

树莓多糖中单糖组成的 GC - MS 分析

杨永晶^{1,2} 韩丽娟^{1,2} 索有瑞^{*1,3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院大学研究生院, 北京 100049;
3. 青海大学农林科学院, 西宁 810001)

摘要:建立了 GC-MS 测定树莓多糖中单糖组成的分析方法。树莓多糖经三氟乙酸水解后, 采用盐酸羟胺肟化和乙酸酐乙酰化衍生, 利用 GC-MS 测定树莓多糖中的单糖组成。最终测得树莓多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其摩尔比为 2.0: 19.9: 1.0: 1.1: 7.1: 2.3, 其中阿拉伯糖和葡萄糖的所占比例较高。

关键词: 树莓多糖, 单糖组成, 乙酰化, 气相色谱 - 质谱联用

中图分类号: O657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2015)06-0688-04

树莓 (*Rubus idaeus L.*) 为蔷薇科悬钩子属植物, 又名山莓、悬钩子、三月泡、牛奶泡、高脚菠、刺儿泡等。主要分布于北半球温带和寒带, 近年来, 随着广泛的人工培育、引种和种植, 目前已有至少 160 个树莓品种^[1]。树莓果实为多浆小聚合果, 味甜微酸, 营养丰富, 其中含有大量的维生素、矿物质、蛋白质、氨基酸等。此外, 树莓果实中还含有多糖、有机酸、黄酮、花青素、多酚、挥发油、鞣质等多种生物活性成分^[2], 具有极高医疗保健作用, 被誉为“黄金水果”。

多糖是一种广泛存在于动植物中, 具有多种生理活性的生物大分子。近年来, 由于天然、无毒的特性以及良好的疗效, 多糖已经成为一类极具开发潜力的新药资源^[3]。研究发现, 多糖具有调节机体免疫力、抗肿瘤、抗疲劳、抗菌、防辐射、抗疲劳、降糖降脂等多种生理活性^[4]。目前, 已有多种动植物多糖被成功的开发和利用, 如香菇多糖、灵芝多糖等^[5-6]。

树莓果实中多糖含量极高, 是一种理想的多糖提取原料。前期研究发现, 种植于青海互助的红树莓 (品种: 哈瑞太兹) 多糖产率高达 12%。此外, 通过药效学研究发现, 树莓多糖具有良好的抗肿瘤、抗疲劳、抗氧化、降血糖以及免疫调节活性, 是一种极具开发前景的天然植物多糖。明确的化学结构对于天然产物的开发至关重要。鉴于此, 本文采

用盐酸羟胺肟化和乙酸酐乙酰化衍生法对树莓多糖的水解产物进行衍生化, 并采用气相色谱 - 质谱联用 (GC-MS) 技术研究了其单糖组成, 为树莓多糖结构的进一步深入研究提供了依据。

1 实验部分

1.1 材料

树莓冷冻果 (品种: 哈瑞太兹, 青海瑶池生物科技 (Qinghai Yaopi Biotech) 公司)。鼠李糖 (Rhamnose)、阿拉伯糖 (Arabinose)、果糖 (Fructose)、木糖 (Xylose)、甘露糖 (Mannose)、葡萄糖 (glucose)、半乳糖 (Lactose) 标准品 (中国药品生物制品检定所)。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

涡旋混合仪 (TD-RS-1, 北京同德创业公司); 7890A-5975c 气相色谱 - 质谱联用仪 (Agilent 科技公司)。

2 实验方法与结果

2.1 树莓多糖的提取

将树莓冷冻果置于电热恒温鼓风干燥箱中除去水分 (温度 55 °C)。粉碎树莓干果并过 180 μm 筛除去几乎完好无损的树莓籽, 得到树莓果粉。称取树莓果粉 100 g, 加入石油醚 (*m: V = 1: 4*) 置于磁力搅拌器上搅拌除脂。滤渣风干后, 加入 80% 乙醇 (*m: V = 1: 4*), 于 60 °C 加热回流除去色素、单糖和寡糖。再次风干滤渣, 加入纯净水

收稿日期: 2015-03-12

基金项目: 青海省科技计划项目 (2014 - NS - 509) 资助

E-mail: yongjing223@163.com

($m:V=1:5$) ,于 60 °C 超声提取 1 h。离心取上清,利用 Sevag 法除蛋白,重复 3 次。滤渣重复提取 2 次。合并除去蛋白的提取液,于 60 °C 进行减压浓缩至原体积的 1/4 后加入 4 倍体积 95% 乙醇沉淀 4 °C 过夜后离心,沉淀冷冻干燥后即得淡粉色树莓多糖。采用硫酸-蒽酮法测得多糖的糖含量为 76.2% ± 6.57%。

2.2 树莓多糖的水解

精密称取树莓多糖 5 mg 置于安瓿瓶中,加入 2 mol/L 的 TFA 4 mL,用酒精喷灯将安瓿瓶封口后置于 105 °C 超高温电热箱中水解 4 h。室温冷却后,将水解产物用氮气吹干,除去 TFA。

2.3 乙酰化衍生物的制备^[7]

将除去 TFA 的样品溶于 100 μ L 50 mg/mL 的盐酸羟胺吡啶溶液,于 90 °C 反应 30 min。将反应液冷却至室温后,加入 100 μ L 乙酸酐,于 90 °C 继续反应 3h,进行乙酰化衍生物的制备。将反应产物冷却至室温,在 70 °C 水浴中用氮气吹干后复溶于 800 μ L 氯仿,取 1 μ L 进行 GC-MS 分析。用同样的方法制备各单糖标准品的乙酰化衍生物。单糖标准品共 7 种,分别是鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。

2.4 GC-MS 分析

采用外标法定量分析多糖样品中的单糖组分。采用 Agilent 7890A-5975c 气质联用仪,配备 DB-5MS UI 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m)。气相色谱条件:载气为高纯氦气;进样口温度 250 °C;程序升温,起始温度 100 °C,以 5 °C/min 升至 200 °C,保持 1 min,再以 10 °C/min 升至 250 °C,保持 5 min;载气流速 1.0 mL/min,不分流速进样 1 μ L。质谱条件:接口温度 280 °C;四极杆温度:150 °C;电离方式:EI;电子轰击能量:70eV;溶剂延长时:5 min;全扫描范围: m/z 50 ~ 800;模式:选择离子扫描(SIM)。

2.5 标准曲线的建立

将含有鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、果糖(Fru)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)和半乳糖(Lac)的混合单糖标准品配成浓度依次为 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL 的储备液。按 2.3 节和 2.4 节分别进行乙酰化衍生物的制备和 GC-MS 分析。以质量浓度 ρ (μ g/mL) 为横坐标,衍生产物的峰面积 y 为纵坐标,对各个单糖标准品进行线性回归,线性范围为 25 ~ 400 μ g/mL。结果见表 1。

表 1 7 种单糖标准品的标准曲线方程及相关系数
Tab. 1 The linear equation and linear correlation coefficients of seven monosaccharide standards

单糖标准品	相关系数 (r)	回归方程 ρ (μ g/mL)
Rha	0.9998	$y = 86472\rho - 154083$
Ara	0.9998	$y = 72472\rho - 51750$
Fru	0.9995	$y = 10197\rho + 147979$
pyl	0.9996	$y = 74569\rho + 347094$
Man	0.9999	$y = 195909\rho - 771962$
Glu	0.9998	$y = 86963\rho - 337613$
Lac	0.9996	$y = 195909\rho - 771962$

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度 量取 100 μ L 400 μ g/mL 的混合单糖标准溶液,按 2.3 节进行衍生化,按 2.4 节的色谱条件,连续进样 5 次,测定各单糖衍生产物峰面积,并计算各峰面积的 RSD。结果发现,鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖衍生产物峰面积的 RSD 分别为 1.4%, 2.0%, 2.3%, 1.7%, 1.7%, 2.0% 和 2.1%,均小于 3%,说明该测定方法精密度良好。

2.6.2 重复性 按 2.2 节平行制备 5 份树莓多糖水解产物,并按 2.3 和 2.4 节分别进行乙酰化衍生物的制备和 GC-MS 分析。计算出 5 份树莓多糖样品中各个单糖的浓度,并计算 RSD。结果发现,5 份树莓多糖样品中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖浓度的 RSD 分别为 2.1%, 1.3%, 2.4%, 2.3%, 1.8% 和 2.5%,均小于 3%,5 份树莓多糖样品中均未检测出果糖,表明该方法具有很好的重复性。

2.6.3 稳定性 树莓多糖按 2.2 节和 2.3 节水解并乙酰化后,常温放置 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 后分别按 2.4 节的条件进行 GC-MS 分析,并计算不同放置时间下各单糖含量。结果表明,鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖含量的 RSD 分别为 2.0%, 0.57%, 1.7%, 1.7%, 1.1% 和 1.2%,均小于 3%。树莓多糖样品中未检测出果糖,说明树莓多糖乙酰化样品在 24 h 之内基本稳定。

2.6.4 加样回收率测定 平行称取 5 份已知各单糖含量的树莓多糖,按 2.2 节的方法水解后分别加入单糖混合标准溶液,并按 2.3 节、2.4 节的方法进行衍生化和 GC-MS 分析,计算平均回收率(见表 2)。样品中各种单糖的平均回收率分别在 96.4% ~ 101.4%,且回收率 RSD 值均小于 3%,表明该方法回收率较高。

表 2 5 份树莓多糖样品中单糖的回收率

Tab. 2 The recovery of monosaccharide in five raspberry polysaccharide samples

单糖	平均回收率/%	RSD/%
Rha	96.4 ± 2.0	2.1
Ara	97.9 ± 2.2	2.2
Fru	—	—
Xyl	98.4 ± 1.8	1.9
Man	101.4 ± 2.3	2.2
Glu	98.9 ± 2.5	2.5
Lac	96.7 ± 2.4	2.5

“—”表示未检出

上述实验结果表明,该检测方法具有简便灵敏,精密度高,衍生物稳定,衍生杂质少,回收率稳定,重复性佳的优点,能准确测定出树莓多糖中单糖的组成,具有较强的适用性。

2.7 样品的测定

7 种单糖标准品乙酰化衍生产物的 GC-MS 图谱如图 1 所示,各个单糖标准品的衍生产物能很好的分离,且几乎无杂质峰产生。各个单糖标准品的保留时间及特征离子见表 3。

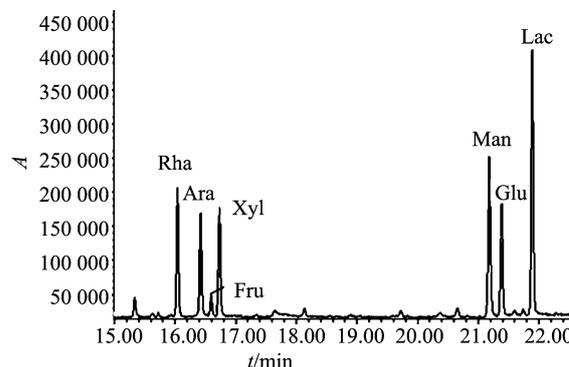


图 1 7 种混合单糖衍生标准品色谱图

Fig. 1 The chromatogram of the derivatives of seven monosaccharide standards

表 3 7 种单糖标准品的保留时间及特征离子

Tabel3. The retention time and characteristic ions of seven monosaccharide standards

单糖	保留时间 t/min	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
Rha	16.041	145	129 ,113 ,117 ,159
Ara	16.423	145	103 ,115 ,200 ,242
Fru	16.595	145	103 ,129 ,117
Xyl	16.728	145	103 ,115
Man	21.182	145	115 ,187 ,212 ,103 ,314
Glu	21.385	145	115 ,187 ,212
Lac	21.894	145	212 ,115 ,103

图 2 为树莓多糖乙酰化衍生产物的 GC-MS 图谱。通过与单糖标准品保留时间和离子碎片确定树莓多糖主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,果糖未检出。且多糖中鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖的含量分别为 32.06, 298.49, 15.13, 19.63, 127, 40.57 μg/mL, 摩尔比为 2.0: 19.9: 1.0: 1.1: 7.1: 2.3, 其中阿拉伯糖和葡萄糖的所占比例较高。

3 讨论

分析多糖的单糖组成是多糖结构研究的一个重要环节。气相色谱法(GC)虽然在定量方面具有一定的优势,但单纯地依靠保留时间来定性是不准确的,特别是在有杂质峰干扰的情况下。而 GC-MS 不但能够依靠其 FID 图谱的峰面积定量,还能通过样品的特征离子碎片定性,从而能准确而快速的完成多糖中单糖组成的测定。目前,GC-MS 还在诸多领域得到了极为广泛的应用,如食品安全领

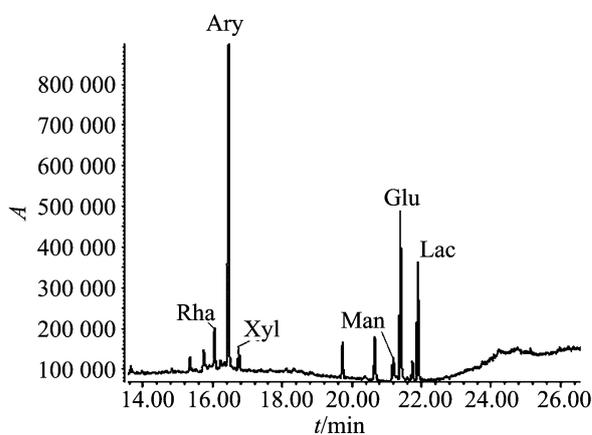


图 2 树莓多糖水解衍生产物色谱图

Fig. 2 The chromatogram of the derivatives of raspberry polysaccharide hydrolysate

域的农残及有毒物质检测^[8],环境保护领域的污染物检测,医药保健品成分的检测^[9]等。

在多糖中单糖组成的分析中,衍生化是至关重

要的步骤。最为常用的多糖衍生方法是硅烷化和乙酰化。硅烷化衍生法虽然具有衍生条件温和、步骤简单、节约时间等优点,但容易产生副衍生物而造成多峰、重叠峰等现象,这给后续的定性定量工作带来了较大困难^[10]。而本文所采用的盐酸羟胺肟化和乙酸酐乙酰化衍生法能有效克服由于糖的异构化而造成的多峰现象,每种单糖都能获得单一的色谱峰,非常利于进行气相色谱的定性和定量分析。

本文所建立的方法具有简便灵敏、衍生杂质少、精密度高、回收率稳定、重复性佳的优点,能准确测定出树莓多糖中单糖的组成,具有较强的适用性。

参考文献

- [1] Finn C E. Raspberries. Temperate Fruit Crop Breeding. Springer Science Business Media B V, 2008: 359
- [2] Bowen-Forbes C S, Zhang Y J, Nair M G. J Food

Compos Anal 2010 23: 554

- [3] Beat E, John LM. Nature Reviews Drug Discovery, 2009, 8: 661
- [4] Wei J T, Wang S X, Liu G. Int J Biolog Macromol, 2014, 64: 1
- [5] Sheng L, Zhang Y Y, Lina Z, et al. Food Hydrocoll, 2011 25: 196
- [6] Shi M, Zhang ZY, Yang YN. Carbohydrate Polymers, 2013, 95: 200
- [7] Li X Y, Wang Z Y, Wang L. Carbohydrate Polymers, 2013, 94: 829
- [8] 荣维广, 阮华, 马永建, 等. 分析试验室, 2013, 32 (9): 40
- [9] 何志海, 候功坦, 梁虹瑜, 等. 分析试验室, 2014, 33 (2): 229
- [10] Chiantore O, Riedo C, Scalarone D. Inter J Mass Spectrom 2009, 284: 35

Analysis the monosaccharide composition in raspberry polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry

YANG Yong-jing^{1,2}, HAN Li-juan^{1,2} and SUO You-rui^{*1,3} (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3. Qinghai University, Academy of Agriculture and Forestry Science, Xining 810001), Fenxi Shiyanshi 2015, 34(6): 688 ~ 691

Abstract: In this study, the method was established for the analysis of monosaccharide compositions in *raspberry polysaccharides* by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with DB-5MS UI capillary column. The *raspberry polysaccharides* were firstly hydrolyzed to monosaccharides by trifluoroacetic acid, and were then subjected to oximation by hydroxylamine hydrochloride and acetylation by acetic anhydride before the GC-MS analysis. The methodological evaluation showed that this method is fast, sensitive and precise with a good repeatability and a stable recovery. The high accuracy for the analysis of monosaccharide composition in *raspberry polysaccharides* demonstrate its good applicability. The final result showed that *raspberry polysaccharides* were consisted of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and lactose in a ratio of 2.0 : 19.9 : 1.0 : 1.1 : 7.1 : 2.3 and arabinose, and glucose took a major proportion.

Keywords: Raspberry polysaccharides; Monosaccharide compositions; Acetylation; Gas chromatography-mass spectrometry.