

植物中多糖分析方法的研究进展

杨跃辉¹, 姜清华¹, 丁平田²

1. 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110004

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 多糖是由单糖连接而成的多聚物, 具有免疫调节、抗肿瘤及降血糖等药理作用, 是一类重要的生物大分子, 由于其独特的功能和低毒性, 在新药研发方面具有广阔的应用前景。在医药领域具有潜在的应用价值。综述了多糖的提取和分离方法, 以及常用的定量方法, 旨在为植物多糖的相关研究提供参考。

关键词: 多糖; 酶提取; 气相色谱法; 高效液相色谱法; 高效毛细管电泳法

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1239-04

Advances in studies on analytical methods of polysaccharides in plant

YANG Yue-hui¹, JIANG Qing-hua¹, DING Ping-tian²

1. Shengjing Hospital Affiliated China Medical University, Shenyang 110004, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Key words: polysaccharide; enzyme extraction; GC; HPLC; high performance capillary electrophoresis (HPCE)

多糖是生物体中广泛存在的物质, 是重要的生物大分子, 是维持生命活动正常运转的基本物质之一。大量研究表明^[1-7], 多糖除具有免疫调节、抗肿瘤生物学效应外, 还有抗衰老、降血糖、抗凝血、抗肝纤维化等作用, 且对机体不良反应小。一些多糖已经成为治疗疾病的药物和保健食品, 具有较高的开发价值。据 Franz 报道^[8], 已有近百种植物多糖被提取鉴定, 因其来源广且毒性小, 广泛应用于医药领域。近期研究较多的是黄芪多糖、茶多糖、银杏多糖等^[9-12]。这些大分子多糖类成分过去往往被忽视, 而作为杂质除去。随着对多糖活性的深入了解, 以及人们对各种天然药物、天然食品的推崇, 多糖以其不良反应小, 且又是营养、辅助医疗等功能性保健品的有效成分, 被广泛重视。本文对近几年来有关多糖的提取、分离纯化以及定量方法进行了综述, 期望能对从事植物多糖分析工作的同仁提供参考和借鉴。

1 提取方法

1.1 溶剂提取法

溶剂提取法首先是要根据多糖不同的溶解度选择一种溶剂, 对多糖进行提取。最常用的溶剂是水、稀醇以及二甲亚砜等。二甲亚砜虽然是一种提取多

糖的良好溶剂, 但价格昂贵, 对人体有害, 故在使用上受到限制。溶剂提取法具有不需特殊设备, 成本低等优点, 但提取费时且效率低。不同多糖受提取温度、时间、溶剂量等因素影响呈现不同的提取效果, 依具体情况需确定最佳提取工艺^[13]。

1.2 酸碱提取法

酸碱提取法是以稀酸或碱水溶液为溶剂提取多糖的方法。有研究证明羊栖菜多糖、大豆多糖、香菇多糖采用稀酸提取效果更佳^[14]。酸性条件可能致使糖苷键断裂, 因此多糖类物质一般采用不同温度的稀碱溶液进行提取, 稀碱液提取法适用于多糖与蛋白质间结合型的转化^[15]。

1.3 酶提取法

酶技术是近几年广泛应用于活性成分提取的一项生物技术, 常压条件下所用的酶有蛋白酶、纤维素酶、果胶酶等。酶提取法的提取条件比较温和, 在酶作用下, 植物组织分解后, 可加速多糖的释放与提取。虽然成本较高, 但是对一些药物提取效果较好, 如硫酸软骨素和大枣多糖的提取^[16-17]。

1.4 其他提取法

多糖提取的辅助手段也在不断丰富, 有实验表明经微波处理后可使金针菇子实体多糖提取效率明

收稿日期: 2010-09-05

作者简介: 杨跃辉(1969—), 湖南长沙人, 女, 副主任药师, 主要从事医院药学与医院制剂研究。Tel: 18940251176 E-mail: yangyh1@sj-hospital.org

显增加^[18-19]。直接采用超声波进行提取淡竹叶多糖,效果也优于水提法^[20]。

2 分离纯化

2.1 脱色

含色素较高的根、茎、叶、果实类药材,或色泽较深的动物药材需进行脱色处理,脱色剂较常用的有活性炭^[21](吸附法,其他吸附剂有纤维素、硅藻土等)、过氧化氢^[22](氧化法)、DEAE 纤维素(离子交换法)等。大孔树脂分离技术在多糖脱色中也有应用^[20]。

2.2 除大分子杂质

多糖类物质易溶于水,水作为最为常用且价廉的提取溶剂,常会将植物淀粉及动、植物蛋白类物质一同提取出来,为提高多糖提取率,常需除去其他成分:酶法可用于淀粉的去除,如在大麦多糖提取液中加入液化酶与糖化酶可除去淀粉^[23]。除蛋白质常用的方法有 Sevag 法(氯仿-戊醇或丁醇 4:1)、三氯乙酸沉淀法和蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等)水解法、鞣酸法等,也有人尝试使用盐酸法^[24]。对于不同种类的多糖,采用不同方法,除杂效果亦有差异,如对红毛五加多糖分离纯化工艺比较研究发现,Sevag 法脱蛋白效果优于三氯乙酸法^[25]。而对于有的多糖,二者差异不大^[26],三氯乙酸法操作更为简便,而 Sevag 法条件较为温和。有时为达到更好的分离纯化效果,也将几种方法联合使用。由于蛋白类物质带有电荷,也有采用絮凝剂吸附法^[27]。

2.3 除小分子杂质

去除多糖中所含的游离氨基酸、单糖等小分子水溶性成分最常用的是透析法。将多糖提取液置于膜透析袋中,逆向流水透析。该方法的关键是选择一种规格适宜的透析膜,以免样品损失。目前,用连续透析仪是较为方便的方法。

2.4 多糖的分离

2.4.1 沉淀法 由于多糖类化合物均难溶于有机溶剂,初步纯化时多采用分级醇、丙酮等沉淀的方法,以及盐析(氯化钠、氯化钾等)、季铵盐沉淀等方法。对于冷水不溶而温水可溶的多糖,在萃取时,采用热萃取,趁热滤过,滤液冷却即可析出多糖;含有糖醛酸、硫酸基团的多糖,可在盐类、稀酸溶液中直接醇析,使多糖以盐的形式或游离的形式析出;也可加入沉淀剂使多糖结合生成不溶性络合物或盐类沉淀物,常用的沉淀剂有费林氏试剂、硫酸酮、氢氧化钡、

氯化钾等。此外,还可采用特殊季铵盐试剂,用硼酸缓冲液调节 pH,沉淀带有不同羧基数目的多糖。

2.4.2 柱色谱法 为从多糖粗提物中得到均一组分,尚需对其进行进一步纯化。主要方法有凝胶柱色谱和离子交换树脂等。凝胶柱色谱法选用葡聚糖凝胶(型号 Sephadex 或 Sepharose),使不同相对分子质量多糖得以分离纯化,如冬凌草多糖、柴胡多糖、西洋参多糖等^[28-30]。纤维素阴离子交换柱色谱法常用的交换剂为 DEAE 纤维素,如百合多糖的分离纯化^[31]。两种柱色谱也常联合使用,如山茱萸多糖的分离纯化^[32]。

2.4.3 超滤法 超滤法是一种用于分子分离的膜分离法,操作条件温和,不需添加化学试剂,不损坏热敏药物。根据待分离物质选择不同规格的超滤膜,膜的孔径以相对分子质量为单位,常用的有醋酸纤维素膜、聚砜酰胺膜。谭晓梅等^[33]对当归多糖分离纯化工艺条件(超滤膜规格、时间、压力、温度)进行了优化,取得了较好效果。

2.4.4 其他方法 制备性区域电泳、制备性高压液相色谱、活性炭柱色谱、离心沉淀色谱法^[34]等也有应用于多糖分离纯化的报道,但由于适应对象较少或技术要求较高较少使用。

3 多糖定量分析

多糖的检测方法可分为两大类^[35],一是利用组成多糖的单糖的性质进行测定,其中利用单糖缩合反应而建立的方法最多,如比色法、滴定法;二是直接测定多糖,如高效毛细管电泳法、高效液相色谱法、气相色谱法和酶法。第二类方法需要昂贵的仪器和多糖的纯品,且需要特定的酶。

3.1 比色法

比色法已被广泛使用。该法需用上述方法将多糖从植物中提取分离出来,然后显色、比色测定。所用的显色剂有呋啉-硫酸、蒽酮-硫酸、苯酚-硫酸、3,5-二硝基水杨酸。1947 年,Dishe 等^[36]报道了呋啉-硫酸法,该法是将多糖用硫酸先水解生成葡萄糖醛酸,然后与呋啉显色,即可获得重复性好的结果。此法适于酸性多糖的测定。20 世纪 50 年代,Yemm 等^[37]根据多糖在硫酸的作用下水解成单糖分子,并迅速脱水生成糖醛衍生物这一性质,将其与蒽酮或苯酚缩合生成有色化合物,在适当的波长下比色测定。20 世纪 90 年代,美国公职分析化学家协会将苯酚-硫酸法列为标准方法。上述 3 种比色法都只是测量总多糖量,不能排除还原性杂质(包括单糖)的干

扰。董文慧等^[38]在以上3种方法的基础上,找到了一个能消除还原性杂质干扰的方法——3,5-二硝基水杨酸法(DNS)。用旋涡混合器进行醇沉淀分离,在碱性条件下用过氧化氢处理,获得满意结果。为了简化操作,改用以水解前测得值校正水解后测定值,也可达到消除杂质干扰的效果。

3.2 滴定法

费林反应早已应用于多糖的定性分析,后被发展为多糖的定量分析。此法虽然快速,但需在沸腾状态下滴定,温度、滴定速度等因素影响较大,而且不能排除还原糖的干扰。周学敏等^[39]在前人工作的基础上报道了一个间接碘量滴定法。根据多糖气相色谱分析结果,按多糖各单糖组分比例制备混合单糖标准液,制备工作曲线,测定多糖量。实验证明,本法可消除样品中还原性杂质对多糖测定的影响,本身的颜色对测定基本无干扰,而且简便快速。在多糖的测定中,要得到相应多糖的标准品较困难,以上报道的各方法都是采用葡萄糖代替标准品,测定样品多糖的相对量。因此,间接碘量滴定法所测结果更接近实际多糖的量。

3.3 气相色谱法(GC)

GC测定多糖,具有选择性好、样品用量少、分辨率高、灵敏等优点,在国内外得到了广泛应用。由于糖类本身没有足够的挥发性,需将其转化为挥发性衍生物才能进行GC测定,对于多糖,需先将其降解为结构简单的单糖或寡糖,再衍生成易挥发、热稳定的衍生物,再对降解糖的衍生物进行定性、定量测定。一般是将多糖酸水解或甲醇解(用盐酸-甲醇),用三甲基硅烷基化法(TMS)或三氟乙酰化法(TFA)转化为硅烷化产物或乙酰化产物进行GC分析。但乙酰化之前,糖先用 KBO_4 或 NaBH_4 还原剂还原成开链的糖醇化合物较好。康学军等^[40]以三氟乙酸水解白芷多糖,衍生化生成糖腈乙酸酯衍生物,采用OV-101毛细管柱,进样温度为210℃,检测器温度为240℃,程序升温,从白芷多糖中得到木糖、甘露糖、葡萄糖等7种单糖。

3.4 高效液相色谱法(HPLC)

HPLC已经成为分析糖类物质最主要的方法。糖的传统检测方法采用柱后反应和可见光检测器检测,将糖衍生化后进行色谱分离,而后采用紫外、荧光、示差折射检测器(RID)直接测定,但灵敏度较低且不能用于梯度洗脱。近年来,蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种新型的通用检测器,对挥

发性组分和难挥发组分都能产生响应,弥补了紫外、荧光、RID等检测器的不足,可用于多糖的直接检测。HPLC主要用于对多糖的分离纯化、组分分析、定量分析、相对分子质量的测定等。HPLC分析多糖常用的流动相有水和乙腈、甲醇的二元混合溶液或三元混合溶液,其配比视组分的多少、相对分子质量范围、结构组成等而定,还可以采用梯度洗脱改善分离、缩短分析时间。池玉梅等^[41]用HPLC法,对白木多糖PSAM-1、PSAM-2进行测定。实验条件为柱温40℃,流动相为水,体积流量为0.8 mL/min,漂移管温度为120℃,气流量为3.4 L/min,灵敏度为26。结果显示均为单一对称峰,并计算得到PSAM-1和PSAM-2的相对分子质量分别为 1.36×10^5 和 1.04×10^5 。

3.5 高效毛细管电泳法(HPCE)

HPCE是20世纪80年代发展起来的一种新型的分离分析技术,其以快速、高效、灵敏度高、所需样品少和污染小等优点被广泛用于各个领域,主要集中于多糖分离和定量分析方面^[42]。由于糖类物质一般缺少生色基团,用HPCE测定糖类物质一般都需要进行柱前衍生化。常用的衍生化试剂有还原性胺类衍生化试剂,如氨基吡啶、2-氨基苯甲酸等,一般只能用于还原糖(如醛糖)的衍生;与氨基糖反应的衍生化试剂,如1,2-二氯芳香化合物、苄甲氧基羰基氯;以及1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)或醛酮物质。多糖的高效毛细管电泳研究目前尚处于探索阶段。

4 展望

经过一个多世纪的发展,多糖的研究已取得了重大的进展,各种分析技术在多糖的提取、纯化、定量中得到应用,发现了许多具有重要生理活性的多糖,研究的广度和深度得到了不断发展。但与蛋白质和核酸的研究发展相比,糖类研究还远远滞后,目前对于多糖的研究大部分还处于实验研究阶段,很多理论和实际问题还有待解决,如多糖结构复杂、种类繁多,分离提取困难,多糖制剂主要为粗制品,质量难以控制,难以进入国际市场等。因此进一步提高检测方法的水平和分析的灵敏度、准确性显得至关重要。随着科学技术的不断发展,多糖的分析方法将会有较大的突破。多糖的研究将成为分子生物学、药物学、食品学等不可缺少的组成部分,植物多糖作为药物和保健食品将为人类的健康和安全提供更为有力的帮助。

参考文献

- [1] 李心群, 许文. 猪苓多糖通过 Toll 样受体 4 对小鼠骨髓来源树突状细胞作用研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 118-123.
- [2] 常改, 杨溢出, 霍飞, 等. 植物多糖的研究进展及保健功能 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(11): 1394-1395.
- [3] 马玉瑕, 陈新, 邓军娥. 中药多糖研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(6): 360-361.
- [4] 周程艳, 艾凌艳, 王美, 等. 杜仲多糖抗肝纤维化作用的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 324-329.
- [5] 陶遵威, 郑奇, 邸明磊, 等. 植物多糖的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 148-152.
- [6] 张洪建, 杨琳, 李幼平. 海带多糖药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 217-219.
- [7] Yang Y F, Feng J Q, Xu H Y, et al. Influence of different extraction and purification methods on astragalus polysaccharides and pharmacological evaluation [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 21(1): 54-61.
- [8] Frnanz G. Polysaccharides in pharmacology, current application and future concepts [J]. *Planta Med*, 1989, 55(6): 493-497.
- [9] 蔡莉, 朱江. 黄芪多糖研究现状与进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(15): 896-900.
- [10] 谢明勇, 聂少平. 茶叶多糖的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 107-113.
- [11] 仰榴青, 徐佐旗, 吴向阳, 等. 银杏多糖的研究进展 [J]. 食品科学, 2004, 25(11): 372-375.
- [12] 苏旭春, 梁傍顺, 邬晓东, 等. 黄芪多糖对化疗后气虚证患者青紫舌的改善作用 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 106-107.
- [13] 杨云, 田润涛, 冯卫生, 等. 大枣渣多糖制备工艺的研究 [J]. 林产化学与工业, 2004, 24(3): 91-94.
- [14] 杨悦, 石森林, 葛卫红. 多糖的化学研究概况 [J]. 中国药师, 2008, 11(1): 93-95.
- [15] Rice K G, Wu P G, Brand L, et al. Experimental determination of oligasaccharide three dimensional structure [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1993, 3: 669.
- [16] 张峥, 耿芳宋, 高华. 猪软骨中硫酸软骨素的分离纯化 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(3): 144-146.
- [17] 张勇, 焦扬, 李鹏, 等. 锁阳中多糖提取工艺研究 [J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2004, 25(3): 16-18.
- [18] 韩慧敏, 谢安, 罗杰英. 海参多糖提取工艺研究 [J]. 湖南中医杂志, 2001, 16(1): 56-57.
- [19] 郑必胜, 蔡妙言. 微波提取技术在中药及天然产物有效成分提取中的应用 [A]. 第二界中药提取技术(国际)研讨会论文集 [C]. 西安: 第二界中药提取技术(国际)研讨会, 2005.
- [20] 王晋, 杜华, 王鲁石. 淡竹叶多糖的超声提取及含量测定 [J]. 中成药, 2004, 26(12): 1067-1068.
- [21] 向东, 王国政, 赖凤英, 等. 活性炭对南瓜粗多糖液的脱色研究 [J]. 河南科学, 2004, 22(6): 780-782.
- [22] 王延兵, 吕鹏, 张长铠. 九州虫草菌丝体多糖 Ck1-A 的纯化及其性质研究 [J]. 菌物系统, 2003, 22(3): 452-456.
- [23] 尹源明, 何国庆. 大麦中活性多糖提取的研究 [J]. 中国粮油学报, 2002, 17(1): 43-45.
- [24] 李知敏, 王伯初, 周菁, 等. 植物多糖提取液的几种脱蛋白方法的比较分析 [J]. 重庆大学学报, 2004, 27(8): 57-59.
- [25] 郭辉, 李善玲, 张红旭, 等. 红毛五加粗多糖脱蛋白工艺比较 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(6): 53-55.
- [26] 马丽, 覃小林, 刘雄民, 等. 不同的脱蛋白方法用于螺旋藻多糖提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(6): 116-119.
- [27] 韩伟, 邓修, 周永传, 等. 中药提取新方法的应用研究 [A]. 第二界中药提取技术(国际)研讨会论文集 [C]. 西安: 第二界中药提取技术(国际)研讨会, 2005.
- [28] 刘芳, 刘桂友, 周晶, 等. 冬凌草多糖 RPPSIIa 的分离纯化及其性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 241-243.
- [29] 杨立明, 王永中. 柴胡多糖的制备及部分理化性质测定 [J]. 安徽农业技术师范学院学报, 2000, 14(3): 27-29.
- [30] 马秀俐, 赵德超, 孙允秀, 等. 西洋参多糖 PPQI-1~4 的分离和表征 [J]. 中草药, 2000, 31(3): 165-167.
- [31] 刘成梅, 付桂明, 游海, 等. 百合多糖的纯化与化学结构鉴定研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(5): 114-117.
- [32] 杨云, 刘翠平, 王浴铭, 等. 山茱萸多糖的化学研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(10): 614-617.
- [33] 谭晓梅, 房信胜. 超滤法精制当归多糖的研究 [A]. 第二界中药提取技术(国际)研讨会论文集 [C]. 西安: 第二界中药提取技术(国际)研讨会, 2005.
- [34] Kazufusa S, Yozo K, Toshihiko T, et al. Separation of chondroitin sulfate and hyaluronic acid fragments by centrifugal precipitation chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 922: 365-369.
- [35] 陶遵威, 郑奇, 邸明磊, 等. 植物多糖的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 148-152.
- [36] Dishe Z A. New specific color reaction of hexuronic acid [J]. *Biochemistry*, 1947, 167: 189.
- [37] Yemm E W, Willis A J. The estimation of carbohydrate in plants by anthrone [J]. *Biochemistry*, 1954, 57: 508.
- [38] 董文慧. 云芝肝泰中云芝多糖的工业分析方法 [J]. 中成药, 1990, 12(2): 33.
- [39] 周学敏. 槐耳多糖的含量测定 [J]. 中草药, 1993, 24(3): 127.
- [40] 康学军, 曲见松. 白芷多糖中单糖组成的气相色谱分析 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 891-894.
- [41] 池玉梅, 李伟, 文红梅, 等. 白术多糖的分离纯化和化学结构研究 [J]. 中药材, 2001, 24(9): 647-648.
- [42] 丁侃, 方积年. 多糖类药物的毛细管电泳分析方法及其应用 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(5): 332-335.