

元向东. 香菇胞外多糖的化学结构与抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 313–316.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.097

香菇胞外多糖的化学结构与抗氧化活性

元向东

(包头轻工职业技术学院, 内蒙古包头 014035)

摘要:利用高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)和红外光谱(IR)分析法等对香菇(*Lentinus edodes*)发酵液中香菇胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)2种组分EPS-1、EPS-2的化学结构进行特征分析,测定其抗氧化活性。结果表明,EPS-1的单糖组成主要为鼠李糖、阿拉伯糖和甘露糖,其摩尔比为1.7:1.0:3.0;EPS-2的单糖组成主要为鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖,其摩尔比为7.2:2.3:1.0:8.4;EPS-1、EPS-2均有较强的抗氧化活性,EPS-2体外抗氧化活性相对更强。

关键词:香菇;胞外多糖;化学结构;抗氧化

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0313-03

香菇(*Lentinus edodes*)别称花菇,世界第二大真菌门侧耳科香菇属(*Lentinus*)食用菌,口味鲜美,营养丰富,富含多糖、维生素、蛋白质、多元酚、朴菇素、膳食纤维等多种生物活性物质,其中,香菇多糖具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗炎、保肝护肝和降血糖等作用^[1-2]。液体发酵是目前真菌发酵中应用较为广泛的一项技术,具有可以工业化连续生产、规模大、产量高、发酵周期短、生产效益高等优点,除在液体发酵过程中产生大量菌丝或孢子外,还会在发酵液中分泌多糖、多肽等具有生理活性的物质。本研究采用DEAE-52纤维素柱和G-100葡聚糖,对香菇发酵液中的胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)进行分离纯化,得到EPS-1、EPS-2等2种组分。在此基础上,采用高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)和红外光谱(IR)分析法等分别分析这2种组分的分子量、单糖组成、键型和抗氧化活性,以期对香菇液体的深层发酵及香菇胞外多糖的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌株与培养基 供试菌种香菇由内蒙古农业科学院真菌研究所保存并提供。深层液体种子培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、维生素 B_1 0.1 g、水1 L,自然pH值,于摇床25℃、160 r/min振荡培养10 d。深层液体发酵培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、维生素 B_1 0.1 g、蛋白胨3 g、酵母粉3 g、水1 L,自然pH值,100 L气升式液体深层发酵罐中培养14 d,发酵温度为25℃,连续通入无菌空气。

1.1.2 试剂 30% H_2O_2 ,由天津市凯通化学试剂有限公司生产;95%乙醇,由天津市百世化工有限公司生产;DPPH、DEAE-52纤维素、葡聚糖G-100,由Sigma公司生产;苯酚,由天津市天大化学试剂厂生产;浓硫酸、浓盐酸,由淄博化学

试剂厂有限公司生产;三氯乙酸,由天津大茂化学试剂厂生产。

1.1.3 仪器 752-N紫外可见分光光度计、DK-S24型恒温水浴锅、DZF-6021型真空干燥箱,均由上海精宏实验设备有限公司生产;GC2010气相色谱仪,由日本岛津公司生产;Nicolet380傅立叶变换红外光谱仪,由美国热电集团生产;TDL-5-A型台式离心机,由上海安亭科学仪器厂生产;LXJ-68-02型离心机,由北京医疗仪器修理厂生产;1260型高效液相色谱仪,由美国安捷伦科技有限公司生产。

1.2 多糖的提取

将香菇的发酵液离心,除去胞外产物;用旋转蒸发器浓缩,加入3倍体积的95%无水乙醇;4℃醇沉24 h,3 500 r/min离心20 min;弃去上清液,将获得的沉淀真空冷冻干燥即得胞外多糖。

1.3 多糖组分的测定

采用DEAE-纤维素离子交换柱对EPS组分进行分析:用浓度梯度为0.2、0.5、1.0 mol/L的NaCl溶液进行洗脱,洗脱速度控制在1 mL/min;每个洗脱梯度收集25支试管,每支试管收集2 mL,采用苯酚-硫酸法^[3]测定收集溶液的多糖浓度,绘制洗脱曲线。采用葡聚糖G-100凝胶柱对多糖组分进行纯度鉴定^[4];用0.1 mol/L NaCl溶液充分平衡层析柱,用蒸馏水作为洗脱剂进行洗脱,洗脱速度控制在0.1 mL/min;每支试管收集2 mL,采用硫酸-苯酚法测定收集溶液的多糖浓度,绘制洗脱曲线。

1.4 EPS 2种组分分子量的测定

用0.2 mol/L NaCl水溶液将葡聚糖(标准品)及EPS样品均配成质量浓度为2 mg/mL的溶液,采用高效凝胶渗透色谱法^[5]测定多糖分子量,高效液相色谱仪测定条件为:Shodex SB-806 HQ 8.0 mm × 300 mm色谱柱,柱温为5℃,0.2 mol/L NaCl溶液为流动相,进样量为100 μL,流速为0.5 mL/min;以1 g分子质量对数(M_w)为纵坐标、保留时间(ET)为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程为: $M_w = 1 - 0.3429ET + 11.975$ ($r^2 = 0.9991$);根据样品上柱测定保留时间,计算样品的分子量。

收稿日期:2015-12-30

作者简介:元向东(1970—),男,河南安阳人,硕士,讲师,主要从事生物技术及分析研究。E-mail:18865489890@163.com。

1.5 EPS 2 种组分的单糖构成

糖样品经过 0.25 mol/L H₂SO₄ 100 ℃ 加热 16 h 完全水解,或者不经过水解处理,按照 Blakeney 等的方法^[6]将各单糖制备成全乙酰化糖醇衍生物;采用气相色谱分析糖的构成,分离柱为岛津公司生产的 0.25 mm×30 m 毛细管柱 DB-1,柱温为 210 ℃,N₂ 流速为 30 mL/min。

1.6 EPS 2 种组分化学结构分析

试验样品采用 KBr 压片,采用 Perkin Elmer 公司的 Spec-trun GXFT-IR 红外光谱分析系统对 EPS 2 种组分进行化学成分结构分析。

1.7 EPS 2 种组分体外抗氧化活性测定

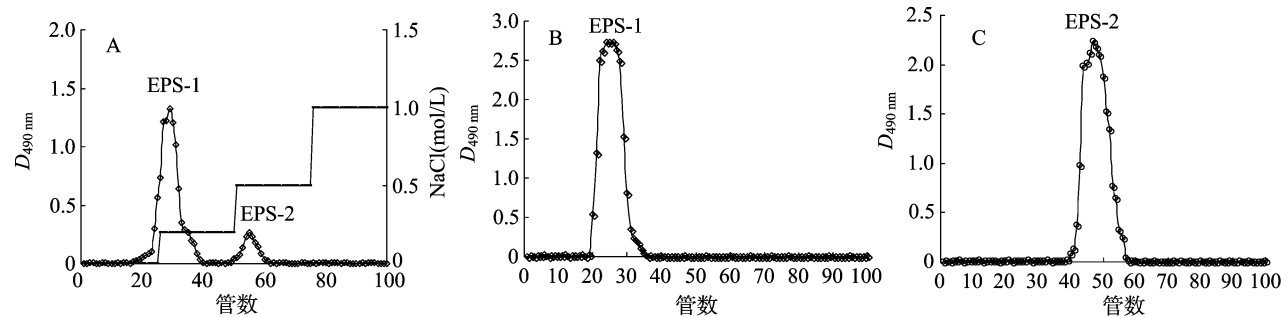
EPS 2 种组分清除 DPPH 自由基的测定方法为:2 mL 95% 乙醇或 0.1 μmol/L DPPH 与 2 mL 浓度在 100 ~

1 000 mg/L 之间的 EPS 溶液进行混合,25 ℃ 水浴 15 min,517 nm 处测定吸光度^[7]。EPS 清除羟基自由基的测定采用 Smironff 等的方法^[8],多糖还原力的测定采用 Oyaizu 的方法^[9]。

2 结果与分析

2.1 香菇胞外多糖的组成

采用 DEAE-纤维素柱分析 EPS 发现,EPS 含有 EPS-1、EPS-2 这 2 个组分(图 1-A)。对 EPS 的 2 个组分采用葡聚糖 G-100 凝胶进行分离,结果表明,EPS-1、EPS-2 均分离得到 1 个单一的洗脱峰(图 1-B、C),这表明 EPS-1、EPS-2 均为纯的多糖。



A—EPS 的 DEAE-纤维素离子交换柱层析洗脱曲线; B、C—分别为多糖组分 EPS-1、EPS-2 的葡聚糖 G-100 凝胶层析洗脱曲线

图1 EPS 的分离纯化结果

2.2 EPS 2 种组分的分子量

由表 1、图 2 可知,EPS-1、EPS-2 的数均分子量分别为 532,714,重均分子量分别为 3.58×10^4 、 1.20×10^5 ,多分散系数分别为 67.26、168.19。

表 1 EPS-1、EPS-2 的分子量测定结果

组分	M_w	M_n	M_z	M_w/M_n	M_z/M_w
EPS-1	3.58×10^4	532	5.21×10^5	67.26	14.56
EPS-2	1.20×10^5	714	7.56×10^5	168.19	6.30

注: M_w 为重均分子量; M_n 为数均分子量; M_z 为 Z 平均分子量; M_w/M_n 为多分散系数; M_z/M_w 为多分散指数。

2.3 EPS 2 种组分的单糖构成

由表 2 可知,EPS-1 单糖组成有鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖,占比分别为 28.8%、15.5%、55.7%,其摩尔比为 1.7:1.0:3.0;EPS-2 单糖组成有鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖,占比分别为 36.7%、10.7%、5.6%、47.0%,其摩尔比为 7.2:2.3:1.0:8.4。

2.4 EPS 2 种组分化学结构分析

由图 3 可见,EPS-1 在 $3\,431.24\text{ cm}^{-1}$ 附近有明显的由—OH 伸缩振动引起的吸收峰,在 $2\,935.87\text{ cm}^{-1}$ 附近有 C—H 伸缩振动引起的吸收峰^[10]; $1\,643.86\text{ cm}^{-1}$ 处有酰胺羰基存在的吸收峰; $1\,433.41\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—H 变角振动; $1\,060.88\text{ cm}^{-1}$ 处有糖环上 C—O 伸缩振动引起的吸收峰,这表明多糖中存在 D-吡喃环^[11]; 812.01 cm^{-1} 处有 α 糖苷键存在的吸收峰, 568.58 cm^{-1} 处有吡喃环伸缩振动引起的吸收峰。

由图 4 可见,EPS-2 在 $3\,415.82\text{ cm}^{-1}$ 附近有较强的由—OH 伸缩振动引起的吸收峰, $2\,925.17\text{ cm}^{-1}$ 附近有 C—H

伸缩振动引起的吸收峰^[10]; $1\,638.03\text{ cm}^{-1}$ 处有酰胺羰基存在的吸收峰; $1\,416.65$ 、 $1\,618.54\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—H 变角振动; $1\,153.83$ 、 $1\,079.34$ 、 $1\,023.96\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰由 C—O、O—H 伸缩振动引起,这表明多糖中存在 D-吡喃环^[11-12]。

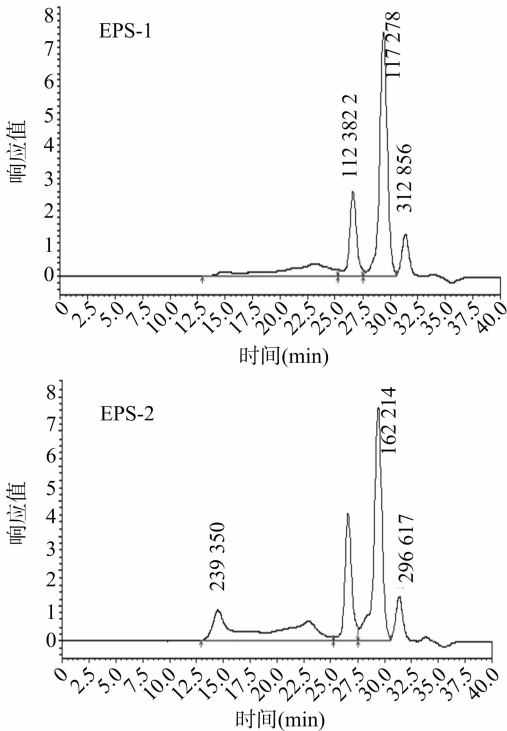


图2 EPS 2 种组分的高效液相色谱分析

表2 气相色谱结果

序号	单糖名称	EPS-1		EPS-2	
		保留时间 (min)	峰面积 (μV)	保留时间 (min)	峰面积 (μV)
1	鼠李糖	14.35	6 459.2	14.35	11 995.0
2	D-核糖	—	—	—	—
3	阿拉伯糖	16.53	3 693.6	16.53	3 776.1
4	木糖	—	—	—	—
5	肌醇	—	—	—	—
6	甘露糖	34.84	11 171.6	34.81	1 668.7
7	葡萄糖	—	—	5.67	14 004.6
8	半乳糖	—	—	—	—

注:“—”表明多糖组分中不含有该单糖。

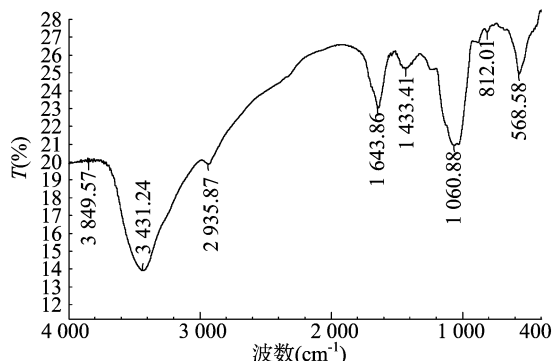
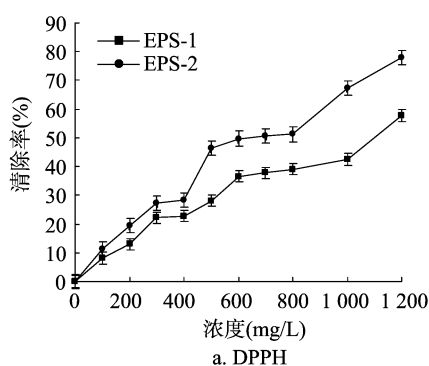
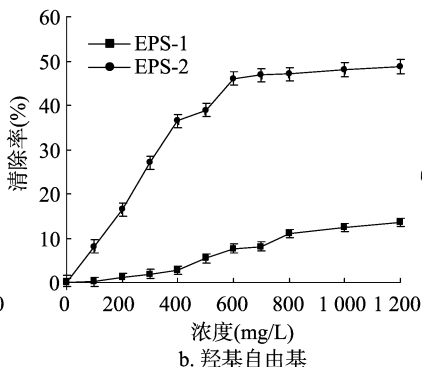


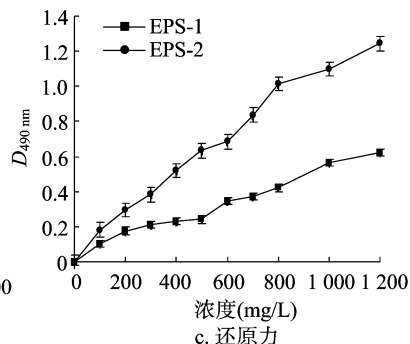
图3 EPS-1的红外光谱



a. DPPH



b. 羟基自由基



c. 还原力

图5 EPS-1 和 EPS-2 的抗氧化活性

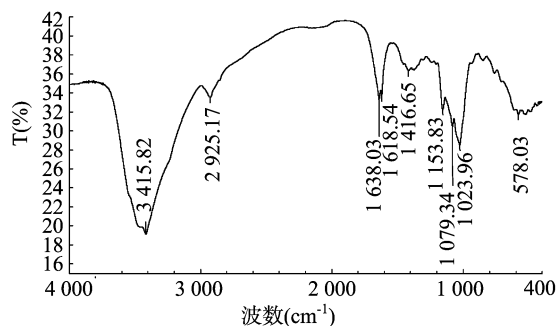


图4 EPS-2的红外光谱

2.5 EPS 2 种组分的体外抗氧化活性

由图5可见,随EPS-1、EPS-2浓度的升高,EPS-1、EPS-2的抗氧化活性上升;EPS-1、EPS-2浓度为1 200 mg/L时,对DPPH的清除率分别为 $(57.85 \pm 0.69)\%$ 、 $(78.96 \pm 1.65)\%$,对羟基自由基的清除率分别为 $(11.50 \pm 0.43)\%$ 、 $(47.20 \pm 2.06)\%$,还原力分别为 0.61 ± 0.01 、 1.26 ± 0.03 ,EPS-2的抗氧化能力明显优于EPS-1。

3 结论与讨论

香菇发酵液经DEAE-纤维素离子交换柱和葡聚糖G-100凝胶柱分离,可得到多糖组分EPS-1、EPS-2。气相色谱法测定EPS-1、EPS-2单糖组成发现,EPS-1中主要含

有鼠李糖、甘露糖,而EPS-2中主要含有鼠李糖、葡萄糖,对EPS-1、EPS-2化学结构分析发现,2种多糖均为D-吡喃型。

有研究表明,当多糖浓度为1 000 mg/L时,虫草对DPPH的清除率为20%^[13],桦褐孔菌对DPPH的清除率为10%^[14];多糖浓度为1 200 mg/L时,桑黄的还原力为0.10^[15],树舌灵芝的还原力为0.40^[16]。本研究结果表明,EPS-1、EPS-2浓度为1 200 mg/L时,EPS-1、EPS-2对DPPH的清除率分别为 $57.85\% \pm 0.69\%$ 、 $78.96\% \pm 1.65\%$,对羟基自由基的清除率分别为 $11.50\% \pm 0.43\%$ 、 $47.20\% \pm 2.06\%$,还原力分别为 0.61 ± 0.01 、 1.26 ± 0.03 ,与虫草等相比,EPS-1、EPS-2对DPPH、羟基自由基有较强的清除能力及较强的还原力,且EPS-2的抗氧化活性相对更强。

参考文献:

[1] 吕国英,范雷法,张作法,等. 香菇多糖研究进展[J]. 浙江农业学报,2009,21(2):183-188.

[2] 张 昕,张 强,梁彦龙. 香菇多糖的抗肿瘤和降糖作用机制的研究进展[J]. 中国药事,2008,22(2):149-154.

[3] Gilles D M,Hamilton K A,Rebers J K,et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry,2002,28(3):350-356.

[4] 王 博,徐 莎,黄琳娟,等. 白菱多糖 BSPI-A 的分离纯化及结构研究[J]. 食品科学,2010,31(17):120-123.

[5] Lin H J,Qin X M,Aizawa K,et al. Chemical properties of water-soluble pectins in hot-and cold-break tomato pastes [J]. Food Chemistry,2005,93(3):409-415.

[6] Blakeney A B,Harris P J,Henry R J,et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis [J]. Carbohydrate Research,1983,113(2):291-299.

[7] Liu X H,Feng P Y,Shi Y L. Study of isolation and purification of polysaccharides from fresh mycelia of *Agaricus blazei* Mussill and its anti-fatigue effect[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2006,28(2):190-194.

陈晓兰,陈 未,王帅兵,等. HPLC-MS/MS法测定鸭肉中氯霉素类药物残留[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):316-319.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.098

HPLC-MS/MS法测定鸭肉中氯霉素类药物残留

陈晓兰^{1,2}, 陈 未¹, 王帅兵¹, 蒋春茂^{1,2}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省动物药品工程技术研究中心, 江苏泰州 225300)

摘要:现有动物性食品中氯霉素类药物残留检测前处理方法较为复杂,为简化样品分析方法,建立简单的样品前处理方法和HPLC-MS/MS方法,以同时检测鸭肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考残留。以50%乙腈制备组织匀浆液,向匀浆液中添加对照药物后采用乙腈去蛋白,高速离心,选择0.1%乙酸和乙腈-甲醇(1:1)为流动相,以0.5 mL/min流速梯度洗脱,LC-MS/MS电喷雾电源(ESI),负离子,选择多反应监测(MRM)模式检测,并对所建立的方法进行方法学验证。在所建立的样品前处理和色谱条件下,3种目标化合物在3 min内实现同时分离,标准工作曲线在0.025~5.000 $\mu\text{g/g}$ 范围内线性良好, r^2 为0.995 8~0.997 6。最低检测限均为2.5 ng/g,最低定量限为25 ng/g。在添加量为20、50、100 ng/g的水平下,平均回收率为93.26%~97.25%,RSD为0.47%~1.83%。本试验采用较为简单的乙腈蛋白沉淀法,操作简易,过程提取回收率高,可大幅提高样品前处理的效率,在所建立的色谱条件下检测灵敏度大幅提高。该方法简易可行,能满足国际氯霉素类药物残留检测的要求。

关键词:HPLC-MS/MS;氯霉素;甲砒霉素;氟苯尼考;鸭肉;残留

中图分类号:TS207.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0316-04

动物源食品(肉、蛋、奶、水产及其制品)的安全是全世界关注的焦点,其中兽药残留问题是影响动物源食品安全的重要因素之一^[1]。氯霉素类药物属于广谱抗生素,对革兰氏阴性及阳性细菌均有抑制作用,主要包括氯霉素(chloramphenicol, CAP)、甲砒霉素(thiamphenicol, TAP)、氟苯尼考(florfenicol, FF)等。氯霉素可抑制人类骨髓的造血功能,引起再生障碍性贫血,在美国、欧盟及我国均被禁用于食品动物,同时规定了禽肉中甲砒霉素、氟苯尼考的最高残留限量分别为50、100 ng/g。目前,氯霉素类药物残留的检测方法主要有微生物法^[2]、酶联免疫法^[3]、共振生物传感器法^[4]、气相色谱法^[5]、液相色谱法^[6]、超高效液相色谱法^[7]、气相色谱-质谱

法^[8]、液相色谱-质谱法^[9]、超高效液相色谱-串联质谱法^[10-12]等。

目前,动物性食品中氯霉素类及其代谢物的残留检测前处理方法较为传统,药物与杂质间分离度差,且复杂的前处理程序影响了样品回收率。如何简化前处理方法是目前该类药物检测中亟待解决的关键问题。仅采用HPLC技术或GC技术已无法满足多残留检测的要求,且其在鸭肉残留检测方法中的应用尚未见国内外报道。鉴于此,本研究拟将快速溶剂萃取(ASE)技术应用于样品前处理,采用HPLC-MS/MS法建立快速、简易、高灵敏、高通量的禽肉中氯霉素类及其代谢物的多残留快速检测技术,为兽药残留监控体系的建立和完善提供先进的技术资料,对于我国动物性食品出口贸易更好地与国际接轨、保障人类健康具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

氯霉素对照品购自中国食品药品检定研究所,批号为

Gracilaria cornea[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(4): 491-498.

[13] 李璐磊, 赵 珺, 李 丹, 等. 冬虫夏草深层发酵胞外和蛹虫草子实体抗氧化活性的对比研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 75-79.

[14] Shen J W, Yu H Y, Huo Y F, et al. Purification of polysaccharide of *Phaeoportun obliquus* and the bioactivity of purified fractions[J]. Mycosystema, 2009, 28(3): 564-570.

[15] Xie L Y, Zhang Y, Peng W H. Immune function and antioxidant activity of intracellular polysaccharides from *Phellinus baumii*[J]. Food Science, 2011, 32(9): 276-281.

[16] Li Z P, Wu P, Wu S Q. Study on antioxidant activity of *Ganoderma applanatum* intracellular polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 108-110.

收稿日期:2015-11-16

基金项目:江苏省泰州市社会发展项目(编号:TS032)。

作者简介:陈晓兰(1979—),女,江苏海安人,博士,讲师,主要从事新药研究。E-mail:cxl7972563@163.com。

通信作者:蒋春茂,博士,教授,主要从事新兽药研究。E-mail:cmj109@126.com。

[8] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.

[9] Oyaizu M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer chromatography[J]. J Soc Food Sci, 1986, 35(11): 771-775.

[10] Zou X. Quick isolation and purification of extracellular polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and elementary property analysis[J]. Food Science, 2005, 17(4): 14.

[11] Liu X, Zhao M. Antioxidant activities and functional composition content of selected *Phyllanthus emblica* fruits juice[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5): 151-154.

[12] Melo M S, Feitosa J A, Freitas A P, et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed