

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241212006

引用格式: 谭思远, 阮兴阳, 王园莉, 等. 气相色谱-质谱/选择离子监测模式检测食用菌多糖中单糖组成方法的建立与质谱解析[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 196–205.

TAN SY, RUAN XY, WANG YL, *et al.* Establishment of gas chromatography-mass spectrometry/selected ion monitoring mode method for the detection of monosaccharide composition in edible fungus polysaccharides and mass spectrometry analysis [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 196–205. (in Chinese with English abstract).

气相色谱-质谱/选择离子监测模式检测食用菌多糖中单糖组成方法的建立与质谱解析

谭思远^{1,2,3*}, 阮兴阳¹, 王园莉¹, 惠和平^{1,2}, 陈月星^{1,2,3}, 范娜^{1,2,3}

(1. 商洛学院生物医药与食品工程学院, 商洛 726000; 2. 陕西秦岭特色生物资源产业技术研究院, 商洛 726000; 3. 商洛市粮食工程技术研究中心, 商洛 726000)

摘要: **目的** 建立一种适用于食用菌多糖中单糖组成准确定性定量分析的高灵敏检测方法。**方法** 选用了香菇、杏鲍菇、海鲜菇和木耳4种食用菌多糖, 经三氟乙酸水解、乙酸酐衍生化后, 采用气相色谱-质谱/选择离子监测模式(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS/SIM)进行分析。用7种单糖混合标准品考察方法的专属性、精密度、线性范围、检出限和定量限, 在不同的 m/z 下以线性关系最佳为标准选择出各单糖最适宜的定量离子, 并用食用菌多糖样品考察了SIM模式下方法的稳定性和加标回收率。**结果** 结果表明, 分别选用 m/z 115、 m/z 103、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 115和 m/z 103作为核糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖对应衍生物的特征定量离子, 各单糖之间分离度均大于1.2, SIM模式下各单糖在10.00~50.00 $\mu\text{g/mL}$ 之间线性关系良好, 相关系数(r^2)大于0.998, 各单糖的检出限和定量限分别为5.75~22.23 ng/mL 和17.26~66.67 ng/mL 。以单糖混合标准品、香菇多糖为样品基质, 得出本方法精密度、稳定性良好, 在不同的加标水平下, 各单糖的平均回收率在94.4%~101.3%之间, 并通过质谱解析讨论了五碳糖、六碳糖和鼠李糖的电子轰击离子源质谱的裂解规律, 佐证了选择以上特征离子的合理性, 表明对不同结构的单糖选择不同的定性定量离子, 可达到良好的分离度、提高分析方法的检出限。**结论** 本研究所建立方法具有良好的分离度、精密度和稳定性, 其灵敏度高于目前已报道的多数同类检测方法, 适用于各类食用菌多糖中单糖组成的检测。

关键词: 食用菌; 多糖; 单糖; 气相色谱-质谱连用/选择离子监测模式; 质谱解析

Establishment of gas chromatography-mass spectrometry/selected ion monitoring mode method for the detection of monosaccharide composition in edible fungus polysaccharides and mass spectrometry analysis

TAN Si-Yuan^{1,2,3*}, RUAN Xing-Yang¹, WANG Yuan-Li¹, HUI He-Ping^{1,2},
CHEN Yue-Xing^{1,2,3}, FAN Na^{1,2,3}

收稿日期: 2024-12-12

基金项目: 陕西省教育厅项目(20JK0617); 陕西秦岭特色生物资源产业技术研究院项目(23HKY035); 陕西省重点研发计划绿色通道一般项目(2023XCZX2-56)

第一作者/*通信作者: 谭思远(1993—), 男, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食用菌生物资源利用、食品分析与检验。E-mail: 469789413@qq.com

1. College of Biology Pharmacy and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo 726000, China;
2. Shaanxi Qinling Industrial Technology Research Institute of Special Biological Resources, Shangluo 726000, China
3. Shangluo Grain Engineering Technology Research Center, Shangluo 726000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a highly sensitive detection method suitable for accurate qualitative and quantitative analysis of monosaccharide composition in edible fungi polysaccharides. **Methods** Four kinds of edible fungus polysaccharides samples: *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Hypsizygus marmoreus* and *Auricularia auricula* were selected, after hydrolyzing with trifluoroacetic acid, and deriving with acetic anhydride, the sample was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/SIM). The specificity, precision, linear range, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of this method were investigated with mixed standards of 7 kinds of monosaccharides. At different m/z , the best linear relationship was used as the standard to select the most suitable quantitative ion for each monosaccharide. The stabilities and recoveries of the method under selected ion monitoring (SIM) mode were investigated using edible fungus polysaccharide samples. **Results** The results showed that m/z 115, m/z 103, m/z 115, m/z 115, m/z 115, m/z 115 and m/z 103 were selected as the characteristic quantitative ions of the corresponding derivatives of ribose, rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose, respectively. The separation of each monosaccharide was greater than 1.2, and the linear relationship between each monosaccharide in SIM mode was good between 10.00–50.00 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient (r^2) was greater than 0.998. The LOD and LOQ were 5.75–22.23 ng/mL and 17.26–66.67 ng/mL , respectively. Using monosaccharide mixed standard and lentinan as sample matrix, it was proved that this method had good precision and stability, and the average recovery of each monosaccharide was between 94.4% and 101.3% under different standard adding levels. And the rationality of selecting the above characteristic ions was discussed by mass spectrometry analysis. **Conclusion** This method has good separation, precision and stability, and its sensitivity is higher than most similar detection methods reported so far. It is suitable for the detection of monosaccharide composition in various edible fungi polysaccharides.

KEY WORDS: edible fungi; polysaccharides; monosaccharide; gas chromatography-mass spectrometry/selected ion monitoring mode; mass spectrometry analysis

0 引言

多糖是一类由醛糖或酮糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物^[1], 是维持生命活动正常进行的基本物质之一。多糖类物质广泛存在于动物、植物、微生物组织中, 近年来, 大量研究表明, 多糖具有调节免疫^[2-3]、抗肿瘤^[4-5]、抗氧化^[6-7]、抗炎^[8-9]、降血糖血脂^[10-11]等多种生理功能, 已被广泛应用到医药、食品等领域。各类多糖在经分离纯化后用于理化性质分析、结构表征、体内和体外活性研究, 但各类多糖在分离纯化的过程中存在多糖得率低、样品少的问题, 如何用较少的样品准确完成各项研究是科研工作者普遍关注的话题^[1,11]。

多糖的结构特征与单糖组成研究是分析多糖生理活性的重要环节, 测定多糖中单糖组成, 对多糖一级结构和构效活性的研究也有一定的基础意义^[12]。测定多糖中单糖组成时, 通常先将提取纯化后的多糖用酸催化、酶催化或氧化降解的方法破坏其中的糖苷键并水解为单糖。水解后由于单糖沸点高、挥发性和稳定性较低且大部分糖类紫外吸收很弱, 需进行衍生化处理, 然后再用色谱法检测^[13]。常用的高效液相色谱检测单糖的衍生化方法有 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮衍生化法、氨基苯甲酸、异氰酸苯酯等; 气

相色谱法常用的衍生化方法是硅烷化和乙酰化^[14]。硅烷化衍生化方法易生产副产物不利于单糖的定性定量分析; 乙酰化法能减少由于糖的异构化造成的多峰现象, 糖腈乙酸酯衍生化法、乙酸酐修饰法等乙酰化法被广泛使用。

气相色谱-质谱联用法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 将气相色谱与质谱仪串联, 既弥补了气相色谱只凭保留时间难以对未知组分在复杂的化合物中进行可靠的定性识别的缺点, 又利用了质谱较强的识别能力和高灵敏度的特点, 使 GC-MS 成为食品检验等部门面对复杂化合物时能够准确定性、定量检测的最有力工具之一。气相色谱-质谱联用仪四极杆质量分析器配备两种扫描模式采集数据: 全扫描模式 (scan patterns, SCAN) 和选择性离子监测模式 (selected ion monitoring, SIM)。SCAN 模式下质谱扫描给定范围内的所有离子, 而 SIM 模式质谱仅监测给定的一个或者多个质荷比的离子, 在相同时间内扫描每个离子的时间和次数都远高于 SCAN 模式, 因此 SIM 模式测定的灵敏度通常要高于 SCAN 模式 2~3 个数量级^[15-16]。

本研究采用糖腈乙酸酯衍生化法通过盐酸羟胺衍化、乙酸酐乙酰化两步反应对几种食用菌多糖水解后的单糖进行衍生化, 反应机制如图 1^[17]。通过 GC-MS/SIM 用单糖混合标准品考察方法的专属性、精密性、线性范围、检出限

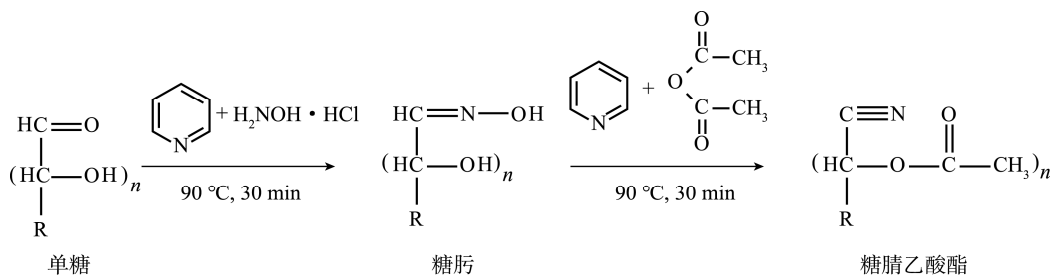


图 1 糖脒乙酸酯衍生反应机制

Fig.1 Derivatization reaction mechanism of aldono-nitrile acetate

和定量限,以线性关系最佳为标准选择出最佳的定量离子及辅助定性离子,并用SIM模式对目标物进行定性定量分析,通过几种食用菌多糖样品考察SIM模式下方法的稳定性和加标回收率,建立了一种基于GC-MS/SIM检测4种食用菌多糖中单糖的高灵敏度方法,为食用菌多糖结构的进一步深入研究提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜香菇购于陕西省商洛市商州区黑山东旭香菇专业合作社、杏鲍菇、海鲜菇购于商州区盛源食用菌种植农民专业合作社、黑木耳采购于商洛市柞水县跃进农业合作社。

吡啶、盐酸羟胺、三氟乙酸、乙酸酐、甲醇、三氯甲烷、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);*D*-葡萄糖标准品(*D*-glucose, Glu)、*D*-半乳糖标准品(*D*-galactose, Gal)、*D*-阿拉伯糖标准品(*D*-arabinose, Ara)、*D*-木糖标准品(*D*-xylose, Xyl)、*D*-鼠李糖标准品(*D*-rhamnose, Rha)、*D*-甘露糖标准品(*D*-mannose, Man)、*D*-核糖标准品(*D*-ribose, Rib)(纯度≥98%,上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪、Rxi-5sil MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)[岛津企业管理(中国)有限公司];DHG-9240A 鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);KH5200E 超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司);TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂);RE-52 旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司);NAI-L2-50C 型真空冷冻干燥机(上海那艾实验仪器有限公司);SI-234 电子天平[精度 0.1 mg, 丹佛仪器(北京)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 单糖标准品的衍生化与标准溶液的配制

精密称取 7 种单糖标准品(Rib、Rha、Ara、Xyl、Man、Glu 和 Gal)各 10.0 mg 置于水解管中,分别加入 100.0 mg 盐酸羟胺和 5 mL 吡啶溶液,于 90 °C 中水浴 30 min,取出冷却后,加入 5 mL 乙酸酐,90 °C 继续反应 30 min,得到单糖混合标准品衍生液,将衍生液用氯仿补充至 10 mL 后经

0.22 μm 滤头过滤后备用。

将 1000 μg/mL 的单糖混合标准品储备液用氯仿逐级稀释,得到质量浓度为 5、20、30、40、50 μg/mL 的混合标准液,经 0.22 μm 滤头过滤后备用。以上准备好的标准样品用 GC-MS/SIM 进行测定^[18]。

1.3.2 4 种食用菌多糖的提取与纯化

将 4 种食用菌(香菇、杏鲍菇、海鲜菇、木耳)除去菇柄后,置于鼓风干燥箱中于 60 °C 烘干,粉碎后过 60 目筛备用;称取干燥后的 4 种食用菌粉末各 20 g 分别置于 500 mL 烧杯中,按 1:30 的料液比加入蒸馏水,于 60 °C 超声提取 30 min,提取液经 4000 r/min 离心 5 min 后弃去沉淀,上清经旋转蒸发仪浓缩,冷却后加入 4 倍体积的无水乙醇于 4 °C 冰箱中过夜醇沉;将沉淀物于 3500 r/min 离心 5 min 后弃去上清,将沉淀冷冻干燥后得到 4 种食用菌多糖粗品^[19]。

采用核酸沉淀溶液法脱蛋白纯化多糖,将粗多糖用蒸馏水复溶,4000 r/min 离心 20 min 取上清液,加入样品体积 1/10 的 40%三氯乙酸溶液,混匀后静置 30 min,4000 r/min 离心 10 min,取上清,重复 3 次。上清经浓缩后,加入四倍体积无水乙醇 4 °C 过夜醇沉,弃上清后将沉淀真空冷冻干燥得纯化后的多糖备用^[20]。

1.3.3 食用菌粗多糖的水解

称取 100.0 mg 粗多糖置于 4 支 50 mL 水解管中,加入 4 mL 4 mol/L 三氟乙酸,密封,于 100 °C 沸水浴中水解 5 h 并蒸干水解液,再反复用甲醇溶液萃取,以除去残留的三氟乙酸,得到 4 种食用菌多糖的水解物,置于 4 °C 冰箱中备用^[21]。

1.4 水解后单糖的衍生化

将多糖水解产物转移至 4 支水解管中,分别加入 100.0 mg 盐酸羟胺和 5 mL 吡啶溶液,于 90 °C 中水浴 30 min,取出冷却后,加入 5 mL 乙酸酐,90 °C 继续反应 30 min,得到单糖衍生物,将衍生液用氯仿补充至 10 mL 后经 0.22 μm 滤头过滤,用 GC-MS/SIM 进行测定^[20]。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件

采用外标法定量分析多糖样品中的单糖组分。色谱条件:载气为高纯氦气。程序升温:起始温度 120 °C,保持 2 min;以

10 °C/min 升至 180 °C, 保持 5 min; 再以 3 °C/min 升至 200 °C, 保持 10 min; 再以 10 °C/min 升至 240 °C, 保持 10 min; 进样口温度 250 °C, 柱流量 1.48 mL/min, 分流比 30:1。

1.5.2 质谱条件

离子源: 电子轰击离子源(electron impact ionization, EI), 电子轰击能量 70 eV; 接口温度 250 °C, 离子源温度 280 °C; 溶剂延迟时间 2.5 min; 扫描范围: m/z 50~400。分析 7 种单糖混合标准品时用 SCAN 模式采集数据, 选定每个单糖的特征离子后, 数据采集方式为 SIM 模式。

1.6 数据处理

实验数据进行 3 次重复实验, 最终结果表示为 3 次平行实验的平均值, 采用 Origin 2021 软件和 KingDraw 软件作图并处理数据。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

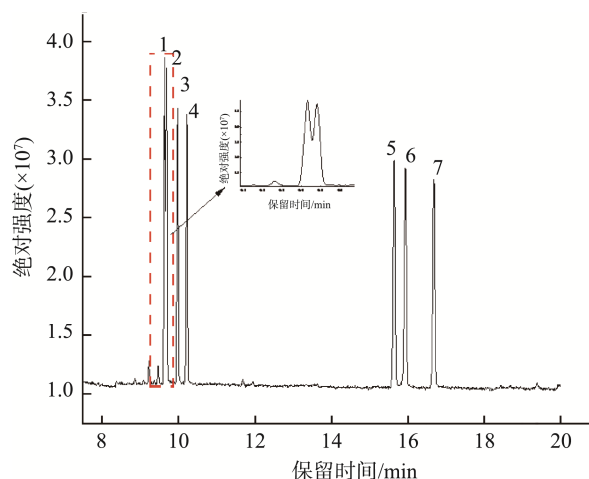
2.1.1 专属性实验

在本研究选定的色谱条件下对 7 种单糖混合标准品进行测定, 对比空白样品与 7 种单糖混合样品的总离子流图, 各待测组分在色谱柱中的分离情况, 用分离度(R)表示, 当 $R=1$ 时, 表示相邻两个色谱峰能基本分离, $R \geq 1.5$ 时, 表示相邻两个色谱峰能完全分离^[22]。 R 计算公式见(1):

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (1)$$

式中: t_{R1} 为相邻两个色谱峰中前一峰的保留时间, min; t_{R2} 为相邻两个色谱峰中后一峰的保留时间, min; W_1 、 W_2 为两个色谱峰的峰宽。

称取 7 种单糖标准品(Rib、Rha、Ara、Xyl、Man、Glu 和 Gal)各 10.0 mg 置于水解管中, 按照 1.3.3 的方法衍生化, 得到 7 种单糖混合标准品。在选定的 GC-MS/SCAN 条件下进行测定, 得到了 7 种单糖混合标准品的总离子流图, 如图 2 所示, 计算每个单糖色谱峰之间的分离度, 并将采集到的各单糖衍生物的 EI 质谱图(图 3)引入美国国家



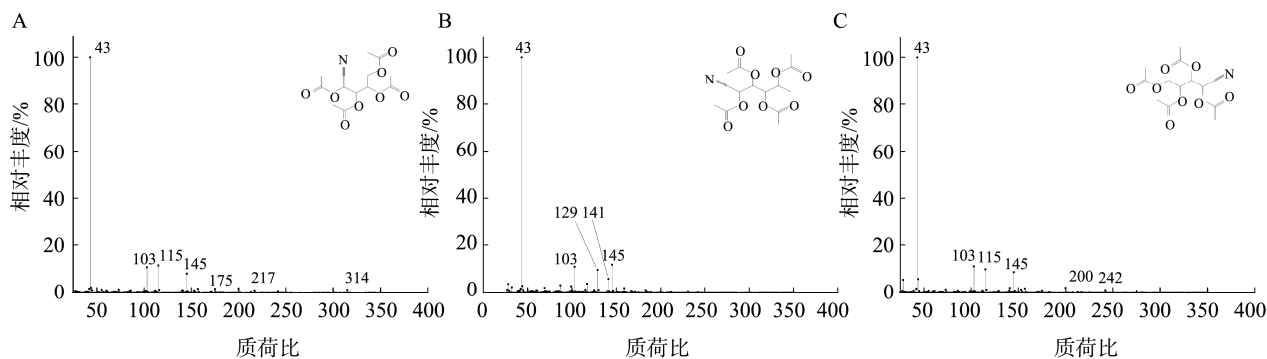
注: 1. 2,3,4,5-四乙酰化-D-氨基核糖; 2. 2,3,4,5-四乙酰化-D-氨基鼠李糖; 3. 2,3,4,5-四乙酰化-D-氨基阿拉伯糖; 4. 2,3,4,5-四乙酰化-D-氨基木糖; 5. D-2,3,4,5,6-五乙酰化-D-氨基甘露糖; 6. D-2,3,4,5,6-五乙酰化-D-氨基葡萄糖; 7. D-2,3,4,5,6-五乙酰化-D-氨基半乳糖。

图 2 7 种单糖混合标准品总离子流图

Fig.2 Total ion chromatograms of the 7 kinds of monosaccharide mixed standards

标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)质谱数据库中检索。

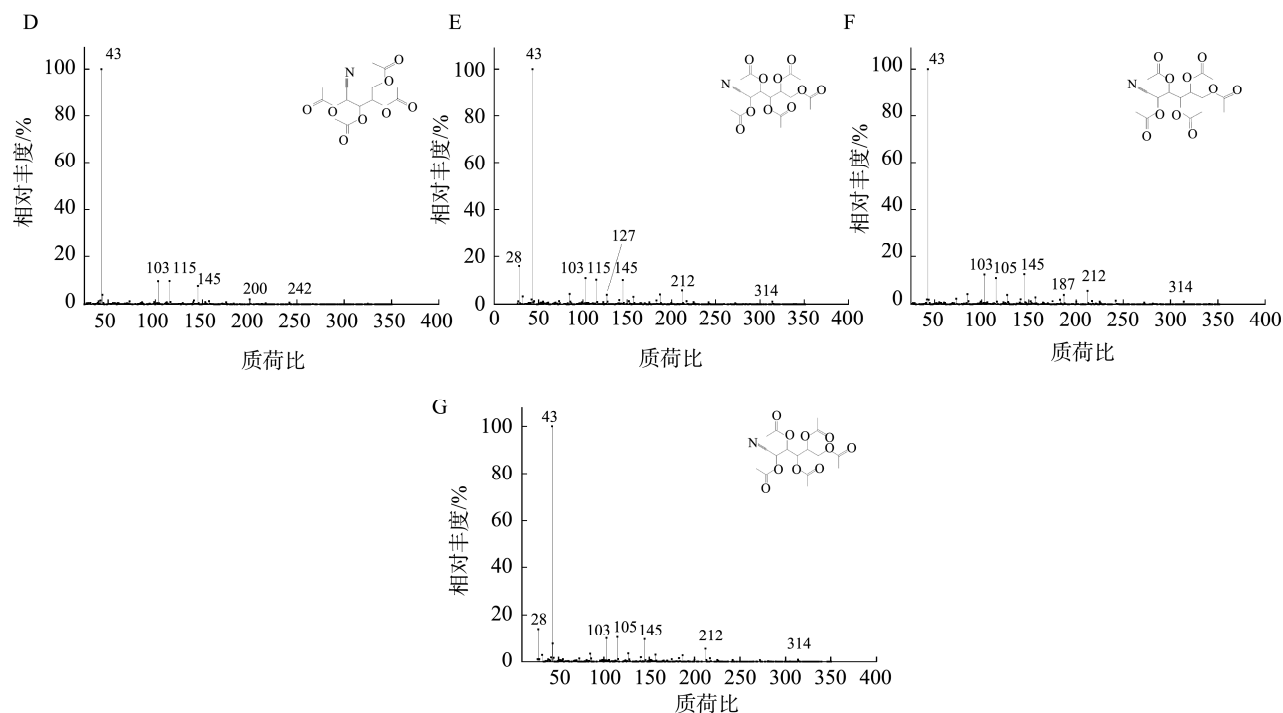
Rib、Ara 和 Xyl 3 个五碳糖和末端为甲基的 Rha(六碳糖)的衍生物中存在 4 个乙酰基, 其保留时间在 9.0~10.5 min 之间, Man、Glu 和 Gal 3 个六碳糖的衍生物中有 5 个乙酰基, 其保留时间在 15~17 min 之间。SEYMOUR 等^[23]的研究表明, 单糖的乙酰化糖腈衍生物通过中等极性乙酰基与色谱柱固定相的相互作用而保留, 乙酰基数量越多, 相互作用越强, 保留时间越长, 此结论与本研究实验结果一致。由图 2 的总离子流图可以看出, 在当前选定的条件下以上 7 种单糖对应的衍生物峰形良好, 各单糖衍生物的质谱图(图 3)中未采集到高丰度的分子离子峰, 将质谱图引入到 NIST 谱库中检索, 与标准质谱图的相似度均在 98%以上, 质谱检索结果、各单糖衍生物的保留时间及分离度见表 1。



注: 化合物 A~G 与图 1 中 1~7 相同。

图 3 7 种单糖衍生物的 EI 质谱图

Fig.3 Mass spectra of 7 kinds of monosaccharide derivatives at EI mode



注: 化合物 A~G 与图 1 中 1~7 相同。

图 3(续) 7 种单糖衍生物的 EI 质谱图

Fig.3 Mass spectra of 7 kinds of monosaccharide derivatives at EI mode

表 1 7 种单糖混合标准品衍生物的质谱检索结果、保留时间和分离度

Table 1 Mass spectrometry search results, retention time and resolution of the 7 kinds of monosaccharide mixed derivatives

编号	化合物	质谱检索结果	保留时间/min	分离度 <i>R</i>
1	Rib	<i>D</i> -ribonitrile,2,3,4,5-tetraacetate	9.630±0.01	0.450
2	Rha	<i>D</i> -rhamnonitrile,2,3,4,5-tetraacetate	9.675±0.02	2.190
3	Ara	<i>D</i> -arabinonitrile,2,3,4,5-tetraacetate	9.970±0.02	1.510
4	Xyl	<i>D</i> -xylonitrile,2,3,4,5-tetraacetate	10.215±0.01	27.150
5	Man	<i>D</i> -mannonitrile,2,3,4,5,6-pentaacetate	15.645±0.01	1.200
6	Glu	<i>D</i> -gluconitrile,2,3,4,5,6-pentaacetate	15.930±0.02	3.020
7	Gal	<i>D</i> -galactonitrile,2,3,4,5,6-pentaacetate	16.685±0.01	-

注: -为未采集到相关数据,表 2 同。

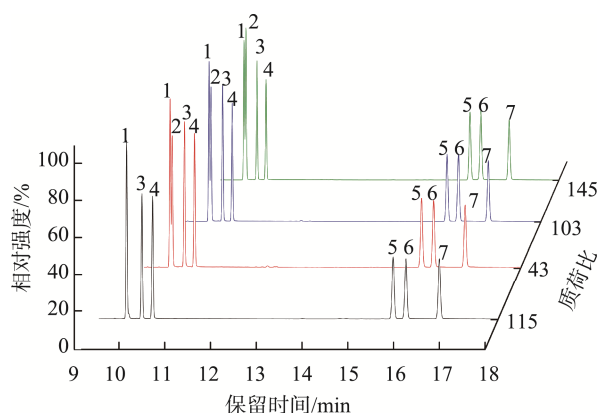
由表 1 和图 2 可知, Rib 与 Rha 的分离度为 0.450, 由于 Rib 与 Rha 的保留时间接近, 两个峰之间出现重合, 所以在 SCAN 模式下 Rib 不能很好的与 Rha 分离; Man 与 Glu 的分离度为 1.200, 说明 Man 与 Glu 能基本分离, 其余组分分离度均大于 1.5, 证明此条件下可以检测此 7 种单糖混合标准品, 为了将 Rib 和 Rha 更好的分离并更精确的定量计算各糖含量, 需要进一步用 SIM 模式采集数据。

2.1.2 特征离子的选择、线性范围

SIM 模式采集数据需要选定各待测组分的特征离子, 通常选择各组分质谱图中丰度高、干扰小的离子作为特征离子。本研究根据图 3 各单糖衍生物的质谱图, 选择了 m/z 43、 m/z 103、 m/z 115、 m/z 145 4 个离子作为各单糖的待选

定的特征离子, 并在此条件下对 7 种单糖混合标准品进行 GC-MS/SIM 检测, 得到在各离子下的质量色谱图(mass chromatography, MC), 如图 4 所示。

2.1.1 中已表明 SCAN 模式下 Rib 与 Rha 不能完全分离, 由图 4 可知, 在 SIM 模式下, 除 Rha 外其他 6 个单糖均能在 m/z 115 采集到质量色谱图, 在此条件下, Rib 与 Ara 的分离度经计算为 2.3, 说明在 SIM 模式下, Rib 与 Ara 达到基线分离。若选择各单糖衍生物质谱图中基峰 m/z 43 作为定量离子, 由图 4 可知, Rib 与 Rha 仍不能完全分离, 因此可在 SIM 模式下结合各单糖的结构特点及质谱图选择各单糖线性关系良好, 分离度更高的定性定量离子对其进行分析。



注: 化合物 1~7 与图 1 中 1~7 相同。

图 4 SIM 模式各离子的质量色谱图

Fig.4 Mass chromatography of each ions at SIM mode

为了选择每个单糖的最适定量离子, 通过考察各单糖在待选定特征离子下的线性范围, 选择其中线性范围最佳的离子为定量离子, 其余的作为辅助定性离子。将逐级稀释的 7 种单糖梯度浓度混合标准品在 GC-MS/SIM 模式下分析, 各个组分在选定离子下对其峰面积(X)与浓度(Y)之间进行线性拟合, 并计算相关系数(r^2), 结果如表 2 所示。结果表明: Rib、Rha、Ara、Xyl、Man、Glu 和 Gal 的衍生物分别在 m/z 115、 m/z 103、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 103 下得到的线性关系更好, 且在 10.00~50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度范围内各组分的 r^2 均在 0.9986 以上, 因此选定这些离子为各单糖的定量离子, 其余离子作为辅助定性离子, 各单糖之间的分离度均大于 1.2, 在此 SIM 条件下采集各单糖的质量色谱图进行定量分析还可解决 Rib 和 Rha 不能完全分离影响其准确定量的问题。

表 2 7 种单糖在不同 m/z 下的线性关系、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 2 Linear relationships, linear ranges, LOD and LOQ of 7 kinds of monosaccharides mixed derivatives at different m/z

化合物	质荷比	线性方程	r^2	线性范围/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	LOD/(ng/mL)	LOQ/(ng/mL)
Rib	115	$Y=187620.2X-689069.1$	0.9989	10.00~50.00	22.23	66.67
	43	$Y=1029672X+1310161$	0.9902			
	145	$Y=142331.0X-555445.4$	0.9932			
	103	$Y=179145.5X-718347.2$	0.9939			
Rha	103	$Y=146351.6X-558478.7$	0.9986	10.00~50.00	6.67	20.00
	145	$Y=154199.9X-565288.5$	0.9940			
	43	$Y=1116449X-3212196$	0.9882			
Ara	115	-	-	10.00~50.00	6.13	18.39
	115	$Y=140285.1X-509095.2$	0.9991			
	103	$Y=162676.8X-644338.3$	0.9938			
	43	$Y=1029672X+1310161$	0.9902			
Xyl	145	$Y=127224.5X-470380.2$	0.9935	10.00~50.00	5.75	17.26
	115	$Y=146695.0X-567417.3$	0.9988			
	103	$Y=150688.8X-620990.4$	0.9943			
	43	$Y=501399.9X+8077441$	0.9186			
Man	145	$Y=117089.0X-469574.3$	0.9936	10.00~50.00	6.67	20.01
	115	$Y=127612.3X-539161.0$	0.9992			
	103	$Y=141578.4X-626835.9$	0.9937			
	43	$Y=857753.9X+1487770$	0.9692			
Glu	115	$Y=123525.0X-524411.9$	0.9988	10.00~50.00	20.48	61.43
	103	$Y=147143.3X-659757.2$	0.9936			
	145	$Y=140658.5X-613838.9$	0.9930			
	43	$Y=865977.8X+936414.6$	0.9746			
Gal	103	$Y=133927.9X-616647.6$	0.9987	10.00~50.00	9.32	27.96
	43	$Y=869562.1X+259366.3$	0.9761			
	115	$Y=128878.5X-594181.5$	0.9931			
	145	$Y=121891.4X-544504.0$	0.9929			

注: Y 为峰面积; X 为质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); 检出限(limit of detection, LOD); 定量限(limit of quantitation, LOQ)。

2.1.3 灵敏度实验

用 7 种单糖的混合标准品配制一系列含有微量 7 种单糖的溶液, 并且分别在以上选定的 GC-MS/SIM 条件下测定, 计算各单糖色谱峰的信噪比, 以能产生 3 倍信噪比的样品浓度为 LOD, 能产生 10 倍信噪比的样品浓度为 LOQ, 经计算在 SIM 模式下各组分的 LOD 和 LOQ 见表 2。由表 2 可知, 7 种单糖的 LOD 在 5.75~22.23 ng/mL 之间, LOQ 在 17.26~66.67 ng/mL 之间。对比图 2 和图 4 及灵敏度实验结果, 可知 SIM 模式下有更平稳的基线及更高的灵敏度, 适用于微量多糖样品中单糖组成及含量的分析测定^[24-25]。本研究建立的方法相较司雄元等^[26]、XIA 等^[27]所报道的检测单糖组成的方法检出限和定量限高 200 倍以上。

2.1.4 精密度实验

以质量浓度为 16.67 $\mu\text{g/mL}$ 的多糖混合标准品为样品, 在本研究所选 GC-MS/SIM 条件下进行测定, 连续进样 6 次, 测定各单糖衍生物的保留时间及峰面积, 并计算其相应的相对标准偏差(relative standard deviations, RSD)。结果表明, Rib、Rha、Ara、Xyl、Man、Glu 和 Gal 衍生物峰面积的 RSDs 分别为 4.26%, 5.92%, 3.72%, 3.77%, 3.56%, 3.52% 和 6.16%, 均小于 7%, 保留时间的 RSDs 均小于 0.1%, 说明该测定方法的精密度良好。

2.1.5 稳定性实验

以香菇多糖为考察对象, 将香菇多糖样品分别在水解、衍生化处理后, 放置 0、6、12、24、48 h 后分别进样, 按 1.2.4 的条件进行 GC-MS/SIM 分析, 测定不同放置时间后各单糖衍生物的保留时间及峰面积, 并计算其相应的 RSDs 值。结果表明, 香菇多糖中各单糖衍生物的峰面积 RSDs 均小于 8%, 保留时间的 RSD 均小于 1%, 说明香菇多糖中单糖乙酰化后的样品在 48 h 之内基本稳定。

2.1.6 加标回收率实验

以香菇多糖为考察对象, 称取香菇多糖 4 份, 按 1.3.3 方法水解后按以下方法加入标准单糖样品: Rib、Rha 和 Xyl 加入质量浓度分别为 1.0、3.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$; Ara、Man 和 Gal 加入质量浓度分别为 5.0、10.0、15.0 $\mu\text{g/mL}$; Glu 加入质量浓度分别为 100.0、200.0、300.0 $\mu\text{g/mL}$, 按 1.4、1.5 的方法进行衍生化和 GC-MS 分析, 经数据处理计算样品的加标回收率, 结果如表 3。由表 3 可知香菇中各单糖的平均回收率均在 94.4%~101.3% 之间, 回收率 RSDs 均小于等于 2.6%, 说明此方法具有较高的回收率, 能满足分析实验的要求。

表 3 香菇多糖样品中各单糖的加标回收率和 RSDs
Table 3 Recoveries and RSDs of each monosaccharides in lentinan samples

化合物	加标量/ $\mu\text{g/mL}$	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
Rib	1.0	95.7	95.7	2.0
	3.0	97.6		
	5.0	93.8		
Rha	1.0	96.3	94.4	2.0
	3.0	94.3		
	5.0	92.6		

表 3(续)

化合物	加标量/ $\mu\text{g/mL}$	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
Ara	5.0	96.7	96.5	2.2
	10.0	98.6		
	15.0	94.3		
Xyl	1.0	98.2	99.1	2.1
	3.0	101.5		
	5.0	97.6		
Man	5.0	98.9	99.2	1.9
	10.0	101.3		
	15.0	97.6		
Glu	100.0	101.4	101.3	2.6
	200.0	103.9		
	300.0	98.6		
Gal	5.0	97.6	96.0	1.1
	10.0	95.3		
	15.0	96.8		

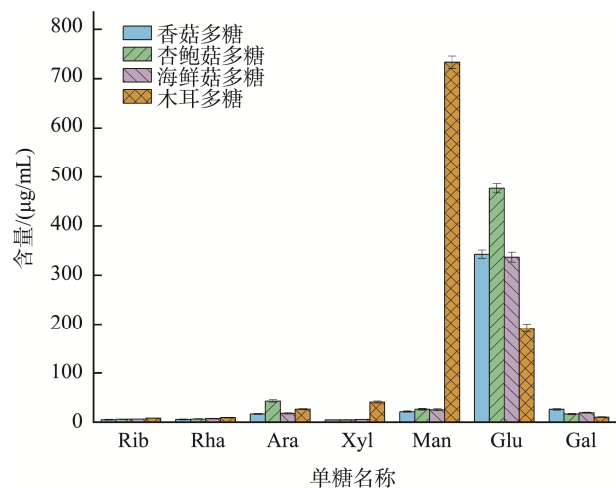


图 5 4 种食用菌多糖样品中单糖含量

Fig.5 Content of monosaccharide in 4 kinds of edible fungi polysaccharide samples

2.2 4 种食用菌样品检测

在选定的 GC-MS/SIM 条件下, 分别测定香菇多糖、杏鲍菇多糖、海鲜菇多糖、木耳多糖中单糖的组分及含量。其中 4 种食用菌多糖的单糖组成及含量如图 5 所示。结果表明, 通过单糖衍生物标准品的保留时间来定性, 本研究所选特征离子定量, 得出 4 种食用菌多糖中的单糖组成及含量, 其中 Rib、Rha、Ara、Xyl、Man、Glu 和 Gal 均被检出, 但不同食用菌多糖所含的单糖含量不相同。香菇多糖中各单糖含量分别为 5.06、5.51、16.65、4.34、21.37、342.58、25.92 $\mu\text{g/mL}$, 摩尔比为 1:0.99:3.29:0.86:3.52:56.43:4.27, 其中 Glu 所占比例较高; 杏鲍菇多糖中各单糖含量分别为 5.74、6.38、42.96、4.59、26.28、476.26、16.30 $\mu\text{g/mL}$, 摩尔比为 1:1.02:7.49:0.80:3.82:69.16:2.37, 其中 Glu 所占比例较高; 海鲜菇多糖中单糖含量分别为 6.29、7.10、17.87、5.35、25.35、336.72、19.11 $\mu\text{g/mL}$, 摩尔比为 1:1.03:2.84:0.85:3.36:

44.61:2.53, 其中 Glu 所占比例较高; 木耳多糖中单糖含量分别为 8.48、9.11、26.52、40.77、733.32、192.62、10.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 摩尔比为 1:0.98:3.13:4.81:72.07:18.93:1.01, 其中 Man 所占比例较高, 4 种食用菌多糖均为杂多糖, 此部分的研究结果与刘楠楠等^[11]、汪文琦等^[28]和赵圆圆^[29]的研究结果相近。

2.3 单糖糖脒乙酸酯质谱裂解规律解析

为了进一步解释 Rha 未采集到 m/z 115 的原因, 对各衍生化单糖的质谱裂解规律进行了解析。乙酰化后的各单糖不考虑其构型, 根据同分异构情况可分为 3 组。第 1 组为五碳糖: 主要为 Rib、Ara 和 Xyl, 其衍生化产物分子式均为

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_8$ ($\text{Mr}=315$); 第 2 组为六碳糖: 主要为 Man、Glu 和 Gal, 其衍生化产物分子式均为 $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_{10}$ ($\text{Mr}=387$); 第 3 组为 Rha, 其衍生化产物分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ ($\text{Mr}=329$)。

第 1 组的 3 个单糖衍生物其质谱图中主要的碎片 m/z 有: 242、200、145、115、103、43; 第 2 组的 3 个单糖衍生物其质谱图中主要的碎片 m/z 有: 314、242、200、145、115、103、73、43; 第 3 组鼠李糖衍生物质谱图中主要的碎片 m/z 有: 314、231、145、105、103、43 等。

本研究对其裂解规律尝试进行解析。图 6(A)表示从不同的 C-C 键之间发生均裂可得到相应 m/z 的离子, 部分

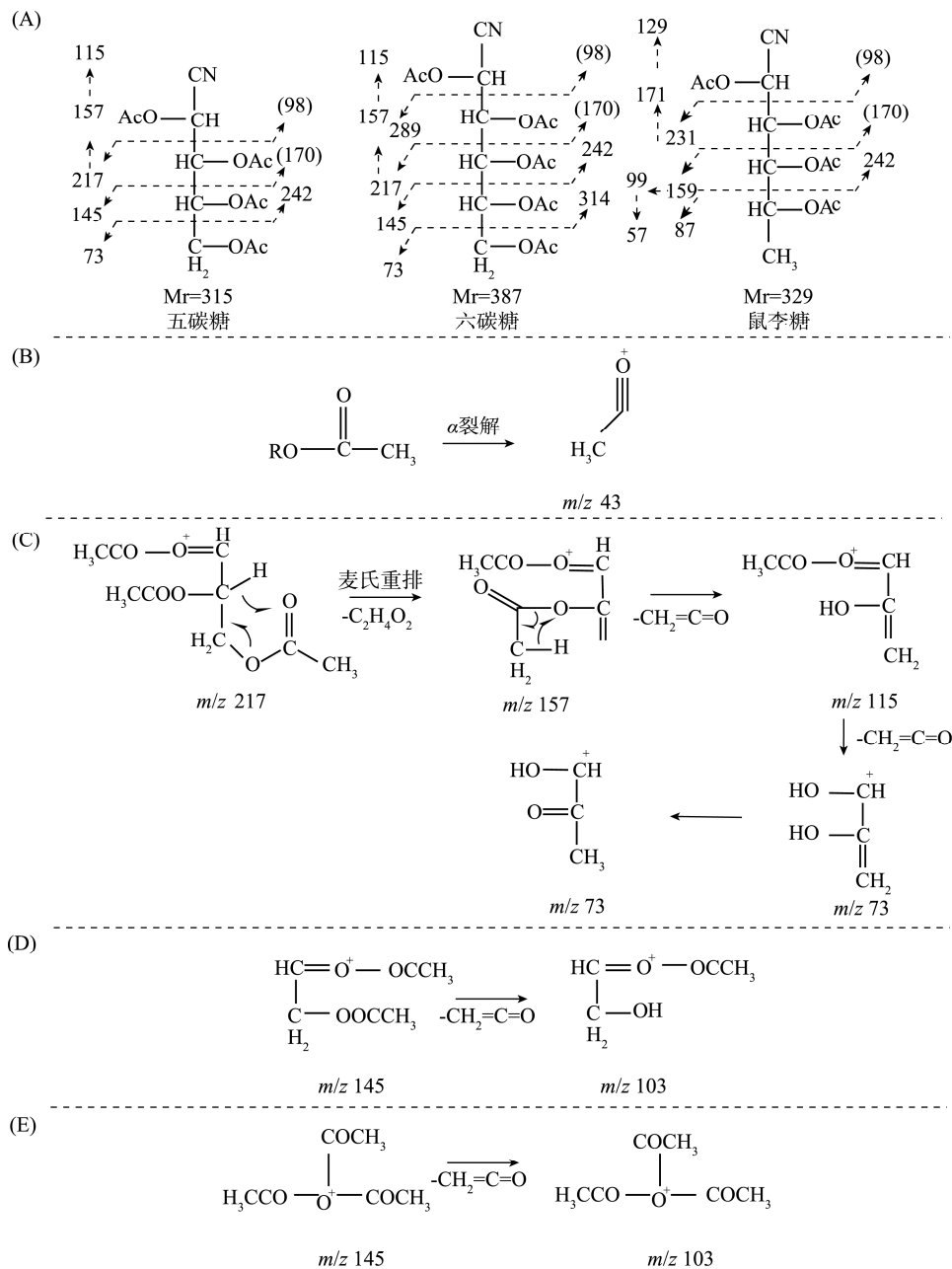


图 6 单糖糖脒乙酸酯 EI-MS 可能的碎裂途径

Fig.6 Proposed fragmentation pathways of aldononitrile acetates derivatization at EI-MS mode

离子由于其稳定性较差,丰度很小或者未采集到其 EI 质谱(其 m/z 用括号表示);如图 6(B)所示,所有单糖中的羟基经衍生化后均生成了 4 或 5 个乙酰基,其中 m/z 43 为单糖中羟基乙酰化后经 α 裂解所得,此离子在所有单糖的衍生物中均可生成,且为基峰,其裂解机制和所有羧酸酯类产生 m/z 43 的离子机制一致^[30];如图 6(C),六碳糖和五碳糖的衍生物分别在 C3-C4、C2-C3 间断裂可生成 m/z 217 的离子,其 3 个乙酰基若存在 γ -H 均可发生麦氏重排,进一步产生 m/z 157, m/z 157 经重排消去中性烯酮分子形成 m/z 115。Rha 的衍生物由于 C6 上所连接为甲基,其碎片 m/z 231 和 159 也可以发生以上裂解过程,但其生成碎片分别为 m/z 171、129 和 m/z 99、57,不能形成 m/z 115^[31];如图 6(D),六碳糖在 C4-C5 之间断裂,五碳糖在 C3-C4 之间断裂,可直接生成 m/z 145, m/z 145 消去中性烯酮分子形成 m/z 103。但 Rha 不能直接生成 m/z 145 的碎片,其质谱图中又观察到 m/z 145, PRICE^[31]和 BIEMANN 等^[32]经研究此类单糖的氘代糖腈乙酸酯衍生物,推测此类化合物可生成图 6(E)中 m/z 145 碎片,并进一步生成 m/z 103。

通过以上分析论证了通过不同目标化合物的结构选择其特征定量离子,在 SIM 模式下检测样品不仅样品需要量少,还可以从色谱上达到更好的分离度,对检测方法本身还能提高其检测的灵敏度,在各类多糖的分离纯化的过程中,常面临纯化后多糖纯度低、量少等问题,将此方法应用于各类多糖中单糖组成及含量的检测具有更大的优势。

3 结论与讨论

多糖中单糖组成的定性定量分析是各类植物、食用菌等多糖结构表征中必要的一环,但各类多糖在分离纯化的过程中面临多糖得率低、样品少等问题,本研究建立了一种用 GC-MS/SIM 检测 4 种食用菌多糖中单糖的高灵敏度方法。各样品经多糖提取、三氟乙酸水解、乙酸酐衍生化,经气相色谱-质谱/选择离子监测模式进行定性定量分析。各单糖的特征离子根据质谱图选择了丰度高、干扰小的若干个离子,经分析不同特征离子下各单糖在一定浓度范围内的线性关系,根据相关系数选择最适的特征定量离子,定性采用质谱比对、特征离子保留时间比对进行,并通过对各单糖的质谱裂解规律进行解析进一步佐证了所选离子的合理性。研究表明,采用 GC-MS/SIM 对 Rib、Rha、Ara、Xyl、Man、Glu 和 Gal 7 种单糖进行测定,分别选择 m/z 115、 m/z 103、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 115、 m/z 103 作为 7 种单糖对应衍生物的定性离子,7 种单糖在此离子下的线性范围均为 10.00~50.00 $\mu\text{g/mL}$, LOD 在 5.75~22.23 ng/mL 之间, LOQ 在 17.26~66.67 ng/mL 之间;在 SCAN 模式下用单糖混合标准品考察了方法的专属性,结果表明除 Rib 和 Rha 外,其余组分分离度均大于 1.2;在 SIM 模式下,选用 m/z 115 作为特征离子时, Rib 与 Ara 的

分离度为 2.3,说明可以很好的分离。在 SIM 模式下用 16.67 $\mu\text{g/mL}$ 的单糖混合标准品考察了方法的精密度,结果表明各单糖衍生物峰面积的 RSD 均小于 7%,保留时间的 RSD 均小于 0.1%,说明该测定方法的精密度良好。在 SIM 模式下用香菇多糖样品考察了方法的稳定性和加标回收率,结果表明 48 h 内香菇多糖样品衍生物峰面积的 RSD 均小于 8%,加标回收率在 94.4%~101.3%之间,表明此方法能满足检测食用菌多糖中单糖的要求。通过对 4 种食用菌多糖中单糖组成的测定,表明本研究所建立方法能用于测定样品中的单糖组成。通过对各单糖衍生物的 EI 质谱裂解规律解析,对丰度比较高的 m/z 217、157、115、73、145、103、43 等离子的可能产生机制进行了分析,进一步验证了对不同结构的单糖选取不同的特征离子采用 SIM 模式检测,不仅便于不同单糖的定性分析,还能进一步提高方法的灵敏度和分离度,此方法能为各类多糖中单糖的定性定量分析提供理论参考。

在对本研究的 7 种单糖进行 GC-MS 分析时,若选用丰度最高的 m/z 43 作为各单糖的定量离子,各单糖不能达到基线分离,影响定量分析的准确性,但若结合各单糖的结构特征及质谱裂解规律选择适宜的定量离子采用 SIM 模式采集数据,不仅能让各组分更好的分离,还可以进一步提高方法的灵敏度,减少样品的使用量。本研究建立方法经验证具有良好的分离度、准确度、精密度和稳定性,其灵敏度较已报到的同类型检测方法高 200 倍以上,本方法能在减少样品用量的基础上准确完成 4 中食用菌多糖中 7 种单糖的定性定量分析。因此,在不同类样品的气相色谱质谱联用分析过程中,可结合其结构特征及质谱图选择适宜的特征离子,于选择离子监测模式下检测,此方法在减少样品使用量、提高分析方法分离度、提高 LODs 方面有一定的应用潜力。但本研究未考虑纯化后多糖样品的纯度、未对样品需要量、水解条件、衍生化试剂用量及时间等条件进行优化,各研究者可参考本研究中的检测条件及方法对样品前处理阶段各条件进一步优化。

参考文献

- [1] 周永飞. 金钱草多糖的纯化、表征及改善小鼠高脂血症机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
ZHOU YF. Study on the purification and characterization of polysaccharide from *Lysimachia christinae* and mechanism of relieving hyperlipidemia in mice [D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [2] BARBOSA JR, DE-CARVALHO JRN. Polysaccharides obtained from natural edible sources and their role in modulating the immune system: Biologically active potential that can be exploited against COVID-19 [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 108: 223-235.
- [3] REN L, ZHANG J, ZHANG T. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells [J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127933.
- [4] 徐文琴, 吴艳红, 余方流, 等. 香菇多糖抑制乳腺癌 4T1 细胞小鼠移植瘤增殖机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(2): 111-116.
XU WQ, WU YH, YU FL, et al. Inhibition mechanism of lentinan on the

- proliferation of breast cancer 4T1 cells xenograft model in mice [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2021, 28(2): 111–116.
- [5] YAO W, QIU HM, CHEONG KL, *et al.* Advances in anti-cancer effects and underlying mechanisms of marine algae polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 221: 472–485.
- [6] ZHONG Q, WEI B, WANG S, *et al.* The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview [J]. Marine Drugs, 2019, 17(12): 674.
- [7] FERNANDES PAR, COIMBRA MA. The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 314: 120965.
- [8] 罗励耕, 王丹, 孟宪群, 等. 虎杖多糖中蛋白去除工艺及多糖的抗炎作用研究[J]. 中南药学, 2024, 22(8): 1999–2005.
- LUO LG, WANG D, MENG XQ, *et al.* Protein removal process and anti-inflammation effect of polysaccharides from *Polygonum cuspidatum* [J]. Central South Pharmacy, 2024, 22(8): 1999–2005.
- [9] NIU W, CHEN X, XU R, *et al.* Polysaccharides from natural resources exhibit great potential in the treatment of ulcerative colitis: A review [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 254: 117189.
- [10] XIANG H, SUN-WATERHOUSE D, CUI C. Hypoglycemic polysaccharides from *Auricularia auricula* and *Auricularia polytricha* inhibit oxidative stress, NF- κ B signaling and proinflammatory cytokine production in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(1): 87–93.
- [11] 刘楠楠. 黑木耳多糖的提取纯化、结构表征及降糖活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2022.
- LIU NN. Study on extraction, purification, structure characterization and hypoglycemic activity of *Auricularia auricula* polysaccharide [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2022.
- [12] 郭淑娟, 朱晟水, 贾悦, 等. 基于主成分分析微波提取圆头蒿多糖工艺中单糖组分变化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(22): 267–274.
- GUO SJ, ZHU SY, JIA Y, *et al.* Changes of monosaccharide components in microwave extraction of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides based on principal component analysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(22): 267–274.
- [13] 刘权, 刘雨婷, 霍滢, 等. 食品与生物样品糖类及其衍生物检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(14): 115–124.
- LIU Q, LIU YT, HUO Y, *et al.* Advances in methods for the detection of sugars and their derivatives in food and biological samples [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(14): 115–124.
- [14] HAAS M, LAMOUR S, TRAPP O. Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1568: 160–167.
- [15] 齐美玲. 气相色谱分析及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- QI ML. Gas chromatography analysis and application [M]. Beijing: China Science Publishing & Media Ltd, 2012.
- [16] TAN SY, NIU YJ, LIU L, *et al.* Development of a GC–MS/SIM method for the determination of phytosteryl esters [J]. Food Chemistry, 2019(281): 236–241.
- [17] 李一聪. 基于液质联用技术的多糖组成分析及应用[D]. 宜春: 宜春学院, 2022.
- LI YC. Analysis and application of polysaccharide composition based on liquid chromatography-mass spectrometry [D]. Yichun: Yichun University, 2022.
- [18] 江和栋, 牛仙, 万仁口, 等. 灵芝孢子多糖的提取工艺优化及单糖组成、抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 159–167.
- JIANG HD, NIU X, WAN RK, *et al.* Optimization of extraction and analysis of monosaccharide composition and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 159–167.
- [19] 汪梦雯. 灵芝、香菇和茯苓多糖的提取、结构表征及降糖活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- WANG MW. Optimization of extraction technology and biological activity of polysaccharides from *ganoderma lucidum*, *lentinus edodes* and *fu brick tea* [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2021.
- [20] 张鑫. 油茶粕多糖的制备、结构初探及与乳清蛋白相互作用的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022.
- ZHANG X. Preparation, structure characterization and interaction with whey protein of *Camellia oleifera* cake polysaccharide [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2022.
- [21] 杨彬君, 易骏, 龚业滔, 等. GC-MS 分析牛樟芝多糖的单糖组成及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019(12): 85–89.
- YANG BJ, YI J, GONG YT, *et al.* monosaccharide composition analysis of polysaccharide from *Antrodia cinnamomea* by GC-MS and its antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019(12): 85–89.
- [22] 郝俊光, 柯锋, 梁振荣, 等. 液相法测定米香型白酒发酵液中 18 种有机酸[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 283–290.
- HAO JG, KE F, LIANG ZR, *et al.* Determination of 18 organic acids in rice flavored liquor fermentation broth by high pressure liquid chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 283–290.
- [23] SEYMOUR FR, CHEN ECM, BISHOP SH. Identification of aldoses by use of their peracetylated aldononitrile derivatives: A GLC-MS approach [J]. Carbohydrate Research, 1979, 73(1): 19–45.
- [24] GUNVANT D, DADASAHEB B, RAJENDRA D, *et al.* Extraction, characterization and quantification of metoprolol in visceral samples using gas chromatography-mass spectro-metry-selected ion monitoring (GC-MS-SIM): A case study [J]. Analytical Chemistry Letters, 2024, 14(2): 230–238.
- [25] KARAMI F, SERESHTI H. Copolymerized natural deep eutectic solvent encapsulated in calcium alginate beads: Application as a green sorbent for analysis of multiclass pesticides in nonalcoholic malt beverages by GC–MS/SIM [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2023, 11(6): 2455–2467.
- [26] 司雄元, 牛子牛, 储思琴, 等. 气相色谱法测定多糖样品中单糖的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(10): 1198–1201.
- SI XY, NIU ZN, CHU SQ, *et al.* GC determination of monosaccharides in polysaccharides samples [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2018, 54(10): 1198–1201.
- [27] XIA YG, SUN HM, WANG TL, *et al.* A modified GC-MS analytical procedure for separation and detection of multiple classes of carbohydrates [J]. Molecules, 2018, 23(6): 1284.
- [28] 汪文琦, 陆磊, 田卫, 等. 香菇多糖分离纯化及结构表征[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2023, 44(1): 10–15.
- WANG WQ, LU L, TIAN W, *et al.* Isolation purification and characterization of *lentinus edodes* polysaccharide [J]. Journal of Northwest Minzu University (Natural Science Edition), 2023, 44(1): 10–15.
- [29] 赵圆圆. 杏鲍菇子实体多糖的提取纯化、结构表征及降脂活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2020.
- ZHAO YY. Study on extraction, purification, structure characterization and lipid-lowering activity of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* fruit body [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2022.
- [30] 朱淮武. 有机分子结构波谱解析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- ZHU HW. Spectral analysis of organic molecular structure [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [31] PRICE NPJ. Acyclic sugar derivatives for GC/MS analysis of ^{13}C -enrichment during carbohydrate metabolism [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(22): 6566–6574.
- [32] BIEMANN K, DEJONGH DC, SCHNOES HK. Application of mass spectrometry to structure problems. xiii. 1 acetates of pentoses and hexoses 2 [J]. Journal of the American Chemical Society, 1963, 85(12): 1763–1771.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)