

桑黄中 β -葡聚糖快速荧光光谱检测方法研究

韩素芳¹, 贺亮², 刘亚群¹, 程俊文², 杨柳^{3*}

(1. 浙江省林业科学研究院分析测试中心, 浙江 杭州 310023;

2. 浙江省林业科学研究院生物技术研究所, 浙江 杭州 310023;

3. 浙江省林产品质量监督检验站, 浙江 杭州 310023)

摘要:建立了以海带多糖为标准样品,与苯胺蓝特异结合,荧光光谱法测定桑黄多糖中 β -D-葡聚糖含量的准确、经济、快速的检测方法。对96孔板、标准样品、回收率、精密度及稳定性进行考察。结果表明:在激发波长为398 nm,发射波长为503 nm测试条件下,海带多糖质量浓度在0~15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与荧光强度呈现良好的线性关系,桑黄粗多糖中 β -D-葡聚糖含量测定结果为19.86%,平均回收率为98.39%。并对市售酵母葡聚糖粉中 β -葡聚糖含量进行了测定,质量分数为82.29%,与产品标识含量相符。

关键词:桑黄; β -葡聚糖;荧光光谱

中图分类号:O657.39

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)06-0156-03

Quick determination of β -glucan from phellinus by fluorometry method

HAN Su-fang¹, HE Liang², LIU Ya-qun¹, CHENG Jun-wen², YANG Liu^{3*}

(1. Zhejiang Forestry Academy, analysis and test center, Hangzhou 310023, China;

2. Zhejiang Forestry Academy, Institute of Biotechnology, Hangzhou 310023, China;

3. Zhejiang Forestry Product Testing Station, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Based on the fluorescent property of specific integration of aniline blue dye and laminarin, a fluorescent determination method for quick determination of β -glucan from Phellinus is developed. The 96 hole state, standard sample, recovery, precision and stability are investigated. With an excitation maximum wavelength of 398nm and an emission maximum wavelength of 503nm, there is a good linear relationship between the concentration of laminarin in the range of 0-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and fluorescent intensity. The content of β -glucan in Phellinus polysaccharide is 19.86%. The recovery is 98.39%. The commercially available yeast beta glucan content in dextran powder is determined for comparison. Its β -glucan content is 82.29%, which is consistent with the labeling content of the products.

Key words: phellinus; β -glucan; fluorometry

葡聚糖是由葡萄糖单体聚合而成的多糖,分为 α 型和 β 型。 β -葡聚糖是一种生物活性物质,具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗辐射、降血糖、降血脂、保肝等多种功能。研究发现大多具有抗肿瘤活性的多糖都是带有 β -(1-6)-D-糖苷键分支的 β -(1-3)-D-葡聚糖。食用菌多糖富含 β -(1-3)-D-葡聚糖,因此被称为生物反应调节物^[1-2]。

桑黄是一种珍贵的多年生大型药用木腐真菌,被称为“森林黄金”。桑黄菌提取物在抑制癌细胞转移和防止癌症手术后复发等临床应用中具有显著效果,是目前国际公认的生物治癌药剂中效率最高的一种药用真菌,桑黄已经成为国内外医药制剂与功能食品研究开发的热点。桑黄多糖是桑黄活性成分之一^[3],近年越来越受到人们的重视。其中 β -葡聚糖是抗癌作用的主要成分。桑黄中 β -葡聚糖的含量是巴西蘑菇中的2倍^[4-5]。

目前 β -葡聚糖含量的检测方法主要有3类:一

是酶法,通过降解成单糖或寡糖来检测;二是蛋白特异识别的方法;三是通过无机化学的方法,如苯酚-硫酸法等。而荧光法原理是利用 β -葡聚糖与荧光剂结合并增强荧光剂的荧光强度。Yuan等^[6]以curdlan多糖为标准品,利用葡聚糖与苯胺蓝的特异结合,进行了一些食品中 β -葡聚糖含量的测定。杨开等^[7]以酵母 β -1,3/1,6葡聚糖为标准品,对灰树花、巴西蘑菇等食药用菌中 β -葡聚糖含量进行了测定。目前各种干、鲜食用菌产品中粗多糖及食用菌制品中多糖含量的测定主要参照NY/T 1676—2008^[8]中苯酚-硫酸法,通过检测总糖含量测定食用菌中多糖含量,存在一定漏洞,淀粉等可使检测值偏高。笔者以价格较低的海带多糖为标准品,利用苯胺蓝与 β -葡聚糖的特异结合,以荧光光谱法快速测定桑黄中 β -葡聚糖,建立一种精密度好、准确度高、快速经济的检测方法。

收稿日期:2014-02-18

基金项目:浙江省分析测试科技计划项目(2012C37046);2013年中央补助地方科技基础条件专项资金项目;浙江省省属科研院所专项(2012F30037)

作者简介:韩素芳(1980-),女,硕士,助理研究员,主要从事林产品检测工作,hansufang2004@126.com。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

大麦 β -D-葡聚糖(sigma, CAS:9041-22-9)、海带多糖(阿拉丁, CAS:9008-22-4)、苯胺蓝(国药集团化学试剂公司生产, CAS:28631-66-5)、甘氨酸、氢氧化钠均为分析纯。

酶标仪(Enspire 2300, Perkin-Elmer);离心机。

1.2 试剂浓度与配制

1 mol/L 氢氧化钠;6 mol/L 氢氧化钠。

苯胺蓝工作液:将40体积0.1%苯胺蓝水溶液,21体积1 mol/L 盐酸及59体积pH 9.5的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液混合为苯胺蓝工作液。

β -葡聚糖标准溶液配制:称取大麦葡聚糖、海带多糖各0.005 0 g,用1 mol/L 氢氧化钠溶解并定容至25 mL,为200 μ g/mL的葡聚糖储备液。用前稀释为系列工作液。

1.3 实验方法

1.3.1 桑黄多糖提取工艺

将新鲜的桑黄子实体风干后粉碎并过60目筛子,称取5 g粉体,加入100 mL蒸馏水于85 $^{\circ}$ C进行冷凝回流提取,共提取2次,合并提取液后,进行减压真空浓缩,然后加入4倍体积的无水乙醇沉淀,4 $^{\circ}$ C过夜,接着在20 $^{\circ}$ C下,10 000 r/min高速离心15 min,收取沉淀物后进行真空干燥,得到0.225 g桑黄粗多糖。

1.3.2 桑黄多糖中 β -葡聚糖含量的测定

称取0.002 g桑黄多糖,1 mol/L 氢氧化钠溶解并稀释至25 mL。吸取0.3 mL桑黄多糖溶液于1.5 mL离心管中,加入0.03 mL的6 mol/L 氢氧化钠,10 000 r/min离心5 min,于80 $^{\circ}$ C水浴中保温30 min。取出,迅速将离心管插入冰浴中10 min。加入0.63 mL苯胺蓝工作液,10 000 r/min离心5 min,50 $^{\circ}$ C水浴中保温30 min。取出,室温下放置30 min,去除未反应的试剂。

由 β -葡聚糖储备液配制1、2、5、10、15、20 μ g/mL系列工作液,同样品处理方法。

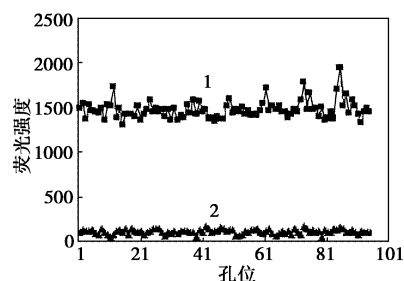
取0.25 mL反应液于酶标仪96孔板中,激发波长为398 nm,发射波长为503 nm,测定反应液荧光值。

2 结果与讨论

2.1 96孔板的选择

不添加反应液96孔透明板与全黑板的96个位置的荧光强度进行对比,结果图1所示。透明板的

荧光强度在1 500左右,而全黑板的荧光强度仅为100左右,笔者所研究样品的荧光强度为4 000~5 000,使用透明板会直接影响检测精密度,因此选择96孔全黑板用于检测样品荧光强度。



1—透明96孔板;2—全黑96孔板

图1 96孔板的荧光强度

2.2 标样选择

以大麦 β -D-葡聚糖和海带多糖为标样进行比较。大麦 β -D-葡聚糖在0、5、10、15、20、25 μ g/mL系列质量浓度上,荧光值变化不大,几乎与本底相同,这与Ko等^[6]的研究结果一致。研究采用了海带多糖做标准样品。如图2所示,海带多糖在0~15 μ g/mL范围内与荧光强度表现良好的线性关系。但浓度再升高,荧光强度不再增加。在低质量浓度范围内呈线性关系,也为提高检测方法灵敏度提供了前提条件。常用葡聚糖标准样品价格如表1所示。由表1可以看出,海带多糖标准样品价格便宜,可大大降低检测方法的成本。

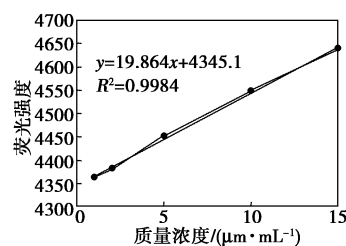


图2 β -葡聚糖浓度与荧光强度标准曲线

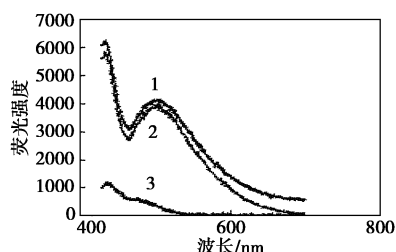
表1 常用葡聚糖标准样品价格 单位:元

名称	海带多糖	大麦葡聚糖	酵母葡聚糖	凝胶多糖
品牌	阿拉丁	sigma	Megazyme	sigma
价格/包装	200/g	650/50 mg	2200/2 g	2500/5 g

2.3 波长扫描

参考文献[6],选择398 nm作为激发波长,对荧光发射波长进行扫描,如图3所示。荧光强度最大时,发射波长为503 nm,与文献报道一致,说明桑黄多糖及海带多糖与苯胺蓝形成了特异结合的复合物。并且考察了苯胺蓝工作液、桑黄粗多糖及海带多糖反应液的荧光强度。苯胺蓝工作液在503 nm

时,没有发射光谱,而 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 桑黄粗多糖及 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 海带多糖反应液均表现了较高的荧光强度,说明利用海带多糖为标样,测定桑黄粗多糖中 β -D-葡聚糖含量具有可行性。



1—15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 海带多糖反应液;2—100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 桑黄粗多糖反应液;3—苯胺蓝工作液

图3 荧光发射光谱扫描

2.4 定量结果分析

如图2所示,海带多糖在 0 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与荧光强度表现在良好的线性关系,其回归方程为: $y = 19.864x + 4345.1$, 相关系数 R^2 为 0.9984。对桑黄粗多糖中 β -D-葡聚糖进行了 5 次平行测定,结果如表2所示。桑黄粗多糖中 β -D-葡聚糖质量分数为 19.86%,与文献^[9]中 β -葡聚糖 14% 基本相符。结合笔者所建立的桑黄多糖提取方法,提取率为 4.5%,桑黄子实体中 β -葡聚糖的质量分数计算结果为 0.89%。

表2 精密度与回收率

实验编号	桑黄样品测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/%
1	20.12	8.36	104.89
2	19.58	7.80	97.87
3	18.43	8.11	101.76
4	20.42	7.55	94.73
5	20.73	7.39	92.72
平均值	19.86	8.01	98.39
RSD/%	4.07	3.75	4.53

2.5 回收率与精密度

在桑黄粗多糖的氢氧化钠溶液中进行加标回收实验。加标方法为 2 mL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的桑黄粗多糖,加入 2 mL 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的海带多糖,用 1 mol/L 氢氧化钠稀释至 10 mL,结果如表2所示。加标回收率 92% ~ 104%,相对标准偏差为 4.53%,平均回收率为 98.39%。桑黄样品 5 次测定相对标准偏差为 4.07%,说明方法精密度高,可行性强。

2.6 稳定性

考察荧光强度 48 h 的变化情况,结果如表3所示。3 个样品 48 h 后测定结果与反应完立即测定结

果偏差 5% ~ 8%,说明形成的复合物具有一定稳定性,方法重现性好。

表3 日间精密度

实验编号	样品测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	48 h 测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	相对偏差/%
1	12.01	15.64	5.29
2	17.22	15.88	8.10
3	8.36	7.85	6.29

2.7 应用性

对市售酵母葡聚糖粉中 β -D-葡聚糖含量进行了考察。3 次平行测定平均结果为 82.29%,与产品标识 β -葡聚糖含量 $\geq 80\%$ 较一致,说明方法对测定各类产品中 β -D-葡聚糖具有可应用性。

3 结论

以海带多糖为标准样品,利用荧光酶标仪测定桑黄多糖等食用菌多糖中 β -D-葡聚糖含量,该方法准确性高、成本低、检测快速。结果表明,在激发波长为 398 nm,发射波长为 503 nm 测试条件下,海带多糖在 0 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与荧光强度表现良好的线性关系,桑黄粗多糖中 β -D-葡聚糖含量测定结果为 19.86%,平均回收率为 98.39%。市售酵母葡聚糖粉中 β -D-葡聚糖含量测定结果与产品标识相符,证明方法对食用菌及各类葡聚糖产品中 β -D-葡聚糖含量的测定具有一定借鉴意义。

参考文献

- [1] Kim H S, Hong J T, Kin Y. Stimulatory effect of β -glucans on immune cells[J]. Immune Network, 2011, 11(4): 191 - 195.
- [2] Tads R, Yoshikawa M, Ikeda F. Induction of IFN-gamma by a highly branched 1,3- β -D-glucan from aureobasidium pullulans in mouse-derived splenocytes via dectin-1-independent pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(4): 1105 - 1110.
- [3] 任涛. 桑黄多糖研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2009.
- [4] 郑立军, 沈业寿, 季俊虬, 等. 桑黄胞外多糖药理活性的初步研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 318 - 321.
- [5] 杨全, 张卉, 王琦, 等. 桑黄胞外多糖抗肿瘤活性研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(3): 188 - 190.
- [6] Yuan-Tih Ko, Yu Ling Lin. 1,3- β -Glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis its distribution in foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(11): 3313 - 3318.
- [7] 杨开, 胡俊荣, 何荣军, 等. 食药两用功能性 β -葡聚糖荧光法测定研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 399 - 406.
- [8] 中华人民共和国农业部. NY/T 1676—2008 食用菌中粗多糖含量的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [9] 李文, 杨焱, 周帅, 等. 八种食用菌水溶性粗多糖的 β -葡聚糖含量与体外免疫活性研究[J]. 食用菌学报, 2012, 19(1): 65 - 69. ■