

ASE 快速溶剂萃取与测定青海十六种高寒植物中多糖含量

谭 亮, 冀 恬, 耿丹丹, 胡凤祖*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

摘要: 本研究采用快速溶剂萃取法(ASE)提取青海十六种高寒植物中的多糖,并建立了苯酚-硫酸法测定其多糖含量。使用 ASE350 通过在线净化过程加入乙醚除去样品中的脂类物质,加入 75% 乙醇在线除去游离单糖、低聚糖和糖醛酸,同时对样品进行脱色。继续加入蒸馏水用 ASE 在线提取出样品中的多糖。离心除去由淀粉溶胀糊化形成的胶体物质,上清液加入 Sevag 试剂除去蛋白质,试液依次加入 5% 苯酚溶液和浓硫酸显色。以蒸馏水做空白对照,在 490 nm 处测定吸光度,同时采用水提醇沉法进行多糖换算因子的测定。结果表明,各样品多糖在 0.01 ~ 0.10 mg 范围内具有良好的线性关系($r=0.9996$),平均加样回收率为 97.26%,RSD 为 0.53% ($n=9$)。该方法简便、准确、稳定性和重现性好,适用于测定植物样品中多糖的含量,可为青海高寒植物的质量控制提供依据。

关键词: 快速溶剂萃取;在线除杂质和提取;苯酚-硫酸法;青海高寒植物;多糖;含量测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Accelerated Solvent Extraction and Determination of Polysaccharides in 16 Alpine Plants from Qinghai

TAN Liang, JI Tian, GENG Dan-dan, HU Feng-zu*

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

Abstract: In this study, an accelerated solvent extraction (ASE) method was developed for extraction of polysaccharides in 16 alpine plants from Qinghai. A phenol-vitriolic colorimetry method was set up for determination of polysaccharides contents. The lipids were removed using ASE350 with diethyl ether through on-line purification. Monosaccharides, oligosaccharides and uronic acid were on-line removed with 75% aqueous ethanol, meanwhile the samples were bleached with it. The plant polysaccharides were continuously on-line extracted by distilled water through ASE. Colloidal substances that were formed by swelling of gelatinized starch were removed by centrifugation, proteins in the supernatant were removed with Sevag reagent. The 5% phenol solution and concentrated sulfuric acid were sequentially added in the test solutions for chromogenic reaction. The absorbance was monitored at 490 nm using distilled water as blank. Polysaccharide conversion factors were measured. The results indicated that the linear response range of polysaccharides in samples was 0.01 ~ 0.10 mg ($r=0.9996$). The average recovery ($n=9$) was 97.26% and RSD was 0.53%. The assay demonstrated that the method was simple, accurate, stable and reproducible. It was suitable for the determination of polysaccharides in plant samples. In addition, it can be used to assist the quality evaluation of alpine plants from Qinghai.

Key words: accelerated solvent extraction; on-line remove impurities and extract; phenol-vitriolic colorimetry method; alpine plants from Qinghai; polysaccharide; assay

植物多糖又称植物多聚糖,是植物细胞代谢产生的聚合度为 10 以上的多聚糖,它是由许多相同或不同的酮糖或醛糖以 α -或 β -糖苷键连接在一起组成的天然高分子化合物^[1,2],已不具有甜味,其性质

与单糖有很大不同。与蛋白质、脂类形成的糖蛋白、脂多糖在细胞的识别、分泌以及在蛋白质的加工、转移方面起着不容忽视的作用^[3]。植物多糖具有免疫调节、抗病毒、抗氧化、降血糖、降血脂、防御艾滋病病毒等生理功能^[4,5],且对机体毒副作用小,可作为药物用于临床治疗。

目前,多糖含量测定的方法有很多,主要有:苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、碱性酒石酸铜溶液滴定

收稿日期:2014-06-03

接受日期:2014-9-23

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J-26);农产品安全检测公共技术服务项目(2012-T-Y19)

* 通讯作者 Tel:86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.cas.cn

法、乙酰丙酮-对二甲基苯甲醛法、高效毛细管电泳法、气相色谱法、高效液相色谱法等^[6-11]。蒽酮-硫酸法几乎可以测定所有的碳水化合物,所以用该法测出的结果偏高;碱性酒石酸铜溶液滴定法、乙酰丙酮-对二甲基苯甲醛法需配制较多试剂,高效毛细管电泳法、气相色谱法还需要进行柱前衍生,操作繁琐、费时;高效液相色谱法存在柱平衡时间长、色谱柱易污染、试剂消耗大等问题;苯酚-硫酸法是常用测定多糖含量方法,可用于甲基化的糖、戊糖和多聚糖的测定,方法简单、灵敏度高。采用苯酚-硫酸法测定的文献屡见不鲜,但前处理方法各有不同:(1)先采用碱性铜试剂从其他大分子物质中沉淀出葡聚糖后进行苯酚-硫酸法测定^[12];(2)先采用苯酚-硫酸法测定总糖含量,然后用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定还原糖,二者之差即为多糖含量^[13];(3)样品超声除游离糖、除去蛋白质后采用苯酚-硫酸法测定^[14];(4)样品采用水提醇沉法沉淀多糖,多糖复溶后除去蛋白质后采用苯酚-硫酸法测定^[15]。方法(1)、(2)需要配制较多的试剂,操作繁杂、费时;方法(3)未考虑到样品含脂肪、淀粉较多和多糖是非均一多糖的情况;方法(4)未考虑到含游离糖和蛋白质较多的样品,同时也未考虑到多糖是非均一多糖的情况。按这些方法操作结果势必存在较大偏差。

ASE 是指在密闭容器内于一定温度(50~200℃)和压力(1000~3000psi 或 10.3~20.6MPa)条件下,在短时间内用有机溶剂提取固体或半固体样品的一种新型样品前处理方法^[16]。与超声、微波、回流、超临界萃取等成熟方法相比,ASE 有溶剂用量

少、提取时间短、萃取效率高、操作简单方便、安全和自动化程度高等优点^[17]。本文使用 ASE350 快速溶剂萃取仪在线除去样品中的脂类物质和游离单糖、低聚糖和糖醛酸,并在线提取出样品中的多糖,建立了苯酚-硫酸法测定青海十六种高寒植物中多糖含量的方法。结果表明该方法简单、准确、稳定、重现性好,可为青海高寒植物的质量控制提供了一定参考,为青海高寒植物的研究与开发利用提供了科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

青海高寒植物:自青海省不同产地收集 16 种高寒植物(每种 3 批)见表 1,经中国科学院西北高原生物研究所分析测试中心胡风祖教授鉴定确认为正品。样品预处理:将收集的样品阴干,粉碎,过 40 目筛,装入密封袋中密封,置干燥器中保存。

D-无水葡萄糖标准品(批号:110833-201205,中国药品生物制品检定所);乙醚、无水乙醇、丙酮、三氯甲烷、正丁醇(天津市百世化工有限公司);苯酚(天津市光复精细化工研究所);浓硫酸(甘肃白银瑞斯物资贸易有限公司),以上化学试剂均为分析纯。

ASE350 快速溶剂萃取仪(美国 DIONEX 公司,配备有 34 mL 不锈钢萃取池);Cary300Bio 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司);MS205DU 型分析电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);TGL-16C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

表 1 青海不同产地的 16 种高寒植物样品(n=3)

Table 1 Sixteen alpine plants samples collected in different habitats from Qinghai(n=3)

编号 No.	高寒植物名称 Name	产地 Origin	编号 No.	高寒植物名称 Name	产地 Origin
1	黑果枸杞 <i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	青海格尔木市大格勒乡 Dagele, Geermu, Qinghai	9	绿萝花 Araceae	青海共和县恰卜恰镇 Qiabuqia, Gonghe, Qinghai
2	红果枸杞 <i>Lycium barbarum</i> L.	青海德令哈市塔湾克里 Tawakeli, Delingha, Qinghai	10	蕨麻 <i>Potentilla anserina</i> L.	青海刚察县哈尔盖镇 Haergai, Gangcha, Qinghai
3	唐古特大黄 <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf.	青海玛沁县大武镇 Dawu, Maqing, Qinghai	11	藏木香 <i>Inula racemosa</i> Hook. f.	青海大同县宝库乡 Baoku, Datong, Qinghai
4	掌叶大黄 <i>Rheum palmatum</i> L.	青海玛沁县大武镇 Dawu, Maqing, Qinghai	12	青稞 <i>Hordeum vulgare</i> Linn. var. nudum Hook. f.	青海互助县边滩乡 Biantan, Huzhu, Qinghai
5	黄蘑菇 <i>Russula lutea</i> (Huds.) Fr.	青海门源县皇城乡 Huangcheng, Menyuan, Qinghai	13	燕麦 <i>Avena sativa</i> Linn.	青海达日县建设乡 Jianshe, Dari, Qinghai
6	黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge.	青海湟中县拦隆口镇 Lanlongkou, Huangzhong, Qinghai	14	羊肚菌 <i>Morchella esculenta</i> (L.)	青海大通县桥头镇 Qiaotou, Datong, Qinghai

7	红景天 <i>Rhodiola rosea</i> L.	青海河南县吉岗山 Jigang Mountain, Henan, Qinghai	15	昆仑雪菊 <i>Dendranthema indicum</i> (Linn.) Des Moul.	青海和田民丰县安迪尔村 Andier, Hetianmingfeng, Qinghai
8	冬虫夏草 <i>Cordyceps sinensis</i> (Berk.) Sacc.	青海囊谦县东坝乡 Dongba, Nangqian, Qinghai	16	肉苁蓉 <i>Cistanche deserticola</i> Ma.	青海乌兰县柯柯镇 Keke, Wulan, Qinghai

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖标准溶液的配制与标准曲线的绘制

称取 D-无水葡萄糖 10 mg, 精密称定, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入蒸馏水使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 (实际浓度为 0.1000 mg/mL)。分别精密移取上述葡萄糖标准溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 25 mL 具塞试管中, 加蒸馏水补至 2.0 mL, 摇匀。加入 1.0 mL 5% 苯酚溶液, 摇匀, 缓慢加入 5.0 mL 浓硫酸, 摇匀后室温下放置 5 min, 再置沸水浴中加热 10 min。另取 2.0 mL 蒸馏水同法进行空白对照试验, 采用紫外分光光度法于 490 nm 处测吸光度。以吸光度 (A) 为纵坐标, 葡萄糖质量 (m) 为横坐标进行回归分析, 绘制标准曲线。

1.2.2 供试品溶液的制备

称取 3 份同一植物样品粉末 0.500 g, 精密称定, 与硅藻土拌匀后填入仪器配备的 34 mL 不锈钢萃取池中。在室温条件下用乙醚静置提取 8 min, 循环提取 1 次, 弃去乙醚提取液。在室温条件下用 75% 乙醇静置提取 12 min, 循环提取 1 次, 弃去 75% 乙醇提取液。继续在 80 °C 条件下用蒸馏水静置提取 15 min, 循环提取 1 次。水提取液冷却至室温, 定容至 250 mL, 静置过夜。在 9000 rpm 转速下离心 5 min, 移取 3 mL 上清液, 加入 Sevag 试剂 ($V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$) 3 mL, 剧烈振荡使其充分混合, 在 9000 rpm 转速下离心 5 min, 弃去中间变性蛋白层和下层有机层, 上层水相继续重复上述操作直至水相与有机相中间无变性蛋白出现为止。将该溶液按实际情况稀释后, 精密移取该溶液一定量按上述“1.2.1”项下内容显色, 并于 490 nm 处测吸光度, 从标准曲线中求出供试液中葡萄糖的含量, 再折算回供试品中葡萄糖含量。

1.2.3 多糖换算因子的测定

另称取植物粉末约 10 g, 精密称定, 与硅藻土拌匀后填入仪器配备的 34 mL 不锈钢萃取池中, 用蒸馏水提取操作同“1.2.2”项下内容, 离心弃去上层油脂层和沉淀物, 中间水层加热浓缩至约 20 mL, 加入 Sevag 试剂离心除去蛋白质。上清液按 1:4 (v/v) 比例加入无水乙醇, 充分振摇, 置冰箱中冷藏过夜以沉淀多糖。次日离心, 弃去上清液, 移出沉淀置于

研钵中依次加入 80% 乙醇、无水乙醇和丙酮各洗涤 3 次, 除去有机溶剂后挥干沉淀, 直至成粉末状。置于 60 °C 烘箱真空干燥, 制得各植物多糖。称取制得的各植物多糖 20 mg, 精密称定, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入蒸馏水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为植物多糖储备溶液。将该溶液按具体情况稀释后, 精密移取该溶液一定量按上述“1.2.1”项下内容显色, 并于 490 nm 处测吸光度, 从标准曲线中求出供试液中葡萄糖的质量。按式 $f = m/C \cdot D$ 计算多糖换算因子, 其中: m 为称取植物多糖的质量 (mg), C 为由标准曲线求得的多糖液中葡萄糖的质量 (mg), D 为多糖的稀释倍数。

1.2.4 植物样品中多糖的含量测定

按“1.2.2”求出供试品中葡萄糖的含量, 按“1.2.3”求出多糖换算因子, 植物样品多糖含量 (%) = 供试品中葡萄糖的含量 (%) \times 多糖换算因子。

1.2.5 方法学验证试验

1.2.5.1 专属性试验

精密移取上述 0.1000 mg/mL 葡萄糖标准溶液 0.5 mL 置于 25 mL 具塞试管中, 加蒸馏水补至 2.0 mL, 摇匀, 按“1.2.1”项下内容进行显色。另取 2.0 mL 蒸馏水同法进行空白对照试验, 分别将蒸馏水、显色后的蒸馏水和对照品溶液在紫外-可见分光光度计进行全波长扫描 (300 ~ 800 nm)。

1.2.5.2 稳定性试验

取已制备好的样品溶液 (No. 1, 格尔木市大格勒乡黑果枸杞) 0.5 mL, 置于 25 mL 具塞试管中, 加蒸馏水补至 2.0 mL, 摇匀。按“1.2.1”项下内容显色后, 室温下放置, 于 490 nm 处每隔 15 min 测定一次吸光度, 计算 RSD 值, 检测溶液的稳定性。

1.2.5.3 重现性试验

准确吸取同一植物所提取的多糖试液 (No. 1, 按称样量正好为 0.500 g 计算供试液葡萄糖浓度为 52.8 $\mu\text{g/mL}$) 5 份, 每份 0.5 mL, 分别置于 5 支 25 mL 具塞试管中, 加蒸馏水补至 2.0 mL, 摇匀。按“1.2.1”项下内容显色后, 分别于 490 nm 处测定吸光度, 计算 RSD 值, 检测方法的重现性。

1.2.5.4 回收率试验

采用加样回收法,称取已知多糖含量的植物样品(No. 1)粉末 9 份,每份 0.250 g,精密称定,按“1.2.2”项下内容制备好后,分别精密移取 0.1 mL 上述供试液(按称样量正好为 0.250 g 计算供试液葡萄糖浓度为 26.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)置于 9 支 25 mL 具塞试管中,按低、中、高含量再次分别精密加入葡萄糖标准稀释溶液(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)0.5、1.0、1.5 mL,每一含量 3 份,加蒸馏水补至 2.0 mL,摇匀。按“1.2.1”项下内容显色后,分别于 490 nm 处测定吸光度,计算平均回收率和 RSD 值,检测方法的回收率。

1.2.5.5 定量限和检测限

依据 ICH 指导原则中 Q2(R1)分析方法的验证方法学内容,根据一定量空白响应的标准偏差(σ)和被测物标准曲线的斜率(S)来计算定量限($QL = 10\sigma/S$)和检测限($DL = 3.3\sigma/S$)。按“1.2.1”项下操作步骤绘制标准曲线以确定斜率 S ,另移取 10 份 2.0 mL 蒸馏水同法进行空白样品试验,于 490 nm 处测吸光度,求出这 10 份空白样品响应值的标准偏差 σ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及回归方程

以吸光度(A)为纵坐标,葡萄糖质量(m)为横坐标绘制标准曲线。结果葡萄糖标准品质量在 0.01 ~ 0.10 mg 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 8.0428x + 0.0668$ ($r = 0.9996$)。

2.2 ASE 除杂质和提取最佳条件的考察

利用 SPSS16.0 统计软件,对 16 种高寒植物除去脂类成分、除去游离单糖、低聚糖和糖醛酸以及多糖提取的最佳条件统计分析,进行正交试验设计。

2.2.1 除去脂类物质最佳条件考察

以脂类物质含量最高的冬虫夏草为试验对象,考察了(1)提取溶剂:石油醚、二氯甲烷、三氯甲烷和乙醚;(2)静置提取时间:2、5、8、11、15 min;(3)循环提取次数:1、2、3 次。由于各单因素之间有相互交叉影响,在单因素试验的基础上设计了三因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表 2。由结果可知最佳提取工艺为 $A_3B_2C_1$,即:在室温条件下用乙醚静置提取 8 min,循环提取 1 次时除去脂类物质效率最高。此外,结果还显示影响样品中脂类物质提取效果的各因素主次顺序为: $A > B > C$,表明提取溶剂对样品中脂类物质的提取最重要。

表 2 除脂 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test $L_9(3^4)$ of removing lipids

试验号 Test No.	因素 Factor			脂类物质得率 Yield of lipids(%)
	A 提取溶剂 Extraction solvent	B 静置提取时间 Static extraction time(min)	C 循环提取次数 Extraction number of cycles	
1	3(乙醚 Ethyl ether)	3(11 min)	1(1 次)	8.32
2	1(二氯甲烷 Dichloromethane)	2(8 min)	3(3 次)	6.55
3	3(乙醚 Ethyl ether)	1(5 min)	3(3 次)	6.75
4	1(二氯甲烷 Dichloromethane)	3(11 min)	2(2 次)	6.07
5	2(三氯甲烷 Chloroform)	3(11 min)	3(3 次)	6.89
6	3(乙醚 Ethyl ether)	2(8 min)	2(2 次)	9.00
7	2(三氯甲烷 Chloroform)	2(8 min)	1(1 次)	7.02
8	2(三氯甲烷 Chloroform)	1(5 min)	2(2 次)	6.00
9	1(二氯甲烷 Dichloromethane)	1(5 min)	1(1 次)	6.14
K_1	18.76	18.89	21.48	
K_2	19.91	22.57	21.07	
K_3	24.07	21.28	20.19	
R	5.32	3.68	1.30	

2.2.2 除去游离单糖、低聚糖和糖醛酸最佳条件考察

以糖类成分含量最高的红果枸杞为试验对象,考察了(1)提取温度:室温、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$;(2)静置提取时间:3、6、9、12、15 min;(3)循环提取次数:1、

2、3 次。在单因素试验的基础上设计了三因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表 3。由结果可知最佳提取工艺为 $A_1B_2C_1$,即:在室温条件下用 75% 乙醇静置提取 12 min,循环提取 1 次时提取效率最高。

此外,结果还显示影响样品中这些糖类成分提取效果
的各因素主次顺序为: $B > A > C$, 表明静置提取时

间对样品中游离单糖、低聚糖和糖醛酸提取率影响
最大。

表 3 除游离单糖、低聚糖和糖醛酸 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test $L_9(3^4)$ of removing monosaccharides, oligosaccharides and uronic acid

试验号 Test No.	因素 Factor			糖类物质得率 Yield of saccharides(%)
	A 提取温度 Extraction temperature(℃)	B 静置提取时间 Static extraction time(min)	C 循环提取次数 Extraction number of cycles	
1	3(50℃)	3(15 min)	1(1次)	48.78
2	1(室温)	2(12 min)	3(3次)	50.07
3	3(50℃)	1(9 min)	3(3次)	47.36
4	1(室温)	3(15 min)	2(2次)	49.24
5	2(40℃)	3(15 min)	3(3次)	48.59
6	3(50℃)	2(12 min)	2(2次)	49.95
7	2(40℃)	2(12 min)	1(1次)	50.15
8	2(40℃)	1(9 min)	2(2次)	47.93
9	1(室温)	1(9 min)	1(1次)	48.31
K_1	147.6	143.6	147.2	
K_2	146.7	150.2	147.1	
K_3	146.1	146.6	146.0	
R	1.53	6.56	1.23	

2.2.3 提取多糖最佳条件考察

以多糖含量最高的藏木香为试验对象,考察了
(1)提取温度:室温、60、70、80、90℃;(2)静置提取
时间:5、10、15、20、30 min;(3)循环提取次数:1、2、3
次。在单因素试验的基础上设计了三因素三水平
 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表4。由结果可知最佳提

取工艺为 $A_2B_2C_1$,即:在80℃条件下用蒸馏水静置
提取15 min,循环提取1次时提取多糖效率最高。
此外,结果还显示影响样品中多糖提取效果的各因
素主次顺序为: $A > B > C$,表明提取温度对样品中多
糖提取率影响最大。

表 4 提取多糖 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test $L_9(3^4)$ of extracting polysaccharides

试验号 Test No.	因素 Factor			多糖得率 Yield of polysaccharides(%)
	A 提取温度 Extraction temperature(℃)	B 静置提取时间 Static extraction time(min)	C 循环提取次数 Extraction number of cycles	
1	3(90℃)	3(20 min)	1(1次)	16.13
2	1(70℃)	2(15 min)	3(3次)	15.99
3	3(90℃)	1(10 min)	3(3次)	15.87
4	1(70℃)	3(20 min)	2(2次)	15.86
5	2(80℃)	3(20 min)	3(3次)	16.24
6	3(90℃)	2(15 min)	2(2次)	16.18
7	2(80℃)	2(15 min)	1(1次)	16.30
8	2(80℃)	1(10 min)	2(2次)	16.12
9	1(70℃)	1(10 min)	1(1次)	15.86
K_1	47.71	47.85	48.29	
K_2	48.66	48.47	48.16	
K_3	48.18	48.23	48.10	
R	0.95	0.62	0.19	

2.3 植物样品多糖测定结果

采用改进的苯酚-硫酸法测定 16 种青海高寒植物中多糖的含量结果见表 5。由表 5 可知:各高寒植物多糖换算因子和最终的多糖含量各不相同。其中,藏木香、蕨麻和肉苁蓉的多糖含量较高,三者均

超过 10%;其次是黄蘑菇、黄芪和羊肚菌,多糖含量在 9% 左右;红果枸杞、唐古特大黄、掌叶大黄、红景天、冬虫夏草和青稞多糖含量在 7% 左右;黑果枸杞、绿萝花、燕麦和昆仑雪菊多糖含量较低,含量在 3% 左右。

表 5 青海不同产地的 16 种高寒植物中多糖含量测定结果 (n = 3)

Table 5 Determination results of 16 alpine plants samples collected in different habitats from Qinghai (n = 3)

高寒植物名称 Name of alpine plants	多糖换算因子 Conversion factor	多糖含量 Contents of polysaccharides (%)	高寒植物名称 Name of alpine plants	多糖换算因子 Conversion factor	多糖含量 Contents of polysaccharides (%)
黑果枸杞 <i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	1.029	2.64	绿萝花 Araceae	0.918	2.33
红果枸杞 <i>Lycium barbarum</i> L.	2.905	7.15	蕨麻 <i>Potentilla anserina</i> L.	2.863	12.02
唐古特大黄 <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf.	1.442	7.30	藏木香 <i>Inula racemosa</i> Hook. f.	0.937	16.31
掌叶大黄 <i>Rheum palmatum</i> L.	1.835	6.43	青稞 <i>Hordeum vulgare</i> Linn. var. nudum Hook. f.	0.942	6.88
黄蘑菇 <i>Russula lutea</i> (Huds.) Fr.	1.777	9.89	燕麦 <i>Avena sativa</i> Linn.	0.952	3.27
黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge.	3.072	8.32	羊肚菌 <i>Morchella esculenta</i> (L.)	1.705	8.38
红景天 <i>Rhodiola rosea</i> L.	2.915	6.33	昆仑雪菊 <i>Dendranthema indicum</i> (Linn.) Des Moul.	1.594	3.78
冬虫夏草 <i>Cordyceps sinensis</i> (Berk.) Sacc.	1.520	6.11	肉苁蓉 <i>Cistanche deserticola</i> Ma.	2.785	12.50

2.4 方法学验证试验结果

2.4.1 检测波长的选择及专属性试验

蒸馏水、显色后的蒸馏水以及显色后的对照品溶液在 300 ~ 800 nm 范围内的全波长扫描图如图 1 所示。由图 1 可知,显色后的对照品溶液在 490 nm 处有最大吸收峰,而蒸馏水和显色后的蒸馏水在 490 nm 处均无吸收,说明不存在空白干扰,试验方法的专属性良好,故选择 490 nm 作为检测波长。

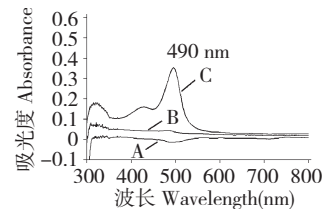


图 1 蒸馏水(A)、显色后蒸馏水(B)与显色后对照品溶液(C)的全波长扫描图(300 ~ 800 nm)

Fig. 1 Full wavelength scanning spectrum of distilled water (A), distilled water after chromogenic reaction (B) and reference substance solution after chromogenic reaction (C) (300 ~ 800 nm)

2.4.2 稳定性试验

取已制备好的样品溶液(No. 1)显色后,室温下每隔 15 min 于 490 nm 处测定吸光度,结果见表 6。结果表明样品溶液显色后在 60 min 内溶液的稳定性良好。

表 6 稳定性试验结果

Table 6 Results of stability test

时间 Time (min)	15	30	45	60	75	平均吸光度(60 min 内) Mean absorbance (within 60 minutes)	RSD (%)
吸光度值 Absorbance	0.3694	0.3733	0.3751	0.3779	0.3886	0.3739	0.95

2.4.3 重现性试验

准确吸取同一植物所提取的多糖试液(No. 1)5

份,显色后于 490 nm 处测定吸光度,结果见表 7。结果表明检测方法的重现性良好。

表7 重现性试验结果($n=5$)Table 7 Results of reproducibility test($n=5$)

时间 Time (min)	1	2	3	4	5	平均吸光度 Mean absorbance	RSD(%)
吸光度值 Absorbance	0.3667	0.3778	0.3816	0.3711	0.3757	0.3746	1.55

2.4.4 回收率试验

在9份已知多糖含量的同一植物样品溶液(No. 1, 每份0.1 mL)中按低、中、高含量分别精密

加入葡萄糖标准稀释溶液(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 显色后分别于490 nm处测定吸光度, 结果见表8。结果表明检测方法具有良好的准确性。

表8 回收率试验结果($n=9$)Table 8 Results of recovery test($n=9$)

样品编号 Sample No.	原有葡萄糖含量 Original amount (μg)	加入葡萄糖含量 Added amount (μg)	测得葡萄糖含量 Detected amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Mean recovery (%)	RSD(%)
1	2.650	1.0	3.620	97.05		
2	2.635	1.0	3.599	96.38		
3	2.638	1.0	3.612	97.45		
4	2.645	2.0	4.604	97.93		
5	2.645	2.0	4.583	96.91	97.26	0.53
6	2.651	2.0	4.590	96.96		
7	2.640	3.0	5.555	97.17		
8	2.644	3.0	5.577	97.76		
9	2.642	3.0	5.574	97.73		

2.4.5 定量限和检测限

由标准曲线得出S, 10份空白样品响应值求出

标准偏差 σ 。根据计算公式求出定量限和检测限, 结果见表9。

表4 定量限和检测限试验结果($n=10$)Table 4 Results of quantitation limit and detection limit($n=10$)

空白样品编号 Blank samples No.	1	2	3	4	5	σ	定量限 QL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测限 DL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
吸光度值 Absorbance	0.0034	0.0037	0.0040	0.0036	0.0042	2.85×10^{-4}	0.177	0.058
空白样品编号 Blank samples No.	6	7	8	9	10			
吸光度值 Absorbance	0.0035	0.0040	0.0042	0.0039	0.0041			

3 讨论与结论

3.1 ASE快速溶剂萃取的优势

在苯酚-硫酸法测定多糖含量时, 除多糖以外的杂质如脂肪、游离糖、蛋白质等, 会使得苯酚-硫酸显色更深, 测定结果偏高, 所以样品前处理过程中除去杂质是非常关键的, 本文对前处理过程做了一定改进: (1) 本文使用ASE350快速溶剂萃取仪在线除去样品中的脂类物质和游离单糖、低聚糖和糖醛酸, 并在线提取出样品中的多糖。通过对ASE最佳提取

工艺条件的考察, 除去杂质和提取多糖总共只用了35 min, 且所用的试验材料只用了0.5 g, 而其他两种方法除杂质和提取多糖都需耗时至少1.5 h, 且试验材料需要用1 g左右; (2) 试验操作过程从两次除杂到最后的提取步骤, 使用ASE350在线操作使得这些步骤均只发生于同一个34 mL的不锈钢萃取池中, 避免了如溶剂浸提法和超声提取法中由于过滤、转移、淋洗等操作而造成的样品损失。

3.2 测定多糖换算因子是关键

由含量测定结果可知各高寒植物多糖换算因子

各不相同,分析其原因与形成多糖的各单糖有关。对于均一多糖而言,水解后只形成一种单糖,显色也是均一的;而非均一多糖水解后可形成多个不同单糖,各单糖与显色剂显色深浅是不一样的。理论上果糖显色最深,葡萄糖次之,半乳糖和甘露糖显色较浅,而五碳糖显色最浅,不可想当然地认为非均一多糖显色程度是其某一个单糖显色程度的叠加。所以在不清楚组成多糖的各单糖的情况下,测定时一定要考虑多糖换算因子,并将其折算入最终的结果当中。

为使沉淀的多糖纯度较高而不影响多糖换算因子的测定,在沉淀多糖前处理操作步骤中增加了水提定容后静置以除去由淀粉所形成的聚合变大的胶体,同时除去上层的油脂层。并在沉淀多糖前先加入 Sevag 试剂除去蛋白质,以使得沉淀的多糖纯度较高,若先进行醇沉多糖会将蛋白质包裹在内,复溶后再除蛋白质时蛋白质就会因暴露不完全而除不净,影响最终的测定结果。

3.3 结论

本研究对苯酚-硫酸法做了一定改进,使用 ASE350 快速溶剂萃取仪在线除去样品中的脂类物质和游离单糖、低聚糖和糖醛酸,并在线提取出样品中的多糖,提取液静置过夜,离心除去由淀粉溶胀糊化形成的胶体物质,建立了苯酚-硫酸法测定青海十六种高寒植物中多糖含量的方法。结果表明该方法简便、准确、稳定、重现性好,适用于测定植物样品中多糖的含量,可为青海高寒植物的质量控制提供依据。

参考文献

- 1 Chen JH(陈继红), Wang CZ(王成章), Wang YH(王彦华), *et al.* Application of polysaccharide in animal production. *Feed Rev*(饲料博览), 2006, 3: 9-11.
- 2 Fang JN(方积年). Structure analysis of polysaccharide. *Foreign Med Sci Pharm*(国外医学·医学分册), 1981, 7: 222-228.
- 3 Xu YY(许燕燕). Extraction methods and techniques of polysaccharides. *J Fujian Fisheries*(福建水产), 2006, 3: 32-36.
- 4 Wang XR(王希尧). Research into pharmacodynamic function of the polysaccharide. *J Benxi Coll Metall*(本溪冶金高等专科学校学报), 2003, 5: 6-8.
- 5 Chen JT(陈家童). Study on the anti-aids effects of rhodo-

- phyta polysaccharide(RP) *in vitro*. *J Nankai Univ*(南开大学学报), 1998, 31: 21-24.
- 6 Lai YB(来永斌), Wang Q(王琦), Sun Y(孙月). Determination and analysis of *Cordyceps Militaris*(Fr) link's amylose content. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2001, 23: 517-518.
- 7 Qi XM(漆小梅), Bai YE(白云娥). Determination of polysaccharide contents in *Cordyceps hawkesii* Gray. *J Shanxi Med Univ*(山西医科大学学报), 1999, 30: 22-23.
- 8 Zhou R(周蓉), Qi L(齐莉), Wang YF(王雅芬), *et al.* Separation and identification of monosaccharides in polysaccharides of *Lycium barbarum* L. by using HPCE method. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1998, 18: 323-324.
- 9 Li H(李辉), Jia HX(贾宏新), Lu GH(卢桂华). Study on the determination of chitosan by using spectrophotometric method. *China Public Health*(中国公共卫生), 2002, 18: 1248-1249.
- 10 Xie XB(谢小波), Li GZ(李桂贞). Determination of Konjac Glucomannan by high performance liquid chromatography. *J East China Univ Sci Technol*(华东理工大学学报), 2002, 28: 406-409.
- 11 Yu C(于村), Ding GQ(丁钢强), Yu S(俞莎), *et al.* Study on methodology of determination of polysaccharide in mushrooms. *China Public Health*(中国公共卫生), 2000, 16: 245-246.
- 12 Wu XB(武晓滨), Gai W(盖巍), Gao H(高虹). Study on determination of *Ganoderma* polysaccharides. *Liaoning Chem Ind*(辽宁化工), 2008, 37: 283-284.
- 13 Zhao HX(赵海霞), Yuan D(袁丁), He YM(何毓敏), *et al.* Quantitative determination of *Panax japonicus* polysaccharide by DNS method. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2010, 31: 327-329.
- 14 Guo XQ(郭小群). Determination of polysaccharides by phenol-sulfuric acid colorimetric method. *Guangdong Chem Ind*(广东化工), 2010, 37: 207, 214.
- 15 Yang XQ(杨贤庆), Liu MQ(刘名求), Qi B(戚勃), *et al.* Comparison of methods in determination of polysaccharide in *Gracilaria lemaneiformis*. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2013, 34: 54-57.
- 16 Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, *et al.* Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal Chem*, 1996, 68: 1033-1039.
- 17 Mou SF(牟世芬), Liu YJ(刘勇建). The principle and application of accelerated solvent extraction. *Mod Sci Inst*(现代科学仪器), 2001, 3: 18-20.