DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260129001
引用格式: 文俊萍, 黎志锐, 罗达龙, 等. 超声辅助酶提取-离子色谱法测定六堡茶多糖中单糖组分及含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 186–194.
WEN JP, LI ZR, LUO DL, *et al*. Determination of monosaccharide components and content in polysaccharides from Liubao tea by ultrasonic-assisted enzymatic extraction-ion chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 186–194. (in Chinese with English abstract).

超声辅助酶提取-离子色谱法测定六堡茶多糖中单糖组分及含量

文俊萍[1,2], 黎志锐[1*], 罗达龙[1,2,3], 蒋德莉[1,2], 赖秀梅[1]

(1. 梧州市食品药品检验所, 梧州 543000; 2. 广西六堡茶生物学与资源利用重点实验室, 梧州 543000; 3. 广西六堡茶科技成果转化中试研究基地, 梧州 543000)

摘 要: 目的 建立超声辅助酶提取-离子色谱法测定六堡茶多糖中单糖组分及含量的方法。**方法** 采用单因素实验和正交实验对六堡茶多糖中单糖组分及含量的提取条件进行优化, 同时优化了离子色谱法检测六堡茶多糖中单糖的色谱条件, 并对所建立的方法进行方法学评价。**结果** 通过极差和方差分析, 六堡茶多糖中单糖组分及含量最佳提取工艺条件为 $m_{\text{纤维素酶}}$:$m_{\text{果胶酶}}$(1:5)、酶添加量 4.0%、酶解 pH 5.0、料液比 1:25 (g:mL)、酶解-超声时间 40 min、酶解-超声温度 50 ℃; 经方法学评价, 7 种单糖均具有良好的线性关系, 相关系数均大于 0.995, 相对标准偏差小于等于 3.2%, 定量限良好, 回收率为 83.33%~101.74%。通过对六堡茶多糖中单糖组分的分析, 表明六堡茶中组成茶多糖的有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、*D*-木糖、*D*-甘露糖、半乳糖醛酸。**结论** 超声辅助酶提取方法可以大量缩短样品提取时间, 可以用于快速测定六堡茶多糖中单糖的组分及含量测定。

关键词: 超声辅助酶提取; 离子色谱法; 六堡茶; 茶多糖; 单糖

Determination of monosaccharide components and content in polysaccharides from Liubao tea by ultrasonic-assisted enzymatic extraction-ion chromatography

WEN Jun-Ping[1,2], LI Zhi-Rui[1*], LUO Da-Long[1,2,3], JIANG De-Li[1,2], LAI Xiu-Mei[1]

(1. *Wuzhou Institute for Food and Drug Control*, *Wuzhou* 543000, *China*; 2. *Guangxi Key Laboratory of Liubao Tea Biology and Resource Utilization*, *Wuzhou* 543000, *China*; 3. *Guangxi Liubao Tea Scientific and Technological Achievements Transformation Pilot Research Base*, *Wuzhou* 543000, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of the monosaccharide components and content in polysaccharides from Liubao tea by ultrasonic-assisted enzymatic extraction-ion chromatography. **Methods** Optimization of extraction conditions for monosaccharide components and content in Liubao tea

收稿日期: 2026-01-29
基金项目: 六堡茶多糖中单糖组分含量的快速测定(202302004); 广西科技重大专项(桂科 AA20302018-15)
第一作者: 文俊萍(1991—), 女, 副主任药师, 主要研究方向为食品药品检测分析。E-mail: 850805578@qq.cm
***通信作者:** 黎志锐(1989—), 男, 工程师, 主要研究方向为食品药品检测分析。E-mail: 610618957@qq.com

polysaccharides by single-factor experiments and orthogonal experiments. The chromatographic conditions for the determination monosaccharides in Liubao tea polysaccharides by ion chromatography were optimized simultaneously, and the established method was evaluated methodologically. **Results** Through analysis of range and variance, the optimal extraction process conditions for monosaccharide components and content in Liubao tea polysaccharides were that $m_{cellulase}$ to $m_{pectinase}$ ratio of 1:5, enzyme addition level of 4.0%, enzymatic hydrolysis pH of 5.0, solid-to-liquid ratio of 1:25 (g:mL), enzymatic hydrolysis-ultrasonic treatment duration of 40 minutes and enzymatic hydrolysis-ultrasonic temperature at 50 ℃; after methodological evaluation, all 7 kinds of monosaccharides exhibited good linear relationships, with correlation coefficients greater than 0.995, the relative standard deviation of precision was less than 3.2%, the limit of quantitation were satisfactory, and the recovery rates ranged from 83.33% to 101.74%. Through the analysis of monosaccharide components in the polysaccharides of Liubao tea showed that the tea polysaccharides in Liubao tea were composed of rhamnose, arabinose, galactose, glucose, *D*-xylose, *D*-mannose and galacturonic acid. **Conclusion** The ultrasonic-assisted enzymatic extraction method can significantly shorten the extraction time of sample, and can be utilized for the rapid determination of monosaccharide components and content in the polysaccharides of Liubao tea.

KEY WORDS: ultrasonic-assisted enzymatic extraction; ion chromatography; Liubao tea; tea polysaccharide; monosaccharide

0　引　言

六堡茶是我国广西壮族自治区的一类特色黑茶产品, 历史悠久, 具有独特的风味品质特征和保健功效, 其中茶多糖是黑茶功能活性物质之一, 是一类结构复杂的糖蛋白复合物, 具有降血糖[1−2]、降血脂、增强免疫力、降血压、减慢心率、增加冠脉流量、抗凝血、抗血栓和耐缺氧等作用。目前, 六堡茶中关于茶多糖的研究较少[3−5], 尤其是在六堡茶多糖的单糖组成研究上更是稀少。探明单糖谱是解析构效关系、制定质量标准的前提, 目前的基础数据尚无法支撑六堡茶多糖中单糖资源的深度开发。因此, 准确测定六堡茶多糖中单糖组分含量对于地方特色资源六堡茶的深入研究和开发具有重要意义。

目前茶多糖的常见传统提取方法为水提醇沉法[6], 得到粗多糖后再通过加不同的酸将茶多糖水解成单糖, 该方法存在提取效率低、耗时长、茶沉淀多等缺点; 超声辅助酶法因其绿色、高效和温和的特点成为近年来理想技术, 主要通过添加现代生物酶[7−8]联合超声波[9−12]破坏细胞壁结构, 增强酶与底物接触效率, 可实现高纯度茶多糖的提取, 目前超声辅助酶法前处理技术已广泛应用于食品、药品检测领域, 汪雅馨等[9]采用该技术通过探索超声时间、超声温度、复合酶制剂添加量及料液比, 优化了板栗壳多酚的提取工艺; 陈小红等[11]采用该技术与单独超声提取对比实验证明, 超声波辅助酶法能显著提高茯苓多糖的提取率。从而可见, 该技术具有样品消耗少、提取效率高、绿色环保等特点, 适用于大批量样品的同时提取。

对提取后的单糖进行检测分析, 常见的检测方法主要有胶束电动毛细管色谱法[6,13−17]、气相色谱法[18−19]、液相色谱法[20−23]、离子色谱法[24−29]、离子色谱-质谱法[30]等。其中胶束电动毛细管色谱法、气相色谱法、液相色谱法 3 种方法存在需要衍生且操作烦琐, 衍生剂添加过量而不好除去, 重复性差等缺陷; 离子色谱-质谱法需要比较高的仪器成本, 而离子色谱法具有较高的灵敏度且无需衍生前处理, 具有操作简单, 对单糖测定具有较强的专属性, 是目前比较认可的一种糖类含量测定方法, 可作为本研究中六堡茶多糖中单糖组分及含量的测定方法。

鉴于此, 本研究通过单因素实验和正交实验, 优化超声辅助酶法提取六堡茶多糖中单糖的提取工艺, 联合离子色谱法对六堡茶多糖中单糖组分及含量进行测定分析以期为六堡茶功能性食品开发提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

六堡茶样品来自本地茶厂。

鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖(纯度 100%)、*D*-无水葡萄糖、*D*-木糖(纯度 99.9%)、*D*-甘露糖(纯度 99.8%)、*D*-半乳糖醛酸标准品(纯度 95.1%)(中国药品检定研究院)。

超纯水(由实验室 Milli-Q 去离子水发生器直接制备); 400 μ/mg 纤维素酶、50000 μ/g 果胶酶(生物技术级, 上海源叶生物科技有限公司); 聚酰胺粉(100~200 目)、醋酸(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钠(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 醋酸钠(分析纯, 西陇科学股份有限公司)。

1.2　仪器与设备

ICS5000+离子色谱仪、Dionex CarboPac^{TM} PA10 色谱

柱(4 mm×250 mm, 10 μm)、Dionex CarboPac^{TM} PA10 保护柱(4 mm×50 mm, 10 μm) (美国赛默飞世尔科技公司); IKA MS3 漩涡混合器(德国 IKA 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); pHS-3C 酸度计(上海精密科学仪器有限公司); AllegraX-15R 高性能通用台式离心机(美国贝克曼公司); BSA3202S 电子天平[感量 0.01 g, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; XA205DU 电子分析天平[感量 0.01 mg, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; 0.45 mm 茶叶标准检验筛(杭州大吉光电仪器有限公司)。

1.3 色谱条件

脉冲安培检测器采用糖标准四电位波形法, 进样量 25 μL, 柱温 35 ℃, 流速 0.8 mL/min, 淋洗液: 水(A_1)-10 mmol/L 氢氧化钠(B_2)和 10 mmol/L 醋酸钠溶液(C_1); 采用流动相梯度洗脱模式: 0 min: 85% A_1+5% B_2+10% C_1; 0~15.0 min: 85% A_1+5% B_2+10% C_1; 15.0~32.0 min: 85% A_1+5% B_2+10% C_1~65% A_1+20% B_2+15% C_1; 32.0~44.5 min: 65% A_1+20% B_2+15% C_1; 44.5~45.0 min: 65% A_1+20% B_2+15% C_1~85% A_1+5% B_2+10% C_1; 45.0~60.0 min: 85% A_1+5% B_2+10% C_1。

1.4 实验方法

1.4.1 样品溶液的制备

称取过筛后干燥的六堡茶茶粉样品 2.00 g(精确至 0.01 g), 加入 4.0%提取酶($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$=1:5); 提取溶液超纯水 50 mL[料液比 1:25 (g:mL)]混合均匀, 将醋酸 pH 调节为 5.0, 在酶解-超声温度 50 ℃, 酶解-超声时间 40 min 下提取, 提取结束后沸水浴下灭活 10 min, 冷却后在 4500 r/min 下离心 5 min, 取上层溶液 2.00 mL 至 10.00 mL 离心管中, 加入聚酰胺粉 100 mg, 涡旋 3 min, 过 0.22 μm 滤膜, 上机待分析。

1.4.2 单因素实验设计

影响植物多糖提取的主要因素有提取酶种类、提取酶比例、酶添加量、酶解 pH、料液比、酶解-超声时间以及酶解-超声温度, 本研究选择以提取酶($m_{纤维素酶}$:$m_{果胶酶}$=1:5), 酶添加量为 4.0%, 酶解 pH 为 5.0, 料液比为 1:25 (g:mL), 酶解-超声时间为 40 min, 酶解-超声温度为 50 ℃为基础实验条件, 改变单一因素变量。称取六堡茶茶粉 2.00 g(精确至 0.01 g), 分别探究不同提取酶种类(纤维素酶、果胶酶、提取酶($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$=1:1)、提取酶比例($m_{纤维素酶}$:$m_{果胶酶}$=1:1、1:2、1:5、1:10、2:1、5:1、10:1)、酶添加量(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%)、酶解 pH (3.0、4.0、5.0、5.5、6.0)、料液比[1:10、1:20、1:25、1:30 (g:mL)]、酶解-超声时间(20、30、40、50、60 min)、酶解-超声温度(30、40、45、50、55、60 ℃)对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响。

1.4.3 正交实验优化

以单因素实验结果为依据, 选定 $m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$为辅助提取酶, 比例为 1:5, 酶解 pH 为 5.0, 选取酶添加量、料液比、酶解-超声时间以及酶解-超声温度 4 个因素, 以六堡茶多糖中单糖总量提取结果为指标, 设计 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 的正交实验, 优化超声辅助酶提取六堡茶多糖中单糖的工艺, 因素选取及水平安排见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	*A*: 酶添加量/%	*B*: 料液比(g:mL)	*C*: 酶解-超声时间/min	*D*: 酶解-超声温度/℃
1	4.0	1:20	40	45
2	5.0	1:25	50	50
3	6.0	1:30	60	55

1.4.4 标准品溶液的制备

称取鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、*D*-无水葡萄糖、*D*-木糖、*D*-甘露糖、*D*-半乳糖醛酸各 50 mg(精确至 0.01 mg)分别置于 50 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解至刻度, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液, 于–18 ℃冷冻保存。使用前取出解冻, 取相同量浓度级别的标准储备溶液混合后作为混合标准工作溶液。

1.5 数据处理

利用变色龙数据处理软件(Chromeleno 7.2.9)对上机数据进行处理计算, Excel 2010 软件对结果数据进行绘图和统计学计算, 采用正交设计助手IIv 3.1 对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 提取酶对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

由图 1(A)可知, 六堡茶多糖中各单糖在添加复合酶($m_{纤维素酶}$:$m_{果胶酶}$=1:1)提取时, 半乳糖、葡萄糖以及半乳糖醛酸单糖含量明显高于只添加纤维素酶或果胶酶其中一种, 而从单糖总含量来看更加证实, 添加复合酶提取效果比只添加其中一种酶更佳, 这是因为在两种酶共同协助的作用下, 可分别将高聚植物纤维、果胶等细胞壁成分水解成可溶性还原糖, 比只添加单种提取酶提取效率高, 因此选择提取酶($m_{纤维素酶}$:$m_{果胶酶}$)作为本次提取六堡茶多糖中单糖的提取酶。

2.1.2 酶添加量对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

由图 1(B)可知, 酶添加量在 1.0%~4.0%之间, 单糖总含量随着酶添加量的增大而呈上升趋势, 其中在 4.0%时达到最高值, 这是因为酶添加量的增大, 可增加酶与茶叶细胞壁接触的面积, 加快了酶促反应, 从而提高的提取效果, 而在 5.0%~6.0%之间, 提取效果开始下降, 推测是其酶促反应已经达到饱和, 但其提取出的单糖总量还是比 1.0%~3.0%高, 因此选择 4.0%、5.0%、6.0%进行正交实验。

2.1.3 酶解 pH 对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

根据研究可知纤维素酶的最适 pH 在 4.5~6.0; 果

胶酶的最适 pH 在 3.0~5.0。分别考察不同酶解 pH (3.0、4.0、5.0、5.5、6.0)对六堡茶多糖中单糖含量提取的影响。由图 1(C)可知, 在 pH 为 3.0~5.0 时, 单糖含量随着增大, 而到 5.5~6.0 时, 含量突然下降。这是因为只有在最适合的 pH 条件下, 酶的活性才能发挥最大效果, 酶促反应加快, 从而对单糖含量的提取效果最佳, 因此, 选择 pH 5.0 作为本次研究酶解 pH。

2.1.4　不同料液比对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

由图 1(D)可知, 当料液比在 1:10~1:25 (g:mL)时, 六堡茶多糖中单糖总量的提取呈上升趋势, 其中在 1:25 (g:mL)时最高, 这是因为随着料液比的增加, 茶叶与溶液的接触面加大, 多糖总的单糖溶出提高了, 而当料液比在 1:30 (g:mL)时开始下降, 因为此时的酶浓度被稀释, 导致提取率下降所致, 因此, 选择料液比 1:20、1:25、1:30 (g:mL)进行正交实验。

2.1.5　酶解-超声时间对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

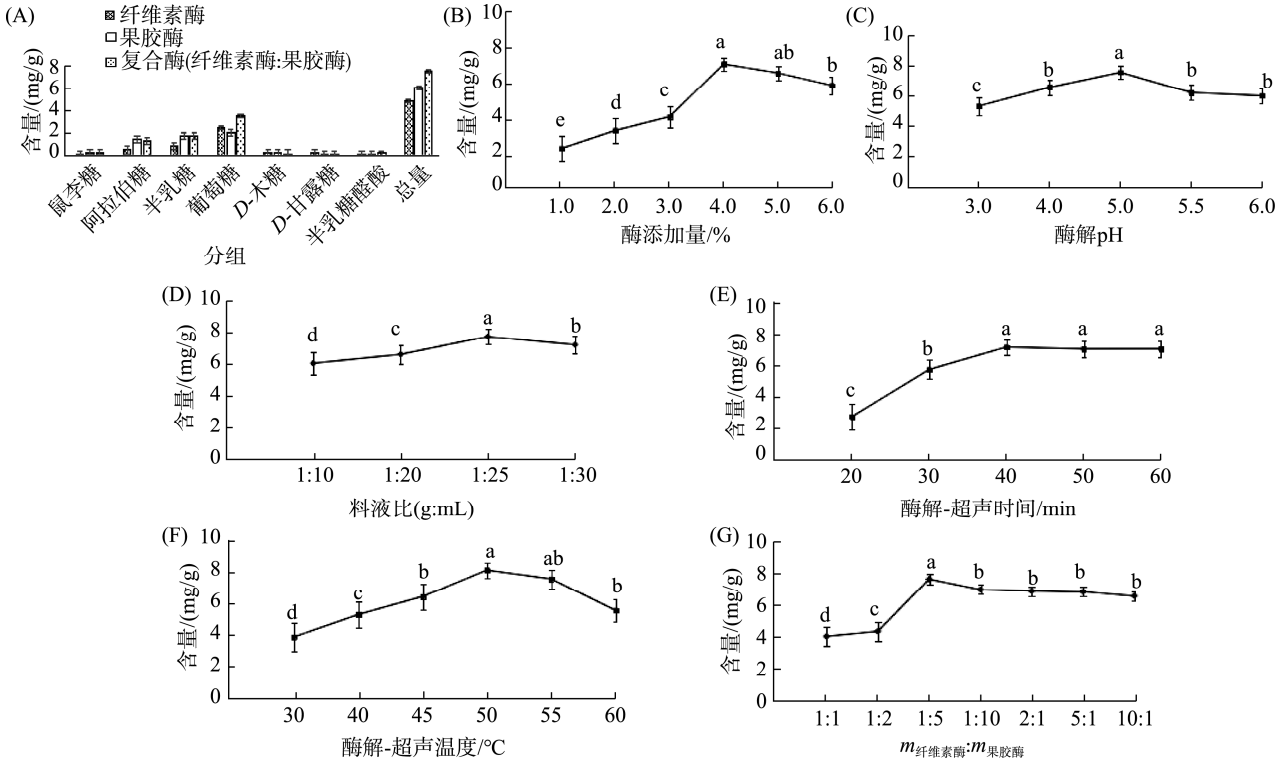
由图 1(E)可知, 酶解-超声时间在 20~40 min 之间, 六堡茶多糖中单糖总量的提取呈上升趋势, 其中在 40 min 达最高值, 而在 40~60 min 时, 提取效果呈平衡趋势, 证明酶解-超声时间并非越长越好, 因此选择 40、50、60 min 进行正交实验。

2.1.6　酶解-超声温度对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

根据研究可知纤维素酶的最适温度在 50 ℃左右; 果胶酶的最适温度在 40~60 ℃。分别考察不同酶解-超声温度(30、40、45、50、55、60 ℃)对六堡茶多糖中单糖含量提取的影响。由图 1(F)可知, 温度在 30~50 ℃时, 六堡茶多糖中单糖总量呈上升趋势, 温度的升高, 加快了酶促反应速度, 从而提高了提取效果, 而在 55~60 ℃之后, 开始呈下降趋势, 这是因为当酶解-超声温度超出最合适温度后, 酶存在失活现象, 从而导致提取率下降, 因此, 选择 45、50、55 ℃进行正交实验。

2.1.7　提取酶比例对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

由图 1(G)可知, 提取酶($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$)比例随着果胶酶的占比增大, 而各单糖总糖含量也随着增大, 其中在提取酶($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$=1:5)最高, 而在提取酶($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$=1:10), 提取酶($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$=2:1、5:1、10:1)反而下降, 推测其果胶酶对六堡茶多糖提取的影响比纤维素酶提取的影响大, 但果胶酶比例并非越大越好, 越大反而抑制纤维素酶在提取中的发挥, 因此, 本次研究选择最适合的提取酶比例为($m_{纤维素酶}$: $m_{果胶酶}$=1:5)。



注: 图中不同小写字母表示差异显著, P<0.05。

图 1　提取酶(A)、酶添加量(B)、酶解 pH (C)、料液比(D)、酶解-超声时间(E)、酶解-超声温度(F)和提取酶比例(G)对六堡茶多糖中单糖含量提取效果的影响

Fig.1　Effects of extraction enzymes (A), enzyme amount (B), enzymatic hydrolysis pH (C), solid-liquid ratio (D), enzymatic hydrolysis-ultrasonic time (E), enzymatic hydrolysis-ultrasonic tempetature (F) and enzyme extraction ratio (G) on the extraction efficiency of monosaccharide content in Liubao tea polysaccharides

2.2 正交实验

结合表 2 极差分析和表 3 方差分析可看出, *A*、*C*、*D* 3 个因素对实验结果影响显著, *B* 因素不显著, 影响的主次顺序为 *A*>*D*>*C*>*B*, 即酶添加量>酶解-超声温度>酶解-超声时间>料液比。不考虑交互作用, 从表 2 中 *K* 可得, 六堡茶多糖中单糖最优方案为 $A_1B_2C_1D_2$, 即酶添加量 4.0%, 料液比 1:25 (g:mL), 酶解-超声时间 40 min, 酶解-超声温度 50 ℃。以此条件做验证实验, 六堡茶多糖中单糖总含量分别是 7.83、7.83、7.86 mg/g, 平均值为 7.84 mg/g。

表 2 正交实验结果与极差分析

Table 2 Results of orthogonal experiment and range analysis

实验号	*A*	*B*	*C*	*D*	总含量/(mg/g)
1	1	1	1	1	7.41
2	1	2	2	2	7.50
3	1	3	3	3	6.90
4	2	1	2	3	5.49
5	2	2	3	1	6.15
6	2	3	1	2	6.97
7	3	1	3	2	6.59
8	3	2	1	3	6.09
9	3	3	2	1	5.48
K_1	21.81	19.49	20.47	19.04	
K_2	18.61	19.74	18.47	21.06	
K_3	18.16	19.35	19.64	18.48	
k_1	7.27	6.50	6.82	6.35	
k_2	6.20	6.58	6.16	7.02	
k_3	6.05	6.45	6.55	6.16	
R	1.22	0.13	0.67	0.86	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	*F*	*F* 临界值	显著性
A	2.641	2	101.577	19	*
B	0.026	2	1.000	19	
C	0.673	2	25.885	19	*
D	1.228	2	47.231	19	*
误差	0.03	2			

注: *表示差异显著(*P*<0.05)。

2.3 样品净化、色谱条件优化

2.3.1 净化剂对六堡茶样品提取溶液的净化效果影响

参考董晓倩等[23]研究结论, 本研究直接通过对比不同聚酰胺粉用量在本实验样品提取溶液进行考察其除杂效果, 同时, 取上述 1.4.4 标准贮备液各 1.0 mL 配制成 100 μg/mL 的混合标准溶液, 分别加入 50、80、100、200 mg 的聚酰胺粉, 以回收率为指标考察其对 7 种单糖的吸附效果。结果表明, 样品提取溶液在净化步骤加入 100 mg 聚酰胺粉时, 已经达到几乎透明澄清状态, 样品中色素杂质基本被清除; 通过计算混合标准溶液的回收率, 加入 100 mg 聚酰胺粉对 7 种糖吸附效果不明显, 回收率均在 90%以上。

2.3.2 离子色谱条件的优化

保持其他色谱条件一致下, 分别考察两种洗脱程序(表 4), 洗脱程序 1: 水(A_1)-100 mmol/L 氢氧化钠(B_1)和 10 mmol/L 醋酸钠溶液(C_1), 洗脱程序 2: 水(A_1)-10 mmol/L 氢氧化钠(B_2)和 10 mmol/L 醋酸钠溶液(C_1)对目标化合物的分离效果, 由图 2 可知, 洗脱程序 1 无法将鼠李糖和阿拉伯糖分开, 而洗脱程序 2 可以, 因此本研究采用洗脱程序 2 作为本次研究的洗脱溶液。分别取 1.4.1 制备的样品溶液和 2.3.1 的混合标准溶液, 按照上述 1.3 的色谱条件测定单糖含量, 在此条件下单糖标准混合溶液色谱图见图 3A, 样品溶液色谱图见图 3B。

2.4 线性关系、检出限与定量限

准确配制含量分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL 的混合标准溶液, 按 1.3 的色谱条件进行分析, 以峰面积为纵坐标(*Y*), 质量浓度为横坐标(*X*, μg/mL)作图, 得到各单糖线性方程图; 检出限实验:称取过筛后干燥的六堡茶茶粉样品 2.00 g(精确至 0.01 g), 按 1.4.1 提取后, 加纯水稀释得到含葡萄糖质量浓度为 0.1 μg/mL 左右的样品稀释液, 在样品稀释液中加入其余 6 种成分相应的浓度, 过滤膜后, 按 1.3 的色谱条件进行分析, 以各组分信噪比为 *S*/*N*=3 为依据, 计算得到各单糖组分的检出限值。定量限实验: 称取过筛后干燥的六堡茶茶粉样品 2.00 g(精确至 0.01 g), 按 1.4.1 提取后, 加纯水稀释得到含葡萄糖质量浓度为 0.5 μg/mL 左右的样品稀释液, 在样品稀释液中加入其余 6 种成分相应的浓度, 过滤膜后, 按 1.3 的色谱条件进行分析, 以各组分信噪比为 *S*/*N*=10 为依据, 计算得到各单糖组分的定量限值。结果如表 5 显示, 各单糖在 0.5~50.0 μg/mL 范围内线性良好, 相关系数均大于 0.995, 检出限范围在 0.02~0.03 mg/g 之间, 定量限范围在 0.07~0.08 mg/g 之间。检出限和定量限均较低, 证明该方法灵敏度较高。

表 4 2 种离子色谱法检测梯度洗脱程序

Table 4 Gradient elution procedures for 2 kinds of ion chromatography detection

洗脱程序 1				洗脱程序 2			
时间/min	A_1/%	B_1/%	C_1/%	时间/min	A_1/%	B_2/%	C_1/%
0	80	10	10	0	85	5	10
18.0	80	10	10	15.0	85	5	10
35.0	65	20	15	32.0	65	20	15
45.5	65	20	15	44.5	65	20	15
46.0	80	10	10	45.0	85	5	10
60.0	80	10	10	60.0	85	5	10

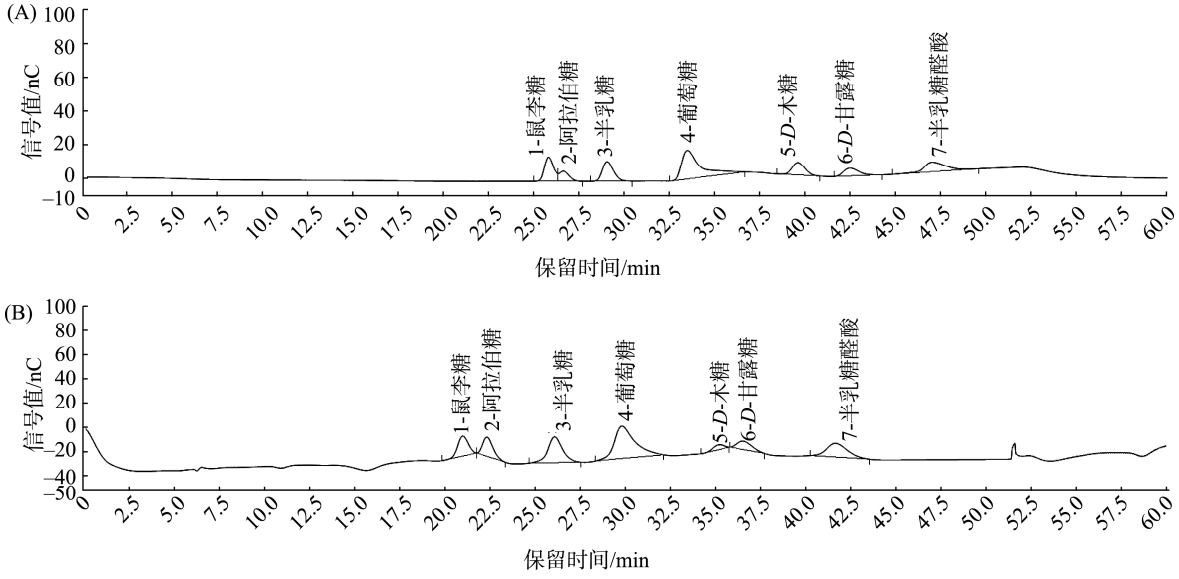


图 2　使用洗脱溶液 1(A)和洗脱溶液 2(B)分析单糖混合标准溶液色谱图

Fig.2　Analyze of chromatograms of standard monosaccharide mixtures using elution solutions 1 (A) and 2 (B)

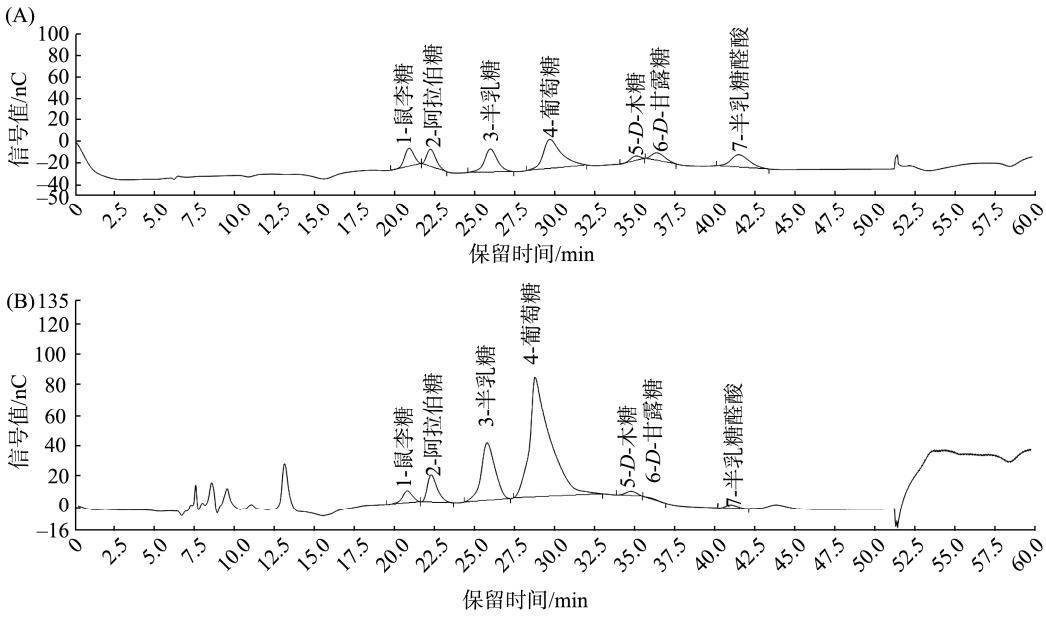


图 3　单糖混合标准溶液(A)及样品溶液(B)的色谱图

Fig.3　Chromatogram of the standard monosaccharide mixture (A) and the sample solution (B)

表 5　各单糖的线性范围、相关系数

Table 5　Linear range and correlation coefficient of each monosaccharide

组分名称	线性方程	相关系数(r)	检出限/(mg/g)	定量限/(mg/g)
鼠李糖	Y=1.8757X+0.1834	0.9975	0.02	0.07
阿拉伯糖	Y=1.6224X+0.4486	0.9991	0.02	0.07
半乳糖	Y=2.2438X–0.4470	0.9982	0.03	0.08
葡萄糖	Y=2.8010X+1.2062	0.9996	0.02	0.08
D-木糖	Y=1.4353X–0.5897	0.9961	0.02	0.07
D-甘露糖	Y=1.4040X+0.2339	0.9958	0.02	0.07
半乳糖醛酸	Y=2.1572X–0.4857	0.9977	0.02	0.07

2.5 加标回收实验、精密度实验

称取过筛后干燥的六堡茶茶粉样品 2.00 g(精确至 0.01 g), 分别添加 3 个不同水平的质量溶液, 计算平均回收率和相对标准偏差, 考察方法准确度和精密度, 由表 6 可知, 各单糖在不同水平浓度下的回收率均为 83.33%~101.74%, 相对标准偏差为 1.3%~3.2%。证明本研究方法用于测定六堡茶多糖中各单糖含量回收率良好, 准确度高, 重复性好。

表 6 回收实验及精密度实验(n=6)

Table 6 Recovery experiment and precision experiment (n=6)

组分名称	本底值/(mg/g)	加标值/(mg/g)	实测值/(mg/g)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
鼠李糖	0.36	0.2	0.47	83.92	1.3
		0.5	0.77	89.53	
		1.0	1.15	84.55	
阿拉伯糖	1.52	0.2	1.75	101.74	3.1
		0.5	2.01	99.50	
		1.0	2.49	98.81	
半乳糖	1.80	0.2	1.98	99.00	2.8
		0.5	2.21	96.08	
		1.0	2.65	94.64	
葡萄糖	3.65	0.2	3.58	92.98	2.9
		0.5	4.02	96.86	
		1.0	4.27	91.82	
D-木糖	0.23	0.2	0.41	95.34	2.5
		0.5	0.67	91.78	
		1.0	1.12	91.05	
D-甘露糖	0.16	0.2	0.30	83.33	1.9
		0.5	0.63	95.45	
		1.0	1.12	96.55	
半乳糖醛酸	0.12	0.2	0.28	87.50	3.2
		0.5	0.65	98.38	
		1.0	1.06	94.64	

2.6 样品测定

取样品 6 批, 测定六堡茶多糖中单糖含量, 每批做 3 个平行样, 按 1.4.1 提取样品, 用 1.3 色谱条件对六堡茶样品溶液进行测定。从结果可知, 该方法得到的六堡茶多糖中单糖主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、*D*-木糖、*D*-甘露糖以及半乳糖醛酸组成, 其中以阿拉伯糖和半乳糖和葡萄糖为主, 3 者含量最高, 各单糖含量值分别为(0.36±0.15) 、 (1.36±0.50) 、 (1.78±0.45) 、 (3.60±0.26) 、(0.23±0.02)、(0.16±0.06)、(0.12±0.02) mg/g (n=3)。

2.7 超声辅助酶提取法与水提醇沉法样品测定结果比较

称取同一批次过筛后干燥的六堡茶茶粉样品 2.00 g (精确至 0.01 g), 同步做 3 个平行样, 水提醇沉法参考陆建平等[6]研究的前处理方法对样品进行提取, 超声辅助酶提取法按 1.4.1 提取样品, 用 1.3 色谱条件对 2 种方法提取的六堡茶样品溶液进行测定。结果发现, 从单糖组分上看, 超声辅助酶提取法比传统的水提醇沉法多提取出一种新的组分(*D*-木糖); 从单糖含量上看, 以 3 个平行样各单糖含量加和平均值作相比, 超声辅助酶提取法单糖总含量为 7.84 mg/g, 水提醇沉法单糖总含量为 3.20 mg/g, 提取效率提高了两倍, 这不仅证明了超声波辅助酶提取法更适合于六堡茶多糖中单糖的提取, 同时还为其他茶类茶多糖中单糖提取提供了新的研究思路。

3 结 论

本研究建立的超声辅助酶提取-离子色谱法测定六堡茶多糖中单糖组分及含量的方法, 可同时测定六堡茶中 7 种单糖组分含量, 与常规传统的水提醇沉加酸水解茶多糖裂解成单糖的方法相比, 该方法具有样品消耗少、提取效率高、绿色环保等特点, 而采用离子色谱法协同糖分析专用柱可免去气相色谱法中复杂的衍生过程, 可以在同一

色谱图中分析和检测中性糖和酸性糖, 灵敏度高, 更适用于大批量样品的检测, 可为六堡茶多糖中单糖组分分析以及其他茶类组分分析提供新的方法和思路。然而, 本研究方法目前尚有不足之处, 如只考察了纤维素酶和果胶酶两种酶组合在六堡茶多糖中单糖提取效果的影响, 而周小玲等[7]研究指出胰蛋白酶对茶叶中多糖得率的提高也非常有利, 因此, 纤维素酶、果胶酶和胰蛋白酶 3 者组合在六堡茶多糖中单糖组成及含量的提取效果影响有待进一步深入研究, 从而可为六堡茶的功能性食品应用开发提供更全面的理论支撑。

参考文献

[1] 刘丹奇, 任发政, 侯彩云. 几种茶多糖对糖尿病模型小鼠血糖的影响[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(1): 59–64.
LIU DQ, REN FZ, HOU CY. Effects of several tea polysaccharides on blood glucose in diabetic mice [J]. Food and Nutrition in China, 2020, 26(1): 59–64.

[2] 王慧琴. 超声波辅助提取六堡茶多糖工艺及其降血糖活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 57(7): 57–65.
WANG HQ. Optimization of ultrasonic assisted extraction process of polysaccharides from Liubao tea and its hypoglycemic activity [J]. China Food Additives, 2023, 57(7): 57–65.

[3] 邱思绮, 毛彦, 夏宁, 等. 六堡茶多糖的提取工艺优化及组成的研究[J]. 饲料研究, 2021, 44(4): 56–60.
QIU SQ, MAO Y, XIA N, *et al*. Study on optimization of extraction process and composition of polysaccharide from Liubao tea [J]. Feed Research, 2021, 44(4): 56–60.

[4] 应乐, 潘越, 王岳飞, 等. 六堡茶多糖理化性质、体外抗氧化及对人脐静脉血管内皮细胞的保护作用[J]. 茶叶科学, 2017, 37(1): 25–37.
YING L, PAN Y, WANG YF, *et al*. Physicochemical properties, in vitro antioxidant aactivities and protective effects of Liubao tea polysaccharides on HUVEC [J]. Journal of Tea Science, 2017, 37(1): 25–37.

[5] 江成英, 梁圆曼, 李博, 等. 六堡茶多糖的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 梧州学院学报, 2025, 35(4): 77–85.
JIANG CY, LIANG YM, LI B, *et al*. Optimization of extraction process of Liupao tea polysaccharides and their antioxidant activity [J]. Journal of Wuzhou University, 2025, 35(4): 77–85.

[6] 陆建平, 覃梦琳, 布静龙, 等. 胶束电动毛细管色谱法测定金花茶和六堡茶中多糖的单糖组成[J]. 理化检验-化学分册, 2017, 53(4): 442–446.
LU JP, QIN ML, BU JL, *et al*. MECC Determination of monosaccharide composition of polysaccharides in camellia and Liubao teas [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2017, 53(4): 442–446.

[7] 周小玲, 汪东风, 李素臻, 等.不同酶法提取工艺对茶多糖组成的影响[J]. 茶叶科学, 2007, 27(1): 27–32.
ZHOU XL, WANG DF, LI SZ, *et al*. Effects of different extraction processes on the components of tea polysaccharides [J]. Journal of Tea Science, 2007, 27(1): 27–32.

[8] 龚玉雷. 纤维素酶和果胶酶复合体系在茶叶提取加工中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
GONG YL. Application research on the composite system of cellulase and pectinase in tea extraction and processing [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.

[9] 汪雅馨, 刘晓媛, 马梦媛, 等. 超声波辅助酶法提取板栗壳多酚及其降糖降脂生物活性评价[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(5): 89–94.
WANG YX, LIU XY, MA MY, *et al*. Ultrasonie assisted enzymatie extraction of polyphenols from chestnut shells and evaluation of their hypoglycemic and lipid-lowering biological activities [J]. Cereals and Oils, 2025, 38(5): 89–94.

[10] 李继伟, 杨贤庆, 许加超, 等. 超声波辅助酶法提取琼枝麒麟菜多糖及其理化性质研究[J]. 南方农业学报, 2020, 51(12): 3030–3039.
LI JW, YANG XQ, XU JC, *et al*. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and physicochemical properties of polysaccharide from Eucheuma gelatinae [J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(12): 3030–3039.

[11] 陈小红, 马芳, 林标声, 等. 超声波辅助植物提取酶提取中药茯苓多糖的工艺优化研究[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2015, 12(27): 38–41, 59.
CHEN XH, MA F, LIN BS, *et al*. Optimization of ultrasonic-assisted plant complex enzyme extraction process for polysaccharides from *Poria cocos* in traditional Chinese medicine [J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2015, 12(27): 38–41, 59.

[12] 吴金松, 耿广威, 任聪, 等. 超声波辅助酶法提取山药皮水溶性多糖的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(8): 90–97.
WU JS, GENG GW, REN W, *et al*. Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of water-soluble polysaccharides from peel of rhizoma dioscoreae [J]. Food Research and Development, 2022, 43(8): 90–97.

[13] 王芝彪, 章银军, 龚玉雷, 等. 毛细管电泳法测定绿茶酶解液中的还原糖成分[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(6): 165–170.
WANG ZB, ZHANG YJ, GONG YL, *et al*. Determination of reducing carbohydrates in enzyme extracts of green tea by capillary zone electrophoresis [J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(6): 165–170.

[14] 马海宁, 华玉娟, 屠春燕, 等. 毛细管电泳法分析藏红花植物细胞多糖中单糖组成[J]. 色谱, 2012, 30(3): 304–308.
MA HN, HUA YJ, TU CY, *et al*. Analysis of monosaccharide composition in polysaccharides from *Crocus sativus* plant cells by capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(3): 304–308.

[15] GUO HZ, LIU Fl, JIA G, *et al*. Extraction optimization and analysis of monosaccharide composition of fucoidan from *Saccharina japonica* by capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(6): 1903–1908.

[16] WANG T, YANG XB, WANG DY, *et al*. Analysis of compositional carbohydrates in polysaccharides and foods by capillaryzone electrophoresis [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(2): 754–762.

[17] SALLA HILTUNE, HELI SIREN. Analysis of monosaccharides and oligosaccharides in the pulp and paper industry by use of capillary zone electrophoresis: A review [J]. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(17): 5773–5784.

[18] 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 monosaccharide in

polysaccharide samples [J]. Physical Testing and Chemical Analysis, 2018, 54(10): 1198–1201.

[19] 郑文静, 孙静, 张英. 毛细管气相色谱法测定山茱萸多糖的单糖组成[J]. 现代盐化工, 2018, 45(1): 15–16.
ZHENG WJ, SUN J, ZHANG Y. Determination of monosaccharide content in polysaccharide samples by gas chromatography [J]. Modern Salt and Chemical Industry, 2018, 45(1): 15–16.

[20] LV Y, YANG XB, ZHAO Y, *et al*. Eparation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection [J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 742–746.

[21] 袁勇, 黄建安, 李银花, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定茶叶中单糖和双塘[J]. 茶叶科学, 2010, 30(6): 435–439.
YUAN Y, HUANG JAN, LI YH, *et al*. Determination of monosaccharides and disaccharides in tea by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. Journal of Tea Science, 2010, 30(6): 435–439.

[22] 徐瑾, 张庆合, 张维冰, 等. 液相色谱荧光衍生法在糖类物质分析中的应用[J]. 色谱, 2003, 21(2): 115–120.
XU J, ZHANG QH, ZHANG WB, *et al*. Application of liquid chromatography fluorescence derivatization method in carbohydrate analysis [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(2): 115– 120.

[23] 董晓倩, 白春蓉, 兰韬, 等. 快速滤过型净化结合液相色谱-蒸发光散射法检测茶叶中 5 种糖类成分[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 330–336.
DONG XQ, BAI CR, LAN T, *et al*. Determination of five saccharides in tea by multi-plug filtration cleanup combined with high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector [J]. Food Science, 2023, 44(22): 330–336.

[24] 颉东妹, 王宁丽, 刘笑笑, 等. 微波消解-离子色谱法测定枸杞多糖的含量及组成[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1065–1072.
XIE DM, WANG NL, LIU XX, *et al*. Determination of the content and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides by microwave digestion-ion chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(4): 1065–1072.

[25] 于青, 尚姝, 冯有龙, 等. 离子色谱法测定灵芝孢子粉中多糖的含量[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(4): 344–347.
YU Q, SHANG S, FENG YL, *et al*. Determination of monosaccharide composition of polysaccharide in ganoderma iucidum spore by ion chro-matography [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014, 49(4): 344–347.

[26] 何连军, 干雅平, 吕伟德, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定多花黄精多糖的单糖组成[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1671–1676.
HE LJ, GAN YP, LV WD, *et al*. Determination of monosaccharide composition of polysaccharide polysaccharides by high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(8): 1671–1676.

[27] 王梓轩, 李娅琦, 柳国霞, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定枸杞多糖的单糖及糖醛酸组成[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 6082–6085.
WANG ZX, LI YQ, LIU GX, *et al*. Determination of monosaccharide and uronic acid composition of *Lycium barbarum* polysaccharide by high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 36(10): 6082–6085.

[28] 乐胜锋, 王尉, 王雅萱, 等. 离子色谱-脉冲安培法测定芦荟多糖中 7 种单糖的含量[J]. 色谱, 2019, 37(3): 319–324.
LE SF, WANG W, WANG YX, *et al*. Determination of 7 monosaccharides in aloe polysaccharide by ion chromatography-pulse amperometric method [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(3): 319–324.

[29] XIE JH, SHEN MY, NIE SP, *et al*. Analysis of monosaccharide composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide with anion exchange chromatography [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 976–981.

[30] ZHAO Z, LIN Q, FENG Y, *et al*. Determination of monosaccharides hydrolyzed from plysaccharides in activated sludge by ion chromatography-mass spectrometry with online petreatment of column switching technique [J]. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(29): 8061–8071.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)