

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170111001

http://www.yykxjz.cn/

刘芬, 孙晓杰, 朱文嘉, 郭莹莹, 何柳, 杨祯祯, 王媛媛, 文艺晓, 王联珠. 海参中单糖检测方法的建立及含量测定. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 177-182

Liu F, Sun XJ, Zhu WJ, Guo YY, He L, Yang ZZ, Wang YY, Wen YX, Wang LZ. Establishment and determination of monosaccharide in sea cucumber. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 177-182

海参中单糖检测方法的建立及含量测定*

刘芬^{1,2} 孙晓杰¹ 朱文嘉¹ 郭莹莹¹ 何柳^{1,3}
杨祯祯^{1,2} 王媛媛^{1,2} 文艺晓^{1,2} 王联珠^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306;
3. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003)

摘要 本研究建立了高效阴离子交换-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)分析海参(*Apostichopus japonicus*)多糖的单糖组成及含量测定。通过比较 3 种蛋白去除法对海参多糖含量的影响,优化海参多糖纯化方法;比较淋洗液浓度对单糖分离效果的影响,优化海参中单糖分离的色谱条件。结果显示,Sevag 法去蛋白的效果最好,在淋洗液为 20 mmol/L NaOH 的条件下分离岩藻糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖和乳糖;在淋洗液为 160 mmol/L NaOH 和 200 mmol/L NaAC 的条件下分离葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸。各单糖标准曲线的线性相关系数不低于 0.998,检出限为 2.5~50 $\mu\text{g/L}$,加标回收率在 83.6%~113.1%之间。该方法可测定海参多糖的中性糖、氨基糖和糖醛酸,可作为海参及其制品中的单糖分析及定量方法,为相关标准的制定提供参考。

关键词 高效阴离子交换-脉冲安培检测法; 海参多糖; 单糖测定

中图分类号 TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0177-06

海参(*Apostichopus japonicus*)是我国传统的名贵海珍品,营养丰富,蛋白质含量高,脂肪含量低,不含胆固醇,富含多种微量营养成分(Shi *et al*, 2016)。此外,海参还具有较高的药用价值,对治疗肺结核、再生障碍性贫血、糖尿病等有一定疗效(林威威等, 2011)。海参多糖是海参体壁重要的活性成分之一,其化学组成能直接反映海参的品质(姜健等, 2004)。目前,在海参体壁中发现的多糖分为两大类:海参糖胺聚糖和海参岩藻多糖。海参糖胺聚糖是由 D-N-乙酰氨基半乳糖、D-葡萄糖醛酸、L-岩藻糖和硫酸酯基组成的分支杂多糖,相对分子量为 4~5 万道尔顿;海参岩藻多糖是由 L-岩藻糖构成的支链匀多糖,相对

分子量为 8~10 万道尔顿(樊绘曾, 2001)。海参多糖含量可占干参总有机物的 6%以上(刘琪等, 2015),具有抗肿瘤(Song *et al*, 2013)、抗凝血(Pomin, 2012)、抗氧化(Liu *et al*, 2012)、抗高血脂(Olivera-Castillo *et al*, 2013)、抗高血糖(Hu *et al*, 2013)等多种生物学功能。

高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)近年来发展迅速,在糖和糖醇等的应用已较为成熟(刘婷, 2009),比如食用菌和植物多糖的单糖分析等,在动物多糖单糖分析上的相关报道较少,海参中仅用于硫酸基含量的测定(尹利昂, 2009)。和植物多糖不同,海参多糖不能采用水提等非降解法,需要采用酶解的方式提取后再水解成单糖,增加了前处理

* 农业行业标准制定与修订(农产品质量安全)项目(2130109201515026-15)资助 [This work was supported by Agricultural Industry Standard Setting and Revision Program (Quality and Safety of Agricultural Products) (2130109201515026-15)]. 刘芬, E-mail: liufeniran@sina.com

① 通讯作者: 王联珠, 研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-11, 收修改稿日期: 2017-03-01

的难度。海参多糖含有中性糖、氨基糖和糖醛酸,优化淋洗液浓度和梯度以确保每种单糖都能出峰。本研究采用 HPAEC-PAD 方法首次建立了以 CarboPac PA10 糖分析柱、NaOH 溶液和 NaAC 溶液梯度淋洗,分析海参中的 10 种单糖,包括中性糖、氨基糖和糖醛酸,为海参及其制品中单糖含量的检测方法及标准的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验材料 实验用活刺参样品均于 2016 年 6 月购于山东省青岛市新贵都水产批发市场,重量为 (200±10) g/只,淡干刺参即鲜活刺参经去内脏清洗后煮制 40 min 后烘干制成;冻干刺参即鲜活刺参经去内脏清洗后放入冷冻干燥机中冻干制成;盐干刺参即鲜活刺参经去内脏清洗后盐渍再烘干制成。

1.1.2 主要试剂 10 种单糖标准物质: L-岩藻糖(L-Fucose)、D-半乳糖(D-Galactosamine)、D-甘露糖(D-Mannose)、D-阿拉伯糖(D-Arabinose)、D-葡萄糖(D-Glucose)、D-乳糖(D-Lactose)、D-氨基葡萄糖(D-Glucosamine)、D-氨基半乳糖(D-Galactosamine)、D-半乳糖醛酸(D-Galacturonic acid)、D-葡萄糖醛酸(D-Glucuronic acid),纯度均≥98%,购于美国 Sigma 公司。

无水乙醇、苯酚、浓硫酸、丙酮、三氯甲烷、正丁醇、乙酸钠、EDTA、L-半胱氨酸、50%氢氧化钠溶液(色谱纯,购于美国麦克林公司)、木瓜蛋白酶(分析纯,美国 Sigma 公司),其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备 ICS-3000 离子色谱仪(配备电化学检测器),CarboPac PA10 糖保护柱(美国戴安);CarboPac PA10 糖分析柱(0.4 mm×250 mm,美国戴安);V1800 型可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);高速离心机(赛默飞世尔);DFY-300 型摇摆式高速万能粉碎机(温岭市林大机械);SP-7417 电动研磨搅拌机(德清拜杰电器);ZRD-A7080 全自动新型鼓风干燥箱(上海智试分析仪器)。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白去除方法的优化 酶解法是动物多糖提取常用的方法,但经酶解法提取的海参多糖保留长度不一的肽链,为了进一步纯化海参多糖及减少对离子色谱柱的影响,海参多糖中残留的多肽还要通过其他方式去除。比较三氯乙酸法、Sevag 法、乙酸锌和亚铁氰化钾法 3 种方法去蛋白的效果,进一步提高海

参多糖得率。

三氯乙酸法: 向海参多糖水溶液中加入 30% 的三氯乙酸溶液缓慢搅拌至不再出现浑浊,静置、离心后去沉淀。

乙酸锌和亚铁氰化钾法: 向海参多糖水溶液中加入乙酸锌和亚铁氰化钾溶液,混匀后静置离心。

Sevag 法: Sevag 试剂是将氯仿和正丁醇以 5:1 的比例混匀。向海参多糖水溶液中加入 1/4 体积的 Sevag 试剂,混匀后取出上层水溶液,重复操作 3 次。

1.2.2 色谱条件的优化 淋洗液为 NaOH 溶液,分别采用 400、120、80、20 mmol/L NaOH 溶液,通过分析单糖的分离效果,选择中性糖和氨基糖的最佳淋洗液浓度。采用 200 mmol/L NaOH 和 1 mol/L NaAC 混合淋洗液,设置不同浓度梯度分离糖醛酸,选择糖醛酸分离的最佳淋洗液梯度。

1.2.3 方法重复性和加标回收实验 将 5 μg/ml 的单糖标准混合液进样 6 次,计算相对标准偏差。对于海参样品中不含有的单糖及含量低的单糖按照 1.0、2.0 和 5.0 mg/g 的添加量进行加标回收实验;对于样品中含量高的单糖按照含量的 0.5 倍、1 倍和 2 倍的添加量进行加标回收实验。平行测定 6 份,计算平均回收率和相对标准偏差。

1.2.4 单糖含量的测定 称取 2 g(精确到 0.001 g)海参样品,分别加入 30 ml 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲溶液、100 mg 木瓜蛋白酶、10 ml EDTA 溶液和 10 ml 半胱氨酸溶液,置于 60℃ 下振荡反应 24 h 之后,反应混合物离心。向上清液中加入 2 倍体积 95% 乙醇,4℃ 静置过夜,离心弃上清液。沉淀经无水乙醇、丙酮洗涤后重新溶解并定容至 100 ml,取 4 ml 多糖水溶液采用 Sevag 法去蛋白。取 2 ml 海参多糖水溶液加入 1 ml 2 mol/L 三氟乙酸溶液,充氮封管,120℃ 水解 2 h (GB/T 33108-2016),中和后定容至 10 ml。取多糖水解液过 0.45 μm 水系滤膜,采用 HPAEC-PAD 进行单糖分析及含量测定。前处理方法参考盛文静等(2007),并在原来的基础上稍加改进。

1.2.5 数据分析 实验重复 3 次,每组实验设 3 组平行,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 SPSS 18.0 统计软件单因素分析(One-way ANOVA)对不同处理的差异进行统计分析,统计差异显著性水平为 $P < 0.05$,比较采用 Duncan 法分析。

2 结果与分析

2.1 海参多糖最佳去蛋白方法

分别采用三氯乙酸法、乙酸锌和亚铁氰化钾法及

Sevag 法去除海参多糖中的蛋白质, 结果见表 1。结果显示, 3 种去蛋白的方法差异性显著($P<0.05$), 其中乙酸锌和亚铁氰化钾去除蛋白的方法得到的海参多糖含量最低, 表明多糖有损失, 效率低, 同时该法也引入了杂质离子, 因此, 不适用于离子交换色谱法。虽然三氯乙酸法得到的海参多糖含量最高, 但三氯乙酸引起多糖不必要的水解, 不利于海参多糖的纯化。Sevag 法去蛋白后和不去蛋白得到的海参多糖含量差异不显著, 表明 Sevag 法对蛋白去除的效果明显, 不会引起多糖的损失, 同时能够去除小分子多肽对离子色谱柱和离子色谱仪的影响。

表 1 不同蛋白沉淀剂对海参多糖纯化的影响

Tab.1 The effect of protein precipitants on the polysaccharide purification of sea cucumber

蛋白沉淀剂 Protein precipitant	海参多糖含量(以岩藻糖计) Content of sea cucumber polysaccharide (Count on fucose, %)
不加沉淀剂 Non-precipitant	6.46±0.23 ^b
三氯乙酸 TCA	11.46±0.39 ^a
乙酸锌和亚铁氰化钾 Zinc acetate & Potassium Ferrocyanide	4.30±0.31 ^c
Sevag 法	7.14±0.31 ^b

注: 同一列中不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Data within the same column with different letters were significantly different ($P<0.05$)

2.2 单糖分离的最佳淋洗液梯度

结果显示, 当浓度为 400 mmol/L NaOH 溶液时, 各单糖的色谱峰几乎不能分开, 表明淋洗液强度太大, 单糖在色谱柱上保留变弱, 导致保留时间太短, 不能实现单糖的有效分离, 因此, 需要降低 NaOH 的浓度(李静等, 2012)。由图 1 可见, 随着淋洗液浓度的降低, 单糖与离子基团交换时间长, 各单糖标准品逐渐分离, 当 NaOH 溶液浓度为 20 mmol/L 时, 单糖实现了有效分离。在该条件下, 8 种中性糖和氨基糖(Fuc、Glc、Lac、Gal、Man、Ara、GlcN 和 GalN)实现了较好分离。

采用 160 mmol/L NaOH-200 mmol/L NaAC 混合淋洗液分离 2 种更难洗脱的糖醛酸, 葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸混合标准溶液的色谱图见图 2。

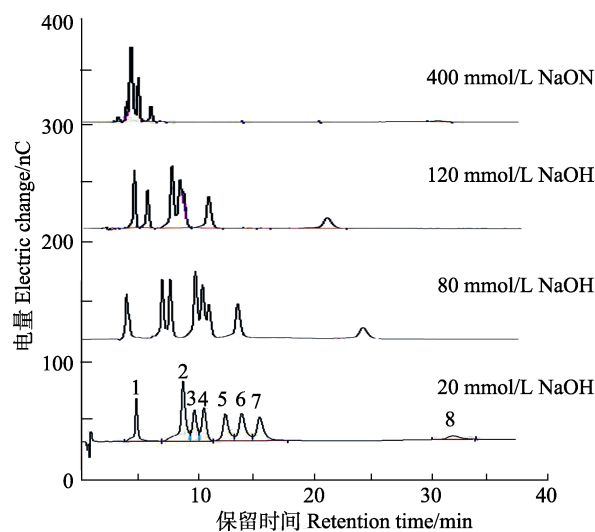
2.3 方法线性关系和回收率

HPAEC-PAD 的色谱条件经优化后, 各单糖标准线性方程的相关系数均大于 99.8%, 线性良好, 线性范围在 0.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 之间。将 5 $\mu\text{g/ml}$ 的单糖标准混

合液进样 6 次, 相对标准偏差在 0.81%~3.81%之间。加标回收率在 83.6%~113.1%之间, 结果见表 2。

2.4 单糖含量的测定结果

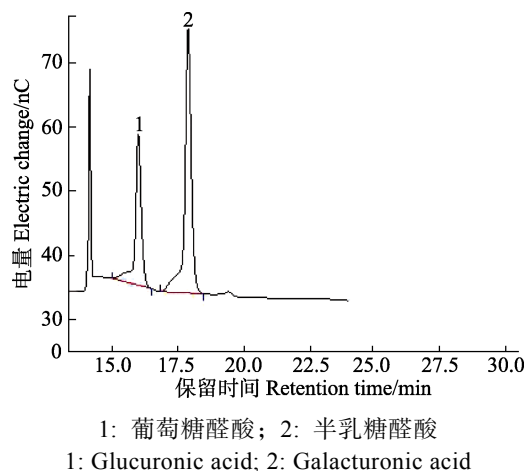
将刺参多糖的单糖水解液进行 HPAEC-PAD 测定, 将刺参样品的色谱图与单糖标准品色谱图进行对比分析, 根据保留时间定性, 峰面积定量, 计算各海参中单糖的含量, 结果见表 3。刺参多糖含有岩藻糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸, 加工方式的不同影响海参中单糖的组成比例。



1: 岩藻糖; 2: 氨基半乳糖; 3: 阿拉伯糖; 4: 氨基葡萄糖;
5: 半乳糖; 6: 甘露糖; 7: 葡萄糖; 8: 乳糖
1: Fucose; 2: Galactosamine; 3: Arabinose; 4: Glucosamine;
5: Galactose; 6: Mannose; 7: Glucose; 8: Lactose

图 1 淋洗液浓度对单糖分离的影响

Fig.1 The effect of eluent concentration on the monosaccharide separation



1: 葡萄糖醛酸; 2: 半乳糖醛酸
1: Glucuronic acid; 2: Galacturonic acid

图 2 5 $\mu\text{g/ml}$ 2 种糖醛酸混合标准溶液的离子色谱
Fig.2 HPAEC-PAD chromatogram of two mixed uronic acid standards (5 $\mu\text{g/ml}$)

表 2 淡干刺参中 10 种单糖的加标回收率

Tab.2 The recovery rate of ten monosaccharides in dried sea cucumber ($n=6$)

单糖 Monosaccharide	本底均值 Mean (mg/g)	加标回收率 Recovery rate (%)	相对标准偏差 RSD (%)
岩藻糖 Fuc	16.0±0.36	88.6~101.3	3.00
氨基半乳糖 GalN	0.10±0.05	83.6~99.2	0.81
阿拉伯糖 Ara	1.85±0.47	87.0~113.1	2.91
氨基葡萄糖 GlcN	3.28±0.16	93.3~102.7	2.64
半乳糖 Gal	10.1±0.51	85.9~99.9	2.50
葡萄糖 Glc	0.00±0.00	85.5~90.1	3.25
甘露糖 Man	4.37±0.56	92.3~96.1	3.81
乳糖 Lac	0.00±0.00	89.9~99.5	2.94
半乳糖醛酸 GalUA	6.05±0.15	98.9~96.7	1.46
葡萄糖醛酸 GlcUA	1.15±0.01	96.4~104.6	1.86

表 3 海参多糖单糖组成测定结果

Tab.3 The composition of monosaccharide in sea cucumber polysaccharide

样品名称 Sample name	单糖含量 Content of Monosaccharide (mg/g)							
	岩藻糖 Fuc	氨基半乳糖 GalN	阿拉伯糖 Ara	氨基葡萄糖 GlcN	半乳糖 Gal	甘露糖 Man	半乳糖醛酸 GalUA	葡萄糖醛酸 GlcUA
鲜刺参 Fresh sea cucumber	1.79±0.32	0.45±0.18	0.95±0.01	0.08±0.02	5.61±0.02	2.74±0.01	0.68±0.02	0.57±0.21
干刺参 Dried sea cucumber ¹	16.0±0.36	0.10±0.05	1.85±0.47	3.28±0.16	10.1±0.51	4.37±0.56	6.05±0.15	1.15±0.01
盐干刺参 Salty-dried sea cucumber	11.25±1.76	0.11±0.01	0.65±0.03	2.20±0.09	7.02±0.52	2.22±0.10	0.59±0.23	0.85±0.49
冻干刺参 Frozen-dried sea cucumber	8.63±0.22	0.00±0.00	0.13±0.02	3.23±0.55	2.00±0.05	2.52±0.10	5.63±0.10	0.15±0.03
淡干刺参 Dried sea cucumber	11.35±0.59	0.45±0.18	0.28±0.02	1.21±0.04	6.26±0.17	2.46±0.13	9.32±0.04	2.47±0.19

1. 干刺参是鲜活刺参未经煮制直接烘干所得

1. Dried sea cucumber was dried directly from fresh sea cucumbers without cooking

3 讨论

3.1 蛋白去除对海参多糖含量的影响

海参多糖提取的同时,与糖连接的蛋白也同时被提取(王远红等, 2005), 残留的蛋白会堵塞分析柱, 且会影响离子色谱仪的稳定性, 因此, 蛋白去除是海参多糖进一步纯化和分级的前提(殷涌光等, 2006), 张红静(2006)比较不同蛋白去除方法发现, Sevag 法去蛋白的效率最高, 可用于动物多糖的纯化。李苹苹等(2006)研究紫贻贝(*Mytilus edulis*)多糖蛋白质脱除方法, 发现酶法与 Sevag 法结合能有效去除紫贻贝多糖中的蛋白质, 蛋白脱除率为 78.5%。因此, Sevag 法能够有效去除海参多糖中的小分子肽, 同时不会引起多糖的损失, 是动物多糖蛋白去除最常用的方法。

3.2 淋洗液浓度对单糖分离效果的影响

HPAEC-PAD 是利用糖分子在 pH>10 的淋洗液中带负电的形式, 能够结合在阴离子交换柱上并被分

离, 因此, 调节分离效率和选择性的重要参数是氢氧化物浓度(曹莉, 2012)。

在淋洗液浓度为 20 mmol/L 的条件下, 葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸没有分离, 原因可能是 NaOH 的浓度太低, 不能将糖醛酸解析出来, 因此, 需要更高浓度的淋洗液。在研究中发现, 当单独采用 NaOH 溶液并不能分离糖醛酸, 需加入洗脱能力更强的 NaAC 溶液作为淋洗液(吴胜芳等, 2005; 彭云云等, 2009; 戴军等, 2006)。但在研究中发现, 如果淋洗液的浓度过高会造成基线不稳, 同时会影响中性糖和氨基糖的分离。因此, 可采用 2 种不同的色谱条件分别分离海参多糖中的单糖, 即采用低淋洗液浓度条件分离海参多糖中的中性糖和氨基糖, 采用高淋洗液浓度条件分离海参多糖中的糖醛酸。

3.3 单糖含量测定结果的比较

海参多糖由不同类型的单糖组成, 且单糖存在互变异构、差向异构以及各单糖具有相似结构等特征,

所以海参多糖的单糖组成分析是进行海参多糖质量控制和获取多糖基本信息的重要环节(Fonseca *et al.*, 2009)。HPAEC-PAD 分析单糖组成具有简单、精密度高、无需衍生等优点, 在植物多糖和真菌多糖的应用广泛, 本研究首次将 HPAEC-PAD 应用于动物多糖的单糖分析。将本研究结果和 PMP-HPLC 分析海参多糖的单糖组成结果(田鑫等, 2014)相比, 就单糖种类来看, 发现 PMP-HPLC 的测定结果缺少 Ara 和 GalUA 这 2 种单糖, HPAEC-PAD 测得的海参中单糖的种类更全面, 这可能和海参多糖的提取方法有关。

3.4 加工工艺对海参中单糖含量的影响

传统淡干海参的加工工艺都要经过煮制和烘干, 煮制的过程会丢失部分海参单糖, 会对海参的营养价值有影响。冻干海参一定程度上保留了海参多糖, 但盐干海参和盐渍后再脱水而成的淡干海参单糖的含量明显降低, 单糖的种类明显减少。没有经过煮制而直接烘干的海参, 其单糖的含量明显高于其他加工方式的海参, 表明海参的加工还需要新的科技条件的支撑, 最大限度地保留海参单糖。

4 结论

本研究采用 HPAEC-PAD 对海参多糖水解得到的单糖进行分析, 使用 CarboPac PA10 糖分析柱, 以一定浓度 NaOH 溶液和 NaAC 溶液为淋洗液进行梯度淋洗。该方法可测定海参中的中性糖、氨基糖和糖醛酸, 分离效果好, 操作简单, 无需衍生, 精密度高, 可为海参中单糖检测标准的制定提供参考。

参 考 文 献

- Cao L. Separation and detection of monosaccharide by ion chromatography. *Chinese Journal of Medical Guide*, 2012(10): 1839-1840, 1838 [曹莉. 单糖的离子色谱法分离及检测. *中国医药导刊*, 2012(10): 1839-1840, 1838]
- Dai J, Liang LN, Yin HP, *et al.* Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides from *D. salina* by high-performance anion-exchange chromatography. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(11): 131-135 [戴军, 梁立娜, 尹鸿萍, 等. 高效阴离子交换色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成. *食品与发酵工业*, 2006, 32(11): 131-135]
- Fan HZ. Study on development of sea cucumber and its components in health care. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2001, 82(4): 37-44 [樊绘曾. 海参: 海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发. *中国海洋药物*, 2001, 82(4): 37-44]
- Fonseca R, Sabtos G, Mouro P. Effects of polysaccharides enriched in 2, 4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding: Practical and conceptual implications. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009, 102(5): 829-836
- GB/T33108-2016, determination of saponins in sea cucumbers and their products by high performance liquid chromatography [GB/T33108-2016, 海参及其制品中海参皂苷的测定 高效液相色谱法]
- Hu S, Chang Y, Wang J, *et al.* Fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber in combination with rosiglitazone improved glucose metabolism in the liver of the insulin-resistant mice. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2013, 77(11): 2263-2268
- Jiang J, Yang BL, Tai Y. Studies on resources and bioactive substances of sea cucumber. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(5): 537-540 [姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究. *生物技术通讯*, 2004, 15(5): 537-540]
- Li J, Li RY, Liang LN. Determination of monosaccharide constituents in *Lycium barbarum* polysaccharide using capillary ion chromatography with pulsed amperometric detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(9): 1415-1420 [李静, 李仁勇, 梁立娜. 毛细管型离子色谱-脉冲安培法检测枸杞多糖的单糖组成. *分析化学*, 2012, 40(9): 1415-1420]
- Li PP, Ding XL. Study on method of protein removal from crude *Mytilus edulis* Linnaeus polysaccharides. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(3): 3328-3332 [李莘莘, 丁霄霖. 紫贻贝多糖脱除蛋白质方法的研究. *上海水产大学学报*, 2006, 15(3): 3328-3332]
- Lin WW, Zhang J, Wang MJ. Purification and physico-chemical analysis of polysaccharides from sea cucumber. *Shandong Fishery*, 2011, 28(3): 40-43 [林威威, 张健, 王茂剑. 海参多糖的纯化及理化分析研究进展. *齐鲁渔业*, 2011, 28(3): 40-43]
- Liu Q, Dai QC. Study on the activity of polysaccharides in sea cucumber. *Heilongjiang Science and Technology Information*, 2015(9): 54 [刘琪, 代岐昌. 海参多糖活性研究进展. *黑龙江科技信息*, 2015(9): 54]
- Liu T. Studies of detecting polysaccharides with IC. Master's Thesis of Southwest University, 2009, 11-16 [刘婷. 多糖类物质的离子色谱检测技术研究. *西南大学硕士研究生学位论文*, 2009, 11-16]
- Liu X, Sun Z, Zhang M, *et al.* Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicas*. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(4): 1664-1670
- Olivera-Castillo L, Davalos A, Grant G, *et al.* Diets containing sea cucumber (*Isostichopus badiionotus*) meals are hypocholesterolemic in young rats. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79446
- Peng YY, Wu SB, Cheng JN, *et al.* Determination of monosaccharide and uronic acid in bagasse hemicellulose by ion chromatography. *Science and Technology of Papermaking*, 2009, 28(5): 10-12, 86 [彭云云, 武书彬, 程江娜, 等. 离子色谱法测定蔗渣半纤维素中的单糖及糖醛酸含量. *造纸科学与技术*, 2009, 28(5): 10-12, 86]
- Pomin VH. Fucanomics and galactanomics: Marine distribution, medicinal impact, conceptions, and challenges. *Marine Drugs*, 2012, 10(4): 793-811
- Sheng WJ, Xue CH, Zhao QX, *et al.* Chemical component analysis of polysaccharides from different sea cucumbers. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2007, 26(1): 44-49 [盛文

- 静, 薛长湖, 赵庆喜, 等. 不同海参多糖的化学组成分析比较. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 44–49]
- Shi SJ, Feng WJ, Hu S. Bioactive compounds of sea cucumbers and their therapeutic effects. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(3): 549–558
- Song Y, Jin SJ, Cui LH, *et al.* Immunomodulatory effect of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular carcinoma in rats. Molecules, 2013, 18(6): 7179–7193
- Tian X, Sheng WJ, Zhao YY, *et al.* Simultaneous determination of uronic acids, amino sugars and neutral sugars in polysaccharide from sea cucumber. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 85–89, 94 [田鑫, 盛文静, 赵园园, 等. 刺参多糖中糖醛酸、氨基糖和中性单糖的同步测定方法研究. 食品工业科技, 2014, 35(15): 85–89, 94]
- Wang YH, Lü ZH, Jiang TF, *et al.* Extraction and determination of polysaccharides in the Holothuria. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2005, 35(6): 109–112 [王远红, 吕志华, 姜廷福, 等. 梅花参中多糖提取工艺及含量测定的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(6): 109–112]
- Wu SF, Wang SY, Tao GJ, *et al.* Determination of galacturonic acid and glucuronic acid in the hydrolyzed polysaccharide solution by ion chromatography. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(4): 86–88 [吴胜芳, 王树英, 陶冠军, 等. 离子色谱法测定多糖水解液中的半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 86–88]
- Yin LA. Isolation, purification and characterization of different kinds of sea cucumber polysaccharides. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009, 37–40 [尹利昂. 不同海参多糖的分离纯化及生化性质分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009, 37–40]
- Yin YG, Han YZ, Ding HW. Progress in research on animal polysaccharides. Food Science, 2006, 27(3): 256–263 [殷涌光, 韩玉珠, 丁宏伟. 动物多糖的研究进展. 食品科学, 2006, 27(3): 256–263]
- Zhang HJ. Polysaccharide fractionation by ultrafiltration—a novel method for isolation and purification of lentinan from *Lentinus edodes*. Master's Thesis of Tianjin University, 2006 [张红静. 超滤法提取与纯化香菇多糖. 天津大学硕士研究生学位论文, 2006]

(编辑 冯小花)

Establishment and Determination of Monosaccharide in Sea Cucumber

LIU Fen^{1,2}, SUN Xiaojie¹, ZHU Wenjia¹, GUO Yingying¹, HE Liu^{1,3}, YANG Zhenzhen^{1,2},
WANG Yuanyuan^{1,2}, WEN Yixiao^{1,2}, WANG Lianzhu^{1①}

(1. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) was widely used to analyze monosaccharide in botanical and fungal polysaccharides, but lightly used in marine animal polysaccharides. A method has been developed for determining monosaccharide composition and content in sea cucumber polysaccharide by HPAEC-PAD. Purifying sea cucumber polysaccharide were optimized by comparing three deproteinization methods. Optimum chromatographic conditions for the separation of monosaccharide were optimized by comparing eluent concentration on the separation of monosaccharide. The results indicated that the reagent of Sevag removed micro-molecule polypeptide more effectively than others from sea cucumber polysaccharides. The concentration of eluent had significant effect on separating monosaccharide. Eight monosaccharide, such as Fuc, Gal, Ara, GalN, GlcN, Man, Glc, and Lac, were separated using 20 mmol/L NaOH as eluent. GlcUA and GalUA were separated by 160 mmol/L NaOH and 200 mmol/L NaAC as eluent. The linear coefficients of monosaccharide standard were above 0.998. The detection limit of each monosaccharide was between 2.5 and 50 $\mu\text{g/L}$, and the recovery rates ranged from 83.6% to 113.1%. The method determining neutral sugar, amino sugar and uronic acid in sea cucumber polysaccharides could be used as analysis and quantitative method of monosaccharide in sea cucumber and its products. The composition and content of monosaccharide were significant indices for determining the biological activity of sea cucumber. The established method could provide basic monosaccharide information and promote the polysaccharides research progress in sea cucumber. It could provide references for the establishment of sea cucumber standards, and expand the application of active substances in medicine and other fields.

Key words HPAEC-PAD; Sea cucumber polysaccharide; Monosaccharide determination

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn