0.91 : 28.03 : 1.58 : 0.11. The method was rapid, simple and reproducible and could be used to determine monosaccharide compositions of *L. edodes*.

Key words: *Lentinus edodes*; monosaccharide; pre-column derivatization; HPLC

香菇多糖具有广泛的生理活性, 如免疫调节作用、抗肿瘤、降血脂、抗衰老等作用(李健等, 2005)。金钱菇(*Lentinus edodes*) 是一种幼小型、未开伞的香菇, 具有清香味鲜的独特风味, 含有大量的对人体有益的营养物质, 其多糖也具有多种生理活性, 如抗氧化活性等(许春平等, 2013; 党蕾等, 2010)。

活性多糖组成往往比较复杂, 对其进行单糖组成分析, 对于进一步确定其结构、深入研究药理作用

具有重要的意义。多糖的单糖组成测定有多种方法, 如薄层色谱法(刘柳等, 2008)、气相色谱法(韩威等, 2012)及高效毛细管电泳法(耿越等, 2005; 汲晨锋等, 2006)、高效液相色谱法(马耀宏等, 2012)。薄层色谱法无需衍生化处理, 但灵敏度较低、分离效果较差、重现性不好, 仅适合于多糖的定性分析(饶金华等, 2007; 韩威等, 2012)。因为多糖本身没有足够的挥发性、热稳定性较低, 所以采用气相色谱法需对

收稿日期: 2013-11-28 修回日期: 2014-02-12

基金项目: 广西教育厅(高等学校特色专业及课程一体化建设)项目(药学 GXTSZY286)

作者简介: 伍善广(1974-), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为药物新剂型与新技术, (E-mail) 510242227@qq.com。

*通讯作者: 陈颖, 硕士, 实验师, 研究方向为天然活性组分分离、药物新剂型研究, (E-mail) chenying96@gmail.com。

其衍生化后才能测定,且容易出现色谱峰异构化裂分,对糖醛酸和氨基糖的分析也不大适合(饶金华等,2007;宋叶涵等,2012)。高效毛细管电泳法多用于分析单糖及寡糖,而对于中性多糖的分离则比较困难(张丽芝等,2013)。采用配备示差折光检测器(RI)或蒸发光散射检测器(ELSD)的高效液相色谱可以分析未经衍生化的单糖,但RI分辨率较低(郭守军等,2010),而ELSD价格昂贵、难以普及(颜军等,2006)。对单糖进行衍生化后,采用高效液相色谱-紫外检测器的检测方法可以获得较高的灵敏度(You *et al.*,2009)。最常用单糖衍生化试剂是1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP),具有反应条件温和、无需酸催化、无去唾液酸作用、不产生异构化等特点(Honda *et al.*,2003;Zhang *et al.*,2003),广泛应用于单糖组成分析(付海宁等,2008;孙莲等,2010;You *et al.*,2009;Hsu *et al.*,2013)。

本研究采用超声波辅助提取金钱菇多糖,以1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP)为衍生剂,采用柱前衍生高效液相色谱法测定金钱菇多糖的单糖组成,为深入研究金钱菇多糖提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

金钱菇,广西平南县红心食品有限公司,粉碎、过筛后置于干燥器中备用。

单糖标准品:葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、鼠李糖(Rha)、木糖(Xyl)、核糖(Rib),均购自国药集团化学试剂有限公司;三氟乙酸(TFA)(AR)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP)(AR),国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钠(AR)、磷酸氢二钠(AR),汕头西陇化工有限公司;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),Fisher公司。其他试剂为分析纯。

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)(美国Agilent公司);TU-1901双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DL-180J智能超声清洗器,上海之信仪器有限公司。

1.2 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相A为0.02 mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0),流动相B为乙腈;洗脱梯

度(0 min,0%B;10 min,18%B;20 min,25%B);柱温:30℃;流速1.0 mL/min;检测波长:250 nm。

1.3 金钱菇多糖的提取

称取金钱菇5.0 g,加入一定体积的95%乙醇,浸泡12 h后过滤,取滤渣风干。加入50倍体积的水,于70℃超声波提取40 min。将提取液静止一定时间后,于10 000 r/min离心,取上清液浓缩后加95%乙醇。置于4℃冰箱,过夜后离心、干燥即得金钱菇粗多糖。

粗多糖中可能含有少量蛋白质,可以采用蛋白酶将其水解除去。方法如下:取金钱菇多糖溶液,加入1.0%的胃蛋白酶,50℃、pH 6.5条件下水解。水解2 h后,沸水浴灭酶5 min。将灭酶后溶液5 000 r/min离心,取上清液加95%,4℃冰箱静止12 h,离心后取沉淀,干燥即得金钱菇多糖样品。

1.4 溶液的配制

单糖标准品溶液配制:分别称取一定量单糖标准品配制成0.05 mmol/mL水溶液。单糖混合标准品溶液:各取等体积的6种单糖标准溶液混合均匀。

金钱菇多糖样品溶液制备:称取一定量的1.3项所得金钱菇多糖,置于具塞试管中,加入2 mol/L的三氟乙酸(TFA)2 mL,封管后于110℃水解。2 h后取出,冷却、离心,上清液用NaOH调pH值至7.0,定容至5 mL,备用。

1.5 衍生化产物的制备

标准单糖混合物的衍生:量取100 μL单糖混合标准品溶液置于离心管中,加入100 μL 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液及0.3 mol/L NaOH溶液,涡旋混合1 min,于70℃水浴衍生化反应30 min,冷却至室温后先用100 μL 0.3 mol/L HCl溶液中和,再用氯仿2 mL萃取3次,合并水层,0.45 μm微孔膜过滤后,备用。

金钱菇多糖水解产物的衍生:将金钱菇多糖水解产物按上述方法进行衍生化处理。

1.6 标准曲线的绘制及方法学考察

按1.2的色谱条件,将不同量的单糖标准溶液衍生产物进样,记录色谱图,制作单糖标准曲线方程。

单糖标准溶液衍生产物,重复进样5次,以考察方法的精密度。分别取金钱菇多糖样品溶液5份,按衍生化方法衍生后进样,以考察方法的重复性。将衍生化后单糖混合标准液及金钱菇多糖溶液放置于4℃冰箱储存,于12 h内每隔2 h取出后进样,以考察样品的稳定性。

精密量取已知各单糖含量的金钱菇多糖水解液 4 mL, 加入单糖标准品溶液 1 mL (含 6 种单糖浓度均为 10.0 mg/mL)。混合均匀后, 取 100 μ L 进行衍生化。用标准曲线法计算回收率。

2 结果与分析

2.1 单糖标准图谱及方法学考察

由图 1 可知, 6 种单糖混合标准液衍生物在色谱条件下可以实现较好地分离。根据峰面积对应的各单糖标准品的进样量进行线性回归, 结果见表 1。由表 1 可知, 所测定的 6 种单糖标准品的峰面积与进样量呈良好的线性关系, 相关系数 R^2 在 0.9945~0.9983 之间; 衍生化的单糖标准品溶液在重复进样 5 次的情况下, RSD 在 1.04%~2.83% 之间 ($n=5$), 表明测定方法的精密度良好。

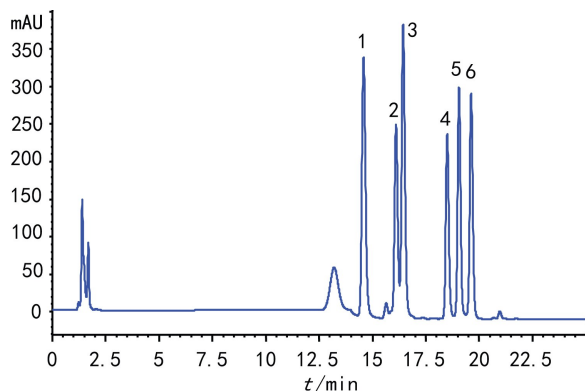


图 1 6 种单糖标准品混合物的高效液相色谱图

1. 甘露糖; 2. 核糖; 3. 鼠李糖; 4. 葡萄糖; 5. 半乳糖; 6. 木糖。

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixture of six standard monosaccharide

1. Man; 2. Rib; 3. Rha; 4. Glc; 5. Gal; 6. Xyl.

连续取 5 份金钱菇多糖溶液衍生后进样, 各峰面积的 RSD 为 2.82% ($n=5$), 表明测定方法有较好重复性。稳定性试验表明, 衍生化后的单糖混合标准液及金钱菇多糖溶液的 RSD 分别为 1.75% ($n=5$)、2.81% ($n=5$), 表明衍生化样品在 12 h 内稳定。

由表 2 可知, 甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖的平均回收率分别为 97.38% (RSD 2.03%)、96.50% (RSD 1.85%)、96.84% (RSD 1.16%)、97.62% (RSD 1.99%)、97.22% (RSD 1.05%)、98.00% (RSD 2.78%), 表明方法的精密度好。

2.2 金钱菇多糖的单糖组成分析

将 1.4 项制备得到的衍生化样品溶液按 1.2 项

表 1 6 种单糖的标准曲线方程

Table 1 Calibration curves of six monosaccharides

单糖 Monosaccharide	线性回归方程 Equation of linear regression	相关系数 R^2	线性范围 linear range (μ g)	相对偏差 RSD($n=5$) (%)
甘露糖 Man	$Y=4813.5x+328.69$	0.9983	0.231~2.31	1.57
核糖 Rib	$Y=3798.2x+222.47$	0.9974	0.192~1.92	2.23
鼠李糖 Rha	$Y=4823.6x+337.5$	0.9972	0.234~2.34	1.71
葡萄糖 Glc	$Y=2797.4x+94.473$	0.9945	0.254~2.54	1.04
半乳糖 Gal	$Y=3517.4x+233.9$	0.9978	0.231~2.31	2.83
木糖 Xyl	$Y=4305.5x+208.24$	0.9980	0.192~1.92	1.82

表 2 回收率测定结果

Table 2 Results of recovery test

单糖标准品	甘露糖 Man	核糖 Rib	鼠李糖 Rha	葡萄糖 Glc	半乳糖 Gal	木糖 Xyl
加入量	10	10	10	10	10	10
Addition (mg)	9.47	9.77	9.81	9.62	9.79	9.97
测得量	9.63	9.58	9.76	9.91	9.64	9.48
Measured amount (mg)	9.96	9.52	9.71	9.50	9.85	9.56
平均回收率	9.74	9.90	9.54	9.83	9.73	9.87
Average recovery rate (%)	97.38	96.50	96.84	97.62	97.22	98.00
相对偏差 RSD ($n=5$) (%)	2.03	1.85	1.16	1.99	1.05	2.78

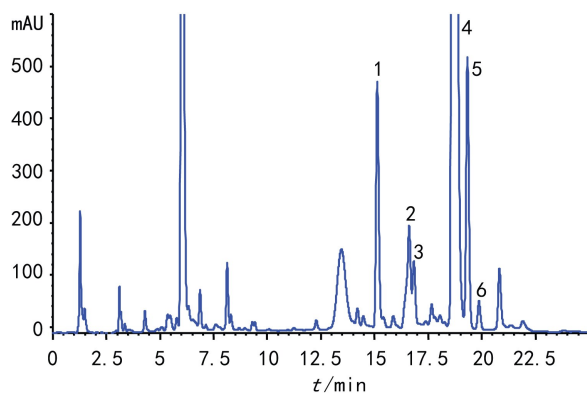


图 2 金钱菇多糖高效液相色谱图

1. 甘露糖; 2. 核糖; 3. 鼠李糖; 4. 葡萄糖; 5. 半乳糖; 6. 木糖。

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixture of *Lentinus edodes* polysaccharide

1. Man; 2. Rib; 3. Rha; 4. Glc; 5. Gal; 6. Xyl.

下色谱条件进样测定, 结果见图 2。由图 2 可知, 金钱菇多糖主要由甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖组成, 其摩尔为 1.00 : 0.90 : 0.91 : 28.03 : 1.58 : 0.11, 其中葡萄糖含量最高, 木糖含量最低。

3 结论

本文采用超声波辅助法提取金钱菇多糖,建立了柱前衍生化高效液相色谱法测定金钱菇多糖中单糖组分的方法。金钱菇多糖酸水解后的单糖组分经PMP衍生化,以常用的紫外检测器和C18柱分析了多糖的单糖组成。方法简便快速、准确可靠,可用于测定金钱菇多糖的单糖组成,也为其他多糖的单糖组成测定提供参考。

研究表明,金钱菇多糖含有甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖,其中葡萄糖含量最高,木糖含量最低。本研究也为进一步开发金钱菇产品提供了科学依据。

参考文献:

- Dang L(党蕾), Hao JX(郝佳欣), Jiang HT(江海涛). 2010. Comparison of the antioxidant activities of several mushroom polysaccharides(几种食用菌多糖抗氧化活性比较)[J]. *Anhui Agric Sci Bull*(安徽农学通报), **16**(5):76-77
- Fu HN(付海宁), Zhao X(赵峡), Yu GL(于广利), et al. 2008. Comparison of four chromatographic methods for monosaccharide composition analysis of *Dunaliella salina* polysaccharide(盐藻多糖单糖组成分析的四种色谱方法比较)[J]. *Chin J Marine Drug*(中国海洋药物杂志), **27**(4):30-34
- Geng Y(耿越), Wang JB(王建波), Liu JW(刘靛雯), et al. 2005. Determination of monosaccharide composition of maize pollen polysaccharides by HPCE(高效毛细管电泳法测定玉米花粉多糖中单糖的组成)[J]. *Chin Trad Herbal Drug*(中草药), **36**(3):164-166
- Guo SJ(郭守军), Yang YL(杨永利), She JB(余建保), et al. 2010. Determination of carbohydrates in seed gum of *Crotalaria mucronata* by HPLC(高效液相色谱法分析猪屎豆种子胶多糖中的单糖组成)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(3):422-425
- Han W(韩威), Jiang RZ(姜瑞芝), Chen YH(陈英红), et al. 2012. Comparison of three chromatographic methods for monosaccharide composition analysis of *Tremella polysaccharide*(银耳多糖单糖组成分析的三种色谱方法比较)[J]. *Nat Prod Res Devel*(天然产物研究与开发), **24**(3):359-361
- Honda S, Suzuki S, Taga A. 2003. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography [J]. *J Pharm Biom Anal*, **30**(6):1689-1714
- Hsu WK, Hsu TH, Li FY, et al. 2013. Separation, purification, and α -glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia[J]. *Carbohydr Polymer*, **92**(1):297-306
- Ji CF(汲晨锋), Ji YB(季宇彬). 2006. Determination of monosaccharide composition in mushroom polysaccharides by HPCE(高效毛细管电泳法测定香菇多糖中单糖的组成)[J]. *Chem Adhes*(化学与粘合), **28**(4):276-278
- Li J(李健), Liu N(刘宁), Chen P(陈平), et al. 2005. Determination of composition and content of monosaccharide in the mushroom polysaccharide(香菇多糖单糖组成及含量的测定方法研究)[J]. *Chem & Adhes*(化学与粘合), **27**(2):71-74
- Liu L(刘柳), Li L(李莉), Zhang QL(张庆林), et al. 2008. Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from *Urtica fissa* with microcrystalline cellulose thin layer chromatography(微晶纤维素薄层色谱法分析荨麻多糖中的单糖组成)[J]. *Chin J Experim Trad Med Form*(中国实验方剂学), **14**(6):17-18
- Lü Y, Yang XB, Zhao Y, et al. 2009. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection[J]. *Food Chem*, **112**(3):742-746
- Ma YH(马耀宏), Zheng L(郑岚), Yang JH(杨俊慧), et al. 2012. Analysis on monosaccharide composition of fungal polysaccharides by HPLC with pre-column derivatization(柱前衍生化 HPLC 法分析真菌多糖的单糖组成)[J]. *Food Sci Technol*(食品科技), **37**(1):254-259
- Rao JH(饶金华), Liu WY(刘文英), Jiang JY(江佳峪). 2007. Analysis of monosaccharide compositions in epimedium polysaccharide by precolumn derivation HPLC(柱前衍生化高效液相色谱法分析淫羊藿多糖中单糖的组成)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), **18**(2):366-368
- Song YH(宋叶涵), Li DM(李冬梅), Yang JF(杨静峰), et al. 2012. Comparison of three chromatographic methods for monosaccharide composition analysis of abalone gonad polysaccharide(三种色谱法分析鲍鱼生殖腺多糖的单糖组成)[J]. *Food & Mach*(食品与机械), **28**(2):44-47
- Sun L(孙莲), MaHe MT(马合木提), Zeng LL(曾玲力), et al. 2010. Determination of monosaccharide compositions and contents in polysaccharide of *Brassica rapa* by Pre-column derivatization-HPLC(柱前衍生化 HPLC 测定新疆芜菁多糖中的单糖)[J]. *West Chin J Pharm Sci*(华西药学杂志), **25**(2):171-172
- Xu CP(许春平), Xiao Y(肖源), Zhao YQ(赵亚奇), et al. 2013. The application of cigarette flavor prepared from *Lentinus edodes*(金钱菇香料的制备及其在卷烟中的应用研究)[J]. *Acad Period Farm Prod Process*(农产品加工), **1**:34-36
- Yan J(颜军), Guo XQ(郭晓强), Li XG(李晓光), et al. 2006. TLC to fleetly analyze monosaccharide composition of polysaccharide(TLC 快速分析多糖的单糖组成)[J]. *Food Sci*(食品科学), **27**(12):603-605
- Zhang L, Xu J, Zhang L, et al. 2003. Determination of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography[J]. *J Chromatogr B*, **793**(1):159-165
- Zhang LZ(张丽芝), Shen R(沈荣). 2013. Research advance of monosaccharide composition analysis(单糖组成分析方法的研究进展)[J]. *Progr Microbiol Immunol*(微生物学免疫学进展), **41**(1):77-81