

同时测定旱芹抗性淀粉和抗性低聚糖含量¹

马秀红^a 谭亮^{④b}

^a(青海民族大学化学与生命科学学院药学系 西宁市八一路 72 号 810007)

^b(中国科学院西北高原生物研究所 西宁市新宁路 23 号 810001)

摘要 建立了同时测定旱芹中抗性淀粉(Resistant Starch, RS)和抗性低聚糖(Resistant Oligosaccharides, RO)含量的方法。通过模拟人体胃肠道的生理条件,除去样品中脂类物质、蛋白质和可溶性淀粉后,分别采用紫外分光光度法和酶-重量法测定 RS 和 RO 含量。RS 含量在 0.0160—0.1600 mg/mL ($r=0.9993$) 范围内呈良好的线性关系($n=6$),平均回收率为 90.7%,RSD=2.0% ($n=9$);RO 含量测定平均回收率为 87.3%,RSD=2.9% ($n=9$)。实验结果表明:该方法线性、精密度、重复性、稳定性和回收率试验均符合方法学验证要求。该方法操作简便,结果准确,重复性好,为全面测定旱芹膳食纤维(DF)中各组分的含量提供了依据,使旱芹 DF 含量标示更准确。

关键词 旱芹;抗性淀粉;抗性低聚糖;紫外分光光度法;酶-重量法

中图分类号:O657.32;R151.3

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2013)05-2665-06

1 引言

旱芹为伞形科植物旱芹(*Apium graveolens* L.)的带根全草。味甘、辛、微苦,性凉,归肝、胃、肺经。主治肝阳眩晕,风热头痛,黄疸,小便淋痛,尿血,疮疡肿毒等^[1]。现代药理研究表明旱芹具有抑制致癌物质的致癌活性;可作为治疗 HIV 和其他病毒感染的抗病毒药物;可治疗各种炎症;具有降血压、降血脂、降血糖等作用^[2]。芹菜中具有生理活性的物质主要包括有:黄酮类、多不饱和脂肪酸、矿物质元素、氨基酸、膳食纤维(DF)等^[3]。其中,DF 可以延缓碳水化合物消化吸收,防止肥胖;促进肠蠕动,防止便秘;促进结肠菌群发酵,有利于防癌;降低胆固醇吸收,利于防止心血管疾病和维护肌体健康等^[4,5]。DF 是不同物质的总称,并非纯净物或简单的纤维素,其按来源不同主要分为非淀粉多糖(NSP)、木质素、抗性淀粉(RS)^[6]和抗性低聚糖(RO)^[7]。在食品工业中,研究多集中在谷物类(如小麦)、果蔬类(如苹果)、豆渣类(如豆腐)以及植物类(如甜菜、甘蔗等)DF 测定,对旱芹 DF 的研究甚少,而旱芹恰恰是 DF 的很好来源;其次,DF 的含量测定多采用酶-重量法。魏红等于 2004 年综述 DF 的应用及检测方法^[8];李英等用正交实验的方法研究松花粉中水不溶性膳食纤维(IDF)的测定条件^[9],该法采用酶解处理,模拟人体的消化方式。虽然方法精度较高,但是测定的仅仅是总膳食纤维(TDF)以及水溶性、水不溶性膳食纤维(SDF、IDF)含量,却不能测定组成 DF 的各组分含量;此外,很多时候会将多糖、纤维素和木质素的总和简单地等同于 DF 含量,而忽略了其他重要组

¹ 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J-26)

^④ 联系人,电话:(0971)6132750;E-mail:tanliang0117@126.com

作者简介:马秀红(1990—),女,青海省化隆县人,本科,主要从事药物制剂工作。

谭亮(1984—),男,西宁市人,工程师,硕士,主要从事天然产物的分析测试工作。

成部分,这样 DF 的含量测定结果必然不准确。作为 DF 的主要组分,RS 和 RO 的含量同样很重要。

目前有单独测定 DF 中 NSP、木质素和 RS 的相关文献报道,但同时测定 RS 和 RO 含量,尤其是存在于早芹 DF 中的两种组分的研究未见报道。本文建立了同时测定早芹中 RS 和 RO 含量的方法,并对该方法各项方法学指标进行了验证试验,为更准确地测定早芹 DF 的含量提供了依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Varian Cary 300 Bio 型紫外-可见分光光度仪(美国瓦里安公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HH-2 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);Anke TDL-40B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);pHS-25 型数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);AG135 型电子分析天平(Mettler Toledo 公司);202-OA 型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);PS-60 型洁康牌超声波清洗仪(东莞市洁康超声波设备有限公司);100—1000 μ L 移液枪(广州君莱贸易有限公司)。

欧力多 LOLGO 系列低聚果糖(BR,广东江门量子高科生物工程有限公司);D-无水葡萄糖(110833-201205,中国食品药品检定研究院);葡萄糖氧化酶(BR,成都艾科达化学试剂有限公司); α -葡萄糖苷酶(BR,上海源叶生物科技有限公司);胃蛋白酶(BR,成都艾科达化学试剂有限公司); α -淀粉酶(BR,成都艾科达化学试剂有限公司);糖化酶(BR,成都艾科达化学试剂有限公司);正己烷、95%乙醇、氢氧化钠、酒石酸钾钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);乙酸钠、氯仿、苯酚(分析纯,沈阳化学试剂厂);活性炭(分析纯,沈阳市试剂二厂);无水亚硫酸钠(分析纯,沈阳市试剂五厂);磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(分析纯,汕头市西陇化工有限公司);3,5-二硝基水杨酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

实验用水均为超纯水(18.25M Ω ·cm)。

2.2 供试材料

不同来源的 7 批早芹样品,分别收集于沈阳(春、夏、秋季)、河北(秋季)、新疆(秋季)、广州(秋季)、韩国(秋季)。将收集的样品阴干,粉碎,置密封袋中密封,保存在干燥器中。

2.3 实验方法

2.3.1 溶液的配制

D-葡萄糖储备溶液:称取 D-无水葡萄糖 10mg,准确称定,置于 100mL 容量瓶中,加超纯水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为 D-葡萄糖储备液(试验浓度为 0.1010mg/mL);低聚果糖储备溶液:称取低聚果糖(纯度>95%)10mg,准确称定,置于 100mL 容量瓶中,加超纯水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为低聚果糖储备液(试验浓度为 0.0985mg/mL);KCl-HCl 溶液(pH 1.7):准确移取 0.85mL 浓盐酸至盛有约 200mL 超纯水的大烧杯中搅拌混匀,然后加入 1.49g 氯化钾超声溶解,将该溶液全部转移至 500mL 容量瓶中,加超纯水稀释至刻度,摇匀,即得;磷酸钾缓冲盐溶液(pH 6.5):准确称取磷酸二氢钾 0.68g 至盛有适量超纯水的烧杯中超声溶解,然后准确移入 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液 15.2mL,搅拌混匀后全部转移至 100mL 容量瓶中,加超纯水稀释至刻度,摇匀,即得;乙酸-乙酸钠缓冲盐溶液(pH 4.4):准确称取无水乙酸钠 4.10g 至盛有适量水的烧杯中超声溶解,然后准确移入冰醋酸 7.19mL,搅拌混匀后全部转移至 500mL 容量瓶中,加超纯水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 DNS 显色剂制备

准确称取酒石酸钾钠 182.0g,加适量超纯水加热溶解,趁热加入 3,5-二硝基水杨酸 6.3g、氢氧

化钠颗粒 21.0g、苯酚 5.0g 和无水亚硫酸钠 5.0g, 搅拌使其溶解。冷却后转移入 1000mL 棕色容量瓶中加超纯水定容, 避光保存。

2.3.3 样品前处理

取双份已阴干旱芹样品粉末 1.5g, 准确称定, 加入 10mL 正己烷, 置于 80℃ 水浴超声 30min。过滤除去上清液, 残渣挥干溶剂后加入 pH 1.7 KCl-HCl 缓冲溶液 10mL, 涡旋混匀后, 加 4% 胃蛋白酶(1:15000, 猪源) 溶液 1.0mL, 置于 40℃ 水浴反应 1h。将溶液转移至 50mL 离心管中, 加入 pH 6.5 磷酸钾缓冲溶液 10mL 和 α -淀粉酶(5480U/g) 溶液 1mL, 置于 37℃ 恒温水浴反应 1h。在 4000r/min 条件下离心 5min, 除去上清液, 残渣加入 10mL 超纯水洗涤, 继续以相同条件离心除去上清液, 烘干残渣。残渣加入 75% 乙醇 50mL 超声 30min, 过滤, 滤液用于 RO 含量测定, 剩余残渣用于 RS 含量测定。

2.3.4 RS 溶液制备

上述剩余残渣加入 1mL 95% 乙醇润湿, 加入 2mol/L 氢氧化钠溶液 6.0mL, 置于沸水浴中加热 15min。冷却至室温, 加入 2mol/L 盐酸溶液调节至中性, 加 pH 4.4 乙酸-乙酸钠溶液 5mL, 涡旋混匀, 加入糖化酶(100000U/mL) 溶液 1.0mL, 置 60℃ 水浴反应 2h。在 4000r/min 条件下离心 5min, 留存上清液, 残渣继续加入 5mL 超纯水洗涤, 离心留存上清液, 将两次上清液并入至 25mL 容量瓶中, 加水定容。准确移取样品溶液 2.0mL 置于 25mL 具塞试管中, 加入 DNS 显色剂 3.0mL, 摇匀, 置于沸水浴显色 10min。流水迅速冷却后加超纯水定容。以超纯水作为空白, 在 540nm 处测定吸光度值。

2.3.5 RO 溶液制备

加入活性炭(1.5:100, W/V) 至前处理备用滤液(上述 2.3.3 节制备滤液), 置于 45℃ 恒温干燥箱中脱色 30min。过滤, 准确移取滤液 25mL 调 pH 至 6.5, 加入 α -葡萄糖苷酶(5000U/g) 溶液 1.0mL, 涡旋混匀, 在 37℃ 酶解 1h。加 pH 6.5 磷酸钾缓冲溶液 10mL, 涡旋混匀, 加入葡萄糖氧化酶(>100U/mg) 溶液 1.0mL, 置于 45℃ 水浴酶解 2h, 然后加入 0.1mol/L 氢氧化钙溶液至不再出现白色沉淀为止。过滤除沉淀, 滤液减压浓缩后转移至已恒重并称量好的瓷坩埚中, 置于烘箱干燥过夜。次日取出置于干燥器中冷却 1h, 准确称量, 减去坩埚质量即得 RO 质量。

3 结果与讨论

3.1 RS 含量测定

3.1.1 葡萄糖校准曲线绘制

分别准确移取 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0mL D-葡萄糖储备液置于 25mL 具塞试管中, 加入超纯水补至 2.0mL, 加入 DNS 显色剂 3.0mL 混匀, 置于沸水浴显色 10min。冷水迅速冷却后加超纯水定容至 25mL, 摇匀, 在 540nm 处测定吸光度值。以 D-葡萄糖浓度 C (mg/mL) 为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标绘制校准曲线, 得 $A = 15.031C + 6.130 \times 10^{-2}$, $r = 0.9993$, 线性范围 0.0160—0.1600 mg/mL。

3.1.2 RS 稳定性试验

取已制备好的样品溶液(河北秋季), 室温下放置, 分别在 0、1、2、4、8、12 和 24h 取样, 并在 540nm 下测定吸光度, 计算得 RSD 为 2.1%。结果表明样品溶液在 24h 内稳定性良好。

3.1.3 RS 精密度试验

取已制备好的样品溶液(河北秋季) 1 份, 在 540nm 下连续测定吸光度 6 次, 计算得 RSD 为

1. 5%, 结果表明仪器精密度良好。

3. 1. 4 RS 重复性试验

准确称取同一旱芹样品粉末(河北秋季) 5 份, 按 2. 3. 4 节 RS 溶液制备”项下内容制备样品溶液, 并分别在 540nm 下测定吸光度, 计算得 RSD 为 2. 3%。结果表明方法重复性良好。

3. 1. 5 RS 回收率试验

采用加标回收法, 称取已知含量的旱芹样品粉末(河北秋季) 9 份, 每份 0. 75g, 准确称定, 按低、中、高浓度分别准确加入 D-葡萄糖溶液, 每一浓度 3 份, 按 2. 3. 4 节 RS 溶液制备”项下内容操作, 分别在 540nm 下测定吸光度值。结果 RS 的平均回收率为 90. 7%, RSD 为 2. 0%, 符合方法学验证要求。

3. 1. 6 RS 含量测定

分别称取各产地的旱芹样品粉末 1. 5g, 准确称定, 每个产地 5 份, 其余步骤按 2. 3. 4 节 RS 溶液制备”项下内容操作。将测得吸光度值代入校准曲线方程计算, 以 5 次测得平均值作为 RS 的含量, 计算结果见表 1。

RS 的含量计算公式:

$$RS(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times 0.9}{W}$$

式中: C ——样品溶液中葡萄糖浓度(mg/mL); V ——水解液离心后的最终体积; 0.9——由葡萄糖换算为抗性淀粉的换算系数; W ——样品重量(g)。

3. 2 RO 含量测定

3. 2. 1 RO 精密度试验

取已制备好的样品溶液(河北秋季) 1 份, 连续称重 6 次, 记录各重量值, 计算得 RSD 为 0. 7%, 结果表明所使用天平的精密度良好。

3. 2. 2 RO 重复性试验

准确称取同一旱芹样品粉末(河北秋季) 5 份, 按 2. 3. 5 节 RO 溶液制备”项下内容制备样品溶液, 减压浓缩后转移至已恒重并称量好的瓷坩埚中, 置于烘箱干燥过夜。次日取出分别称重, 计算 RSD 为 2. 7%。结果表明方法重复性良好。

3. 2. 3 RO 回收率试验

采用加标回收法, 称取已知含量的旱芹样品粉末(河北秋季) 9 份, 每份 0. 75g, 准确称定, 按低、中、高浓度分别准确加入低聚果糖对照品溶液, 每一浓度 3 份, 按 2. 3. 5 节 RO 溶液制备”项下内容操作, 分别称重, 记录各重量值。结果 RO 的平均回收率为 87. 3%, RSD 为 2. 9%, 符合方法学验证要求。

3. 2. 4 RO 含量测定

分别取各产地的旱芹样品粉末 1. 5g, 准确称定, 每个产地称取 5 份, 按 2. 3. 5 节 RO 溶液制备”项下内容操作。滤液浓缩后转移至已恒重并称重的瓷坩埚中, 置于恒温烘箱中干燥过夜。次日

置于干燥器中冷却 1h 后准确称量, 减去坩埚质量即得 RO 质量。以 5 次测得平均值作为 RO 的含量, 计算结果见表 1。

表 1 旱芹样品中 RS 和 RO 的含量测定结果

(n= 5)

样品来源	RS 平均含量 (以干样计, mg/g)	RSD (%)	RO 平均含量 (以干样计, mg/g)	RSD (%)	RO 与 RS 总和 (以干样计, mg/g)
沈阳春季	9.11	2.3	3.548	2.1	12.66
沈阳夏季	10.67	2.1	4.557	1.6	15.23
沈阳秋季	9.62	1.4	2.596	2.8	12.22
河北秋季	4.967	2.7	3.156	1.9	8.123
新疆秋季	6.615	2.0	4.395	1.6	11.01
广州秋季	10.03	1.7	5.885	1.6	15.92
韩国秋季	13.04	2.2	5.066	1.5	18.11

3.3 讨论

3.3.1 RS 和 RO 提取条件的考察

本试验以 RS 和 RO 的最终含量为考察指标, 分别考察了提取溶剂的不同用量、不同浓度、不同提取时间以及酶解液浓度和反应时间对最终提取率的影响。经考察, (1) 最佳 RS 提取条件: 样品制得残渣中加入 2mol/L 氢氧化钠溶液 6.0mL, 置于沸水浴中加热 15min, 调节 pH 后加入 1.0mL 糖化酶溶液置于 60℃ 水浴反应 2h; (2) 最佳 RO 提取条件: 样品制得残渣中加入 75% 乙醇 50mL 超声 30min, 调节 pH 加入 α -葡萄糖苷酶溶液 1.0mL, 37℃ 酶解 1h, 加 pH 6.5 磷酸钾缓冲溶液后置于 45℃ 水浴加入葡萄糖氧化酶溶液 1.0mL 酶解 2h。

3.3.2 RS 含量测定分析

测定食物中 RS 含量应以食物摄入后实际到达大肠部位对人体发挥健康作用的部分为准。本试验在样品前处理时除去脂类物质、蛋白质、可溶性淀粉和单糖、低聚糖类物质, 残余物加入氢氧化钠溶液并加热使 RS 分散溶解, 再经糖化酶酶解将 RS 转化成葡萄糖, DNS 显色测定含量。该法模拟了人体胃肠道的生理条件, 具有更好的重现性, 费用低、操作简单, 无需测定纤维素, 避免了以往测定时使用硅藻土及在 105℃ 干燥过程, 更快捷, 所消耗的酶、溶剂和试剂更少。由实验结果可知: 所收集样品中, 韩国秋季旱芹中 RS 含量最高, 河北秋季旱芹中 RS 含量最低。

3.3.3 RO 含量测定分析

测定食物中 RO 含量多采用正相氨基键合相色谱柱与示差折光检测器(RID) 连用。该法不仅可以测得总 RO 含量, 而且还可测出组成 RO 的各单糖组分含量。但 RID 对温度、流动相组成变化敏感, 无法采用梯度洗脱, 分离效果较差; 在氨基柱分离糖时, 一些还原糖易与固定相的氨基发生化学反应产生席夫碱, 缩短使用寿命; 氨基柱对乙腈纯度要求很高, 价格昂贵; 另外氨基柱平衡时间很长, 常需 5 h 以上等等; 此外, RO 含量测定还可采用 ODS 柱进行分离, 但该法只能分离四糖以下的糖, 四糖以上糖常合并为一单峰。考虑到以上问题, 本试验用 α -葡萄糖苷酶将非抗性低聚糖酶解为葡萄糖, 用葡萄糖氧化酶除去游离的葡萄糖和由非抗性低聚糖酶解产生的葡萄糖, 经氢氧化钙与产生的这些葡萄糖生成不溶性化合物, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩烘干称重的方法测定了 RO 含量。此法操作简单便捷、费用低、重现性较好。

RO 往往含有多种组分, 是个混合物。而本研究重量法测定的是总 RO 含量, 不明确旱芹 RO 的

具体组分。在没有具体对照品的情况下,回收率试验时加入一种应用较多的低聚果糖(RO 的一种)进行试验。由实验结果可知:所收集样品中,广州秋季旱芹中 RO 含量最高,沈阳秋季旱芹中 RO 含量最低。

4 结论

本试验建立了同时测定旱芹 RS 和 RO 含量的方法。分别采用紫外分光光度法和酶-重量法测定了 RS 和 RO 含量。该试验的方法学验证内容均符合要求,为更加准确地测定旱芹 DF 及其各组分的含量提供了依据。由结果可知不同产地旱芹中 RS 含量差异较大,从 4.967—13.04mg/g(平均 9.15mg/g);不同产地旱芹中 RO 含量差异较小,从 2.596—5.885mg/g(平均 4.172mg/g)。二者含量之和从 8.123—18.11mg/g 不等,可见这部分含量对于旱芹 DF 含量测定同样至关重要,不可忽略。

参考文献

- [1] 南京中医药大学编著. 中药大辞典[M]. 第 2 版. 上海科学技术出版社, 2006. 1561—1563.
- [2] 刘克清, 徐中海, 付本燕. 芹菜防治心血管疾病的研究进展[J]. 中外健康文摘: 医药月刊, 2007, 4(12): 107—108.
- [3] 高金燕, 陈红兵. 芹菜中活性成分的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2005, (7): 29—31.
- [4] Roma E, Adamidis D, Nikoara R *et al.* Diet and Chronic Constipation in Children: The Role of Fiber[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1999, 28(2): 169—174.
- [5] Anderson J W. Dietary Fiber and Diabetes: What Else do We Need to Know[J]. *Journal of Diabet Research and Clinical Practice*, 1992, 17(2): 71—73.
- [6] 郑建仙. 功能性低聚糖析论[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 39—46.
- [7] Englyst H N. Classification and Measurement of Nutritionally Important Starch Fractions[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 46(2): S33—50.
- [8] 魏红, 徐宏伟, 钟红舰等. 膳食纤维的应用及检测方法[J]. 海峡预防医学杂志, 2004, 10(2): 25—27.
- [9] 李英, 陈伟, 衣秀娟. 松花粉中水不溶性膳食纤维的测定条件研究[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 263—264.

Simultaneous Determination of Resistant Starch and Resistant Oligosaccharides Contents in *Apium graveolens* L.

MA Xiu-Hong^a TAN Liang^b

a(Pharmacy Department, School of Chemistry and Life Sciences, Qinghai University For Nationalities, Xining 810007, P.R. China)

b(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, P.R. China)

Abstract A method for simultaneous determination of resistant starch (RS) and resistant oligosaccharides (RO) contents in *Apium graveolens* L. was established. UV spectrophotometry was developed to determine the RS contents and enzymatic-gravimetric method for the RO contents after lipids, protein and soluble starch were removed through simulation of the human GI physiological conditions. The method had good linear relationship within the range of 0.0160—0.1600mg/mL for RS ($r = 0.9993$, $n = 6$). The average recoveries and RSD ($n = 9$) were 90.7% and 2.0% for RS, 87.3% and 2.9% for RO, respectively. The linearity, the precision, the repeatability, the stability and the average recoveries were good. The method was found to be simple, accurate and reproducible to be used to provide the basis of the comprehensive determination of components in DF of *Apium graveolens* L. It could be more accurate of DF content marked.

Key words *Apium graveolens* L.; Resistant Starch; Resistant Oligosaccharides; Ultraviolet Spectrophotometry; Enzymatic-Gravimetric Method