

# 高效液相色谱法

## 测定魔芋精粉中魔芋葡甘聚糖含量

(华中农业大学食品科技系天然产物化学研究室,武汉 430070) 李斌 廖勇城 谢笔钧

**摘要** 首次建立了 HPLC 法测定魔芋精粉中魔芋葡甘聚糖 (KGM) 含量的方法。魔芋精粉水解条件: 温度 100℃、时间 2.5h, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度 2mol/L; 色谱条件: 色谱柱 Sugar Pak I; 流动相 重蒸水, 流量 0.4ml/min, 柱温 90℃, 进样量 10μl。结果表明, 上述条件下杂质成分以及 Glu 及 Man 之间可完全分离。该方法测定 KGM 的平均回收率为 99.05%, 相对标准偏差为 0.58%, 同时可以测定精粉中的淀粉含量, 可用于葡甘聚糖的定量分析和魔芋精粉的质量评价。

**关键词** HPLC 魔芋葡甘聚糖 淀粉 含量测定

**Abstract** An HPLC method for one-step quantitative determination of konjac glucomannan and starch in konjac flour was developed successfully for the first time. The konjac flour was hydrolyzed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2mol/L) at 100℃ for 2.5 hours. The chromatographic conditions were as follows: column: Sugar Pak I; mobile phase: redistilled water; flow rate: 0.4ml/min; column temperature: 90℃; injection volume: 10μl; detector: RID. The data showed a good separation among konjac glucomannan, starch and impurities. The average recoveries and RSD were respectively 99.05%, 0.58%. The proposed method can also be applied to determine the starch of konjac, and used for quantitative analysis of konjac glucomannan and quality valuation of konjac flour.

**Key words** HPLC; konjac glicomannan; starch; quantitative determination

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2002)08-0082-03

魔芋是天南星科多年生草本植物, 其主要的生物活性成分是魔芋葡甘聚糖 (Konjac Glucomannan, 简称 KGM), 是由 D-葡萄糖和 D-甘露糖按 1:1.5~1.7 的摩尔比, 以 β-1,4 糖苷键连接起来的高分子杂多糖<sup>[1]</sup>, 被广泛应用于保健食品和医药上。我国魔芋资源十分丰富, 是世界上魔芋精粉最大的出口国。KGM 的含量是评价魔芋精粉和相应的产品质量的最为重要的指

标, 寻求一种准确度高的测定方法十分必要<sup>[2]</sup>。因此, 有一些文献研究了薄层色谱法<sup>[4,5]</sup>、DNS 比色法<sup>[6]</sup>、甘露糖脎法<sup>[6]</sup>及 SEM 法<sup>[8]</sup>等方法, 但在试验设计上有的未能排除淀粉的干扰, 有的认为 Glu 与 Man 的比率一成不变<sup>[7]</sup>, 因此测量结果均存在一定的问题。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验原理

魔芋精粉水解液中 Glu 的含量包括来源于 KGM (Glu<sub>k</sub>) 和来源于淀粉 (Glu<sub>s</sub>) 两部分, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 首先测定 KGM 纯品中 Glu<sub>k</sub>、Man 的比例 n, 按魔芋精粉水解液中 Man 的含量及前面测定的比例 n, 可以精确测定精粉 KGM 中 Glu<sub>k</sub> (Glu<sub>k</sub>=Man×n) 的含量, 该两者之和×0.9 即为 KGM 含量 (KGM=Glu<sub>k</sub>+Man=(n+1)×Man×0.9), 剩余的 Glu 部分来源于淀粉 (Glu<sub>s</sub>=Glu-Glu<sub>k</sub>), 其含量×0.9 即为淀粉含量 Starch=(Glu-n×Man)×0.9, 因而可以同时测定 KGM 及淀粉的含量。采取该方法排除了淀粉等的干扰, 对 Glu 与 Man 的比率也按实际比率处理, 避免了原理误差来源。没有采用提纯的方法直接测定 KGM 的含量, 是因为在魔芋精粉提纯过程中不可避免的带来损失, 产生较大误差, 采取前述方法, 不用追求提纯过程中的 KGM 得率, 只要能够测得得到的纯品中的 Glu 与 Man 的比率即可。

#### 1.2 材料与仪器

魔芋精粉 为武汉清城公司一级品 α-淀粉酶丹麦诺维信公司; 葡萄糖、甘露糖、EDTA-CaNa 为 Fluka 公司产品; NaOH、Ba(OH)<sub>2</sub>、BaCO<sub>3</sub>、可溶性淀粉 (分析纯) 上海化学试剂厂; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (分析纯) 武汉中南化学试剂厂; 医用酒精 武汉酒精厂。

岛津 LC-6A 高效液相色谱仪 配有 RID-6A 示差检测器, CTO-6A 柱温箱, 色谱柱 Sugar Pak I (Waters 公司); 超速冷冻离心机 HIMAC CENTRIFUGE, HITACHI; 真空冷冻干燥 Alphas-Z, Germany; 电子恒温水浴锅 国华仪器厂。

收稿日期: 2002-03-03

作者简介: 李斌 (1972-), 男, 博士, 主要从事天然产物化学及天然精细化学品的研究。

### 1.3 实验方法

1.3.1 魔芋葡甘聚糖纯品的制备 魔芋精粉→50% EtOH 浸提 2 次→乙醚 45℃, 10h 索氏提取去脂肪→溶胀→淀粉酶水解 (35℃, 6h)→220 目滤布抽滤→Sevag 脱蛋白 5 次→16 000r/min 离心 20min→0.02mol/L Ba(OH)<sub>2</sub> 沉淀→HAc 洗→重复 3 次→50%EtOH 沉淀→真空冷冻干燥→KGM 纯品。

1.3.2 葡萄糖标准曲线的制作 分别取 0.6mg/ml 的葡萄糖标准液 0(参比)、2、4、6、8、10 $\mu$ l 进样, 以峰面积为纵坐标, 以 Glu (mg) 量为横坐标, 做标准曲线; 并求回归方程。

1.3.3 甘露糖标准曲线的制作 分别取 1.0mg/ml 的甘露糖标准液 0(参比)、2、4、6、8、10 $\mu$ l 进样, 以峰面积为纵坐标, 以 Man (mg) 量为横坐标, 做标准曲线; 并求回归方程。

1.3.4 魔芋精粉及 KGM 纯品水解 分别准确称取一定量的魔芋精粉和 KGM 精品 (约 20mg), 加适量 85%乙醇, 于 50℃水浴回流提取 1h, 过滤。重复上述操作 1 次, 以去除游离的低聚糖和单糖, 自然挥干后入具旋塞刻度试管中, 加 4ml 水和 0.5ml 的浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 吹 N<sub>2</sub> 替换管内空气, 拧紧旋塞封管。在沸水浴中封管水解 2.5h, 取出冷却。加入 Ba(OH)<sub>2</sub> 调 pH 接近中性, 再以 BaCO<sub>3</sub> 调至中性, 过滤。滤液用阴、阳离子树脂处理, 至电导率在 0.1ms/m 以下, 经 0.45 $\mu$ m 微过滤器过滤后备用, 再加水摇匀, 定容, 离心后收集上清液。

1.3.5 KGM 中 Glu 与 Man 比例的测定 取 KGM 纯品水解液进样分别对照 Glu 和 Man 的标准曲线, 计算 Glu 与 Man 的比例。

色谱条件: 色谱柱 Sugar Pak I, 流动相 重蒸水, 流量 0.4ml/min, 柱温 90℃, 进样量 10 $\mu$ l, 灵敏度 8 $\times$ 。

1.3.6 魔芋精粉中 KGM 含量的测定 取魔芋精粉水解液, 进样 10 $\mu$ l, 分别对照 Glu 和 Man 的标准曲线, 计算 Glu 的含量及 Man 的含量。计算出 KGM 的含量及淀粉含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 Glu 和 Man 的标准曲线

0.130% 的 Glu 和 0.0508% 的 Man 的液相色谱图如图 1 所示, Glu 的保留时间为 14.832min, Man 的保留时间为 16.873min, 对应的峰面积分别为 1339031 和 666955。每进样 1% 的 Glu 和 Man 10 $\mu$ l 对应的峰面积分别为 10300238, 13129822, 说明在上述的色谱条件下, Glu 和 Man 有极好的检测灵敏度, 标准曲线见图 2。Glu 标准曲线回归方程为  $y=1E+06x+7142.9$ ,  $R^2=0.9944$ ; Man 标准曲线回归方程为  $y=1E+06x+21048$ ,  $R^2=0.9933$ 。

### 2.2 Glu 和 Man 的 HPLC 分离条件的确定

单糖的 HPLC 测定中, Glu 和 Man 的分离较为困难, 采用 Sugar Pak I 柱对于这两种单糖的分离效果较 Pak-NH<sub>2</sub> 的效果好, 使用前认真清洗可以提高柱分离效果。以 EDTA-CaNa 溶液清洗 24h 后使用, 柱温提高对分离度的提高有利, 流速控制稍小一些, 对提高分离度效果较好, 在柱温 90℃、流速 0.4ml/min 下分离 Glu 和 Man 的混合物, 分离情况见图 3 (a)。由图可见, 该色谱条件下 Glu 和 Man 的保留时间与标样一致, 并且可以完全分离。

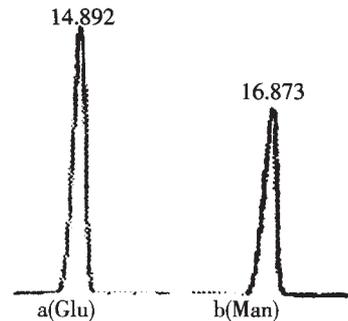


图 1 标准 Glu 和 Man 的液相色谱图

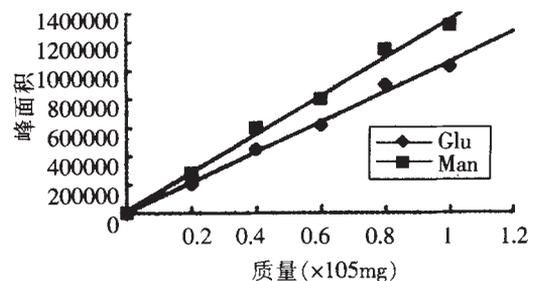


图 2 Glu 和 Man 的标准曲线

KGM 纯品水解产物的色谱图见图 3 (b), 可见 KGM 由 Glu 和 Man 两种单糖构成, 它们也可完全分离, 对照标准曲线, Glu:Man=0.56, 与文献报道的基本一致<sup>[3]</sup>。

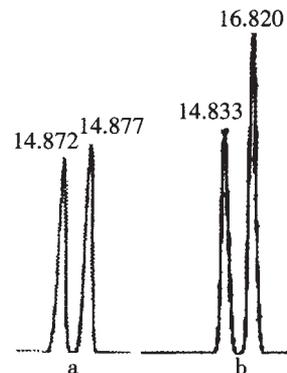


图 3 魔芋葡甘聚糖的高效液相色谱

### 2.3 KGM 水解条件的确定

2.3.1 水解酸度的确定 准确称取 20mg 魔芋精粉入具旋塞刻度试管中, 分别加入 0.5、1、1.5、2、2.5mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 4.5ml, 拧紧旋塞封管, 在沸水浴中封管水解 2.5h, 取出冷却, 定容后进样测定。结果

表1 HPLC法测定魔芋葡甘聚糖的准确度

项目	KGM					淀粉				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
含量(%)	64.5	62.9	63.2	64.0	63.1	15.4	15.9	17.4	17.2	16.1
标准差			0.372					0.596		
相对标准差(%)			0.58					0.92		

表2 HPLC法测定魔芋葡甘聚糖的精确度

项目	KGM					淀粉				
	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
含量(%)	66.5	70.4	75.1	76.4	80.2	23.11	31.69	37.28	45.13	51.39
回收率(%)	99.03	99.44	100.87	97.82	98.10	97.26	98.20	96.88	98.45	96.60
平均回收率(%)			99.05					97.48		

表明(图4)  $H_2SO_4$  浓度在 2mol/L 时, Glu 和 Man 的 HPLC 图峰面积最大, 在 1.5mol/L 时水解不完全, 而在 2.5mol/L 时 Glu 的峰面积已经基本不变, Man 的峰面积却有所下降, 因此水解酸度选择在 2mol/L  $H_2SO_4$ , 可以完全水解。

2.3.2 水解时间的确定 分别准确称取 20mg 魔芋精粉入具旋塞刻度试管中, 分解加入 2mol/L 的  $H_2SO_4$  溶液 4.5ml, 拧紧旋塞封管, 在沸水浴中封管水解 1、1.5、2、2.5、3、3.5h, 取出冷却, 定容后进样测定, 结果见图 5。在沸水水解 2.5h 时, Glu 和 Man 的峰面积均达到最高点, 在 2h 时水解仍不完全, 而在 3h 以后, 峰面积逐渐下降, 说明 KGM 的完全水解时间较短, 仅需要 2.5h。

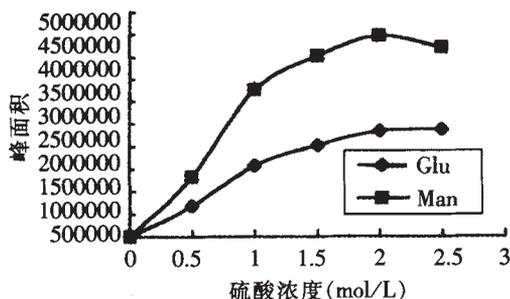


图4 硫酸浓度对魔芋精粉水解的影响

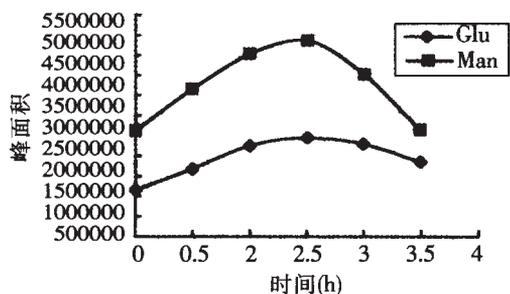


图5 水解时间对魔芋精粉水解的影响

#### 2.4 测定结果的精密度和准确度

将同一种魔芋精粉分别重复测定 5 次, 测定结

果如表 1 所示, KGM 的平均含量为 63.5%, 相对标准差为 0.58%, 具有很高的准确性, 而对淀粉的测定结果类似, 相对标准差为 0.92%。分别以 KGM 纯品和可溶性淀粉作为添加物, 做回收实验, 总量为 20mg, 魔芋精粉和 KGM 纯品 (或淀粉) 的比例分别为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5, 其结果见表 2, KGM 平均回收率为 99.05%, 淀粉的平均回收率为 97.48%。

### 3 结论

3.1 魔芋精粉水解条件为温度 100℃, 时间 2.5h,  $H_2SO_4$  浓度 2mol/L 时, 可以刚好完全水解。

3.2 HPLC 法测定 KGM 的适宜色谱条件为: 色谱柱 Sugar Pak I、流动相 重蒸水、流量 0.4ml/min、柱温 90℃。

3.3 该方法测定 KGM 的平均回收率为 99.05%, 相对标准偏差为 0.58%, 测定淀粉平均回收率为 97.48%, 相对标准偏差为 0.92%。

3.4 该方法可以测定精粉中的淀粉含量, 可用于葡甘聚糖的定量分析和魔芋精粉的质量评价。

#### 参考文献

- 1 Kishida N, Okimasu S. Agric Biol Chem., 1978, 42(3): 669~670
- 2 Takahashi R, Kusakabe L, Kusama S, et al. Agric Biol Chem., 1984, 48(12): 2943~2950
- 3 Maeda M, Shimahara H, Sugiyama M. Agric Biol Chem., 1980, 44(2): 245~2520
- 4 S.A. Hansen. J. Chromatograms, 1995, 107, 224
- 5 毕邛利, 鲁丽, 林惠祥. 色谱, 1998, 153, 198
- 6 张升辉, 宋新建, 等. 湖北民族学院学报, 1999, 17(2): 14~17
- 7 王照利, 吴万兴. 陕西林业科技, 1998(1): 18~20
- 8 张展, 等. 武汉大学学报(自然科学版), 2001, 47(2): 150~152

全国中文核心期刊 轻工行业优秀期刊