

## 高效液相色谱法测定油茶饼粕多糖组成

李怡欣, 张盟雨, 王 颂, 王 静, 张应中, 谢桂军, 李兴伟

(广东省林业科学研究院 广东省森林培育与保护利用重点实验室, 广州 510520)

**摘要:**提出并对比了3种分析油茶饼粕多糖组成的高效液相色谱方法——氨基柱-折光示差检测器法、氨基柱-串联质谱法、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生-C18柱-紫外检测器法(柱前衍生法)。综合考虑分离效果、灵敏度、仪器成本等因素,最终选定柱前衍生法。柱前衍生法可同时测定油茶饼粕多糖中的鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸,线性关系良好(线性系数 $>0.99$ ),检出限为 $0.02\sim 0.29\text{ mg/L}$ ,定量限为 $0.06\sim 0.96\text{ mg/L}$ ;单糖及糖醛酸的加标回收率分别为 $77.2\%\sim 111.9\%$ 、 $60.1\%\sim 87.0\%$ ;峰面积日内精密密度为 $0.08\%\sim 3.77\%$ ,日间精密密度为 $0.39\%\sim 17.15\%$ 。利用柱前衍生法检测油茶饼粕多糖样品,结果显示所检的4个样品中均含有5种或6种单糖及2种糖醛酸,且含量最高的组分均为葡萄糖。

**关键词:**油茶饼粕多糖;单糖;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮;柱前衍生;高效液相色谱

**中图分类号:**TS207.3;O657      **文献标识码:**A      **文章编号:**1003-7969(2020)12-0126-07

## Determination of polysaccharide composition of oil-tea camellia seed cake by high performance liquid chromatography

LI Yixin, ZHANG Mengyu, WANG Song, WANG Jing,  
ZHANG Yingzhong, XIE Guijun, LI Xingwei

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization,  
Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** Three high performance liquid chromatography methods for the determination of polysaccharide composition of oil-tea camellia seed cake were put up and compared, which were  $\text{NH}_2$  column-refractive index detector (RID) method,  $\text{NH}_2$  column-tandem mass spectrometry (MS/MS) method, 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivation-C18 column-ultra-violet detector (UV) method (pre-column derivation method), respectively. Considering the separation effect, sensitivity, instrument cost and other factors, the pre-column derivation method was selected. The method could be used for determination of rhamnose, mannose, glucose, galactose, xylose, arabinose, glucuronic acid and galacturonic acid simultaneously. The correlation coefficients were higher than 0.99, with limits of detection  $0.02\sim 0.29\text{ mg/L}$  and limits of quantification  $0.06\sim 0.96\text{ mg/L}$ . The recoveries of standard addition of monosaccharides and uronic acids were  $77.2\%\sim 111.9\%$  and  $60.1\%\sim 87.0\%$  respectively. Intra-day relative standard deviations (RSD) of the peak area were  $0.08\%\sim 3.77\%$  while inter-day RSD were  $0.39\%\sim 17.15\%$ . The established method was then applied to detect four polysaccharide samples of oil-tea camellia seed cake. The results showed that all the polysaccharide samples consisted of five or six monosaccharides and two uronic acids, and glucose content was the highest.

收稿日期:2020-02-25;修回日期:2020-07-20

基金项目:广东省林业科技创新项目(2017 KJCX 003)

作者简介:李怡欣(1990),女,硕士研究生,研究方向为可食林产品的分析方法开发(E-mail)liy@sinogaf.cn。

**Key words:** oil-tea camellia seed cake polysaccharide; monosaccharide; 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone; pre-column derivation; high performance liquid chromatography

植物多糖是一种来源广泛的天然高分子化合物,一般由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、岩藻糖等单糖及葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸等组成<sup>[1]</sup>。多糖不仅可作为能量资源和结构材料,还参与生命现象中细胞的各种活动,具有抗氧化、降血糖、抗衰老、免疫调节等多种生物活性<sup>[2]</sup>。目前紫芝多糖、香菇多糖、黄芪多糖、猪苓多糖、人参多糖等植物多糖产品已被应用于治疗神经衰弱、抗肿瘤、增强免疫力等医药领域<sup>[3]</sup>。油茶(*Camellia oleifera* Abel),为山茶科山茶属,常绿小乔木或灌木,是我国特有的多年生木本油料作物。在优化的工艺条件下,可从油茶饼粕、油茶果壳、油茶籽壳中分别提取11.29%<sup>[4]</sup>、5.42%<sup>[5]</sup>、0.27%<sup>[6]</sup>的多糖。油茶饼粕多糖具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖等功能<sup>[7-9]</sup>。油茶饼粕作为油茶籽榨油的副产物,年产量约40万t<sup>[7]</sup>,而目前国内大部分油茶饼粕被用作肥料及饲料的原材料。分析油茶饼粕多糖的组成,对进一步研究油茶饼粕多糖的性质、结构、构效关系及生物活性等具有重要的意义,有利于促进油茶饼粕的高效利用,延长油茶加工产业链。

多糖的组成分析一般需先将多糖水解成单糖,再利用薄层色谱<sup>[10]</sup>、气相色谱<sup>[11]</sup>、液相色谱<sup>[12]</sup>等方法对单糖进行分离分析。在液相色谱法中,可用C18柱<sup>[13]</sup>、氨基(NH<sub>2</sub>)柱<sup>[14]</sup>、离子交换柱<sup>[15]</sup>、糖分析柱<sup>[16]</sup>等进行单糖分离,再用蒸发光散射检测器(ELSD)<sup>[17]</sup>、示差折光检测器(RID)<sup>[18]</sup>、紫外检测器(UV)<sup>[13]</sup>、串级质谱检测器(MS/MS)<sup>[14]</sup>等进行检测。NH<sub>2</sub>柱是利用柱上氨基与单糖分子的—OH的氢键强度不同,实现对不同单糖的分离;非极性的C18柱对单糖的保留较弱,但单糖经1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)衍生化后极性降低,故可利用C18柱分离。RID检测利用了单糖分子折光活性;单糖本身虽不产生紫外吸收信号,但其PMP衍生化产物具有生色团,故可用UV检测;MS/MS适用范围广,灵敏度高,也可应用于单糖分析。

本研究首次对比了3种分析油茶饼粕多糖组成的高效液相色谱方法,即NH<sub>2</sub>柱-RID法、NH<sub>2</sub>柱-MS/MS法和PMP柱前衍生-C18柱-UV法,并对优选的PMP柱前衍生-C18柱-UV法进行分析方法验证,以期为油茶饼粕多糖的定量分析及高值开发利用提供科学依据,以利于油茶产业的综合发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

油茶饼粕多糖样品,由广东省林业科学研究院

油茶研发团队提供,已经脱蛋白、脱色素处理。乙腈(色谱纯),欧普森试剂;1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP),麦克林试剂;葡萄糖(Glc),国药试剂;阿拉伯糖(Ara,98%)、甘露糖(Man,98%)、半乳糖(Gal,99%)、鼠李糖(Rha,98%)、木糖(Xyl,99%)、葡萄糖醛酸(GlcUA,98%)、半乳糖醛酸(GalUA,97%),源叶生物科技有限公司;硫酸、氢氧化钠、磷酸二氢钾、三氯甲烷均为分析纯,广州化学试剂厂;超纯水,由Synergy UV纯水系统(德国默克密理博公司)制备。

#### 1.1.2 仪器与设备

LC-30AD高压泵、SPD-20A紫外检测器、CTO-30A柱温箱、RID-10A示差折光检测器、LCMS 8040三重四极杆液质联用仪,日本岛津公司;CO-1000柱温箱,武汉恒信世纪科技有限公司;SHA-C水浴恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;DHG-9245A电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;0.22 μm聚砜醚(PES)针式过滤器,天津市津腾实验设备有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 混合标准溶液配制及分析

分别准确称取鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸的标准品,用去离子水溶解配制成单标溶液。取适当体积的若干种单标溶液混合,配制成混标溶液。分别采用NH<sub>2</sub>柱-RID法、NH<sub>2</sub>柱-MS/MS法及PMP柱前衍生-C18柱-UV法进行分析。

#### 1.2.2 NH<sub>2</sub>柱-RID法分析

取一定质量浓度的混标溶液直接进样分析。色谱条件:InertSustain NH<sub>2</sub>分析柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm,岛津技迹),柱温35℃,进样量10 μL,流动相为水-乙腈(体积比20:80),流速1.4 mL/min。

#### 1.2.3 NH<sub>2</sub>柱-MS/MS法分析

取一定质量浓度的混标溶液直接进样分析。色谱条件:InertSustain NH<sub>2</sub>分析柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm,岛津技迹),InertSustain NH<sub>2</sub>保护柱(10 mm × 4.0 mm × 5 μm,岛津技迹),柱温35℃,进样量2 μL,流动相为水-乙腈(体积比20:80),流速1.1 mL/min(柱后连接三通,进MS流速约为0.4 mL/min)。

质谱条件:电喷雾离子源,脱溶剂管温度150℃,加热块温度450℃,离子源电压-3.5 kV,雾化气流速2.5 mL/min,干燥气流速10 L/min,负离

子多反应监测模式(MRM)(具体条件见表1)。

表1 NH<sub>2</sub>柱-MS/MS法分析单糖的MRM条件

化合物	母离子 ( <i>m/z</i> )	子离子 ( <i>m/z</i> )	Q1 偏转 电压/V	碰撞能量/ eV	Q3 偏转 电压/V
鼠李糖	163.1	59.0	30	15	10
		103.0	30	10	10
木糖	149.1	89.0	15	10	20
		59.0	15	15	10
阿拉伯糖	149.1	89.0	15	10	20
		59.0	15	15	10
甘露糖	179.2	89.0	20	10	20
		59.0	20	15	10
葡萄糖	179.2	89.0	20	10	20
		59.0	20	15	10
半乳糖	179.2	89.0	20	10	20
		59.0	20	15	10

#### 1.2.4 PMP柱前衍生-C18柱-UV法

取一定质量浓度的混标溶液,按参考文献[13,19]进行衍生化。具体如下:取40 μL待测样品于1.5 mL聚丙烯离心管中,依次加入0.5 mol/L PMP甲醇溶液50 μL和0.3 mol/L氢氧化钠溶液50 μL,涡旋混匀后置于70℃烘箱中,反应1 h后取出,冷却至室温。再加入0.3 mol/L盐酸溶液50 μL,混匀后用1 mL三氯甲烷萃取,小心弃去有机层,重复3次。加入100 μL去离子水,混匀后用0.22 μm PES针式过滤器过滤,待高效液相色谱分析。

色谱条件:InertSustain C18分析柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm,岛津技迹),InertSustain C18保护柱(10 mm × 4.0 mm × 5 μm,岛津技迹),柱温35℃;检测器波长250 nm;进样量15 μL;流速1.0 mL/min;流动相A为乙腈-0.5 mol/L磷酸缓冲溶液(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH,pH 6.9)(体积比15:85),流动相B为乙腈-0.5 mol/L磷酸缓冲溶液(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH,pH 6.9)(体积比40:60),梯度见表2。

表2 PMP柱前衍生-C18柱-UV法分析单糖的流动相梯度

时间/min	A/%	B/%
0	100	0
10	80	20
25	80	20
40	75	25
45	100	0

#### 1.2.5 油茶饼粕多糖样品分析

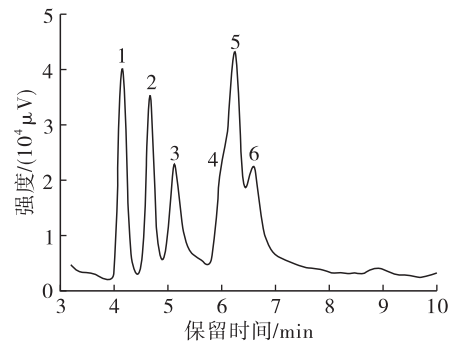
取0.250 g多糖样品,加入约60 mL 2 mol/L稀硫酸,120℃加热水解4 h,冷却至室温,上清液加0.2 mol/L氢氧化钠溶液调节至pH约为7,并用超纯水定容至50 mL。按照1.2.4步骤进行衍生化和分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 3种高效液相色谱法(HPLC)的单糖混标分析结果

#### 2.1.1 NH<sub>2</sub>柱-RID法

实验结果显示,2种糖醛酸具备折光信号,这与文献[20]报道相符。但采用NH<sub>2</sub>柱-RID法检测时,糖醛酸并未出峰,这可能与流动相pH、组成等因素有关<sup>[21-22]</sup>。对鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖的混标溶液(质量浓度均为10 g/L)进行检测,HPLC谱图如图1所示。



注:1.鼠李糖;2.木糖;3.阿拉伯糖;4.甘露糖;5.葡萄糖;6.半乳糖。

图1 NH<sub>2</sub>柱-RID法检测6种单糖混标溶液的HPLC谱图

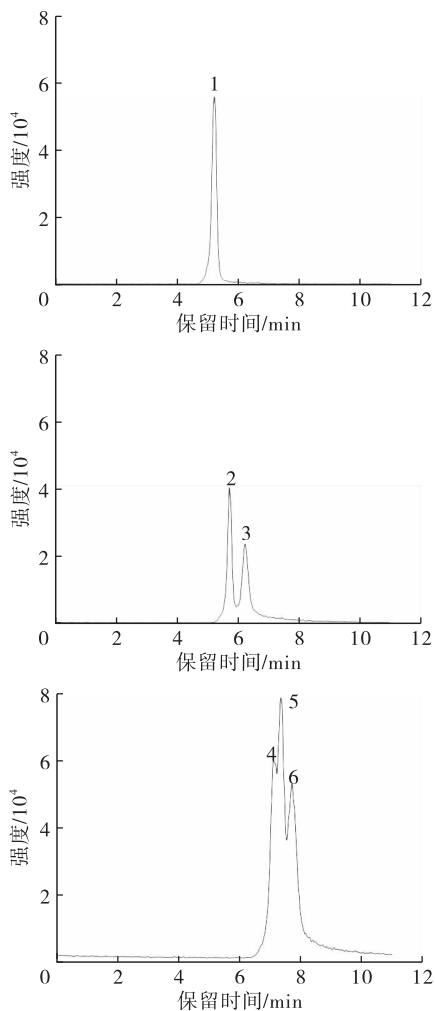
由图1可知,目标物质在8 min内出峰。该法具备不需对多糖水解产物进行再处理、分析时间短的优点,已被应用于测定谷物类、乳制品、果蔬制品、蜂蜜、糖浆、饮料等食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖含量的国家标准中<sup>[23]</sup>,但未能将油茶饼粕多糖中的2种目标戊糖(木糖、阿拉伯糖)和3种目标己糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖)完全分开。由于采用RID,因此也无法进行梯度淋洗以获得更好的分离度,且信号受柱温和流动相流速影响较大。以3倍信噪比计算,6种单糖的检出限在4 823~9 846 ng,灵敏度较低。此外,单糖中的羰基可能与色谱柱固定相中的一NH<sub>2</sub>发生反应生成席夫碱<sup>[24]</sup>,导致柱效降低、柱寿命缩短。因此,该法不能满足油茶饼粕多糖的单糖组成分析要求。

#### 2.1.2 NH<sub>2</sub>柱-MS/MS法

实验结果显示,在优化的MRM条件下,6种单糖和2种糖醛酸均具有质谱响应。但连接上NH<sub>2</sub>柱时,糖醛酸并未出峰,原因与2.1.1分析的NH<sub>2</sub>柱-RID法的相同。对鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖的混标溶液(质量浓度均为200 mg/L)进行检测,HPLC谱图如图2所示。

由图2可见,目标物质在10 min内出峰。6种单糖的出峰顺序与NH<sub>2</sub>柱-RID法一致。与RID法

相比,由于MRM所选择的离子对不同,因此避免了鼠李糖与其他戊糖、己糖谱图的互相干扰。但2种戊糖(木糖、阿拉伯糖)之间、3种己糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖)之间的分离度仍然没有改善。以3倍信噪比计算,6种单糖的检出限为3.53~8.39 ng,灵敏度较RID法约提高3个数量级。该法与NH<sub>2</sub>柱-RID法一样,具有不需对多糖水解产物进行再处理、分析时间短的优点,并克服了RID灵敏度低的缺点。缺点是同分异构体之间未能完全分离,糖羰基可能与NH<sub>2</sub>柱反应导致色谱柱受损。此外,多糖水解产物中的盐或其他杂质可能影响目标物质的离子化效率,并对离子源造成污染,仪器成本和维护成本较高。



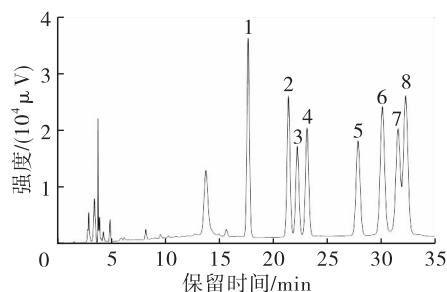
注:1. 鼠李糖;2. 木糖;3. 阿拉伯糖;4. 甘露糖;5. 葡萄糖;6. 半乳糖。

图2 NH<sub>2</sub>柱-MS/MS法检测6种单糖混标溶液的HPLC谱图

### 2.1.3 PMP柱前衍生-C18柱-UV法

利用PMP柱前衍生-C18柱-UV法对鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸的混标溶液(质量浓度均为55

mg/L)进行分离分析,所得HPLC谱图如图3所示。



注:1. 甘露糖;2. 葡萄糖醛酸;3. 鼠李糖;4. 半乳糖醛酸;5. 葡萄糖;6. 半乳糖;7. 木糖;8. 阿拉伯糖。

图3 PMP柱前衍生-C18柱-UV法检测8种PMP衍生物的HPLC谱图

由图3可见,在流动相的梯度淋洗下,甘露糖、葡萄糖醛酸、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖的PMP衍生物在17~35 min依次出峰,13.8 min处的峰属于残留的PMP。除木糖与阿拉伯糖外,其他4种单糖衍生物均能得到较好的基线分离,分离效果较NH<sub>2</sub>柱好;8种目标物质的检出限在0.26~4.31 ng,灵敏度高。该法所用的色谱柱和检测器较前两种方法更普遍、易得、易维护。缺点是衍生化步骤较烦琐,衍生化过程中可能导致样品损失或引入杂质,需仔细操作。

3种分析方法的检出限对比见表3。综合比较3种分析方法的灵敏度优缺点,决定采用PMP柱前衍生-C18柱-UV法检测油茶饼粕多糖样品的组成,并对其进行分析方法验证。

表3 3种分析方法的检出限对比 ng

化合物	NH <sub>2</sub> 柱-RID法	NH <sub>2</sub> 柱-MS/MS法	PMP柱前衍生-C18柱-UV法
鼠李糖	5 151	3.53	2.47
木糖	5 967	4.79	4.31
阿拉伯糖	9 536	7.68	1.89
甘露糖	8 132	7.17	1.04
葡萄糖	4 823	5.43	3.06
半乳糖	9 846	8.39	2.82
葡萄糖醛酸	-	-	2.31
半乳糖醛酸	-	-	0.26

## 2.2 PMP柱前衍生-C18柱-UV法分析方法验证

### 2.2.1 线性范围及检出限(LOD)、定量限(LOQ)

配制不同质量浓度的单糖与糖醛酸混标溶液,并按照1.2.4步骤进行分析。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,拟合线性方程,对最低质量浓度的标准溶液逐级稀释、测定,按信噪比分别为3、10计算检出限和定量限,结果见表4。

表4 6种单糖和2种糖醛酸的线性范围、拟合方程、相关系数(*r*)、检出限(LOD)及定量限(LOQ)

化合物	拟合方程	<i>r</i>	线性范围/(mg/L)	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)
甘露糖	$y = 9\ 707.37x + 2\ 279.59$	0.999 9	1 ~ 200	0.07	0.23
葡萄糖醛酸	$y = 4\ 447.47x + 994.297$	0.996 6	1 ~ 100	0.15	0.51
鼠李糖	$y = 4\ 455.03x + 989.051$	0.999 1	1 ~ 100	0.16	0.55
半乳糖醛酸	$y = 5\ 774.81x - 2\ 610.79$	0.991 0	1 ~ 250	0.02	0.06
葡萄糖	$y = 7\ 167.02x - 64\ 928.2$	0.998 8	5 ~ 500	0.20	0.68
半乳糖	$y = 5\ 802.97x - 4\ 732.57$	0.998 3	5 ~ 300	0.19	0.63
木糖	$y = 5\ 168.16x - 6\ 041.04$	0.999 2	1 ~ 200	0.29	0.96
阿拉伯糖	$y = 7\ 787.55x - 1\ 532.15$	0.999 5	1 ~ 200	0.13	0.42

由表4可知,各衍生物峰面积与单糖/糖醛酸质量浓度之间线性良好,线性系数均大于0.99,检出限为0.02~0.29 mg/L,定量限为0.06~0.96 mg/L。

### 2.2.2 加标回收率和精密度

取一个已知单糖组成的油茶饼粕多糖样品,分别按照50%、100%、150%3个加标水平添加6种单糖和2种糖醛酸的混标溶液,每个水平制备5个平行样。按照1.2.5方法测定,计算加标回收率和精密度,结果见表5。

表5 6种单糖和2种糖醛酸的加标回收率(*n*=5)

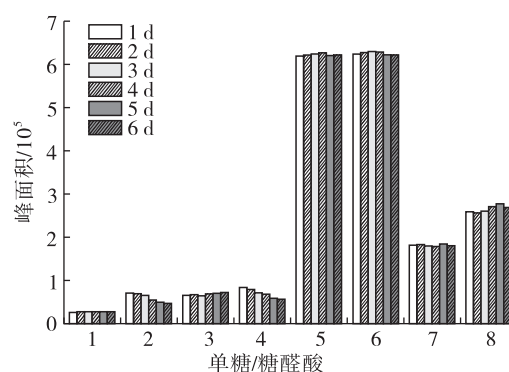
化合物	背景值/(mg/L)	加标值/(mg/L)	实测值/(mg/L)	回收率/%	RSD/%
甘露糖	5.07	2.50	7.28	88.4	5.1
		5.00	9.40	86.6	12.1
		7.50	12.07	93.4	5.0
葡萄糖醛酸	18.04	9.00	25.35	81.2	4.7
		18.00	33.70	87.0	4.0
		27.00	36.88	69.8	5.3
鼠李糖	14.89	9.00	24.96	111.9	0.1
		18.00	33.21	101.8	2.6
		27.00	40.75	95.8	6.2
半乳糖醛酸	22.67	12.50	32.55	79.0	6.1
		25.00	37.69	60.1	3.0
		37.50	50.33	73.8	4.8
葡萄糖	118.73	60.00	173.71	91.6	5.4
		120.00	211.32	77.2	1.3
		180.00	285.36	92.6	4.5
半乳糖	90.10	50.00	136.41	92.6	1.8
		100.00	176.55	86.5	2.2
		150.00	231.27	94.1	4.2
木糖	30.54	12.50	43.99	107.6	6.1
		25.00	58.17	110.5	2.6
		37.50	70.14	105.6	3.0
阿拉伯糖	26.52	12.50	37.06	84.3	3.4
		25.00	48.23	86.8	3.1
		37.50	66.54	106.7	2.6

取一个已完成衍生化的样品溶液,在同一天内

连续测定6次并计算各组分的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD),即得日内精密度。连续6d测定该溶液,并计算各组分的保留时间和峰面积的RSD,即得日间精密度,结果见表6。8种PMP衍生物的峰面积日间变化见图4。

表6 6种单糖和2种糖醛酸的日内精密度和日间精密度(*n*=6)

化合物	日内 RSD		日间 RSD	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
甘露糖	0.08	3.77	0.61	3.13
葡萄糖醛酸	0.11	0.90	1.07	17.15
鼠李糖	0.08	0.61	0.89	4.38
半乳糖醛酸	0.12	1.83	1.19	15.85
葡萄糖	0.11	0.10	0.98	0.39
半乳糖	0.12	0.08	1.02	0.65
木糖	0.11	0.29	1.03	1.19
阿拉伯糖	0.12	0.26	1.04	2.94



注:1.甘露糖;2.葡萄糖醛酸;3.鼠李糖;4.半乳糖醛酸;5.葡萄糖;6.半乳糖;7.木糖;8.阿拉伯糖。

图4 8种PMP衍生物的峰面积日间变化

由表5可知,6种单糖的加标回收率为77.2%~111.9%,2种糖醛酸的加标回收率偏低,为60.1%~87.0%,可能与糖醛酸分子易发生内酯化有关<sup>[25]</sup>。

由表6可知,6种单糖保留时间的日内RSD和日间RSD分别为0.08%~0.12%和0.61%~1.04%,峰面积的日内RSD和日间RSD分别为0.08%~3.77%和0.39%~4.38%。其中甘露糖的峰面积

精密度较其他5种单糖低(除鼠李糖的日间RSD),这与所测样品中甘露糖含量较低有关。葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸保留时间的日内RSD和日间RSD分别为0.11%、0.12%和1.07%、1.19%,峰面积的日内RSD和日间RSD分别为0.90%、1.83%和17.15%、15.85%。2种糖醛酸的峰面积日内RSD较小,但从2d开始呈现出峰面积逐渐减小的趋势(见图4),可能因糖醛酸易发生内酯化而导致衍生化产物不稳定。综上,该方法测定甘露糖、鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖6种单糖的精密度高,测定葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸时日内精密度高,日间精密度较低。为减小误差,建议糖醛酸的标液现配现用,并在衍生化后的1d内进行测定。

### 2.3 油茶饼粕多糖样品分析

依据1.2.5的方法对4个未知的油茶饼粕多糖样品进行测定,结果见表7。

表7 油茶饼粕多糖样品的检测结果 mg/g

化合物	样品1	样品2	样品3	样品4
甘露糖	1.3	0.6	ND	ND
葡萄糖醛酸	1.1	1.4	3.0	4.5
鼠李糖	0.8	1.0	2.7	3.9
半乳糖醛酸	1.7	0.8	6.0	9.1
葡萄糖	79.7	17.7	22.4	26.9
半乳糖	6.9	8.7	15.9	24.0
木糖	0.6	0.6	7.1	11.9
阿拉伯糖	1.7	2.0	6.5	10.0
总计	93.8	32.8	63.6	90.3

注:ND为未检出。

由表7可知,4个油茶饼粕多糖样品均含有鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸,此外样品1和样品2还含有少量甘露糖,单糖及糖醛酸总含量为32.8~93.8 mg/g。4个样品中含量最高的均为葡萄糖,分别占单糖和糖醛酸总量的85.0%、54.0%、35.2%和29.8%。

### 3 结论

本研究对比了3种分析油茶饼粕多糖的单糖组成的高效液相色谱方法,并建立了稀酸水解与PMP柱前衍生-C18柱-UV法相结合的测定油茶饼粕多糖组成的方法。该法可同时测定6种单糖和2种糖醛酸含量,灵敏度高,检出限低,分离效果较好,可为油茶多糖的高值开发利用提供技术支撑,有利于促进油茶产业的综合发展。

### 参考文献:

[1] FENG S, CHENG H, FU L, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activities of polysaccharides from

*Camellia oleifera* leaves[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 68: 7-12.

- [2] 杨玲,胡睿智,夏嗣廷,等.植物多糖的功能性研究进展及其在动物生产中的应用[J].动物营养学报,2019,31(6):2534-2543.
- [3] 中华人民共和国国家药品监督管理局.国产药品[EB/OL].[2020-02-05].http://www.nmpa.gov.cn.
- [4] 张盟雨,王静,张应中,等.水提醇沉法提取油茶饼粕多糖的响应面优化[J].林业与环境科学,2019,35(5):1-6.
- [5] 陈景斯,李奕彤,王晓佳,等.油茶果壳多糖乙醇提取工艺的优化及其吸湿保湿性能[J].中成药,2019,41(5):970-974.
- [6] 余红军,李立祥,倪媛,等.油茶籽壳中多糖和原花青素的超声波提取工艺[J].食品与发酵工业,2010,36(8):194-197.
- [7] 罗凡,黄美群,胡立松,等.油茶籽热处理对油茶饼中多糖含量及其抗氧化性影响的研究[J].中国油脂,2019,44(8):41-45.
- [8] JIN X, NING Y. Antioxidant and antitumor activities of the polysaccharide from seed cake of *Camellia oleifera* Abel [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51(4): 364-368.
- [9] ZHANG S, LI X. Hypoglycemic activity in vitro of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 115: 811-819.
- [10] DONER L W. Determining sugar composition of food gum polysaccharides by HPTLC[J]. Chromatographia, 2001, 53(9): 579-581.
- [11] ZEINALY F, SARAEIAN A, GABOV K, et al. Determination of carbohydrates in sugarcane bagasse pulp in different TCF bleaching sequences [J]. Cellul Chem Technol, 2017, 51(1/2): 45-53.
- [12] 乐胜锋,王尉,王雅萱,等.离子色谱-脉冲安培法测定芦荟多糖中7种单糖的含量[J].色谱,2019,37(3):319-324.
- [13] 杨兴斌,赵燕,周四元,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J].分析化学,2005(9):1287-1290.
- [14] 赵丹,冯峰,粟有志,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定螺旋藻多糖的单糖组成[J].色谱,2017,35(4):413-420.
- [15] 李国强,尹平河,赵玲,等.离子色谱-积分脉冲安培检测法测定大蒜多糖的单糖组成[J].分析测试学报,2007(3):401-403,408.
- [16] SLIMESTAD R, VÅGEN I M. Thermal stability of glucose and other sugar aldehydes in normal phase high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2006, 1118(2): 281-284.

(下转第136页)

染风险,确保食用植物油的安全,是十分必要和紧迫的。

### 3 结 论

本文建立了同位素内标-气相色谱-质谱法用于食用植物油中 GEs 含量的测定。采用正交实验对衍生条件进行优化,确定 3-MBPD 与 PBA 的最佳衍生条件为 GEs 质量浓度为 21.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, PBA 用量 100  $\mu\text{L}$ ,衍生温度 50  $^{\circ}\text{C}$ ,衍生时间 10 min。本方法的检出限为 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均加标回收率为 91.4%~97.0%,RSD 为 4.4%~8.6%。方法可操作性强、重现性好,灵敏度、准确度和精密度均能满足实际工作中食用植物油中 GEs 的定性定量检测,可为食用植物油中 GEs 含量的检测标准制定和 GEs 风险监控提供重要依据。

### 参考文献:

- [1] ARISSETO A P, SILVA W C, TIVANELLO R G, et al. Recent advances in toxicity and analytical methods of monochloropropanediols and glycidyl fatty acid esters in foods[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 24:36-42.
- [2] 向晓玲,赵波,李春松,等. 食用油中 3-氯丙醇酯的研究进展[J]. *中国油脂*, 2017, 42(7): 59-64.
- [3] 宁柠,王卫飞,李道明,等. 食用油脂中缩水甘油酯的风险评估研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(1): 1-6.
- [4] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for human health related to the

presence of 3- and 2- monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food [J/OL]. *Efsa J*, 2016, 14(5) [2020-08-27]. <https://doi.org/10.29031j.efs.2016.4426>.

- [5] Amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of glycidyl fatty acid esters in vegetable oils and fats, infant formula, follow-on formula and foods for special medical purposes intended for infants and young children; Commission Regulation (EU) 2018/290 [S]. Brussels: Official Journal of European Union, 2018.
- [6] 刘京,张晖,王瑛瑶,等. 液相色谱-质谱法测定食用油中缩水甘油酯的含量[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(15): 308-311.
- [7] 宁柠. 油脂工业中缩水甘油酯的产生规律及风险评估研究[D]. 广州:华南理工大学, 2015.
- [8] 袁蕊. 对植物油中缩水甘油酯的两种气相色谱质谱测定方法的比较分析[J]. *分析仪器*, 2018(4): 159-163.
- [9] 李利君,司天雷,马传国. 食用油中缩水甘油酯的检测方法研究进展[J]. *中国油脂*, 2017, 42(9): 83-87.
- [10] 李荷丽,罗季阳,苗虹,等. 氯丙醇和氯丙醇脂肪酸酯检测方法研究进展[J]. *检验检疫学刊*, 2019, 29(6): 124-127,131.
- [11] 胡守江,周静,张妮,等. 同位素内标-气相色谱-质谱法测定婴幼儿配方乳粉中缩水甘油脂肪酸酯的含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2018, 54(7): 745-751.

(上接第 131 页)

- [17] SHARMA U, BHANDARI P, KUMAR N, et al. Simultaneous determination of ten sugars in *Tinospora cordifolia* by ultrasonic assisted extraction and LC-ELSD [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(7): 633-638.
- [18] 汪兴杰,张予林,刘吉彬,等. 基于氨基柱的高效液相色谱-示差折光检测器方法分析媚丽葡萄香气糖苷的糖基组成[J]. *分析化学*, 2017, 45(5): 681-686.
- [19] HONDA S, AKAO E, SUZUKI S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180(2): 351-357.
- [20] VORAGEN A G J, SCHOLS H A, DE VRIES J A, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of uronic acids and oligogalacturonic acids[J]. *J Chromatogr A*, 1982, 244(2): 327-336.
- [21] WEI Y A, FANG J N. Studies on the chromatographic

behavior of some uronic acids and neutral sugars on an amino-bonded phase column [J]. *J Chromatogr A*, 1990, 513: 227-235.

- [22] HAMMAD L A, DERRYBERRY D Z, JMEIAN Y R, et al. Quantification of monosaccharides through multiple-reaction monitoring liquid chromatography/mass spectrometry using an aminopropyl column [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1565-1574.
- [23] 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定:GB 5009.8—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [24] XU W, LIANG L, ZHU M. Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction[J]. *Int J Food Prop*, 2015, 18(3): 547-557.
- [25] BRONS C, OLIEMAN C. Study of the high-performance liquid chromatographic separation of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk [J]. *J Chromatogr A*, 1983, 259: 79-86.