

HPLC-ELSD 法测定不同炮制方法雪莲果中低聚果糖的含量

郝 婷, 尹志峰, 王小青, 高 杨, 王良友*

河北省中药研究与开发重点实验室 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000

摘要: 本文建立了雪莲果低聚果糖的 HPLC-ELSD 测定方法, 分析不同炮制方法雪莲果中低聚果糖的含量。用不同方法处理新鲜雪莲果, 然后超声提取雪莲果粉末中低聚果糖, 采用 HPLC-ELSD 测定, 色谱柱: 华谱 XAmide (4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈: 水 = 75: 25, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测器: ELSD, 漂移管温度 70 °C。方法学考察结果表明, 蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖在 0.406 ~ 2.030 mg/mL、0.420 ~ 2.100 mg/mL、0.456 ~ 2.280 mg/mL 范围内呈良好线性关系, 平均回收率分别为 101.4%、99.7%、98.6%, RSD 分别为 1.53%、1.29%、2.81%。该方法稳定、可靠、精密度高、重复性好, 不同处理方法所得雪莲果粉末中 3 种低聚果糖的含量差别较大, 其中用清水漂洗 0.5 h, 然后冷冻干燥所得雪莲果粉末中的低聚果糖含量最高。

关键词: 雪莲果; 低聚果糖; HPLC-ELSD; 不同炮制方法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.017

Determination of Fructooligosaccharides in *Smallanthus sonchifolius* from Different Processing Methods by HPLC-ELSD

HAO Ting, YIN Zhi-feng, WANG Xiao-qing, GAO Yang, WANG Liang-you*

Institute of Traditional Chinese Materia Medica of Chengde Medical College, Key Laboratory of Study and Exploiture for Traditional Chinese Medicine, Hebei Chengde 067000, China

Abstract: A new HPLC-ELSD method was established to analyze the content of fructooligosaccharides [include 1-Kestose (GF₂), Nystose (GF₃) and 1^F-Fructofuranosyl-nystose (GF₄)] in *Smallanthus sonchifolius* with different processing methods. The content of fructooligosaccharides was determined by HPLC-ELSD. Chromatographic separation was performed on X Amide column (4.6 × 250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-water (75: 25) at a flow rate of 1 mL/min, the drift tube temperature was set at 70 °C. A good resolution and linear range were obtained under this HPLC-ELSD condition. The linear ranges of GF₂, GF₃ and GF₄ were determined to be 0.406-2.030 mg/mL, 0.420-2.100 mg/mL and 0.456-2.280 mg/mL, respectively. The average recoveries were 101.4% (1.53%), 99.7% (1.29%), 98.6% (2.81%). The developed HPLC-ELSD method was simple, reliable, accurate and reproducible. It can be used for the quality control of *S. sonchifolius*. The optimal preparation method was that *S. sonchifolius* was rinsed with water for 0.5 h, and freeze-dried to powder.

Key words: fructooligosaccharides; HPLC-ELSD; different processing methods; *Smallanthus sonchifolius*

雪莲果 (*Smallanthus sonchifolius*) 为菊科多年生草本, 原产于南美洲安第斯山, 是印第安人传统的块茎食品^[1,2]。雪莲果含有 20 多种人体必需的氨基酸和丰富矿物质。雪莲果的主要成分为带有甜味的低聚果糖, 人体内没有酶可以水解这种碳水化合物, 因此难以吸收, 糖尿病患者亦可使用。低聚果糖 (fructooligosaccharides, 简称 FOS) 又叫蔗果低聚糖

或果聚糖, 分子式为 G-F-F_n (G 为葡萄糖基, F 为果糖基, n = 1 ~ 3), 是果糖与葡萄糖构成的直链低聚糖, 是蔗糖的果糖基以 β-1, 2 糖苷键与 1 ~ 3 个果糖基结合而成的蔗果三糖 (GF₂)、蔗果四糖 (GF₃)、蔗果五糖 (GF₄) 的混合物。低聚果糖具有改善体内菌群, 排毒清肠、改善脂质代谢, 降低血脂、调节机体免疫系统, 提高免疫力、促进矿物质吸收等生物活性^[3-7]。本实验采用 HPLC-ELSD^[8,9] 测定方法对雪莲果中低聚果糖的含量进行了测定, 并比较不同炮制方法所得雪莲果粉末中低聚果糖的含量, 为雪莲果的质量控制提供科学依据。

收稿日期: 2014-07-21 接受日期: 2014-11-10

基金项目: 河北省海外高层次人才“百人计划”(E2012100002); 河北省高校重点学科建设项目

* 通讯作者 Tel: 86-314-2290474; E-mail: liangywang@yahoo.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪(自动进样器, 四元泵, 柱温箱, ELSD 检测器, Agilent 公司, 美国); 电子分析天平(瑞士梅特勒 AG-245 型); CHRIST 实验室型冷冻干燥机(德国 MARTIN CHRIST); KQ-100E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品: 蔗果三糖, 蔗果四糖, 蔗果五糖(批号: AWG0714, 均购自上海惠城生物科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津星马克科技发展有限公司), 水(娃娃哈哈饮品有限公司)其余试剂为分析纯。本实验所用雪莲果经河北省承德医学院赵春颖副教授鉴定为菊科植物雪莲果(*Smallanthus sonchifolius* [Poepp. & Endl.] *H. Robinson*)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 华谱 XAmide(4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 水 = 75: 25; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C。检测器: ELSD, 漂移管温度 70 °C, 氮气体积流量 3.5 L/min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称定对照品蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖 20.3、21.0 和 22.8 mg, 用流动相溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 配制成含有蔗果三糖、蔗果四糖和

蔗果五糖 2.03、2.10 和 2.28 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 不同炮制方法制备的供试品溶液

将雪莲果洗净, 切片, 按照表 1 方法对其进行处理。精密称取粉碎后的粉末 0.998 g, 用 0.3% 柠檬酸溶液 100 mL, 超声提取 1 h, 离心取上清液。

表 1 不同雪莲果炮制方法

Table 1 Different processing methods of *S. sonchifolius*

方法 Method	漂洗 Rinsing method	干燥 Drying method
1	无	50-60 °C 烘干
2	清水漂洗 0.5h	50-60 °C 烘干
3	0.2% NaHSO ₃ 溶液漂洗 0.5h	50-60 °C 烘干
4	清水漂洗 0.5h	冷冻干燥

2.3 标准曲线与线性范围

取已配制的含有蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖的混合对照品溶液, 流动相依次 2 倍稀释成一系列浓度。在上述色谱条件下, 分别进样 10 μL, 每个浓度平行测定 3 次, 记录峰面积, 将浓度(Y)与峰面积(X)进行线性回归, 混合对照品及样品色谱图见图 1。

结果, 蔗果三糖回归方程 $Y = 3630.7X - 883.22$, $r = 0.9991$, 线性范围 0.406 ~ 2.030 mg/mL; 蔗果四糖回归方程 $Y = 3643.7X - 774.31$, $r = 0.9994$, 线性范围 0.420 ~ 2.100 mg/mL; 蔗果五糖回归方程 $Y = 4700.7X - 953.02$, $r = 0.9978$, 线性范围 0.456 ~ 2.280 mg/mL。

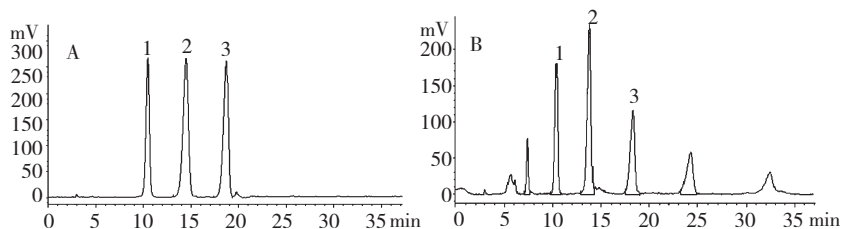


图 1 混合对照品(A)及雪莲果低聚果糖样品(B)的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of mixed standards (A) and sample (B)

注: 1、蔗果三糖; 2、蔗果四糖; 3、蔗果五糖

Note: 1. GF₂; 2. GF₃; 3. GF₄

2.4 仪器精密度以及稳定性

取 2.2.1 项下的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖对照品溶液, 各分别进样 10 μL, 连续 5 次, 按 2.1 项下方法测定, 记录峰面积。取 2.2.2 项下的样品溶液, 于制备后 0、2、4、8、12 h 进样 10 μL, 进行测

定, 按 2.1 项下方法测定, 记录峰面积, 计算出蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖的 RSD 分别为 0.8%、1.1%、1.8%。结果 RSD 均小于 3%, 表明此分析检测系统精密度良好; 样品溶液在此条件下至少 12 h 稳定。

2.5 样品重现性以及回收率

称取同一批雪莲果粉末样品,按照 2.2.2 项下的方法制备样品溶液 5 份。进样 10 μL ,按 2.1 项下方法测定,记录峰面积,并计算样品中的准确含量,结果蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖质量分数分别为 12.53%、20.14%、10.82%,其 RSD 分别为 1.2%、1.5%、2.6%,结果 RSD 均小于 3%,说明该方法重现性良好。

称取已知含量的雪莲果粉末 10 mg,共 6 份,分别精密加入蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖对照品适量,按照 2.2.2 项下的方法制备样品溶液,按 2.1 项下方法测定,计算加样回收率,结果平均回收率分别为 101.4%、99.7%、98.6%,RSD 分别为 1.53%、1.29%、2.81%。

2.6 样品测定

取不同处理方法所得的雪莲果,按照 2.2.2 项下的方法制备样品溶液,按 2.1 项下方法测定,计算 3 种低聚果糖的含量,见表 2。

表 2 不同处理方法雪莲果低聚果糖的含量

Table 2 Determination results of fructooligosaccharides prepared by different processing methods

处理方法 Method	蔗果三糖 GF ₂	蔗果四糖 GF ₃	蔗果五糖 GF ₄
1	16.65%	17.72%	9.35%
2	13.26%	19.24%	10.27%
3	12.87%	18.96%	10.18%
4	12.53%	20.14%	10.82%

由表 2 可以看出不同处理方法的雪莲果中都是蔗果四糖的含量最高,蔗果三糖次之,蔗果五糖最少。而且明显第四种处理方法即清水漂洗 0.5 h 后冷冻干燥的雪莲果中蔗果四糖和蔗果五糖的含量明显高于其他处理方法。

3 讨论

用甲醇-水、乙腈-水进行梯度及不同比例的等度洗脱比较,结果表明采用乙腈-水(75:25)为流动相不但基线稳定,而且色谱峰在 30 min 内达到良好分离且峰形漂亮。漂移管温度和气体流速是 ELSD 检测中至关重要的 2 个参数,根据反复比较实验确定漂移管温度为 70 $^{\circ}\text{C}$,氮气流速为 3.5 L/min。

通过对雪莲果中低聚果糖含量测定,可以看出不同处理方法的雪莲果中都是蔗果四糖的含量最高,蔗果三糖次之,蔗果五糖最少。而且明显第四种

处理方法即清水漂洗 0.5 h 后冷冻干燥的雪莲果粉末中蔗果四糖和蔗果五糖的含量明显高于其他处理方法。由表 2 可以明显看出四种处理方法中清水漂洗 0.5 h 后冷冻干燥这种处理方法最好。雪莲果块根中低聚果糖含量是所有植物中含量最高的,其干物质中的 45%~65% 含量是低聚果糖,因此雪莲果具有“低聚果糖之王”的美称。低聚果糖作为人和动物的生理活性物质,广泛应用在疾病诊断与防治、营养与保健、畜牧养殖、植物生长调节及抗病害等方面,它的开发在国际上已经发展成为一个应用于医药、食品、饲料、农业等领域的重要产业。

参考文献

- 1 You Y(游懿),Gong FC(龚福春). Studies on extraction and analysis of fructooligosaccharides in *Smallanthus sonchifolius*. Changsha:Changsha University of Science & Technology(长沙理工大学),MSc. 2011.
- 2 Wu Y(武莹). 雪莲果中糖类成分分析及低聚果糖制备工艺路线初探. Beijing:Beijing University of Chinese Medicine,MSc. 2008.
- 3 Li XH(李新海),Liang ZH(梁兆辉),Cai JY(蔡锦源),et al. Study on the extraction of oligosaccharides from Yacon by microwave-assisted extraction. *Chin J Pharmacovigil*(中国药物警戒),2011,8:145-147.
- 4 Chen XL(陈学玲),Guan J(关键),He JJ(何建军),et al. Function and application of Yacon. *Acade Period Farm Prod Proc*(农产品加工. 学刊),2010,10:18-19.
- 5 Han X(韩笑),Yang M(杨明),Cui CB(崔承彬),et al. Quantitive determination of inulin type oligosaccharides in *Morinda officinalis* by HPLC. *Milit Med Sci*(军事医学),2011,35:296-298.
- 6 Hond ED,Geypens B,Ghoos Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation. *Nutri Res*,2000,20:731-736.
- 7 Lobo AR,Colli C,Alvares EP. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp and Endl.) flour on caecum mucosal morphometry,calcium and magenesium balance,and bone calcium retention in growing rats. *Br J Nutr*,2007,97:776-785.
- 8 Wei JX(魏军香),Zhang YJ(张跃进),Liang ZS(梁宗锁),et al. HPLC analysis of chlorogenic acid content in yacon tubers under different storage conditions and storage time. *Acta Agric Boreali-occident Sin*(西北农业学报),2012,21:118-122.
- 9 Zheng MM(郑明敏),Li JW(李静威),Liu J(刘坚),et al. Determination of changes in sugar compositions of yacon under different storage conditions by HPLC. *Food Sci*(食品科学),2009,30:190-193.