

微波消解-1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生-高效液相色谱法测定枸杞多糖含量及组成

燕梦雨^{1,2}, 颌东妹^{1,2}, 刘志虎³, 崔国忠³, 刘建飞², 王宁丽²,
刘笑笑⁴, 吴福祥⁴, 谢晓蓉^{1*}, 邸多隆^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000;
3. 酒泉市林果服务中心, 酒泉 735000; 4. 兰州市食品药品检验检测研究院, 兰州 730000)

摘要: **目的** 建立微波消解-1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)柱前衍生-高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP)含量及组成的方法。**方法** 采用微波消解技术水解 LBP 进行样品前处理, 利用 PMP 进行柱前衍生, 建立结合 HPLC 检测 LBP 的方法, 并利用该方法测定 4 个不同枸杞产地 LBP 的含量及单糖组成。**结果** 经方法学评价, 8 种单糖均具有良好的线性关系, 相关系数均大于 0.98; 平均加标回收率为 94.95%~99.22%, 相对标准偏差小于等于 1.90%; 检出限和定量限良好。**结论** 该方法可用于 LBP 含量及组成的测定, 分析表明 LBP 主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸组成, 不同产地 LBP 含量存在差异, 其中甘肃玉门含量较高。

关键词: 枸杞多糖; 柱前衍生化; 单糖组成

Determination of content and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides by microwave digestion-1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone pre-column derivatization-high performance liquid chromatography

YAN Meng-Yu^{1,2}, XIE Dong-Mei^{1,2}, LIU Zhi-Hu³, CUI Guo-Zhong³, LIU Jian-Fei²,
WANG Ning-Li², LIU Xiao-Xiao⁴, WU Fu-Xiang⁴, XIE Xiao-Rong^{1*}, DI Duo-Long^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Jiuquan Forest Fruit Service Center, Jiuquan 735000, China; 4. Lanzhou Institute of Food and Drug Inspection and Testing, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of the content and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) by microwave digestion-1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization and high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Microwave digestion technology was used to hydrolyze LBP for sample pretreatment, PMP was used for pre-column derivatization, and a method

基金项目: 甘肃省科技计划项目(21YF5NA135、21CX6NF234)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan Project of Gansu Province (21YF5NA135, 21CX6NF234)

*通信作者: 谢晓蓉, 教授, 主要研究方向为中药资源评价、保护与可持续利用。E-mail: gszyxxr@163.com

邸多隆, 研究员, 主要研究方向为基于现代分离分析技术的复杂体系的分离分析新方法与新技术的建立。E-mail: didl@licp.cas.cn

*Corresponding author: XIE Xiao-Rong, Professor, College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, 35 Dingxi Dong Lu, Chengguan District, Lanzhou 730000, China. E-mail: gszyxxr@163.com

DI Duo-Long, Professor, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 18 Tianshui Zhong Lu, Chengguan District, Lanzhou 730000, China. E-mail: didl@licp.cas.cn

combining HPLC was established to detect LBPs. The content and monosaccharide composition of LBPs from four different *Lycium barbarum* producing areas were determined by this method. **Results** After methodological evaluation, 8 kinds of monosaccharides had good linear relationship, the correlation coefficients were all greater than 0.98, the average recoveries were 94.95%–99.22%, the relative standard deviations were less than or equal to 1.90%, and the limits of detection and limits of quantification were good. **Conclusion** This method can be used to determine the content and composition of LBPs. The analysis shows that LBPs mainly consist of glucose, arabinose, galactose, mannose, rhamnose, xylose, glucuronic acid and galacturonic acid. The content of LBPs in different regions is different, and the content in Yumen City of Gansu Province region is higher.

KEY WORDS: *Lycium barbarum* polysaccharides; pre-column derivatization; monosaccharide composition

0 引言

枸杞子(*Lycium Fructus*)是茄科植物宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥成熟果实,始载于《神农本草经》。目前,我国是世界枸杞子生产第一大国,种植面积和产量均稳居世界第一,主要分布在宁夏、甘肃、青海、新疆等西北地区。现代研究表明,枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides, LBPs)是枸杞子的重要活性成分之一,具有缓解视觉疲劳、降血糖、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等多种药理活性^[1-3]。

目前, LBPs 含量测定方法主要有苯酚-硫酸分光光度法、离子色谱法和 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)衍生高效液相色谱法等^[4-6]。苯酚-硫酸法是利用浓硫酸将多糖水解成单糖,并迅速脱水生成糠醛衍生物,再与苯酚缩合生成有色化合物,用紫外分光光度法进行含量测定^[7]。中国药典 2020 版(一部)^[8]与 GB/T 18672—2014《枸杞》中 LBPs 的含量测定方法均采用苯酚-硫酸法,但该方法易受到中药复杂体系中其他成分的干扰,专属性、重现性差。离子色谱法是基于离子性化合物与固定相表面离子性功能基团之间的电荷相互作用来实现离子性物质的分离和分析^[9]。颌东妹等^[10]利用微波消解-离子色谱(ion chromatography, IC)法测定 LBPs 的含量及组成,微波辅助消解大大缩减了 LBPs 的水解时间,该方法灵敏度高且无需衍生,但实验条件较严格,仪器及试剂要求高。李静等^[11]利用 IC 法测定 LBPs 时发现多糖水解的温度或时间若高于或长于所建方法中的水解条件,易导致果糖降解影响检测,且离子色谱法所需仪器昂贵、普适性不强。PMP 柱前衍生法是将多糖用硫酸或三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)水解后经 PMP 衍生,再利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定多糖含量的方法^[12]。赵孟欣等^[13]报道了基于高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)法,利用 PMP 柱前衍生测定 LBPs,用于其单糖结构的确认及含量测定。余亦婷等^[14]报道了利用 PMP 柱前衍生-HPLC 法测定黄芪多糖含量,研究表明

PMP 衍生-HPLC 法测定多糖时具有灵敏度高、重复性好等优点。但应用该方法时,多糖提取溶液常需在 110~120℃条件下 TFA 水解 5~6 h^[15-17],存在前处理耗时、长时间强酸高温环境易引起目标物质不稳定等缺点。

为了缩减样品前处理时间,提高目标物质的专属性与稳定性,本研究将课题组前期建立的微波消解技术水解 LBPs 样品的前处理方法^[10]与 PMP 柱前衍生-HPLC 法进行联用,对我国 4 个产地枸杞(新疆精河、宁夏中宁、甘肃玉门和青海都兰)样品中的 LBPs 含量进行测定并分析其单糖组成,以为不同产地枸杞品质评价提供方法参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枸杞样品:采集新疆精河、宁夏中宁、甘肃玉门和青海都兰 4 个产地样品各 3 份(500 g),经甘肃中医药大学谢晓蓉教授鉴定为茄科枸杞属宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥成熟果实,样品保存于中科院西北特色植物资源化学重点实验室,在-4℃冰箱冷冻保存,临用前取用。

D-葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-果糖、L-岩藻糖、D-核糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸标准品(纯度≥99%,中国食品药品检定研究院);乙醇、甲醇、二氯甲烷(CH_2Cl_2)、磷酸二氢钾(分析纯,天津大茂有限公司);TFA(分析纯,成都市科隆化学有限公司);盐酸(分析纯,西陇化工股份有限公司);氢氧化钠(分析纯,利安隆博华医药化学有限公司);乙腈(色谱纯)、PMP(纯度≥99%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器与设备

1260 型 Agilent HPLC 仪(美国 Agilent 公司);SinoChrom ODS-AP、SinoChrom ODS-BP 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm,大连依利特分析仪器有限公司);CEM Mars6 高通量密闭高压微波消解仪(美国培安有限公司);MX5 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团);CPA224S 万分之一电子天平(德国赛多利斯集团);MH500 电子调温电热套(北

京科伟永兴仪器有限公司); H1650 型医用离心机(长沙湘仪仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准品溶液制备

精密称取经干燥至恒重的 D-葡萄糖、D-木糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、L-岩藻糖、D-核糖、D-半乳糖醛酸和 D-葡萄糖醛酸对照品各约 100 mg, 分别置于 10 个 100 mL 容量瓶中, 加水适量使溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 1 mg/mL 的单糖标准品储备溶液。

精密量取单糖标准品储备溶液各 1 mL, 置于 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 10 μg/mL 的单糖标准品混合溶液。临用前分别稀释至 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 μg/mL。

1.3.2 样品溶液制备

(1) LBP 的提取

参考文献[8]进行, 由于文献方法使用紫外可见分光光度法(ultraviolet-visible spectrophotometry, UV-vis)测定 LBP 时枸杞中所含色素等成分会影响测定结果, 故先要用乙醚进行脱色处理。本研究使用 HPLC 法测定 LBP 时枸杞中所含色素不会对测定产生影响, 故具体操作过程略作修改: 精密称取干燥枸杞粉末 0.5 g, 加 100 mL 80%乙醇, 加热回流 1 h, 趁热过滤, 滤渣与滤器用 30 mL 80%热乙醇分次洗涤, 滤渣连同滤纸置烧瓶中, 加水 150 mL, 加热回流 2 h。趁热过滤, 用少量热水洗涤滤渣与滤器, 合并滤液与洗液, 浓缩, 浓缩液移至 25 mL 容量瓶中, 用少量水洗涤容器, 洗涤液并入容量瓶中, 用水定容至刻度, 得 LBP 提取液。

(2) LBP 的水解

参考文献[10]进行 LBP 样品前处理, 具体操作如下: 精密量取 5 mL 制备的 LBP 提取液, 加 5 mL 3 mol/L TFA, 在 120℃微波条件下消解 20 min 后 N₂ 吹干, 以 1 mL 蒸馏水定容, 得 LBP 水解液。

1.3.3 PMP 衍生化

参考文献[18–20]进行 LBP 的 PMP 衍生化, 具体操作如下: 精密量取 100 μL 各单糖标准品混合溶液及 LBP 水解液, 加 100 μL 0.5 mol/L PMP、100 μL 0.3 mol/L NaOH, 水浴锅 70℃避光反应 1 h, 冷却至室温, 加 100 μL 0.3 mol/L HCl 终止反应。以 700 μL CH₂Cl₂ 萃取 3 次, 取上层, 过 0.45 μm 滤膜, 按照 HPLC 色谱条件, 进样分析。

1.3.4 HPLC 色谱条件

色谱柱: SinoChrom ODS-BP 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 245 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL; 流速: 1.0 mL/min; 流动相 V_A 为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液, 流动相 V_B 为乙腈, 洗脱程序如表 1 所示。

1.3.5 样品测定

枸杞样品依次按 1.3.2、1.3.3 项下方法处理后, 再按

1.3.4 项 HPLC 色谱条件进样, 平行测定 3 次, 记录各单糖色谱峰峰面积。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution		
保留时间/min	流动相 V _A /%	流动相 V _B /%
0	82	18
55	82	18
57	84	16
75	84	16

1.3.6 计算方法

参考文献[21–22]计算 4 个不同产地枸杞样品的单糖含量与多糖含量。

1.3.7 数据处理

采用 Microsoft office Excel 2016、IBM SPSS Statistics 25.0 在 P<0.05 水平下进行统计分析, Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化结果

2.1.1 检测波长选择

采用相同质量浓度(1 mg/mL)的单糖(葡萄糖)溶液和单糖标准品混合溶液进行 PMP 衍生化, 用紫外分光光度计分别对其衍生物进行全波长扫描, 考察吸光度与波长的关系, 结果见图 1。由图 1 可知, 单糖标准品混合溶液衍生物在 245 nm 处有最大吸收, 因此, 本研究设定的检测波长为 245 nm。

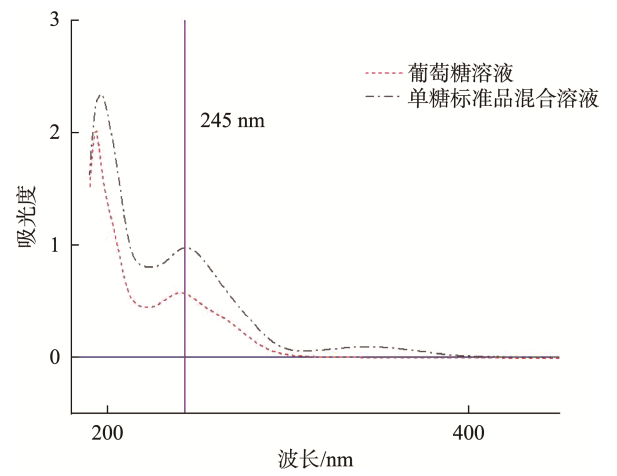
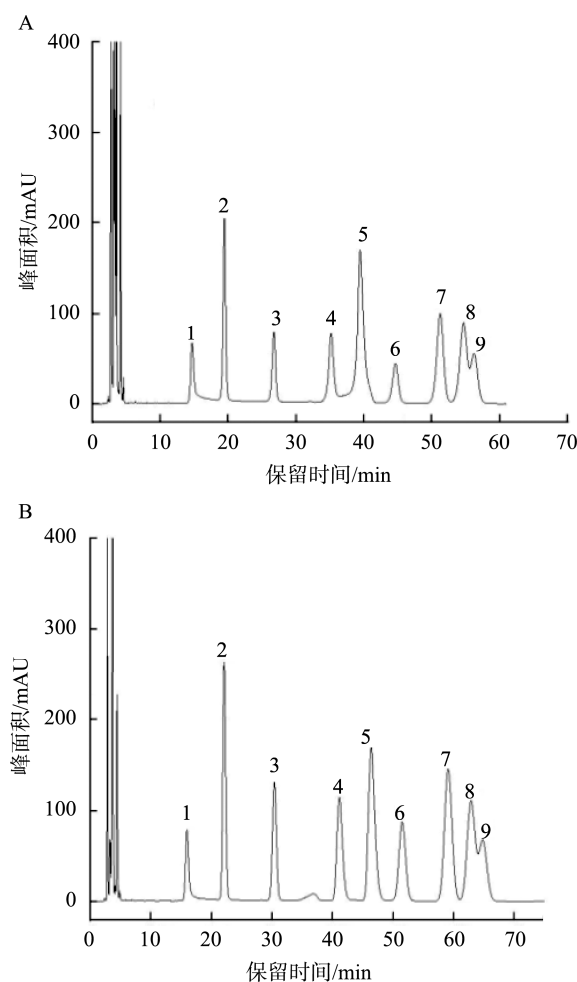


图 1 单糖衍生物在不同波长下的吸光度(n=3)
Fig.1 Absorbance of monosaccharide derivatives at different wavelengths (n=3)

2.1.2 色谱柱选择

采用 SinoChrom ODS-AP (A)和 SinoChrom ODS-BP

(B) 2 种色谱柱分别分析单糖标准品混合溶液衍生物, 考察色谱柱对分离的影响, 结果见图 2。由图 2 可知, 使用 2 种色谱柱对衍生物进行分离, 均不能实现同分异构体木糖和阿拉伯糖的基线分离, 但 SinoChrom ODS-BP 色谱柱对其他单糖分离效果优于 SinoChrom ODS-AP 色谱柱, 各单糖基本达到基线分离, 峰形较佳。因此, 本研究设定的色谱柱为 SinoChrom ODS-BP。



注: A: SinoChrom ODS-AP 色谱柱色谱图; B: SinoChrom ODS-BP 色谱柱色谱图; 1. PMP; 2. 甘露糖; 3. 鼠李糖; 4. 葡萄糖醛酸; 5. 半乳糖醛酸; 6. 葡萄糖; 7. 半乳糖; 8. 木糖; 9. 阿拉伯糖, 下同。

图 2 单糖标准品混合溶液 PMP 衍生物色谱图($n=3$)

Fig.2 Chromatograms of PMP derivatives of monosaccharide mixed standard solutions ($n=3$)

2.1.3 洗脱程序的确定

采用流动相 V_A (0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液): 流动相 V_B (乙腈)=82:18(V:V, 下同) 对单糖标准品混合溶液衍生物进行等度洗脱, 考察洗脱程序对单糖分离的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 采用 $V_A:V_B=82:18$ 等度洗脱, 除木糖和阿拉伯糖之外, 基本可以达到基线分

离。木糖与阿拉伯糖是手性对称分子, 均为五碳糖, 其吸附力和分配系数极为相似, 通常难以基线分离。根据文献[23-24]报道, 其二者常在相同的保留时间出现同一个峰, 通过提高磷酸盐缓冲溶液比例可适度提高其分离度。本研究将缓冲溶液比例提高至 84% 时, 洗脱时间延长至 75 min 时, 木糖与阿拉伯糖分离度有所提高; 继续将缓冲溶液比例增至 90% 时, 洗脱时间延长至 95 min, 但分离度较 84% 缓冲溶液未有明显变化。由此可见, 单纯增加缓冲盐比例, 分离效果没有显著改善, 保留时间却大大增加, 同时缓冲盐比例过高容易引起色谱柱的堵塞。按照表 1 程序进行梯度洗脱, 实际样品测定过程中, 梯度洗脱改善了二者分离效果。在此条件下, 单糖标准品混合溶液和样品溶液衍生物的色谱图见图 4。将所建方法用于 LBP 分析, 甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖在 75 min 内基本可实现有效分离。

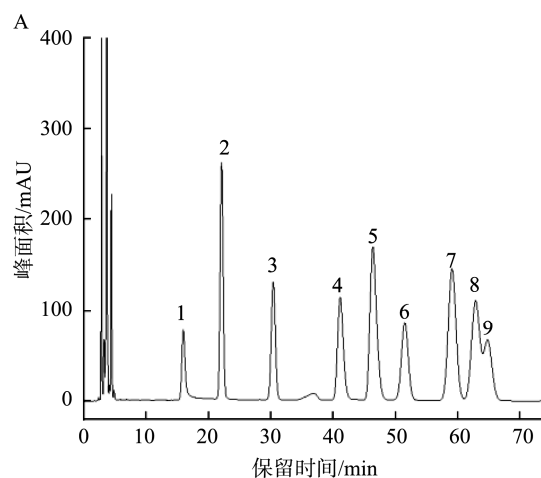


图 3 单糖标准品混合溶液 PMP 衍生物等度洗脱($n=3$)

Fig.3 Isometric elution of PMP derivative in mixed solution of monosaccharide standard ($n=3$)

2.2 方法学考察结果

2.2.1 线性关系与检出限、定量限

精密量取单糖标准品混合溶液和 LBP 水解液, 按照 1.3.3 项进行 PMP 衍生化, 按照 1.3.4 项色谱条件进样分析, 以各单糖标准品的色谱峰面积为纵坐标(Y), 以其对应的浓度为横坐标(X, $\mu\text{g/mL}$) 进行线性回归, 绘制标准曲线并计算相关系数(r^2)。以检测器响应信号为噪声值 3 倍时的浓度为检出限(limits of detection, LODs), 以检测器响应信号为噪声值 10 倍时的浓度为定量限(limits of quantitation, LOQs), 线性方程、线性范围、检出限和定量限的结果见表 2。各单糖在一定浓度范围内, r^2 均大于 0.98, 线性关系良好。各单糖 LODs $\leq 0.076 \mu\text{g/mL}$, 表明该方法灵敏度较高, 适用于 LBP 含量及组成的测定。

2.2.2 加标回收率考察

取 1.3.2 项下的 LBP_s 提取溶液分别加入高、中、低 3 个水平(1、2、3 μg/mL)的混合标准储备液, 按照 1.3.2 项及 1.3.3 项进行水解、衍生化反应, 按 1.3.4 项的色谱条

件进样分析, 平行测定 6 次, 计算回收率, 结果见表 3。由表 3 可知, 各单糖平均加标回收率在 94.95%~99.22%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSDs)为 1.07%~1.90%, 表明该方法准确度良好。

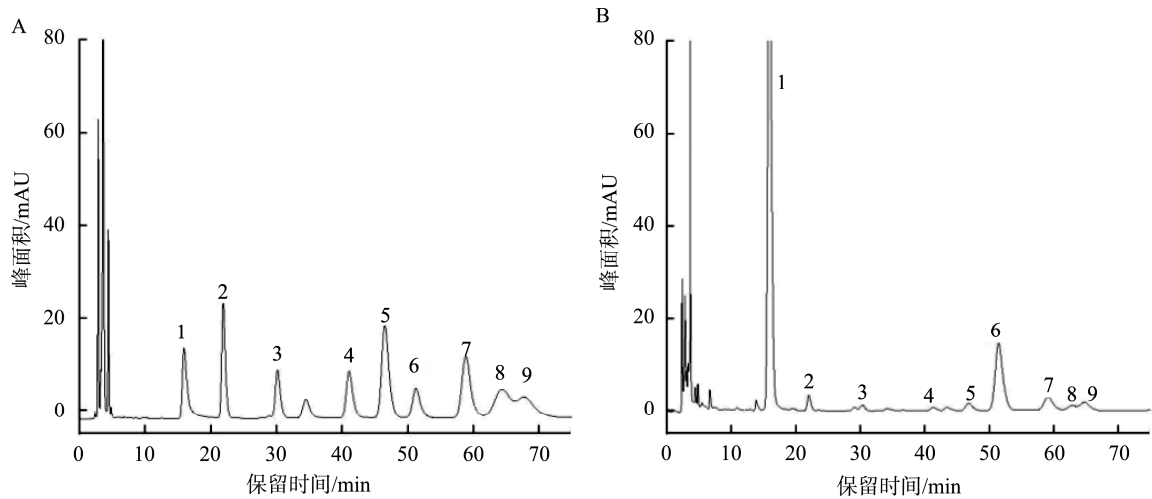


图 4 单糖标准品混合溶液(A)与样品(B) PMP 衍生物色谱图(n=3)
Fig.4 Chromatograms of monosaccharide mixed standard solution (A) and sample (B) PMP derivatives (n=3)

表 2 8 种单糖的线性方程、线性范围、检出限和定量限(n=3)				
Table 2 Linear equations, linear ranges, limits of detection and limits of quantification of 8 kinds of monosaccharides (n=3)				
目标物	线性方程	线性范围/(μg/mL)	LODs/(μg/mL)	LOQs/(μg/mL)
甘露糖	Y=266.58X-316.35	0.5~5.0	0.076	0.254
鼠李糖	Y=334.17X-375.94	0.2~5.0	0.022	0.073
葡萄糖醛酸	Y=203.62X-234.02	0.2~5.0	0.025	0.083
半乳糖醛酸	Y=223.71X-234.71	0.2~5.0	0.022	0.074
葡萄糖	Y=345.46X-391.80	0.2~50.0	0.026	0.086
半乳糖	Y=279.49X-307.56	0.5~10.0	0.033	0.110
木糖	Y=694.13X-737.93	0.2~5.0	0.029	0.097
阿拉伯糖	Y=241.63X-345.79	0.2~10.0	0.021	0.069

表 3 回收率实验结果(n=6)				
Table 3 Results of recovery test (n=6)				
单糖	样品含量 /(μg/mL)	加标量 /(μg/mL)	平均回收率 /%	RSDs /%
甘露糖	1.254	1.0; 2.0; 3.0	95.15	1.83
鼠李糖	1.246	1.0; 2.0; 3.0	95.46	1.07
葡萄糖醛酸	1.328	1.0; 2.0; 3.0	97.43	1.87
半乳糖醛酸	1.561	1.0; 2.0; 3.0	99.22	1.83
葡萄糖	6.259	3.0; 6.0; 9.0	97.77	1.90
半乳糖	2.035	1.0; 2.0; 3.0	97.56	1.25
木糖	1.195	1.0; 2.0; 3.0	94.95	1.87
阿拉伯糖	2.106	1.0; 2.0; 3.0	98.24	1.73

2.3 实际样品测定

2.3.1 不同产地 LBP_s 的单糖组成及含量
不同产地枸杞样品按照 1.3.5、1.3.6、1.3.7 项进行测定分析, 结果见表 4。由表 4 可知: 枸杞样品 LBP_s 中均含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖 8 种单糖, 由平均值可知, 葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的含量较高, 是 LBP_s 单糖组成的主要成分, 该趋势与文献[10]测定结果一致。由显著性分析结果可知, 除含量较低的甘露糖、鼠李糖外, 不同产地 LBP_s 的各单糖含量大部分均存在显著性差异(P<0.05), 其中甘肃玉门的葡萄糖含量最高, 为 10.667 mg/g; 青海都兰的甘露糖含量最低, 为 0.021 mg/g。分析其原因可能是光照、温度、海拔等生态因素影响了枸杞糖分的积累^[25-26]。

表 4 不同产地 LBP 单糖的组成、含量和物质的量比(mg/g, n=3)

Table 4 Composition, content and molar ratio of monosaccharides of LBPs in <i>Lycium barbarum</i> L. from different origins (mg/g, n=3)										
编号	产地	-	甘露糖	鼠李糖	葡萄糖醛酸	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	阿拉伯糖
S1	新疆精河	MC	0.027±0.001 ^a	0.049±0.005 ^a	0.042±0.002 ^a	0.081±0.005 ^a	7.868±0.100 ^a	2.240±0.005 ^a	0.695±0.004 ^a	1.464±0.010 ^a
		N	1.000	1.815	1.556	3.000	291.407	82.963	25.741	54.222
S2	宁夏中宁	MC	0.023±0.003 ^b	0.069±0.002 ^b	0.078±0.001 ^b	0.058±0.002 ^b	8.383±0.020 ^b	2.095±0.010 ^b	0.637±0.003 ^b	1.440±0.006 ^b
		N	1.000	3.000	3.391	2.522	364.478	91.087	27.696	62.609
S3	甘肃玉门	MC	0.034±0.002 ^c	0.052±0.002 ^a	0.066±0.003 ^c	0.067±0.002 ^c	10.667±0.010 ^c	1.340±0.004 ^c	0.653±0.005 ^c	1.840±0.010 ^c
		N	1.000	1.529	1.941	1.971	313.735	39.412	19.206	54.118
S4	青海都兰	MC	0.021±0.002 ^b	0.025±0.004 ^c	0.074±0.001 ^d	0.034±0.003 ^d	6.297±0.100 ^d	0.804±0.020 ^d	0.310±0.008 ^d	1.163±0.005 ^d
		N	1.000	1.190	3.524	1.619	299.857	38.286	14.762	55.381
平均值		MC	0.026	0.049	0.065	0.060	8.304	1.620	0.574	1.477
		N	1.000	1.884	2.603	2.278	317.370	62.937	21.851	56.582

注: -: 不同产地 LBP 单糖的含量和物质的量, MC: 含量; N: 物质的量; 同列字母表示不同产地 LBP 单糖含量之间具有显著性差异(P<0.05), 下同。

2.3.2 3 种 LBP 含量测定方法比较

分别应用本研究建立的方法与中国药典 2020 版(一部)^[8]规定的方法(苯酚-硫酸法)和微波消解-IC 法, 对我国 4 个不同产地枸杞样品进行多糖含量的测定和比较, 结果见表 5。由表 5 可知: 苯酚-硫酸法测定 LBP 含量的结果明显高于本研究建立方法测定的结果, 前者所测含量比后者平均高 2.94 倍。分析其原因可能是苯酚-硫酸法属于 UV-vis 法, 枸杞中复杂的伴生化化合物在测定时可能影响紫外吸收而造成误差^[27]; 同时, 苯酚-硫酸法以葡萄糖为对照进行含量计算, 而 LBP 中所含单糖结构差异使其紫外吸收性质与葡萄糖紫外吸收不完全相同, 苯酚-硫酸法所测结果只是以葡萄糖为基准的相对值, 无法真实反映枸杞中多糖的含量^[28]; 而本研究建立的方法通过测定构成 LBP 中单糖的含量, 加合计算多糖的含量, 可较为真实地反映枸杞中多糖的含量。

表 5 不同产地枸杞中的 LBP 含量(% , n=3)
Table 5 Content of LBPs in *Lycium barbarum* L. from different origins (% , n=3)

编号	产地	多糖含量		
		PMP 柱前衍生法	苯酚-硫酸法	离子色谱法
S1	新疆精河	2.55±0.03 ^a	7.18±0.02 ^a	3.43±0.20 ^a
S2	宁夏中宁	2.57±0.02 ^a	7.21±0.02 ^a	3.62±0.20 ^a
S3	甘肃玉门	2.97±0.01 ^b	8.00±0.04 ^b	3.93±0.04 ^b
S4	青海都兰	1.75±0.04 ^c	6.57±0.03 ^c	2.24±0.05 ^c
平均值	-	2.46	7.24	3.31
含量比	-	1.00	2.94	1.34

注: -: 3 种 LBP 含量测定方法测定不同产地 LBP 平均值与含量比。

微波消解-IC 法测定 LBP 含量的结果略高于本研究建立方法测定的结果。分析其原因, 一方面是微波消解-IC 法可测定 LBP 中 11 种单糖的组成和含量^[10], 而本研究建立的方法可测定 LBP 中 8 种单糖的组成和含量, 岩藻糖、核糖和果糖无法测定是导致本研究建立的方法 LBP 含量测定结果略低的主要原因, 但这 3 种糖在枸杞中含量极低, 前两者仅占总糖含量的 0.98%, 后者为酮糖^[29], 仅占 2.2%, 对测定 LBP 含量影响较小, 本研究建立的方法基本可体现 LBP 的含量; 另一方面是两种方法的不同所致, 本研究建立的方法和微波消解-IC 法检测的原理不同, 本研究建立的方法主要是通过 PMP 衍生将样品单糖组分制备成具有紫外吸收能力的衍生物, 用二极管阵列检测器进行测定^[12]; IC 法主要是在碱性条件下通过施加一个电位的金电极, 使样品糖分发生氧化还原反应, 用脉冲安培检测器进行测定^[9]。在分析检测中, 使用的检测设备不同, 同一种物质的量测定的结果可能不完全相同, 但本研究建立的方法检出限完全满足 LBP 实际含量的测定。

分别对 PMP 柱前衍生法、苯酚-硫酸法、离子色谱法测定的 4 个产地 LBP 含量进行显著性分析, 在 P<0.05 水平下, 本研究方法测定的新疆精河与宁夏中宁 LBP 含量没有显著性差异(P>0.05), 其余产地两两之间 LBP 含量均具有显著性差异(P<0.05), LBP 含量由高到低依次为甘肃玉门>宁夏中宁>新疆精河>青海都兰, 该趋势与采用苯酚-硫酸法、离子色谱法测定结果一致。

3 结 论

本研究建立了微波消解-PMP 柱前衍生-HPLC 法测定 LBP 含量, 经方法学验证, 该方法准确、可靠、适用性强。应用该方法对我国 4 个不同枸杞主产地样品进行测定, 结

果表明: LBP 主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸 8 种单糖组成。不同产地单糖组分含量存在差异, 其中葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖含量较高; 木糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸含量较低, 该趋势与文献研究结果一致^[10]。不同产地 LBP 含量存在差异, LBP 含量由高到低依次为甘肃玉门>宁夏中宁>新疆精河>青海都兰, 该趋势与采用苯酚-硫酸法、离子色谱法研究结果一致。

本研究建立的微波消解-PMP 柱前衍生-HPLC 法对 LBP 水解液进行测定, 与目前使用较普遍的 PMP 衍生-HPLC 法相比, 明显缩短了样品前处理时间, 提高了测定的稳定性^[30]; 与苯酚-硫酸分光光度法相比, 具有良好的专属性^[31]; 与课题组前期建立的微波消解-IC 法相比, 适用性更强^[32]。综上所述, 本研究建立的方法简单实用, 适用于枸杞及其制品中多糖含量的测定, 也为食品相关领域多糖含量测定提供了可借鉴的方法。

参考文献

- [1] WEI J, ZHANG L, LIU J, *et al.* Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on ethanol-induced injury in human hepatocyte and its mechanism [J]. *J Food Biochem*, 2020, (44)10: e13412.
- [2] ZHOU ZQ, FAN HX, HE RR, *et al.* Lycibarbarspermidines A-O, new dicationic spermidine derivatives from wolfberry, with activities against Alzheimer's disease and oxidation [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(11): 2223.
- [3] ZHOU ZQ, XIAO J, FAN HX, *et al.* Polyphenols from wolfberry and their bioactivities [J]. *Food Chem*, 2017, 214: 644–654.
- [4] EHNERT S, SEEHASE J, MÜLLER-RENNO C, *et al.* Simultaneous quantification of total carbohydrate and protein amounts from aqueous solutions by the sulfuric acid ultraviolet absorption method (SA-UV method) [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1174: 338712.
- [5] GRÜNEWALD C, BOHNERT S, JACOB S. The determination of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) [J]. *Method Mol Biol*, 2021, 2356: 57–68.
- [6] BAILLY C, HECQUET PE, KOUACH M, *et al.* Chemical reactivity and uses of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP), also known as edaravone [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2020, 28(10): 115463.
- [7] ZENG C, YE G, LI G, *et al.* RID serve as a more appropriate measure than phenol sulfuric acid method for natural water-soluble polysaccharides quantification [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 278: 118928.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2020 edition 1 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [9] MICHALSKI R, PECYNA-UTYLSKA P, KERNERT J. Ion chromatography and related techniques in carboxylic acids analysis [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2021, 51(6): 549–564.
- [10] 颜东妹, 王宁丽, 刘笑笑, 等. 微波消解-离子色谱法测定枸杞多糖的含量及组成[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1065–1072.
- XIE DM, WANG NL, LIU XX, *et al.* Determination of content and composition of *Lycium barbarum* polysaccharide by microwave digestion-ion chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(4): 1065–1072.
- [11] 李静, 李仁勇, 梁立娜. 毛细管型离子色谱-脉冲安培法检测枸杞多糖的单糖组成[J]. *分析化学*, 2012, 40(9): 1415–1420.
- LI J, LI RY, LIANG LN. Determination of monosaccharide constituents in *Lycium barbarum* polysaccharide using capillary ion chromatography with pulsed amperometric detection [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(9): 1415–1420.
- [12] VOJVODIĆ CA, KOMES D, RALET MC. Development and validation of HPLC-DAD method with pre-column PMP derivatization for monomeric profile analysis of polysaccharides from agro-industrial wastes [J]. *Polymers*, 2022, 14(3): 544.
- [13] 赵孟欣, 王泽岚, 孟哲, 等. 温和条件下柱前标记-高效液相色谱-质谱法测定枸杞多糖中单糖组成[J]. *色谱*, 2019, 37(11): 1162–1172.
- ZHAO MX, WANG ZL, MENG Z, *et al.* Analysis of monosaccharide composition in polysaccharides from *Lycium barbarum* L. by precolumn labeling under mild conditions and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(11): 1162–1172.
- [14] 余亦婷, 皮文霞, 谢辉, 等. PMP 柱前衍生化-HPLC 法分析不同生长年限黄芩中 6 种单糖的含量[J]. *中国药房*, 2021, 32(12): 1448–1452.
- YU YT, PI WX, XIE H, *et al.* Content determination of 6 kinds of monosaccharide in *Astragalus membranaceus* with different growth years by pre-column derivatization-HPLC [J]. *Chin Pharm*, 2021, 32(12): 1448–1452.
- [15] 周彦强, 吴光斌, 陈发河. PMP 柱前衍生化 HPLC 法测定黄秋葵多糖的单糖组成[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 266–271.
- ZHOU YQ, WU GB, CHEN FH. Analysis of monosaccharide composition of polysaccharides from okra by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2019, 40(4): 266–271.
- [16] 王骞, 杨敏, 郭冬琴, 等. PMP 柱前衍生化 HPLC 法测定野生与移栽滇重楼多糖的单糖组成[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(12): 1503–1509.
- WANG Q, YANG M, GUO DQ, *et al.* Determination of monosaccharide composition of polysaccharides from wild and transplanted *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis* by HPLC with PMP pre-column derivatization [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2019, 30(12): 1503–1509.
- [17] 赖戈娜, 贾文玉, 罗思婉, 等. 猪苓多糖的 PMP 柱前衍生化-HPLC 指纹图谱研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(7): 788–793.
- LAI GN, JIA WY, LUO SW, *et al.* Study on PMP pre-column derivatization-HPLC fingerprint of polyporus polysaccharide [J]. *Chin Pharm*, 2020, 31(7): 788–793.
- [18] WANG W, CHEN F, WANG Y, *et al.* Optimization of reactions between reducing sugars and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) by response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2018, 254: 158–164.
- [19] 赵行, 刘永成, 马娇颖, 等. 超高效液相色谱法检测香菇多糖片单糖组分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(5): 1659–1666.
- ZHAO X, LIU YC, MA JY, *et al.* Determination of monosaccharide

- components in *Lentinus edodes* polysaccharide tablets by ultra performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(5): 1659–1666.
- [20] 黄小兰, 何旭峰, 杨勤, 等. PMP 柱前衍生化 HPLC 法测定地参多糖的单糖组成[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 250–256.
- HUANG XL, HE XF, YANG Q, *et al.* Determination of monosaccharide composition in *Lycopus lucidus* polysaccharides by pre-column PMP derivatization and HPLC [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(7): 250–256.
- [21] 万晓莹, 刘振丽, 宋志前, 等. 中药多糖含量测定方法研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(7): 1175–1178.
- WAN XY, LIU ZL, SONG ZQ, *et al.* Study on determination method of polysaccharide content in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2021, 27(7): 1175–1178.
- [22] 郝变, 袁少雄, 潘丽丽, 等. 瓜蒌皮多糖的单糖组成及含量测定方法研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(6): 2153–2156.
- HAO B, YUAN SX, PAN LL, *et al.* Study on determination method of monosaccharide composition and content of polysaccharide in snakegourd peel [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(6): 2153–2156.
- [23] 田妍, 陈振兴, 张宁, 等. 中药水提液中还原糖衍生化测定方法研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(9): 3803–3807.
- TIAN Y, CHEN ZX, ZHANG N, *et al.* Study on the method of reducing sugar derivatization in water-extract of Chinese materiamedicia [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(9): 3803–3807.
- [24] 杨世波, 雀静, 宋云杉, 等. 高效液相色谱耦合柱前衍生化定量测定木质纤维素原料酸水解过程中还原糖的方法[J]. *纤维素科学与技术*, 2021, 29(4): 11–18.
- YANG SB, QUE J, SONG YS, *et al.* Method for quantitative determination of reducing sugar in acid hydrolysis of lignocellulosic by high performance liquid chromatography coupled with pre-column derivatization [J]. *J Cellul Sci Technol*, 2021, 29(4): 11–18.
- [25] WEI F, SHI Z, WAN R, *et al.* Impact of phosphorus fertilizer level on the yield and metabolome of goji fruit [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14656.
- [26] MI J, YAN Y, LI Y, *et al.* The effects of ecological factors on the chemical compounds in *Lycium barbarum* L. [J]. *Acta Physiol Plant*, 2020, 42(5): 84.
- [27] ZENG C, YE G, LI G, *et al.* RID serve as a more appropriate measure than phenol sulfuric acid method for natural water-soluble polysaccharides quantification [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 278: 118928.
- [28] YUE F, ZHANG J, XU J, *et al.* Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 963318.
- [29] XU J, WANG R, LIU J, *et al.* Determination of monosaccharides in *Lycium barbarum* fruit polysaccharide by an efficient UHPLC-QTRAP-MS/MS method [J]. *Phytochem Anal*, 2021, 32(5): 785–793.
- [30] WEN M, CUI Y, DONG CX, *et al.* Quantitative changes in monosaccharides of Keemun black tea and qualitative analysis of the aflavins-glucose adducts during processing [J]. *Food Res Int*, 2021, 148: 110588.
- [31] 徐涵, 刘云, 阙欢. 天然多糖提取纯化及生理功能活性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(5): 1382–1390.
- XU H, LIU Y, KAN H. Research progress on extraction, purification and physiological activity of natural polysaccharides [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(5): 1382–1390.
- [32] PENG Y, ZHAO L, HU K, *et al.* Anti-fatigue effects of *Lycium barbarum* polysaccharide and effervescent tablets by regulating oxidative stress and energy metabolism in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10920.

(责任编辑: 黄周梅 于梦娇)

作者简介



燕梦雨, 硕士研究生, 主要研究方向为中药学。

E-mail: 910053962@qq.com



谢晓蓉, 教授, 主要研究方向为中药资源评价、保护与可持续利用。

E-mail: gszyxxr@163.com



邸多隆, 研究员, 主要研究方向为基于现代分离分析技术的复杂体系的分离分析新方法与新技术的建立。

E-mail: didl@licp.cas.cn