

· 药学基础 ·

不同来源银耳多糖的质量评价

杜钢^{1*}, 刘美玲², 黄璐瑶¹, 苏燕¹, 姜卫东¹

(1. 四川省食品药品检验检测院, 成都 611731; 2. 四川大学药学院, 成都 610041)

[摘要] 目的:建立银耳多糖及其组成单糖的含量测定方法,分析不同产地和不同栽培方法的银耳中多糖含量差异,为银耳品质判定提供参考依据。方法:采用高效凝胶排阻色谱法联用多角度激光光散射和示差折光法(HPSEC-MALLS-RID)测定银耳多糖的含量及其相对分子质量分布;利用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生法结合高效液相色谱法对银耳多糖的组成单糖类型和比例进行分析。结果:不同产地段木银耳多糖的重均相对分子质量(M_w)在 $2.618 \times 10^6 \sim 3.503 \times 10^6$ Da,质量分数处于 $307.12 \sim 609.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;不同产地代料银耳多糖的 M_w 在 $2.723 \times 10^6 \sim 3.886 \times 10^6$ Da,质量分数处于 $366.38 \sim 647.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。银耳组成单糖主要由甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和岩藻糖组成,段木和代料银耳多糖的上述组成单糖比例分别为 $4.4:0.7:1.0:0.2:1.4:1.6$ 和 $4.4:0.8:1.0:0.1:1.5:1.5$ 。39批银耳样品中多糖的组成单糖质量分数范围分别为甘露糖 $36.71 \sim 191.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,葡萄糖醛酸 $9.74 \sim 32.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,葡萄糖 $10.46 \sim 76.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,半乳糖 $1.00 \sim 6.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,木糖 $16.73 \sim 70.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,岩藻糖 $17.16 \sim 68.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结论:不同来源的银耳多糖及其组成单糖含量存在一定差异,通过建立的分析方法能够准确、稳定的测定其含量,对于银耳品质判定和质量控制具有重要参考价值。

[关键词] 银耳; 多糖; 高效液相色谱法(HPLC); 高效凝胶排阻色谱法(HPSEC); 相对分子质量; 单糖; 栽培方法

[中图分类号] R28;O629.12;R93;O65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0210-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201749

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200609.1500.006.html>

[网络出版日期] 2020-6-10 09:50

Quality Evaluation of *Tremella fuciformis* Polysaccharides from Different Sources

DU Gang^{1*}, LIU Mei-ling², HUANG Lu-yao¹, SU Yan¹, JIANG Wei-dong¹

(1. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China;

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of polysaccharide and monosaccharide composition of *Tremella fuciformis*, and to analyze the difference of polysaccharide content in *T. fuciformis* from different sources and cultivation methods, so as to provide reference for the quality determination. **Method:** High performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detection (HPSEC-MALLS-RID) was employed to determine the content and relative molecular weight distribution of *T. fuciformis* polysaccharides. The monosaccharide types and proportions of *T. fuciformis* polysaccharides were analyzed by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) precolumn derivative high performance liquid chromatography (HPLC). **Result:** The weight-average relative molecular weight (M_w) and the content of polysaccharides in *T. fuciformis* cultivated by cut-log from different sources were distributed in $2.618 \times 10^6 \sim 3.503 \times 10^6$ Da and $307.12 \sim 609.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. These two parameters of polysaccharides in *T. fuciformis* with substitute cultivation from different sources were $2.723 \times 10^6 \sim 3.886 \times 10^6$ Da and $366.38 \sim 647.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. The *T. fuciformis* polysaccharides mainly consisted of mannose, glucuronic acid, glucose, galactose, xylose and fucose, their ratios in samples with cut-log and

[收稿日期] 20200302(014)

[基金项目] 四川省科技计划重点研发项目(2018SZ0340)

[通信作者] *杜钢,博士,副主任药师,从事食品药品质量研究, Tel:028-87877120, E-mail:709172140@qq.com

substitute cultivation were 4.4:0.7:1.0:0.2:1.4:1.6 and 4.4:0.8:1.0:0.1:1.5:1.5, respectively. The contents of the above six monosaccharides in 39 batches of *T. fuciformis* from different sources were mannose of 36.71-191.31 g·kg⁻¹, glucose of 10.46-76.10 g·kg⁻¹, galactose of 1.00-6.72 g·kg⁻¹, xylose of 16.73-70.54 g·kg⁻¹, glucuronic acid of 9.74-32.12 g·kg⁻¹, fucose of 17.16-68.20 g·kg⁻¹. **Conclusion:** The content of polysaccharides in *T. fuciformis* from different sources has a certain difference, the developed method can be used as a routine method for the quality evaluation of polysaccharides in *T. fuciformis*.

[Key words] *Tremella fuciformis*; polysaccharides; high performance liquid chromatography (HPLC); high performance size exclusion chromatography (HPSEC); relative molecular weight; monosaccharides; cultivation method

银耳属于真菌门、异隔担子菌亚纲、银耳科、银耳属^[1],也称白木耳、雪耳等,有“菌中之冠”的美称。银耳作为中药材和中药饮片分别收载于2010年版《四川省中药材标准》和2015年版《四川省中药饮片炮制规范》,功效滋阴润肺、养胃生津,用于肺虚咳嗽、阴虚低热、津少口渴^[2-3]。目前,银耳栽培方法主要以段木栽培和代料栽培为主^[4-5],段木栽培以四川通江最为著名,代料栽培则以福建古田最为出名。

银耳作为药食两用的食用菌,其主要成分为银耳多糖,该有效部位具有增强免疫力、降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗辐射、抗氧化、抗炎等活性^[6-11]。据报道,多糖的生物活性与其结构特征(相对分子质量、单糖组成、粒径、溶液链构象、糖苷键类型等)密切相关^[11-14]。然而,现行的银耳品质主要依据形态、气味等感官指标和常规理化指标^[15-16]来划分等级。因此,为了更加科学地评价银耳质量,针对银耳多糖关键指标的研究就显得十分必要。

目前,银耳多糖研究多侧重于测定粗多糖和总糖含量^[17-18]、分析单糖组成^[19-23]方面,缺乏对多批次不同产地、不同栽培方法银耳多糖相对分子质量分布、多糖含量、单糖组成及比例的比较。虽然高效凝胶排阻色谱法以葡聚糖为对照品被用于测定银耳多糖的相对分子质量^[24],但该方法联用多角度激光光散射和示差折光法(HPSEC-MALLS-RID)更为便捷,已被用于香菇多糖和竹荪多糖的相对分子质量分析^[25-26]。

HPSEC-MALLS-RID技术是通过采集激光照射样品溶液中颗粒物后产生的散射光特性来描述样品的分子特征。仪器配套软件可以同时采集激光散射光和示差折光信号,并直接计算多糖相对分子质量,包括数均相对分子质量(M_n)和重均相对分子质量(M_w),且无需借助对照品或预设的标准曲线^[27]。同时, M_w/M_n 也是描述样品多分散水平的重要量化指标,多分散性越小,其值则越小。此外,

HPSEC-MALLS-RID技术还可以通过测定比折光指数增量值(dn/dc)来测定多糖含量。基于此,本实验采用HPSEC-MALLS-RID和柱前衍生HPLC多糖分析技术检测39批次银耳,获取不同产地和栽培方法银耳多糖的相对分子质量分布、多糖含量、组成糖含量及比例。通过比较和分析实验数据,对待测银耳多糖建立相对客观的描述,通过分析方法的建立为银耳多糖及其产品的质量控制和品质判定提供参考依据。

1 材料

1260 Infinity II型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),DAWN Heleos II型十八角度动态激光散射仪和Optilab T-rEX型示差折光检测器(美国怀雅特公司),UltiMate3000型高效液相色谱仪和Multifuge X3R型离心机(美国赛默飞公司),MTS/4 digital型振荡器(德国艾卡公司),ZHWHY-110X50型往复式水浴恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司),N1-50型氮吹浓缩仪(上海屹尧仪器科技发展有限公司),Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国密理博公司)。

银耳多糖对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号ST8770,纯度≥90%),甘露糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为140651-201504,110833-201707,100226-201706,112014-201601,140648-201804,纯度均≥99%),木糖对照品(德国Dr. Ehrenstorfer公司,批号40206,纯度≥99%),1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP,北京百灵威科技有限公司,批号M0687),三氟乙酸(TFA,美国Fisher公司,批号153080),超滤离心管(3 kDa,美国密理博公司),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;银耳样品共39批,购于北京同仁堂(四川)健康药业有限公司,包括段木银耳12批(四川通江11批,四川青川1批)和代料银耳27批(福建古田9批,福建宁

德4批,四川通江13批,四川巴中1批),上述样品均经四川省食品药品检验检测院中药室黎跃成主任药师鉴定为银耳科银耳 *Tremella fuciformis* 的干燥子实体。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取银耳多糖对照品约10 mg,置于25 mL量瓶中,用水溶解并定容至刻度,摇匀,作为多糖对照品溶液。精密称取各单糖对照品约100 mg,分别置于10 mL量瓶中,用水溶解并定容至刻度,摇匀,制成各单糖对照品储备液(质量浓度约 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$);分别取各单糖对照品储备液500 μL ,置同一10 mL量瓶中,加水定容,摇匀,制成质量浓度均约 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单糖混合对照品溶液。

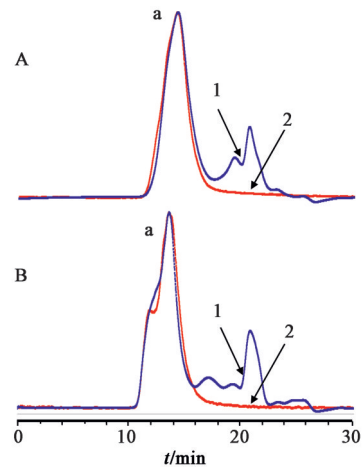
2.2 供试品溶液的制备 称取银耳粉末(过100目筛,下同)约0.5 g,为了除去银耳中的醇溶性小分子、色素和脂肪,避免后期干扰多糖的纯化与检测,先加80%甲醇20 mL,涡旋混匀,于70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热30 min,取出冷却,离心(转速1万 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心时间5 min,离心半径15.3 cm,下同),弃去上清液。沉淀加水30 mL,涡旋混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡提取1.5 h,取出,离心,收集提取液。重复提取1次,合并提取液于旋蒸瓶中,旋蒸浓缩至约10 mL。加无水乙醇适量至其终体积分数为80%,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。取出,离心,弃去上清液。向沉淀中加入80%乙醇10 mL,涡旋混匀,离心,弃去上清液。重复上述步骤洗涤沉淀1次。沉淀于60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥至近干,沉淀用0.9%氯化钠溶液(含0.02%叠氮化钠)使溶解,置25 mL量瓶中,摇匀,精密量取5 mL转移至超滤离心管,于4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min(离心半径20.9 cm)。吸取上层溶液置于10 mL量瓶中,加0.9%氯化钠溶液(含0.02%叠氮化钠)定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 HPSEC-MALLS-RID 色谱条件 TSK-GEL GMPWXL 色谱柱(7.8 mm \times 30 cm, 13 μm),柱温35 $^{\circ}\text{C}$,流速0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,流动相0.9%氯化钠溶液(含0.02%叠氮化钠),进样量25 μL ,采集时间设定30 min。见图1。

2.4 HPSEC-MALLS-RID 方法学验证

2.4.1 精密度试验 取银耳多糖对照品溶液,按2.3项下条件连续进样6次,分别测定银耳多糖的相对分子质量和含量。结果银耳多糖 M_n 的RSD 1.0%, M_w 的RSD 0.9%,银耳多糖含量的RSD 1.0%,说明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 称取6份同一批次的银耳粉



A. 对照品;B. 供试品;a. 银耳多糖;1. 示差折光检测器信号;2. 散射光检测器信号

图1 银耳多糖的HPSEC

Fig. 1 HPSEC chromatograms of polysaccharides in *Tremella fuciformis*

末,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下条件测得银耳多糖 M_n 平均值 2.805×10^6 Da, RSD 1.2%; M_w 平均值 3.065×10^6 Da, RSD 1.6%,多糖平均质量分数 $428.21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, RSD 1.7%,说明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后0, 1, 4, 8, 12, 24 h按2.3项下条件测定,结果银耳多糖含量的RSD 1.4%,银耳多糖 M_n 和 M_w 的RSD分别为3.9%, 3.6%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.4 加样回收率试验 精密称取银耳粉末约0.25 g,共9份,按照高、中、低3个浓度加入对照品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下条件测定,按公式回收率=(测得量-样品中量)/加入量 \times 100%计算回收率,结果平均加样回收率92.51%, RSD 2.5%,表明该方法准确可靠,见表1。

表1 银耳多糖含量测定的加样回收试验

Table 1 Recovery test of determination of polysaccharides in *Tremella fuciformis*

称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.253 6	108.59	44.51	150.67	94.55
0.250 7	107.35	44.51	150.64	97.27
0.257 8	110.39	44.51	151.97	93.41
0.251 1	107.52	89.01	188.73	91.23
0.250 5	107.27	89.01	189.70	92.61
0.253 4	108.51	89.01	188.89	90.26
0.251 5	107.69	133.52	230.99	92.34
0.250 9	107.44	133.52	227.73	90.09
0.253 7	108.64	133.52	229.85	90.78

2.5 样品测定 采用HPSEC-MALLS-RID对39批样品进行测定。银耳多糖质量浓度按公式 $C_i = \alpha (v_i - v_{i_{\text{基线}}}) / (d_n/d_c)$ 进行计算^[28-29], 式中 C_i 为银耳多糖质量浓度, α 是RID检测器校准常数 (3.1147×10^{-5} RIU/pixel), v_i 和 $v_{i_{\text{基线}}}$ 分别为样品和基线的电信号。用RID检测器测定银耳多糖对照品比折光指数增量 (d_n/d_c), 即精密称取银耳多糖对照品 10 mg, 加水配制质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g·L⁻¹ 的溶液

各 3 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 采用 ASTRA 6.1 软件测得银耳多糖的 $d_n/d_c = 0.130 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。HPSEC-MALLS-RID 获得的银耳多糖图谱见图 1, 结果发现样品中主成分色谱峰的保留时间与银耳多糖对照品的保留时间一致, 在 10~16 min。利用 ASTRA 6.1 软件对银耳多糖数据进行处理, 激光散射数据模型采用 Zimm 1, 计算银耳多糖的相对分子质量及质量分数, 见表 2。

表 2 不同栽培方法和不同产地银耳多糖的相对分子质量及质量分数 (n=2)

Table 2 Relative molecular weight and content of polysaccharides in *Tremella fuciformis* from different cultivation methods and different sources (n=2)

银耳来源	栽培方法	M_n/Da	M_w/Da	M_w/M_n	质量分数 /g·kg ⁻¹	银耳来源	栽培方法	M_n/Da	M_w/Da	M_w/M_n	质量分数 /g·kg ⁻¹
四川通江 1	段木	2.697×10 ⁶	2.931×10 ⁶	1.09	451.25	福建古田 9	代料	3.291×10 ⁶	3.473×10 ⁶	1.06	463.59
四川通江 2	段木	2.883×10 ⁶	3.063×10 ⁶	1.06	425.85	福建宁德 1	代料	3.142×10 ⁶	3.364×10 ⁶	1.07	410.65
四川通江 3	段木	3.108×10 ⁶	3.335×10 ⁶	1.07	473.59	福建宁德 2	代料	2.935×10 ⁶	3.157×10 ⁶	1.08	366.38
四川通江 4	段木	2.973×10 ⁶	3.163×10 ⁶	1.06	450.84	福建宁德 3	代料	3.185×10 ⁶	3.268×10 ⁶	1.03	460.84
四川通江 5	段木	3.249×10 ⁶	3.332×10 ⁶	1.02	465.22	福建宁德 4	代料	2.827×10 ⁶	3.056×10 ⁶	1.08	448.39
四川通江 6	段木	2.681×10 ⁶	2.865×10 ⁶	1.07	331.70	四川通江 1	代料	2.937×10 ⁶	3.109×10 ⁶	1.06	398.52
四川通江 7	段木	3.405×10 ⁶	3.503×10 ⁶	1.03	388.01	四川通江 2	代料	2.898×10 ⁶	2.723×10 ⁶	0.94	469.40
四川通江 8	段木	2.763×10 ⁶	2.998×10 ⁶	1.08	439.52	四川通江 3	代料	2.812×10 ⁶	3.096×10 ⁶	1.10	451.39
四川通江 9	段木	2.361×10 ⁶	2.618×10 ⁶	1.11	609.06	四川通江 4	代料	2.887×10 ⁶	3.011×10 ⁶	1.04	395.36
四川通江 10	段木	2.505×10 ⁶	2.727×10 ⁶	1.09	307.12	四川通江 5	代料	2.811×10 ⁶	2.941×10 ⁶	1.05	451.55
四川通江 11	段木	2.849×10 ⁶	2.808×10 ⁶	0.99	552.33	四川通江 6	代料	2.806×10 ⁶	3.029×10 ⁶	1.08	447.07
四川青川 1	段木	2.845×10 ⁶	3.066×10 ⁶	1.08	487.76	四川通江 7	代料	2.849×10 ⁶	3.062×10 ⁶	1.07	522.83
福建古田 1	代料	2.912×10 ⁶	3.102×10 ⁶	1.07	478.89	四川通江 8	代料	2.867×10 ⁶	3.104×10 ⁶	1.08	392.50
福建古田 2	代料	3.782×10 ⁶	3.886×10 ⁶	1.03	461.65	四川通江 9	代料	3.225×10 ⁶	3.402×10 ⁶	1.06	418.30
福建古田 3	代料	3.161×10 ⁶	3.295×10 ⁶	1.04	647.37	四川通江 10	代料	2.815×10 ⁶	3.082×10 ⁶	1.09	438.91
福建古田 4	代料	3.224×10 ⁶	3.381×10 ⁶	1.05	481.03	四川通江 11	代料	3.352×10 ⁶	3.463×10 ⁶	1.03	413.61
福建古田 5	代料	3.637×10 ⁶	3.691×10 ⁶	1.01	500.51	四川通江 12	代料	2.836×10 ⁶	2.977×10 ⁶	1.05	446.66
福建古田 6	代料	3.131×10 ⁶	3.291×10 ⁶	1.05	552.61	四川通江 13	代料	3.393×10 ⁶	3.484×10 ⁶	1.03	571.00
福建古田 7	代料	2.943×10 ⁶	3.056×10 ⁶	1.04	385.56	四川巴中 1	代料	3.459×10 ⁶	3.545×10 ⁶	1.02	401.68
福建古田 8	代料	3.377×10 ⁶	3.616×10 ⁶	1.07	404.43						

由表 2 可知, 不同产地段木银耳多糖的 M_w 分布在 $2.618 \times 10^6 \sim 3.503 \times 10^6$ Da, 其分散指数 (M_w/M_n) 在 0.99~1.11。不同产地代料银耳多糖的 M_w 分布在 $2.723 \times 10^6 \sim 3.886 \times 10^6$ Da, M_w/M_n 处于 0.94~1.10。说明在该条件下测定的银耳多糖均一性较好, 相对集中, 为窄分布。由图 1 可知, MALLS 检测器的信号 10~16 min 与 RID 检测器获得的信息非常相似, 说明该区域为银耳多糖主成分分布区域, 可用该段区域的信号计算银耳多糖的含量。不同产地段木和代料银耳多糖的质量分数分别为 307.12~609.06, 366.38~647.37 g·kg⁻¹, 说明同一栽培方法, 可能由于

选种、培育技术、环境控制等因素会导致批间差异。利用 SPSS Statistics 24 软件对 2 种栽培方法银耳的多糖含量整体数据进行统计学差异分析, 结果显示不同栽培方法银耳多糖含量总体无显著性差异。代料栽培样品本实验收集到 4 个产地 27 批, 利用 SPSS Statistics 24 软件对不同产地的代料银耳多糖含量测定结果进行单因素方差分析和邓肯检验, 结果显示不同产地的代料银耳多糖含量整体数据无显著性差异。除了多糖相对分子质量外, 其单糖组成、比例和含量是多糖的重要信息。多糖完全水解, 柱前衍生液相色谱法是分析多糖中单糖组成的

重要方法。

2.6 银耳多糖的水解 精密吸取银耳多糖提取液(即2.2项下供试品溶液)0.5 mL于2 mL离心管中,加入4 mol·L⁻¹ TFA溶液0.5 mL,涡旋混匀,充氮气后于95 °C水浴过夜。取出冷却,转移至氮吹管中,用适量水洗涤离心管3次,洗涤液合并于氮吹管。加入甲醇1 mL,混匀,50 °C水浴氮吹至近干。

2.7 组成糖的衍生化 取2.6项下多糖水解产物,加入水0.5 mL使溶解,精密吸取50 μL,分别加入0.6 mol·L⁻¹ NaOH溶液50 μL和0.5 mol·L⁻¹ PMP溶液100 μL,涡旋混匀,70 °C下水浴100 min。取出冷却,加入0.3 mol·L⁻¹ HCl溶液100 μL,加水至1 mL。加入三氯甲烷1 mL萃取残留PMP,静置分层,弃去三氯甲烷层,重复萃取3次。取上清液过0.45 μm微孔滤膜,即得衍生化样品,供HPLC分析。取单糖混合对照品溶液50 μL同法操作,得衍生化混合对照品溶液。

2.8 HPLC色谱条件 采用ACE Excel C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 6.7)-乙腈(83:17),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长245 nm,柱温30 °C,进样量20 μL。

2.9 组成糖的测定 称取39批样品适量,按2.2,2.6和2.7项下方法制备衍生化供试品溶液,按2.8项下条件测定,采用标准曲线法进行计算^[21-22],结果见表3。

由表3可知,段木和代料栽培方法培育的银耳,单糖组成十分相似;以葡萄糖的含量为参比值,代料银耳和段木银耳中甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和岩藻糖的比值(均以平均值计算)分别为4.4:0.8:1.0:0.1:1.5:1.5,4.4:0.7:1.0:0.2:1.4:1.6。

利用SPSS Statistics 24软件对27批不同产地的代料银耳单糖含量测定结果进行单因素方差分析和邓肯检验,对2种栽培方法的39批样品采用*t*检验进行统计学差异分析,结果显示不同产地的代料银耳以及不同栽培方法银耳多糖的单糖整体含量均无显著性差异;39批样品批间产生的含量差异可能与银耳菌种选育、保藏,栽培技术自身和外部环境因素有关^[5]。

3 讨论

银耳多糖是银耳的主要功效成分,多糖及其组成单糖含量是衡量银耳品质的重要指标。本研究采用的2种测定方法具有灵敏度高、准确性好、稳定性强的优点,适用于银耳多糖及其组成单糖的含量

测定。39批银耳多糖及其组成单糖的批间含量测定结果存在一定差异,但在不同栽培方法样品中并无显著性差异。说明就段木和代料栽培技术而言,暂未发现那种培育方法占有绝对优势,但2种栽培方法在培育技术上均存在改良的空间。银耳多糖含量差异可能与菌种、栽培技术以及外部环境有关。因此,优化科学栽培技术,筛选适宜环境生长条件对增加银耳多糖含量、提高银耳品质具有重要意义。

银耳的现行标准主要依据色泽、一般杂质和常规理化指标对银耳品质等级进行划分。本研究通过研究银耳多糖的检测方法,分析不同产地和不同栽培方法银耳样品中多糖含量差异,以期后续划分银耳品质等级,除了考虑气味、颜色、形状等因素外,增加多糖功效成分作为评判依据。本研究中检测的银耳多糖为总多糖,由于纯化和分离技术的局限性未能发现不同栽培技术间银耳多糖种类的具体差异,后续将探索段木银耳和代料银耳的代表性和特征性多糖指标成分,从而准确阐明不同栽培技术采收产品的优劣。

本研究筛选了3种条件下的银耳多糖水解方法,即在烘箱中110 °C条件下水解1.5 h,在烘箱中120 °C条件下水解1.5 h以及在恒温振荡水浴锅内95 °C条件下水解过夜。结果发现前2种水解条件的样品经HPLC连续分析后,基线波动会干扰样品中半乳糖、木糖和甘露糖的检测。原因是在这2个条件下多糖水解不完全,部分多糖或寡糖残留在色谱柱中,在多次进样后缓慢冲出,引起基线不稳。究其原因是该条件下离心管盖密封不紧,导致TFA泄露,从而使水解不完全。考虑到实验条件的限制,本研究采用在恒温振荡水浴锅内95 °C条件下水解过夜,在此条件下基线平稳,能较好地分离各单糖并进行准确定量。

在组成糖的衍生化预试验中,本课题组考察了浓度为0.3 mol·L⁻¹的HCl溶液加入量分别为100,120,140 μL时对PMP萃取的影响,使用精密pH试纸测定,结果发现三者pH大致范围分别为5~6,6~7,7~8;与此同时,本课题组研究发现当加入浓度为0.3 mol·L⁻¹的HCl溶液体积为100 μL时,PMP峰最小,萃取的效果最好,并且上述3个0.3 mol·L⁻¹ HCl溶液加入量下基本不会影响银耳多糖各组成单糖的峰面积,故本课题组最终选择加入0.3 mol·L⁻¹ HCl溶液100 μL。

表3 银耳多糖中单糖的质量分数($n=2$)

Table 3 Contents of monosaccharides in *Tremella fuciformis* polysaccharides($n=2$)

$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

银耳来源	栽培方法	甘露糖	葡萄糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	岩藻糖	总量
四川通江 1	段木	79.02	12.55	15.65	3.59	25.15	27.63	163.59
四川通江 2	段木	129.32	24.34	23.77	5.24	39.87	42.11	264.66
四川通江 3	段木	97.44	17.35	24.50	3.77	30.43	33.13	206.61
四川通江 4	段木	108.64	15.59	17.37	2.14	38.48	38.22	220.44
四川通江 5	段木	103.70	17.13	16.47	1.75	32.55	38.86	210.47
四川通江 6	段木	90.44	14.87	17.24	4.85	29.71	30.19	187.30
四川通江 7	段木	108.55	18.45	35.47	5.46	35.00	37.25	240.19
四川通江 8	段木	119.74	21.11	22.98	3.93	39.35	39.52	246.62
四川通江 9	段木	95.66	15.22	21.07	5.92	31.86	35.17	204.90
四川通江 10	段木	99.03	16.21	17.45	4.70	32.73	37.70	207.82
四川通江 11	段木	93.29	13.84	40.54	4.48	32.23	32.50	216.87
四川青川 1	段木	150.34	24.86	35.21	1.81	49.82	55.26	317.30
福建古田 1	代料	122.41	20.65	20.09	2.59	40.68	41.50	247.92
福建古田 2	代料	98.58	14.95	38.38	2.55	34.26	34.51	223.22
福建古田 3	代料	191.31	32.01	76.10	5.04	70.54	68.20	443.19
福建古田 4	代料	56.93	9.74	10.46	1.93	16.73	17.16	112.94
福建古田 5	代料	178.54	31.61	37.23	3.74	62.30	60.81	374.23
福建古田 6	代料	185.88	31.36	38.96	3.65	64.46	67.65	391.97
福建古田 7	代料	142.46	28.59	23.82	2.26	42.62	40.49	280.24
福建古田 8	代料	146.44	26.17	31.35	2.02	46.04	52.39	304.41
福建古田 9	代料	111.88	18.44	29.24	2.06	35.98	40.98	238.59
福建宁德 1	代料	101.29	15.68	54.55	4.28	35.98	33.08	244.87
福建宁德 2	代料	121.49	21.65	44.34	2.87	40.35	36.92	267.63
福建宁德 3	代料	84.80	15.69	18.22	4.42	22.22	20.19	165.53
四川宁德 4	代料	36.71	14.53	21.10	4.64	28.66	35.26	140.91
四川通江 1	代料	172.10	29.72	20.03	2.34	59.88	54.10	338.17
四川通江 2	代料	138.96	21.69	27.22	6.72	49.94	51.24	295.77
四川通江 3	代料	157.24	30.91	41.07	2.31	48.43	47.38	327.35
四川通江 4	代料	138.77	20.31	46.29	2.99	47.31	52.06	307.73
四川通江 5	代料	98.10	14.95	21.08	2.01	30.89	34.91	201.93
四川通江 6	代料	176.24	32.12	20.68	3.69	58.36	56.42	347.51
四川通江 7	代料	168.88	25.68	17.28	3.57	59.74	63.14	338.28
四川通江 8	代料	171.73	27.42	34.38	4.65	57.37	57.05	352.60
四川通江 9	代料	135.47	26.43	27.80	1.00	35.30	27.30	253.31
四川通江 10	代料	132.85	21.50	12.42	2.18	42.63	44.02	255.59
四川通江 11	代料	120.17	21.69	30.61	4.54	37.51	43.87	258.38
四川通江 12	代料	117.77	19.73	22.95	4.26	38.74	42.94	246.38
四川通江 13	代料	110.59	18.02	18.48	1.99	35.33	39.99	224.40
四川巴中 1	代料	154.79	26.01	26.94	2.61	50.52	58.64	319.52

[参考文献]

- [1] 刘波. 中国真菌志: 第2卷[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 78-80.
- [2] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2010: 572-574.
- [3] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 461-463.
- [4] 黎勇, 王晓东, 高敏. 我国银耳的研究历史及现状[J]. 北方园艺, 2014(16): 188-191.
- [5] 邵平, 薛力, 洪台, 等. 银耳栽培与加工技术的研究进展及应用现状分析[J]. 浙江食用菌, 2011, 19(2): 4-8.
- [6] 史振伟, 许焱, 李晓璐, 等. 银耳多糖改善脓毒症小鼠调节性T细胞的免疫活性[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(3): 313-317.
- [7] BACH E E, COSTA S G, OLIVEIRA H A, et al. Use of polysaccharide extracted from *Tremella fuciformis* berk for control diabetes induced in rats [J]. Emir J Food Agr, 2015, 27(7): 585-591.
- [8] 韩英, 徐文清, 杨福军, 等. 银耳多糖的抗肿瘤作用及其机制[J]. 医药导报, 2011, 30(7): 849-852.
- [9] 王程成, 崔莉, 张振海, 等. 口服中药多糖调节肿瘤免疫应答研究思路[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1965-1971.
- [10] 刘蕾, 刘磊, 康传利, 等. 银耳多糖的制备工艺及研究进展[J]. 生物产业技术, 2019(5): 58-63.
- [11] 管庆霞, 张雪, 邹淑君, 等. 星点设计-效应面法优化枸杞多糖含片的处方并考察其免疫调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 65-72.
- [12] LI S P, WU D T, LU G P, et al. Carbohydrates analysis in herbal glycomics [J]. Trends Anal Chem, 2013, 52: 155-169.
- [13] YANG L Q, ZHANG L M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources [J]. Carbohydr Polym, 2009, 76(3): 349-361.
- [14] HU D J, CHEONG K L, ZHAO J, et al. Chromatography in characterization of polysaccharides from medicinal plants and fungi [J]. J Sep Sci, 2013, 36(1): 1-19.
- [15] 四川省巴中质量技术监督局. 通江银耳, DB 511921/T2-2010[M]. 巴中: 四川省巴中质量技术监督局, 2010: 3-4.
- [16] 福建省质量技术监督局. 古田银耳, DB35/T 1096-2011[M]. 福州: 福建省质量技术监督局, 2011: 2-3.
- [17] 吴琴, 陶瑞霄, 迟原龙, 等. 银耳粗多糖的理化特性研究[J]. 食品科技, 2016, 41(12): 149-153.
- [18] 项丽娟, 黄玉琴, 林占熿, 等. 温室菌草袋栽银耳产量及其品质的研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(1): 339-343.
- [19] 韩威, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 银耳多糖单糖组成分析的三种色谱方法比较[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 359-361.
- [20] 陈英红, 姜瑞芝, 罗浩铭, 等. 高效液相色谱法建立银耳多糖特定图谱的研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 136-139.
- [21] 陈英红, 姜翔之, 罗浩铭, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法分析银耳多糖的单糖组成[J]. 特产研究, 2012, 34(1): 37-39, 54.
- [22] 颜军, 侯贤灯, 徐开来. 柱前衍生 HPLC 分析银耳多糖的单糖组成[J]. 中国测试, 2011, 37(1): 44-46.
- [23] 苟兴, 赵树海, 李先天, 等. 不同来源银耳中银耳多糖差异分析[J]. 中国现代中药, 2017, 19(6): 828-832.
- [24] 刘芹, 宁嘉玲, 丁侃. 基于高效凝胶渗透色谱法的银耳多糖质量控制研究[J]. 中草药, 2011, 42(9): 1732-1735.
- [25] CHEN Y W, HU D J, CHEONG K L, et al. Quality evaluation of lentinan injection produced in China [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 78-79: 176-182.
- [26] 吴定涛, 巨瑶君, 陆静峰, 等. 糖谱法比较不同产地竹荪多糖结构特征[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 66-70.
- [27] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 157-159.
- [28] CHEONG K L, WU D T, ZHAO J, et al. A rapid and accurate method for the quantitative estimation of natural polysaccharides and their fractions using high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detector [J]. J Chromatogr A, 2015, 1400: 98-106.
- [29] WU D T, LAM S C, CHEONG K L, et al. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 129: 210-218.

[责任编辑 刘德文]