

PMP柱前衍生化HPLC法测定黄秋葵多糖的单糖组成

周彦强, 吴光斌*, 陈发河
(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361000)

摘要: 采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮为柱前衍生化试剂, 结合反相高效液相色谱法, 建立同时测定黄秋葵多糖中8种单糖组分的方法。采用InfinityLab Poroahell C₁₈色谱柱为固定相, 流动相为磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.85)-乙腈(82:18, V/V), 流速为1.0 mL/min, 柱温25℃, 紫外检测器, 波长250 nm。各单糖组分的线性范围较宽, 相关系数均大于0.999, 检出限为0.13~0.45 mg/kg, 定量限为0.43~1.49 mg/kg, 相对标准偏差小于5%, 加标回收率为94.51%~106.44%。方法灵敏度高、准确性好、实用可靠, 适用于黄秋葵多糖的单糖组分分析。同时测定从黄秋葵中顺序提取的热水浸提物(hot buffer soluble solution, HBSS)、螯合剂浸提物(chelating agent soluble solution, CHSS)和碱提物(dilute alkaline soluble solution, DASS)的单糖组成, 确定其单糖组分的物质的量比。HBSS中, 甘露糖:鼠李糖:葡萄糖醛酸:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=0.1:7.0:0.4:5.8:0.9:14.6:1.5; CHSS中, 鼠李糖:半乳糖醛酸:半乳糖:阿拉伯糖=4.7:61.8:9.6:5.3; DASS中, 甘露糖:鼠李糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=9.5:5.4:1.3:10.8:2.4:7.6。

关键词: 黄秋葵; 单糖组分; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生; 高效液相色谱

Analysis of Monosaccharide Composition of Polysaccharides from Okra by Pre-Column Derivatization High Performance Liquid Chromatography

ZHOU Yanqiang, WU Guangbin*, CHEN Fahe
(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361000, China)

Abstract: A simple and sensitive high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of eight monosaccharides in okra polysaccharides by pre-column derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) was developed. The monosaccharides were separated on an InfinityLab Poroahell C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 4 μm), maintained at 25℃, using phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 6.85): acetonitrile mixture (82:18, V/V) as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The wavelength of the UV detector was set at 250 nm. Under optimal conditions, the method had wide linear ranges for all monosaccharides, with correlation coefficients above 0.999. The detection limits (LODs) were in the range of 0.13–0.45 mg/kg and the limits of quantitation (LOQs) were in the range of 0.43–1.49 mg/kg. The spiked recoveries ranged from 94.51% to 106.44%, with relative standard deviations (RSDs) less than 5%. The method proved to be simple, rapid and accurate, and could meet the analysis of the monosaccharide composition of okra polysaccharides. This method was successfully applied to analyze the monosaccharide composition of three different polysaccharides from sequential solvent extraction of okra with hot sodium acetate buffer, sodium oxalate-EDTA·2Na-sodium acetate buffer and sodium hydroxide-sodium borohydride solution. The first polysaccharide was composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose at a molar ratio of 0.1:7.0:0.4:5.8:0.9:14.6:1.5, the second one was composed of rhamnose, galacturonic acid, galactose and arabinose at a molar ratio of 4.7:61.8:9.6:5.3, and the third one was composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose at a ratio of 9.5:5.4:1.3:10.8:2.4:7.6.

收稿日期: 2018-01-30

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20173025)

第一作者简介: 周彦强(1994—)(ORCID: 0000-0003-1739-4221), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工。

E-mail: zhouyanqiang@live.cn

*通信作者简介: 吴光斌(1967—)(ORCID: 0000-0003-1254-6329), 女, 高级工程师, 学士, 研究方向为食品分析。

E-mail: gbwu@jmu.edu.cn

Keywords: okra; monosaccharide composition; 1-phenyl-3-menthy-5-pyrazolone pre-column derivatization; high performance liquid chromatography

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180130-426

中图分类号: O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 04-0266-06

引文格式:

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.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180130-426. <http://www.spkx.net.cn>

ZHOU Yanqiang, WU Guangbin, CHEN Fahe. Analysis of monosaccharide composition of polysaccharides from okra by pre-column derivatization high performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2019, 40(4): 266-271. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180130-426. <http://www.spkx.net.cn>

黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus* L.) 属于锦葵科植物, 起源于非洲^[1], 在上个世纪90年代引入我国, 目前在全国多个地区均有栽培, 产量较高^[2]。黄秋葵嫩荚中含有丰富的黏性多糖物质, 主要是由果胶类多糖、半乳糖、阿拉伯聚糖及少量糖蛋白组成^[3]。果胶多糖是一种可溶性纤维, 它能促进机体内毒素的排泄, 降低血糖及胆固醇的含量, 也具有一定的抗肿瘤作用^[4]。黄秋葵的水溶性果胶具有较高的黏性, 前人对其流变学性质、结构单元和乳化性等做了部分研究。Kontogiorgos等^[1]研究黄秋葵流变学特性, 结果显示具有明显的剪切稀化现象; Sengkhamparn等^[5]研究黄秋葵结构单元, 发现包含一种特殊的 α 键连接的鼠李糖-半乳糖交替单元; Georgiadis等^[6]研究黄秋葵水包油乳液的流变学特性和稳定性, 认为其具有作为乳化剂的潜力。黄秋葵的水溶性果胶还具有类似脂肪的性质, 已经被用作脂类的替代物^[7], 还有研究称这种特殊黏液可用来制备Lepidimoides (一种类植物激素, 属于寡糖类生物活性物质)^[8]。

多糖中单糖组分的分析, 通常需要用三氟乙酸将多糖降解成单糖再进行测定。目前单糖的检测方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法、气相色谱法及高效阴离子交换色谱安培检测法等^[9]。薄层色谱法具有操作方便、设备简单、无需衍生化的特点, 但是其灵敏度低, 分离效果差, 仅适用于简单多糖的定性分析。气相色谱法分离效能高、测定快速、灵敏度高; Sengkhamparn等^[10]使用气相色谱法分析了黄秋葵多糖的单糖组成。但是糖类化合物和多元醇挥发性和热稳定性较低、沸点高, 需对其衍生化后才能用气相色谱法进行分析, 而气相色谱法的单糖衍生化反应操作十分复杂, 容易产生异构体, 也容易受样品杂质的干扰, 误差较大。高效阴离子交换色谱安培检测法是糖类技术分析较为理想的方法, 它利用糖类化合物的电化学活性, 单糖可在强碱溶液中呈离子化状态, 因此可以使用强碱溶液作为流动相通过阴离子交换从而达到分离效果。潘媛媛等^[11]利用此法分析了啤酒和麦汁中的单糖组分, 但该法的缺点是分析过程中需要使用较高pH值的流动相, 对设备的要求较高, 价格昂

贵, 并且较低的柱容也限制了后续的分析操作。HPLC法用于单糖组成分析时具有分离速度快、分辨率高、重现性好等优点。单糖可以直接使用HPLC法结合通用型检测器进行分析。裴雅渔等^[12]使用高效液相体积排阻色谱法配合示差折光检测器分析黄秋葵多糖的单糖组成。刘晓霞^[3]使用HPLC配合示差折光检测器分析黄秋葵花中果胶类多糖的单糖组成。但是通用型示差折光检测器灵敏度低, 检测限也较高; 而另一种通用型检测器蒸发光散射检测器价格昂贵且检测步骤繁琐。单糖分子本身缺少发色基团, 无法直接使用紫外或荧光检测器, 因此一定程度上限制了单糖的分析检测。有研究将多糖水解后的单糖用发光试剂衍生后再利用HPLC法分离和检测^[13-17], 其原理是1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-menthy-5-pyrazolone, PMP) 可以在碱性条件下与单糖定量缩合成PMP-单糖衍生物, 该物质较为稳定并在波长250 nm处有较强的光吸收^[18-20], 这使得紫外检测器可以应用于单糖的分析。本实验将顺序提取的3种不同黄秋葵多糖经过酸高温水解为单糖, 研究PMP柱前衍生化HPLC法测定黄秋葵多糖的单糖组成的分析方法, 旨在为黄秋葵多糖的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜黄秋葵购自厦门市集美区永辉超市, 样品购买后去蒂去籽, 置于 -75°C 保存备用。

鼠李糖、葡萄糖醛酸 (均为色谱纯) 北京索莱宝科技有限公司; 甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 (均为分析纯)、NaOH、HCl、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等 (均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 岩藻糖 (分析纯) 美国Aladdin公司; 乙腈 (色谱纯)、PMP (纯度 $\geq 99.9\%$) 美国Sigma公司; 三氟乙酸 (色谱纯) 上海麦克林生化科技有限公司。标准品纯度均不小于98%。

1.2 仪器与设备

2695 HPLC仪 (配Waters 2489紫外检测器) 美国

Waters公司; PE20K型pH计、LE204E电子天平 瑞士Mettler Toledo公司; RIOS 8超纯水系统 美国Millipore公司; WB-14恒温水浴锅 德国Memmert公司; ULT1386 -80 °C超低温冰箱 美国Thermo Fisher公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

0.1 mol/L磷酸盐缓冲液 (pH 6.85): 配制0.1 mol/L磷酸氢钠和0.1 mol/L磷酸二氢钠, 混合后调整pH值至6.85; 单一标准储备液: 配制质量浓度在1.0~1.7 mg/L内的8种单糖标准品(甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、半乳糖醛酸、阿拉伯糖、岩藻糖), 4 °C保存1周; 混合标准溶液: 分别移取适量的单一标准储备液混合, 然后用超纯水稀释至2、4、8、16、32、64倍, 得到梯度混合标准溶液。

1.3.2 黄秋葵多糖的提取

将黄秋葵冷冻干燥后粉碎, 称取黄秋葵粉末10.0 g, 再分别使用70%乙醇溶液洗涤(料液比1:10 (g/mL)) 2次、三氯甲烷-甲醇溶液(1:1, V/V)洗涤(料液比1:15 (g/mL)) 3次、丙酮洗涤(料液比1:10 (g/mL)) 2次, 然后烘干, 得到醇不溶固形物(alcohol-insoluble solid, AIS)。

使用3种不同的缓冲溶液对AIS进行顺序提取。每种缓冲液重复提取多次至提取液中的总糖质量浓度低于50 µg/mL, 总糖含量的测定使用苯酚-硫酸法^[21]。缓冲溶液1为醋酸盐缓冲液(pH 5.2, 0.05 mol/L), 料液比1:60 (g/mL), 70 °C提取30 min得到热水浸提物(hot buffer soluble solution, HBSS)提取液; 缓冲溶液2为草酸钠(0.05 mol/L)、EDTA·2Na(0.05 mol/L)和醋酸钠(0.05 mol/L)的混合溶液, 料液比1:60 (g/mL), 70 °C提取30 min得到螯合剂浸提物(chelating agent soluble solution, CHSS)溶液; 缓冲溶液3为NaOH(0.05 mol/L)和硼氢化钠(0.02 mol/L)的混合溶液, 料液比1:60 (g/mL), 70 °C提取30 min得到碱提物(dilute alkaline soluble solution, DASS)溶液。

将得到的HBSS、CHSS和DASS溶液使用Sevag溶液(氯仿-正丁醇, 5:1, V/V)反复处理脱去蛋白质; 然后透析48 h脱盐, 期间换水6次; 旋蒸浓缩后冷冻干燥, 得到HBSS、CHSS和DASS多糖样品。

1.3.3 多糖样品的水解

称取多糖样品固体10.0 mg于离心管中, 加2 mol/L的三氟乙酸2 mL, 氮气封口后于110 °C水解5 h, 旋干水解后的溶液, 再利用甲醇洗涤后旋干, 继续重复3次除去残留的三氟乙酸, 最后加入10.0 mL蒸馏水得到1.0 mg/mL的样品水解溶液。

1.3.4 衍生处理

取多糖样品的水解液或单糖标准溶液500 µL于

试管中, 加入0.3 mol/L NaOH溶液500 µL, 混合后加入0.5 mol/L PMP-甲醇溶液500 µL, 混匀后70 °C水浴60 min, 冷却后加入0.3 mol/L HCl溶液500 µL中和NaOH; 然后加氯仿1 mL涡旋30 s, 离心后吸弃氯仿层, 继续重复萃取2次以除去多余的PMP, 最后过0.22 µm微孔膜备用。

1.3.5 HPLC条件

InfinityLab Poroahell C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 4 µm); 检测波长250 nm; 柱温25 °C; 上样量20 µL; 流速1 mL/min; 流动相为磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.85)-乙腈(82:18, V/V); 洗脱方式为等度洗脱。

1.4 数据处理

使用Microsoft Excel 2016软件和Empower 2软件对数据进行处理, 使用Adobe 3d Reviewer软件和Empower 2软件对图像进行处理。

2 结果与分析

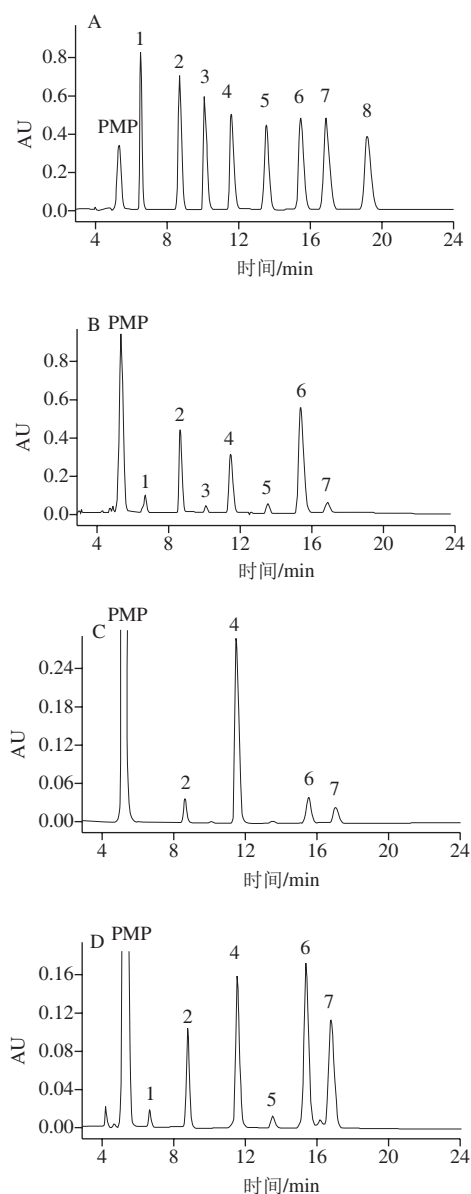
2.1 色谱柱的选择

考察Symmetry C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 µm)、Xbridge Amide C₁₈(4.6 mm×150 mm, 3.5 µm)和InfinityLab Poroahell C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 4 µm), 在磷酸盐(pH 6.75)-乙腈溶液(82:18, V/V)条件下的分离效果。结果显示, Xbridge Amide C₁₈的效果较差, 其中半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸的分离度均小于1.2; 而Symmetry C₁₈和InfinityLab Poroahell C₁₈柱均具有良好的分离效果, 8种单糖组分的分离度均大于1.5。又因InfinityLab Poroahell C₁₈柱的柱长为150 mm, 其分析时间短, 节省流动相, 因此实验选用InfinityLab Poroahell C₁₈柱。

2.2 流动相体系的选择

以磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相反相分离PMP-醛糖衍生物时, 缓冲液的pH值和乙腈的比例是重要的影响因素。相关文献选用的pH值大多为6.6~6.9^[22-24]。实验先使用磷酸盐缓冲液(pH 6.75)-乙腈作流动相, 考察乙腈比例分别为16%、17%、18%、19%、20%对单糖衍生物的分离效果。结果表明, 乙腈比例越少, 8种单糖的分离度越大, 分析时间越长, 而PMP的出峰时间受影响较小, 这与林钦恒等^[25]的研究结果基本一致。当乙腈比例小于18%时, 8种单糖的分离度均大于1.5, 实验进一步考察缓冲液的pH值分别为6.65、6.75、6.85、6.95时对8种单糖的保留时间及分离效果的影响。结果表明, 增大pH值可以缩短分析时间, 但是过高的pH值会使糖醛酸的出峰时间相对提前, 导致葡萄糖醛酸与鼠李糖有重合现象, 分离度降低, 这与张晓^[26]的研究结果基本一致; 当使用磷酸盐(pH 6.85)缓冲液-乙腈(82:18, V/V)溶液

进行洗脱时, 8 种单糖的分离效果良好, 分离度均大于 1.5。因此本实验最终选用磷酸盐缓冲液 (pH 6.85) - 乙腈 (82:18, *V/V*) 溶液作为流动相。在上述优化的色谱条件下对标准品和样品进行测定, 如图1所示。



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

图1 8种单糖标准品(A)、HBSS(B)、CHSS(C)和DASS(D)色谱图

Fig. 1 HPLC profiles of mixed eight monosaccharide standards and three polysaccharides

2.3 标准曲线、线性范围和检出限测定结果

将梯度浓度的单糖标准溶液按1.3.4步骤衍生, 在优化的实验条件下进行测定。以各单糖组分的色谱峰峰面积为纵坐标 (*y*) 与相应浓度为横坐标 (*x*) 绘制标准曲线, 根据信噪比确定检出限 ($R_{SN}=3$) 和定量

限 ($R_{SN}=10$)。如表1所示, 8 种单糖的相关系数均大于 0.999 0, 说明线性关系良好; 8 种单糖的检出限为 0.13~0.45 mg/kg, 定量限为 0.43~1.49 mg/kg。

表1 单糖组分的标准曲线方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限
Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) for monosaccharides by HPLC

单糖组分	标准曲线方程	相关系数	线性范围/(mg/kg)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
甘露糖	$y=40\ 620x+45\ 161$	0.999 6	2.07~132.65	0.13	0.43
鼠李糖	$y=36\ 171x+87\ 167$	0.999 1	2.95~189.00	0.19	0.62
葡萄糖醛酸	$y=31\ 018x+48\ 722$	0.999 6	3.13~200.00	0.25	0.85
半乳糖醛酸	$y=31\ 950x+55\ 002$	0.999 3	2.92~187.00	0.28	0.94
葡萄糖	$y=30\ 119x+58\ 146$	0.999 4	2.91~186.50	0.35	1.17
半乳糖	$y=36\ 303x+58\ 149$	0.999 0	2.96~189.50	0.34	1.14
阿拉伯糖	$y=45\ 982x+103\ 525$	0.999 1	2.91~186.50	0.28	0.93
岩藻糖	$y=32\ 655x+114\ 517$	0.999 2	3.30~211.25	0.45	1.49

2.4 回收率与精密度测定结果

在超纯水中分别加入高中低3个水平的混标, 按照1.3.4节方法进行处理, 各加标水平平行测定6次, 计算其回收率和相对标准偏差, 见表2。结果表明, 8 种单糖的加标回收率为 94.51%~106.44%, 相对标准偏差均小于 5%, 说明该检测方法准确度好、精密度高。

表2 单糖组分的空白加标回收率 ($n=6$)
Table 2 Average recoveries of monosaccharides in spiked pure water ($n=6$)

单糖组分	加标量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
甘露糖	26.53	25.60, 25.57, 26.24, 26.37, 25.98, 26.45	98.13	1.48
	53.06	51.34, 50.40, 51.17, 49.80, 50.51, 48.70	94.84	1.92
	79.59	79.24, 78.24, 80.22, 80.20, 80.67, 82.01	100.64	1.60
鼠李糖	38.82	39.09, 38.83, 38.52, 40.27, 39.51, 38.86	103.65	1.60
	75.60	78.73, 76.94, 77.96, 76.37, 77.36, 76.30	102.22	1.23
	113.40	116.85, 122.46, 120.50, 119.69, 124.01, 120.68	106.44	2.03
葡萄糖醛酸	40.00	39.35, 39.10, 39.90, 39.02, 39.78, 39.12	98.45	0.96
	80.00	76.06, 78.47, 77.05, 73.78, 74.74, 75.36	94.89	2.21
	120.00	114.43, 110.80, 112.50, 117.16, 112.58, 113.00	94.51	1.92
半乳糖醛酸	37.40	37.03, 38.73, 37.10, 38.14, 39.41, 37.42	101.53	2.53
	74.80	74.18, 73.32, 74.44, 71.95, 72.89, 72.67	97.92	1.28
	112.20	112.21, 114.72, 112.13, 114.82, 116.42, 112.65	101.45	1.54
葡萄糖	37.30	38.57, 38.55, 39.72, 39.73, 39.22, 40.07	105.39	1.63
	74.60	75.13, 75.27, 76.55, 72.88, 73.83, 74.85	100.20	1.70
	111.90	112.90, 114.60, 113.43, 115.55, 116.31, 113.89	102.28	1.14
半乳糖	37.90	37.77, 37.25, 37.21, 38.90, 37.89, 37.54	99.63	1.64
	75.80	75.75, 75.87, 76.73, 73.48, 74.43, 75.03	99.23	1.54
	113.70	113.10, 115.08, 114.93, 115.76, 116.77, 115.33	101.28	1.05
阿拉伯糖	37.30	37.43, 37.97, 37.00, 38.56, 38.63, 37.32	101.39	1.78
	74.60	75.18, 74.26, 73.58, 72.92, 73.87, 71.79	98.66	1.58
	116.83	118.79, 116.78, 111.92, 121.73, 118.45, 112.44	104.28	3.29
岩藻糖	42.25	41.99, 41.45, 41.08, 43.25, 42.18, 41.44	99.17	1.84
	84.50	84.13, 83.29, 84.42, 81.61, 82.65, 82.95	98.43	1.23
	126.75	129.22, 127.44, 127.78, 132.69, 128.89, 127.67	101.74	1.52

2.5 样品的测定

表3 3种样品的单糖含量 (n=3)
Table 3 Monosaccharide composition of three samples (n=3)

单糖组分	HBSS		CHSS		DASS	
	测定值/ (mg/kg)	相对标准 偏差/%	测定值/ (mg/kg)	相对标准 偏差/%	测定值/ (mg/kg)	相对标准 偏差/%
甘露糖	17.58±0.31	1.78	—	—	2.8±0.04	1.72
鼠李糖	114.91±1.24	1.08	7.77±0.07	1.01	31.2±0.27	0.88
葡萄糖醛酸	7.75±0.14	1.83	—	—	—	—
半乳糖醛酸	123.47±1.21	0.99	131.18±0.64	0.49	70.14±0.19	0.28
葡萄糖	15.51±0.26	1.71	—	—	3.29±0.06	1.94
半乳糖	262.67±1.69	0.64	17.28±0.11	0.64	88.65±0.39	0.44
阿拉伯糖	22.63±0.56	2.49	7.99±0.11	1.46	53.13±0.60	1.14
岩藻糖	—	—	—	—	—	—

注：—未检出。

利用本方法对3种样品进行测定，结果见表3。样品HBSS中含有甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖，其物质的量比为0.1:7.0:0.4:5.8:0.9:14.6:1.5；样品CHSS中含有鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖，其物质的量比为4.7:61.8:9.6:5.3，样品DASS中含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖，其物质的量比为9.5:5.4:1.3:10.8:2.4:7.6。

3 讨论

果胶中含量较高的结构是半乳糖醛酸聚糖(homogalacturonan, HG)、鼠李半乳糖醛酸聚糖I(rhamnogalacturonan I, RG I)和鼠李半乳糖醛酸聚糖II(rhamnogalacturonan II, RG II)。其中RG II的分子链较小，并且通常连接于HG的末端，所以在果胶中的含量也较少。对不同植物、植物不同器官或植物细胞中不同位置的果胶，其HG和RG I的比例也不相同^[27]。HG结构的主链是半乳糖醛酸；而RG I结构的主链是鼠李糖和半乳糖醛酸的交替结构，2种单糖的比例为1:1。根据Alba等^[28]的研究，单糖的物质的量比可以反映果胶分子结构包括支链上的差异。使用不同的溶液对黄秋葵进行提取可以得到不同组分的多糖，这可能与多糖在细胞内的存在位置或者多糖与其他物质的结合方式有关^[1,4,29]。使用热水浸提得到的HBSS应该是黄秋葵细胞中游离于细胞质或者与细胞壁结合不紧密的多糖，其中高物质的量比的鼠李糖说明其具有很高比例的RG I结构，大量的半乳糖说明其分子链具有较多的分支结构；使用螯合剂提取得到的CHSS应该是黄秋葵细胞中以离子键结合到细胞壁上的多糖，其中具有高比例的半乳糖醛酸，说明其中的果胶结构主要为HG结构，这与螯合剂对离子键的破坏有关；DASS的提取过程使用碱溶液和还原剂，这可能会

破坏部分共价键，其结构与HBSS类似，但是其中出现了较多的阿拉伯糖^[10]。

此外，根据样品的测定结果，此提取方法可以得到不同结构的多糖，实现多糖的粗分离效果，其主要体现在HBSS和CHSS上。在果胶类多糖中，其酸性和中性糖的差异主要体现在半乳糖醛酸的含量上。对热水浸提后的AIS，使用螯合剂(EDTA和草酸盐)可以屏蔽掉钙离子，这部分半乳糖醛酸含量较高的多糖便被提取出来。此法可以一次性分离得到大量的粗多糖，同时具有速度快的优点。Coimbra等^[30]也根据类似的原理进行了橄榄果多糖的分离。

4 结论

本实验建立PMP柱前衍生HPLC法分析黄秋葵多糖的单糖组成的方法，测定从黄秋葵中顺序提取的3种不同多糖的单糖组成，确定其物质的量比，样品HBSS中，甘露糖:鼠李糖:葡萄糖醛酸:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=0.1:7.0:0.4:5.8:0.9:14.6:1.5；样品CHSS中，鼠李糖:半乳糖醛酸:半乳糖:阿拉伯糖=4.7:61.8:9.6:5.3；样品DASS中，甘露糖:鼠李糖:半乳糖醛酸:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖=9.5:5.4:1.3:10.8:2.4:7.6。该方法不仅目标物响应值高、干扰低、稳定，而且与其他方法相比，其检出限更低，准确度和精密度高，灵敏度和回收率高，操作简便，可用于黄秋葵多糖组成的分析，亦可为其他植物材料多糖组成研究提供参考。

参考文献:

[1] KONTOGIORGOS V, MARGELOU I, GEORGIADIS N, et al. Rheological characterization of okra pectins[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(2): 356-362. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.04.003.

[2] 陈忆. 黄秋葵果胶和超微粉的制备及性质研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015.

[3] 刘晓霞. 黄秋葵花果胶类多糖的提取工艺及其性质的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[4] MOHNEN D. Pectin structure and biosynthesis[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(3): 266-277. DOI:10.1016/j.pbi.2008.03.006.

[5] SENGKHAMPARN N, BAKX E J, VERHOEF R, et al. Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(14): 1842-1851. DOI:10.1016/j.carres.2008.11.022.

[6] GEORGIADIS N, RITZOULIS C, SIOURA G, et al. Contribution of okra extracts to the stability and rheology of oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 991-999. DOI:10.1016/j.foodhyd.2010.09.014.

[7] TILMON R W, ROMANCHIK-CERPOVICZ J E. Feasibility of using okra exudate as a fat replacer in low fat chocolate dropped cookies[J]. Journal of the American Dietetic Association, 2001, 101(9): A-23. DOI:10.1016/S0002-8223(01)80055-9.

[8] HIROSE K, ENDO K, HASEGAWA K. A convenient synthesis of lepidimide from okra mucilage and its growth-promoting activity

- in hypocotyls[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(1): 9-19. DOI:10.1016/j.carres.2003.10.003.
- [9] 张丽芝, 沈荣. 单糖组成分析方法的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(1): 77-81. DOI:10.3969/j.issn.1005-5673.2013.01.017.
- [10] SENGKHAMPARN N, VERHOEF R, SCHOLS H A, et al. Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench)[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(14): 1824-1832. DOI:10.1016/j.carres.2008.10.012.
- [11] 潘媛媛, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析啤酒和麦汁中的糖[J]. 色谱, 2008, 26(5): 626-630. DOI:10.3321/j.issn.1000-8713.2008.05.020.
- [12] 裘雅渔, 李巧玲, 程和勇. 高效液相体积排阻色谱法分析黄秋葵多糖的单糖组成[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(12): 27-30. DOI:10.3969/j.issn.1006-7167.2014.12.008.
- [13] STRYDOM D J. Chromatographic separation of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-derivatized neutral, acidic and basic aldoses[J]. Journal of Chromatography A, 1994, 678(1): 17-23. DOI:10.1016/0021-9673(94)87069-1.
- [14] FU D T, ONEILL R A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 227(2): 377-384. DOI:10.1006/abio.1995.1294.
- [15] 陈燕文, 李玉娟, 宋梦璐, 等. PMP柱前衍生化-HPLC法分析玛咖多糖的单糖组成[J]. 当代化工, 2017, 46(8): 1513-1516. DOI:10.3969/j.issn.1671-0460.2017.08.004.
- [16] 姜彩霞, 刘晓兰, 田英华, 等. 高效液相色谱法测定亚麻纤维果胶单糖衍生条件的优化[J]. 毛纺科技, 2014, 42(10): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.1003-1456.2014.10.001.
- [17] 戴军, 朱松, 汤坚, 等. PMP柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 206-210. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2007.02.015.
- [18] XUE S, WANG L, CHEN S, et al. Simultaneous analysis of saccharides between fresh and processed radix rehmanniae by HPLC and UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS with multivariate statistical analysis[J]. Molecules, 2018, 23(3): 541-560. DOI:10.3390/molecules23030541.
- [19] JIANG W X, DI S X, HUA H M, et al. Structural characterization of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves and its α -glucosidase inhibitory effect[J]. Chinese Traditional & Herbal Drugs, 2017, 48(8): 1524-1528. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.008.
- [20] 张璐瑶, 赵峡, 陈欢欢. 糖类化合物PMP衍生分析进展[J]. 分析测试学报, 2016, 35(3): 367-372. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2016.03.020.
- [21] 王文洁, 唐炜, 俞玲娜, 等. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定凉粉草多糖的比较[J]. 食品科技, 2017, 42(9): 274-279. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2017.09.053.
- [22] 付海宁, 赵峡, 杨海, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定多糖类兽药中单糖组分的方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(6): 9-12. DOI:10.3969/j.issn.1002-1280.2010.06.003.
- [23] 朱照武, 庄洋, 向春林, 等. 单糖柱前PMP衍生HPLC测定方法探讨[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2015, 33(3): 337-341. DOI:10.13501/j.cnki.42-1569/n.2015.09.027.
- [24] 郝蕾蕾, 张典瑞, 赵忠熙, 等. 柱前衍生化HPLC法测定黄河滩枣多糖的单糖组成[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(6): 740-743. DOI:10.3969/j.issn.1005-1678.2012.33.006.
- [25] 林钦恒, 郑家概, 蔡大川, 等. 柱前衍生化HPLC法测定酵母细胞壁中的甘露聚糖与 β -葡聚糖[J]. 分析测试学报, 2015, 34(1): 106-110. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2015.01.017.
- [26] 张晓. 桑叶多糖的提取分离纯化、结构鉴定及PMP柱前衍生HPLC分析单糖组成[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [27] TEMENOUGA V, CHARITIDIS T, AVGIDOU M, et al. Novel emulsifiers as products from internal Maillard reactions in okra hydrocolloid mucilage[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52(Suppl 1): 972-981. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.08.026.
- [28] ALBA K, LAWS A P, KONTOGIORGOS V. Isolation and characterization of acetylated LM-pectins extracted from okra pods[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 726-735. DOI:10.1016/j.foodhyd.2014.08.003.
- [29] MA X L, SONG F F, ZHANG H, et al. Compositional monosaccharide analysis of *Morus nigra* Linn by HPLC and HPCE quantitative determination and comparison of polysaccharide from *Morus nigra* Linn by HPCE and HPLC[J]. Current Pharmaceutical Analysis, 2017, 13(5): 433-437. DOI:10.2174/1573412913666170330150807.
- [30] COIMBRA M A, WALDRON K W, SELVENDRAN R R. Isolation and characterisation of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europaea* L.)[J]. Carbohydrate Research, 1994, 252(1): 245-262. DOI:10.1016/0008-6215(94)90019-1.