

## 柱前衍生化毛细管气相色谱法分析松茸多糖的单糖组成

刘刚\*, 王辉, 周建, 周本宏

(武汉大学人民医院药学部, 武汉 430060)

**[摘要]** 目的: 采用毛细管气相色谱法测定松茸多糖的单糖组成及摩尔比。方法: 采用三氟乙酸水解松茸多糖, 六甲基二硅烷(HMDS)和三甲基氯硅烷(TMCS)作硅烷化试剂, 将单糖衍生化为三甲基硅烷衍生物, 以肌醇为内标物, 用 HP-50 毛细管色谱柱(0.32 mm×30 m), 氢火焰检测器(FID)气相色谱法测定了松茸多糖中单糖组成。结果: 通过分析 6 种标准单糖全部达到基线分离, 分析时间为 15 min; 松茸多糖是由葡萄糖、木糖和半乳糖组成的杂多糖, 其摩尔比为 14.84:1.42:1.00。结论: 结果表明该方法可快速有效的分析多糖中的单糖组成。

**[关键词]** 松茸; 多糖; 气相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0062-03

## Analysis of Monosaccharides Composition in Polysaccharide of *Tricholoma matsutake* by Precolumn Derivatization and Capillary Gas Chromatography

LIU Gang\*, WANG Hui, ZHOU Jian, ZHOU Ben-hong

(Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the monosaccharides composition and their molar ratio in *Tricholoma matsutake* polysaccharide. **Method:** The monosaccharide units were hydrolyzed by trifluoroacetic acid from polysaccharide in *T. matsutake* and derivatized with hexamethyldisilane (HMDS) and trimethylchlorosilane (TMCS) to form trimethylsilyl derivative. The capillary chromatographic column HP-50 (0.32 mm×30 m) and FID detector were used in GC determination with inositol as internal standard. **Result:** Under the optimum conditions, the six standard monosaccharides were in baseline separation within 15 min, *T. matsutake* polysaccharide was composed of glucose, xylose and galactose with the molar ratio of 14.84:1.42:1.00. **Conclusion:** The results indicated that this method was effective and quick in analyzing the components of monosaccharides.

**[Key words]** *Tricholoma matsutake*; polysaccharide; gas chromatography

**[收稿日期]** 20110415(004)

**[基金项目]** 湖北省自然科学基金项目(2010CDB06907)

**[通讯作者]** \* 刘刚, 博士, 副主任药师, 从事天然药物化学研究, Tel: 027-88041911-88891, E-mail: liugang\_wh@126.com

忽略阴性对照的干扰。

分光光度法与滴定法相比较, 具有灵敏度高的优点。选用分光光度法测定马应龙麝香痔疮膏中氧化锌的含量, 方法简单、重复性好, 可用于该制剂中的质量控制。

**[参考文献]**

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 511, 附录 30.

[2] 徐永波, 梁秀芬, 王蓉华. 分光光度法测定复方氧化锌洗剂中氧化锌的含量[J]. 中国医疗前沿, 2007, 2(8): 78.

[3] 黄萍, 黄群, 蓝忠, 等. 咪喃西林炉甘石洗剂质量标准制定和验证[J]. 临床合理用药, 2010, 3(4): 83.

**[责任编辑]** 蔡仲德

松茸 *Tricholoma matsutake* Sing. 亦称松蕈、松口蘑,是一种珍贵的可食用真菌<sup>[1-2]</sup>,属于口蘑科、口蘑属的一个种,具有强身、理气、止痛、益肠胃、治疗糖尿病、抗肿瘤等功效<sup>[2-3]</sup>。松茸在世界上分布范围很广,主要分布于朝鲜、日本、加拿大、美国和北欧国家。在我国主要分布在东北吉林省,西南地区的云南、四川、西藏。松茸香气宜人,菌肉肥厚,味道鲜美,含有大量的蛋白质、氨基酸、维生素、矿物元素和微量元素,具有很高的营养价值和药用价值<sup>[4-5]</sup>。松茸主要的活性成分为多糖类化合物。为了深入研究松茸多糖的生物活性,本课题组已经对松茸多糖的提取、分离与纯化工艺进行了研究<sup>[6-7]</sup>。在此基础上,本文采用三甲基硅醚衍生化法,通过气相色谱检测了松茸多糖中的单糖组成。

## 1 材料

**1.1 仪器** 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent 公司),氢火焰检测器;HP-50 毛细管色谱柱(0.32 mm × 30 mm),DZG-6020 型真空干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),AG245 型电子分析天平(Mettler-Toledo,瑞士),3K30 型低温超速离心机(Sigma,USA),RE-52C 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

**1.2 试剂** D-葡萄糖、D-半乳糖、D-阿拉伯糖、D-木糖、D-鼠李糖、D-甘露糖、肌醇对照品(武汉大学中南医院当归研究所惠赠)。所用其他化学试剂均为分析纯。松茸(购于云南)经武汉大学人民医院张洪教授鉴定为口蘑科口蘑属松茸 *T. matsutake*。

**1.3 松茸多糖的提取分离及纯化** 取松茸粉末约 20 g 于圆底烧瓶中,加 95% 乙醇 100 mL 100 °C 水浴回流提取 1 h,过滤;滤渣于 90 °C 水浴中浸提 3 h,离心分离,沉淀再加入 30 倍量蒸馏水重复提取 1 次,合并上清液,用旋转蒸发仪将上清液浓缩到适当体积后,缓慢地加入 3 倍体积的 95% 乙醇至含醇量约为 70% 4 °C 低温放置 24 h,可见棕色絮状粗多糖析出,4 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,收集沉淀物加 80% 乙醇洗涤得粗多糖;松茸粗多糖,采用 Sevag 法连续脱蛋白 4 次,3% 活性炭 60 °C 脱色 30 min,再经过透析处理后得到松茸精制多糖。

## 2 方法

**2.1 单糖的衍生化** 精密称取 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-阿拉伯糖、D-木糖、D-鼠李糖、D-甘露糖、肌醇约 6 mg,分别加入 1 mL 分子筛干燥后的吡啶,振摇

溶解,再依次加入六甲基二硅醚烷 0.6 mL 和三甲基氯硅烷 0.3 mL,充分振摇,置于 50 °C 水浴摇床中反应 30 min,移入离心管离心 5 min(4 000 r·min<sup>-1</sup>),取上清液,定容至 1 mL。

**2.2 松茸多糖的水解** 精密称取松茸精制多糖约 10 mg,加入 4 mol·L<sup>-1</sup> 三氟乙酸(TFA) 适量,使多糖充分溶解,抽真空封管后于 110 °C 油浴水解 4 h,室温冷却,离心,上清液旋转蒸发仪减压浓缩,反复多次加入无水乙醇,除掉多余的三氟乙酸。

**2.3 气相色谱条件** HP-50 石英毛细管柱(0.32 mm × 30 mm);氢火焰检测器(FID);程序升温,从 130 °C 按 10 °C·min<sup>-1</sup> 升温至 290 °C,气化室温度 295 °C;检测器温度 300 °C;载气为氮气,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;分流比 50:1,进样量 2 μL。

**2.4 单糖标准曲线** 分别取上述衍生化后的 6 种单糖对照溶液 100 μL 混合,配制混和对照品溶液。吸取 5 份混合对照品溶液分别稀释 1,2,3,4,5 倍后加入肌醇为内标,混匀,分别吸取 2 μL 注入 GC 色谱仪。以单糖标准品峰面积/内标物峰面积的比值为纵坐标 Y,单糖标准品的浓度/内标物浓度的比值为横坐标 X,进行线性回归,计算 6 种单糖的标准曲线。

**2.5 多糖样品测定** 取上述水解后的松茸多糖样品,按上述三甲基硅醚化法衍生化,加入内标,进行 GC 色谱分析,将样品各峰与单糖标准品的保留时间对照,确定多糖中的单糖组成及各单糖的摩尔比。

## 3 结果

**3.1 系统适用性实验** 按照上述的气相色谱条件对各单糖对照品进行测定,结果见图 1,可以看到 D-阿拉伯糖、D-鼠李糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖、D-葡萄糖及内标物肌醇的保留时间分别为 7.594,7.706,8.618,9.525,10.084,10.421,10.562 min,在混合对照品色谱图中,各峰之间都达到基线分离,分析时间为 15 min。结果表明,此色谱条件作为分析多糖中单糖组成的方法是可行的。

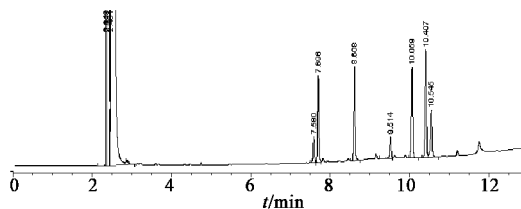


图 1 单糖对照品 GC 色谱

**3.2 单糖标准曲线** 以峰面积为纵坐标,单糖含量为横坐标进行线性回归。结果表明,在  $0.2 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,单糖质量浓度与色谱峰面积有良好的线性关系,各单糖的回归方程的相关系数为  $0.9977 \sim 0.9993$ ,见表 1。

表 1 种单糖的标准曲线

| 单糖     | 标准曲线                   | 相关系数   |
|--------|------------------------|--------|
| D-阿拉伯糖 | $Y = 0.4127X - 0.2031$ | 0.9987 |
| D-鼠李糖  | $Y = 0.5373X - 0.0025$ | 0.9982 |
| D-木糖   | $Y = 0.4384X + 0.0126$ | 0.9977 |
| D-甘露糖  | $Y = 0.4210X - 0.1680$ | 0.9989 |
| D-半乳糖  | $Y = 0.4023X + 0.1124$ | 0.9981 |
| D-葡萄糖  | $Y = 0.4136X - 0.1026$ | 0.9993 |

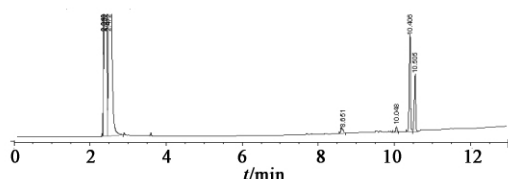


图 2 松茸多糖单糖组成 GC 色谱

**3.3 单糖组成分析** 松茸多糖经水解、衍生化后,进行 GC 色谱分析,与单糖对照品色谱比较,结果见图 2,松茸多糖主要含有葡萄糖,也含有少量的木糖和半乳糖,通过计算,葡萄糖、木糖、半乳糖的摩尔比为  $16.77:1.63:1$ 。

#### 4 讨论

多糖是多羟基醛、酮、醇衍生物,由于其相对分子质量大,因此分析多糖组成的主要方法一般是通过水解,使多糖中连接单糖的糖苷键断裂,释放出单糖,再通过柱前衍生化气相色谱法分析其组成和含量。

本研究通过衍生化 GC 法,采用 FID 检测器和 HP-50 毛细管柱分析松茸多糖的单糖组成,试验

分别对气化室温度、检测器温度进行了考察。结果表明,当柱温箱温度低于  $230^\circ\text{C}$  时,色谱分离效果差,色谱基线不稳,灵敏度低。试验选择采用程序升温,柱温箱从  $130^\circ\text{C}$  按  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升温至  $290^\circ\text{C}$ ,气化室温度为  $295^\circ\text{C}$ ,检测器温度为  $300^\circ\text{C}$ ,效果较为理想,在 15 min 内 6 种单糖达到基线分离,与文献 [8-9] 比较具有检测时间短的优势。

该方法所需样品量少,精密度好,具有定性简单、可靠,定量准确的优点。可望推广于其他多糖的单糖组成测定。

#### 【参考文献】

- [1] 刘培贵,袁明生,王向华,等. 松口蘑群生物资源及其合理利用与保护 [J]. 自然资源学报, 1999, 14 (3): 245.
- [2] 周选围. 松茸资源研究概况 [J]. 食用菌学报, 2002, 9 (1): 50.
- [3] 郭爱莲. 珍贵食用菌松茸的研究概况 [J]. 西北轻工业学院学报, 1996, 14 (3): 111.
- [4] Gang L, Hui W, Benhong Z, et al. Compositional analysis and nutritional studies of *Tricholoma matsutake* collected from Southwest China [J]. J. Med. Plant. Res. 2010, 4 (12): 1222.
- [5] 刘刚,王辉,周本宏. 云南产松口蘑 17 种氨基酸的含量测定及评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (7): 552.
- [6] 刘刚,王辉,郭成希,等. 正交试验法优选松茸多糖提取工艺的研究 [J]. 中国药师, 2009, 12 (7): 914.
- [7] 刘刚,王辉,周本宏,等. 松茸多糖的提取及含量测定 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17 (5): 421.
- [8] Yi C, Mingyong X, Yuanxing W, et al. Analysis of the monosaccharide composition of Purified Polysaccharides in *ganoderma atrum* by capillary gas chromatography [J]. Phytochem. Anal. 2009, 20: 503.
- [9] 梁轩,王仲孚,李建军. 毛细管气相色谱法测定果胶的单糖组成 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24 (1): 6.

[责任编辑 蔡仲德]