

白及中四类糖的定量检测

刘品华¹, 冯亚娟¹, 杨凤仙¹, 曹 晓¹, 马菊莲^{2,*}

(1. 曲靖师范学院化学与环境科学学院, 云南曲靖 655011;

2. 云南煜欣农林生物科技有限公司, 云南曲靖 655500)

摘要: 白及中糖类的含量对评价白及质量有重要意义, 为此开展了白及中四类糖的定量检测研究。白及粉用适量水均匀润湿, 加无水乙醇调至乙醇浓度为 80% vol, 超声提取, 离心分离。清液除去乙醇后, 用纯水定容, 按 GB5009.7 检测还原糖和酸水解后检测非还原低聚糖含量。固体用淀粉酶水解后定容、过滤, 清液加 4 倍体积的无水乙醇混匀后离心, 其离心清液按 GB 5009.9 检测淀粉含量, 固体按 SN/T 4260 检测粗多糖含量。结果表明, 还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖的 RSD 为 1.12%、0.67%、3.66%、1.73%, 回收率为 103.41(98.14)%、93.76%、101.21%、96.16%, 白及样品中还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖含量为 1.37%、4.46%、4.70%、42.50%。该方法符合相关糖类检测标准的精密度和准确度要求, 可用于白及四类糖的定量检测。

关键词: 白及, 还原糖, 非还原低聚糖, 淀粉, 粗多糖

Quantitative Detection of Four Sugars from *Bletilla striata*

LIU Pin-hua¹, FENG Ya-juan¹, YANG Feng-xian¹, CAO Xiao¹, MA Ju-lian^{2,*}

(1. College of Chemistry and Environmental Science, Qujing Normal University, Qujing 655011, China;

2. Yunnan Yixin Agriculture and Forestry Biotechnology Company Limited, Qujing 655011, China)

Abstract: The content of sugar in *Bletilla striata* was very important to evaluate its quality. Therefore, quantitative detection methods of 4 sugars were studied in this paper. *Bletilla striata* powder was mixed with distilled water uniformly, absolute alcohol was added to mixture and the volume fraction of alcohol was 80%. Mixture was extracted by ultrasound and centrifuged. After removal of alcohol from upper, the liquid was diluted to required volume with distilled water. The content of reducing sugar and non-reducing oligosaccharide after acid hydrolysis were quantitative detected by GB5009.7. After amylase hydrolysis of solids, diluted to required volume with distilled water and centrifuged. 4 times volume of absolute alcohol was added to upper clear liquid, mixed uniformly and centrifuged. Starch was detected in centrifuged clear liquid by GB5009.9. Rude polysaccharide was detected in solid by SN/T 4260. Results showed that, the RSD (relative standard deviation) experiment result of reducing sugar, non-reducing oligosaccharide, starch and rude polysaccharide were 1.12%, 0.67%, 3.66%, 1.73%, recovery rate were 103.41 (98.14)%, 93.76%, 101.21%, 96.16%. The content of reducing sugar, non-reducing oligosaccharide, starch and rude polysaccharide was 1.37%, 4.46%, 4.70%, 42.50% in *Bletilla striata* sample. The accuracy and precision of this method conformed to related national quantitative detection standards of carbohydrate and could be used for quantitative detected 4 carbohydrates in *Bletilla striata*.

Key words: *Bletilla striata*; reducing sugar; non-reducing oligosaccharide; starch; crude polysaccharides

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)22-0231-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.22.040

引文格式: 刘品华, 冯亚娟, 杨凤仙, 等. 白及中四类糖的定量检测[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 231-234.

白及 (*Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.) 是兰科 (Orchidaceae) 白及属 (*Bletilla*) 植物, 也叫连及草、地螺丝、白鸡儿、白根、白给等, 植株高 18~60 cm。白及的初生假鳞茎为圆球形, 长大到一定程度的假鳞茎为扁球形, 上有萼芽似的环带状, 含有大量的黏胶质, 富粘性。白及假鳞茎 (块茎) 是我国传统的中药材, 药用历史极为悠久, 历代中医药书籍中

都有记载。白及味苦、甘、涩, 性微寒, 入归肺、肝、胃经, 在咳嗽、肺结核等病方中大量使用, 其主要功能是敛疮止血、补肺、消肿生肌等^[1-2]。

白及鳞茎中含有大量水溶性多糖, 其化学成分为吡喃型葡萄糖甘露聚糖, 重均分子量 $M_w = 9.545 \times 10^4$ g/mol, 数均分子量 $M_n = 7.297 \times 10^4$ g/mol^[3]。刘福强等^[4]采用 PMP 衍生化-高效液相色谱法、红外吸

收稿日期: 2018-02-09

作者简介: 刘品华 (1963-), 男, 本科, 教授, 研究方向: 食品化学、食品分析, E-mail: 406051584@qq.com。

* 通讯作者: 马菊莲 (1977-), 女, 本科, 主要从事种植方面的研究, E-mail: 2529001262@qq.com。

基金项目: 上海师范大学资源化学省部共建教育部重点实验室; 云南省科技计划项目 (2013FD047)。

收光谱(FT-IR)和 ^{13}C 核磁共振谱(^{13}C -NMR),对白及多糖的结构的研究表明,白及多糖主要由 β -1,4-甘露糖和 β -1,4-葡萄糖组成,二者比例为3.5:1。洪彤彤等^[5]研究得出,水提醇沉所得白芨粗多糖中总糖含量为67.62%,收率为34.70%。白及中多糖含量较高、无毒,具有保湿、减少刺激性、保护皮肤、延缓皮肤衰老之功效,作为食品添加剂或原料,具有较高的安全性和独特性能^[6]。白及粗多糖不但是优良天然食品增稠剂,还有很好的成膜性,在果蔬保鲜方面也有潜在的应用开发价值。随着对白及粗多糖的认识,其在食品工业或化妆品领域用途将更加广泛。

关于白及中粗多糖定量检测,目前还未见报道。也缺乏非还原低聚糖和含淀粉原料中粗多糖的检测方法标准。已有白及多糖含量检测相关的报道^[7-10],其试验方法没有考虑到白及假鳞茎中含有淀粉,所以报道的多糖包含淀粉,如何定量检测含淀粉原料中粗多糖含量仍有待探索。为此,本实验以白及为对象,开展了还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖的定量检测方法研究,旨在检测白及中的各种糖类含量,为评价白及质量提供检验方法,同时也为探索适合于含淀粉原料中粗多糖及非还原低聚糖的定量检测方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白及 云南煜欣农林生物科技有限公司药材种植基地提供; α -淀粉酶($\geq 3700\text{ U/g}$) 北京奥博星生物技术有限责任公司;魔芋甘露聚糖(纯度 $\geq 98.0\%$) 合肥博美生物技术有限责任公司;葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉等试剂 均为分析纯。

TU-1810型紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;LD-4型台式离心机 常州天瑞仪器有限公司;QL-866型漩涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;AL204-IC型电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PS-40型超声波清洗机 深圳市超艺达科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料的预处理 新鲜白及原料洗净,切片,80℃热风干燥后,粉碎过60目筛,使用前以105℃烘至恒重。

1.2.2 检样预处理 在50 mL离心管中精密称取1 g白及粉,加5 mL纯水润湿,漩涡振荡1 min,于240 W,20~30℃超声仪中超声3 min,使之充分润均,加入无水乙醇20 mL(乙醇浓度达到80% vol)。漩涡振荡5 min,240 W,20~30℃超声仪中超声20 min,再离心15 min(4500 r/min),上清液倒入100 mL锥形瓶中。固体同法浸提两次(加水后充分分散,然后加无水乙醇),合并上清液,离心管中得固体A。上清液用沸水浴、氮吹除去乙醇,再用水溶解,转入250 mL容量瓶,加水定容(锥形瓶用水洗涤三次,并转入容量瓶),过滤(前10~20 mL弃之),收集滤液得样液A。取50.00 mL样液A到100 mL锥形瓶中,加入5 mL盐酸(1+1),沸水浴加热1 h,冷却后加2滴甲基红指示剂,用氢氧化钠(200 g/L)中和

至中性(刚好变黄色),转入250 mL容量瓶(洗涤锥形瓶两次,液体转入容量瓶),定容,得样液B。

固体A用50 mL纯水洗出转移到250 mL锥形瓶中,煮沸,冷却后加入20 mL淀粉酶溶液(淀粉酶溶液(5 g/L)),55~60℃水解1 h,然后取1滴加入1滴碘溶液,检测不显蓝色(如果显蓝色则按GB5009.9-2016中规定方法处理)。转入到250 mL容量瓶中,加纯水定容,混匀,过滤,弃去初滤液。取过滤清液50 mL,放入100 mL锥形瓶中,于80℃鼓风干燥箱中除去水分,加入5 mL纯水溶解,再加入无水乙醇20 mL,漩涡振荡分散,于240 W,20~30℃超声仪中超声10 min,转入50 mL离心管,离心15 min(4500 r/min),上清液倒入100 mL锥形中。残留固体再加5 mL纯水漩涡振荡分散后加20 mL无水乙醇洗涤,同法超声、离心,合并上清液至锥形瓶,离心管中得固体B。上清液用沸水浴加热除去乙醇,加50 mL纯水,5 mL盐酸(1+1),沸水浴1 h,冷却后加2滴甲基红指示剂,用氢氧化钠(200 g/L)中和至中性,转入100 mL容量瓶(洗涤锥形瓶三次,液体转入容量瓶),定容得样液C。固体B用水溶解,转入到250 mL容量瓶,定容,离心15 min(4500 r/min),得样液D。

1.2.3 还原糖及非还原低聚糖的测定 分别取1.2.2中得到的样液A、样液B参考GB5009.7-2016中直接滴定法检测还原糖,并分别记为 X_1 、 X_2 。

参照GB5009.8-2016中第二法,计算蔗糖的方法计算非还原低聚糖,公式如下。

$$\text{非还原低聚糖含量}(\%) = (X_2 - X_1) \times 0.95$$

为了比对检验方法的可靠性,另外按GB5009.7-2016第一法中的原料处理方法处理白及粉,并检测其还原糖含量,记为 X_3 。同时也考查了该方法检测的回收率。

1.2.4 淀粉及粗多糖含量的测定 取样液C按GB5009.9-2016中第一法检测淀粉含量,记为 X_4 。按照SN/T4260-2015中方法绘制标准曲线。以吸光度为纵坐标,葡萄糖质量(μg)为横坐标,得到葡萄糖标准曲线方程为 $Y = 0.0100X + 0.0003$, $R^2 = 0.9953$ 。取样液D按照SN/T4260中苯酚-硫酸法检测粗多糖含量,记为 X_5 。

1.2.5 回收率试验 精密称取白及原料0.3 g、标样葡萄糖0.05 g,检测还原糖的回收率;精密称取白及原料0.3 g、标样蔗糖0.05 g,检测非还原低聚糖回收率;精密称取白及原料1 g、标样淀粉0.2 g、标样魔芋葡甘聚糖0.1 g,检测淀粉、粗多糖回收率。精密称取白及1 g、标样葡萄糖0.05 g、标样淀粉0.2 g、标样魔芋葡甘露聚糖0.1 g,考查多糖对还原糖回收率的影响。试验方法同1.2.2、1.2.3、1.2.4。

回收率($\%$) = (检测得到的糖质量 - 白及原料中的糖质量) / 标样的质量 $\times 100$

1.3 数据处理

还原糖含量均以葡萄糖计。还原糖含量精密度控制在重复性条件下,测得的三次独立测试结果的极差值不大于平均值的5%。淀粉、粗多糖含量精密

表1 还原糖和非还原低聚糖含量检测结果

Table 1 The content detected results of reducing sugar and non-reducing oligosaccharides

序号	还原糖含量 (%)	RSD (%)	平均值 X ₁ (%)	酸水解后还原糖含量 (%)	RSD (%)	平均值 X ₂ (%)	非还原低聚糖 (%)
1	1.38			6.05			
2	1.35	1.12	1.37	6.02	0.67	6.06	4.46
3	1.37			6.10			

表2 按 GB5009.7 中方法处理原料检测的还原糖及回收率

Table 2 The content and recovery rate of reducing sugar by GB5009.7

序号	还原糖含量 (%)	RSD (%)	平均值 X ₃ (%)	回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)
1	1.44			101.86		
2	1.43	0.86	1.43	101.02	1.05	102.01
3	1.42			103.15		

度控制在重复性条件下,测得的三次独立测试结果的极差值不大于平均值的 10%。采用三次独立测试的平均值为试验结果值。

2 结果与分析

2.1 还原糖及非还原低聚糖

低聚糖在 GB/T 22491-2008、GB/T 23528-2009 中都规定采用高效液相色谱仪进行检测,制约了低聚糖检测的推广。采用 80% vol 乙醇提取后,除去乙醇,再用水定容,过滤,定容液中的糖就只含单糖、双糖、低聚糖。将还原性低聚糖计入还原糖类中,没有还原性的低聚糖类界定为非还原低聚糖。低聚糖的糖苷键具有部分缩醛结构,可通过酸催化水解得到单糖。通过直接检测定容液,可知还原糖含量,另再取等量定容液经酸水解后检测还原糖,其差值就是非还原低聚糖。

还原糖和非还原低聚糖含量检测结果如表 1 所示,按 GB 5009.7 中方法检测的还原糖及回收率如表 2 所示。由表 1~表 2 可知,可溶于 80% vol 乙醇还原糖含量为 1.37%。以 GB 5009.7 标准中方法检测出的还原糖含量为 1.43%。两种方法的差值为 0.06%,是两种方法平均值的 4.29%,两种方法检测结果符合标准中规定的精密度,说明实验设计的检测方案结果符合要求。

表 3 为还原糖回收率检测结果。由表 2~表 3 可知,表 3 中还原糖回收率 103.41%,是本实验设计的试验方法所得的结果。与表 2 中按 GB5009.7 规定方法处理原料,检测所得到的回收率 102.01% 相比,相差 1.4%,t 检验 $p=0.282$,差异不显著($p>0.05$)。说明本实验设计用 80% vol 乙醇(或水:乙醇=1:4)提取后检测还原糖的方法可行。

表3 还原糖回收率检测结果

Table 3 The recovery rate result of reducing sugar

序号	还原糖回收率 (%)	RSD (%)	还原糖平均回收率 (%)
1	101.50		
2	103.98	1.65	103.41
3	104.77		

用表 3 还原糖回收率 103.41% 与表 4 中还原糖回收率 98.14% 比较,可知,用 80% vol 乙醇处理样品时,淀粉、魔芋葡甘露聚糖含量的增加会影响单糖、低聚糖的提取效果,所以对多糖含量高的原料,应增加乙醇提取的次数,确保检测的准确性。

表4 多糖对还原糖回收率影响的检测结果

Table 4 The effect of polysaccharides on recovery of reducing sugars

序号	还原糖回收率 (%)	RSD (%)	还原糖平均回收率 (%)
1	98.01		
2	97.60	0.62	98.14
3	98.80		

表 5 表明,加入标样蔗糖考查非还原低聚糖所得回收率为 93.76%,说明检测和计算方法所得非还原低聚糖含量的结果是可接受的。

表5 蔗糖回收率检测结果

Table 5 The recovery rate detected result of sucrose

序号	酸水解后还原糖含量 (g)	蔗糖回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)
1	0.0969	93.00		
2	0.0838	94.11	0.70	93.76
3	0.0841	94.17		

2.2 淀粉与粗多糖

淀粉及产品为人类提供 78%~80% 的热量^[11],可被淀粉酶定向水解为葡萄糖。粗多糖分子通式为 $(C_6H_{12}O_6)_n$ ^[12],能溶于冷、热水,不溶于 80% vol 以上浓度的乙醇。

表 6 为淀粉和粗多糖含量检测结果,表 7 为淀粉、粗多糖回收率检测结果。由表 6~表 7 可知,淀粉、粗多糖含量的 RSD 值分别为 3.66%、1.73%,精密度符合 GB 5009.9、SN/T4260 中的要求。淀粉、粗多糖回收率分别为 100.36%~102.50%、94.30%~97.66%,也在可接受范围,说明该试验方法用于检测含淀粉原料中的粗多糖及淀粉含量是可行的。白及多糖在医疗上有广泛的用途^[13-19],其含量的检测就尤

表4 为多糖对还原糖回收率影响的检测结果。

表6 淀粉和粗多糖含量检测结果

Table 6 The content detected result of starch and crude polysaccharides

序号	淀粉含量(%)	RSD(%)	平均值 X_4 (%)	粗多糖含量(%)	RSD(%)	平均值 X_5 (%)
1	4.50			43.28		
2	4.77	3.66	4.70	42.41	1.73	42.50
3	4.82			41.82		

表7 淀粉、粗多糖回收率检测结果

Table 7 The recovery rate of starch and crude polysaccharides

序号	淀粉回收率(%)	RSD(%)	淀粉平均回收率(%)	粗多糖回收率(%)	RSD(%)	粗多糖平均回收率(%)
1	102.50			97.66		
2	100.36	1.12	101.21	94.30	1.78	96.16
3	100.78			96.51		

为重要,是评价白及质量的重要指标。

3 结论

本研究定量检测了白及中还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖的含量。结果表明,白及样品中还还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖含量为 1.37%、4.46%、4.70%、42.50%。还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖的 RSD 为 1.12%、0.67%、3.66%、1.73%,回收率为 103.41(98.14)%、93.76%、101.21%、96.16%,符合相关糖类检测标准的精密度和准确度要求,说明该方法可用于白及四类糖的定量检测。所设计的检测方案采用实验室的常规仪器设备,依据此法,一次性处理白及原料,同时完成还原糖、非还原低聚糖、淀粉、粗多糖的定量检测是可行的,有效地提高了工作效率,适用于相关部门及企业经常性的对白及中糖类含量的检测,为其他含淀粉原料中的糖类的检测提供了参考依据。

参考文献

- [1] 孙乐乐,杨永红,刘军凯,等.白及的本草考证[J].中药材,2010,33(12):1965-1968.
- [2] 黄作喜,肖小君,张杨,等.白芨假鳞茎的采收与贮藏保鲜技术[J].江苏农业科学,2014,42(10):276-277.
- [3] 孔令姍,俞琴,胡国胜,等.白芨多糖的分子量测定及其吸湿保湿性评价[J].日用化学工业,2015,45(2):94-98.
- [4] 刘福强,王艳萍,韩丹,等.白及多糖的提取及其相对分子质量测定和结构研究[J].中成药,2013,35(10):2291-2293.
- [5] 洪彤彤,冯军,贺少龙,等.白芨多糖的醇沉分级[J].宁夏医科大学学报,2015,37(3):282-285.
- [6] 孙达锋,史劲松,张卫明,等.白芨多糖胶研究进展[J].食品科学,2009,30(3):296-298.

(上接第 230 页)

- Acid Bacteria[M].New York:Springer US 2013:194-198.
- [19] 郭秀兰,唐仁勇,刘达玉,等.盐分腌制对大头菜滋味、质构和挥发性成分的影响[J].食品与发酵工业,2015,41(1):51-59.
 - [20] 陈弦,张雁,陈于陇.发酵蔬菜风味形成机制及其分析技术的研究进展[J].中国食品学报,2014,14(2):217-225.
 - [21] 曹东,曹琳,范林川,等.泡菜发酵过程挥发性风味成分的变化[J].粮食与油脂,2017,30(3):45-50.

- [7] 王爱民,王永林,郑林,等.白及药材中多糖的含量测定[J].中国中药杂志,2009,34(22):2963-2965.
- [8] 秦亚东,汪荣斌,周宙.不同产地白及多糖含量测定[J].安徽科技学院学报,2014,28(3):41-44.
- [9] 朱海涛,楚亚琴,陈黎.正交试验优选蒽酮-硫酸法测定白芨多糖含量条件[J].中国医院药学杂志,2014,34(20):1714-1718.
- [10] 张雪娇,刘春叶.苯酚-硫酸比色法测定白芨胶中的多糖含量[J].化学研究与应用,2014,26(5):757-760.
- [11] 王璋,许时婴,江波,等译.食品化学第三版[M].北京:中国轻工业出版社,2003:161-169.
- [12] 国家认证认可监督管理委员会.SN/T 4260-2015 出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [13] 代建丽,周斯获,刘铭轩,等.白芨多糖的抑菌作用研究[J].安徽农学通报,2015,21(19):19-21.
- [14] 陶阿丽,金耀东,刘金旗,等.中药白芨化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(11):6-9.
- [15] 罗仕华,郑传胜,黎维勇,等.白及多糖体外抗肿瘤实验研究[J].中成药,2014,36(1):165-168.
- [16] 林福林,杨昌云,杨薇薇,等.中药白芨的现代研究概况[J].中国医院药学杂志,2013,33(7):571-574.
- [17] 黄斐,孙清华,胡旭姣.白芨多糖对动物实验性胃溃疡的影响[J].现代中西医结合杂志,2009,18(6):612-613.
- [18] 柯昌毅,赵春景.白芨多糖对溃疡性结肠炎的作用研究[J].中国药房,2011,22(23):2132-2134.
- [19] 仇树林,王晓,李兵,等.白芨胶载重组人表皮生长因子对创面表皮细胞 DNA 含量及周期的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(1):63-66.

- [22] 刘大群,华颖.基于电子鼻与 SPME GC-MS 法分析不同脱水方式下萧山萝卜干中的挥发性风味物质[J].现代食品科技,2014,30(2):279-285.
- [23] Ozolina V, Kunkulberga D, Cieslak B, et al. Furan derivatives dynamic in rye bread processing[J]. Procedia Food Science, 2011(1):1158-1164.
- [24] 欧芷阳,苏志尧,叶永昌,等.东莞地表植被对表层土壤化学特性的指示作用[J].生态学报,2009,29(2):985-994.