

## 多糖分离纯化方法及应用实例

### 多糖的应用现状

近 20 年来,随着天然药物化学、药理研究的不断深入即分析手段突飞猛进的发展,多糖的研究引起了国内外许多学者极大的兴趣。研究表明,多糖具有复杂的多方面的生物活性和功能,特别是对机体免疫功能的作用。现在多糖已成为天然药物及保健品研发中的重要组成部分。

作为药物的多糖在治疗肿瘤时,不像一般化疗药物直接杀死生长着的肿瘤细胞,而是促进细胞和体液免疫反应,如激活补体、巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞或加强抗体生成等,以达到抑制和消灭肿瘤细胞的作用,对正常细胞影响很小。

例如:紫草和枸杞多糖具有抗突变、抗衰老和增强免疫功能的作用;枸杞多糖等可抵抗自由基过氧化;香菇、商陆、松果、柴胡和云芝多糖可激活巨噬细胞,从而抑制肿瘤生长;从三七、防风、甘草和刺五加中提取的多糖类化合物能激活网状内皮系统,发挥抗肿瘤作用;灵芝多糖通过活化巨噬细胞和蛋白激酶 C (PKC) 而发挥免疫增强作用等。目前,已有部分天然多糖类化合物用于临床,显示出良好的疗效,多糖在治疗肿瘤、代谢及感染性疾病等方面的应用仍在不断扩大,给近代肿瘤、艾滋病及其他疾病的治疗开辟了新的方向。

因此,许多学者也纷纷开始研究多糖,而多糖的分离纯化也成为了研究多糖不可或缺的步骤。选择合适的分离纯化多糖填料尤为重要。

### 多糖的分离方法

尽管多糖来源不同、品种繁多,但其分离纯化的方法基本类似,主要是利用多糖溶于水或酸、碱、盐溶液,而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂的特点。提取时,一般应先将植物原料脱脂和脱色素,然后以水为主体溶剂(如冷、热或稀的酸、碱溶液)提取多糖。提取液以醇、丙酮等沉淀析出,所获得的粗多糖需经反复溶解与醇析。对于含糖多的苷类也可采用此法得到总苷。

2009-8 volume30

糖类提取之后需要进一步除去大量的非糖杂质,再进行混合糖类的相互分离,这是一项比较困难的工作,尤其是多糖类难以获得纯品。一般可采用下列方法分离纯化混合多糖。其中柱层析法是目前采用比较多的方法。

## 部分沉淀法

### ● 金属盐沉淀法

提取液中加入中性醋酸铅可沉淀去除大部分酸性、酚性的杂质(如有机酸、氨基酸、蛋白质、树脂酸、黄酮、蒽醌、鞣质等),包括酸性多糖。而用碱式醋酸铅对多糖的沉淀就更为完全。除去杂质后的母液用 $H_2S$ 脱盐后,单糖、低聚糖和水溶性较大的中性苷类仍保留在滤液中。铅盐沉淀法除去杂质比较完全,母液脱铅后可用于单糖和低聚糖的定量,也可用铜盐沉淀法提取多糖。

### ● 季铵盐沉淀法

季铵类氢氧化物是一类乳化剂,可与酸性糖形成不溶性沉淀,常用于分离酸性多糖。季铵氢氧化物与中性多糖不生成沉淀,但当调高PH,使某些OH基解离,或加硼酸缓冲液增高糖的酸度,中性糖也能被沉淀。利用季铵氢氧化物在酸性、中性、微碱性、碱性中分级沉淀可以分离多糖。

### ● 甲醇分级沉淀法

常用的分级沉淀法是在混合多糖的浓水溶液中(常在PH=7时),逐步加入乙醇,收集不同醇浓度下析出的沉淀。一般各次沉淀需经反复溶解后,再醇析,直到测得的物理常数恒定,最常用的是旋光度测定和电泳检查。用分级沉淀法得到的多糖,常杂有较多的蛋白质,必须予以去除。一般选择那些使蛋白质沉淀而使多糖不沉淀的试剂来处理,如酚、三氯乙酸、鞣酸等。但必须处理时间短,温度低,避免多糖降解。

## 透析、超滤及超速离心

选用不同规格的超滤膜和透析带进行超滤和透析,以及一定条件下的超速离心操作,可按分子大小差异把多糖样品分级。超滤和透析更常用于除去小分子物质。

2009-8 volume30

## 制备性区域电泳

在电场作用下,不同的多糖按其分子大小、形状及其所带电荷的不同而达到分离。载体通常是玻璃粉。电泳完毕后,将玻璃粉载体推出柱外,分割后分别洗脱。此法分离效果较好,但只适于实验室小规模应用。常用的有聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维塑膜电泳。

## 柱层析法

### 凝胶过滤层析

它是根据多糖分子的大小和形状不同而达到分离的目的,已用于各种植物淀粉中直链和支链多糖的分离。常用的凝胶色谱分离材料主要有葡聚糖凝胶(sephadex G、sephadex LH-20),琼脂糖凝胶(sepharose),纤维素凝胶(cellufine GCL-2000),聚丙烯酰胺凝胶(Bio-gel P)等。在色谱分离时,大分子的多糖比小分子先洗下来。对于分子量较大的多糖,选择的sephadex G类对应的凝胶型号一般为sephadex G-100、sephadex G-150、sephadex G-200,这些都属于比较软的一些凝胶(其中sephadex G-200由于太软已经停止生产),这时,可以考虑用Cellufine GCL-2000代替,此填料的基材为纤维素,机械强度高,且它的分子量范围较宽,比较适合多糖的分离。

### 离子交换层析

阴离子交换柱层析法是目前在多糖纯化中应用最普遍的一种方法,特别是对于体积较大的多糖溶液,大多数首先采用阴离子交换柱层析。通过柱层析,多糖溶液得到浓缩及初步纯化(有的多糖通过该步骤即可得到各种均一多糖组分)。至今应用的阴离子交换剂有DEAE-纤维素(DEAE-cellulose),DEAE-葡聚糖(DEAE-Sephadex)及DEAE-琼脂糖(DEAE-Sephadex) 3种,其中以DEAE-纤维素应用得最为广泛。DEAE-cellulose具有开放性的骨架,多糖能自由进入载体中并进行迅速扩散。

阴离子交换柱层析适合于分离各种酸性、中性多糖以及粘多糖。其分离机理不是单一的离子交换,而是吸附与解吸附,所以其不仅可应用于中性多糖与酸性多糖的分离,也可应用于不同

中性多糖的分离。一般在pH值为6时,酸性多糖能吸附于AIER上,中性多糖不吸附,然后用pH值相同、离子强度不同的缓冲液将酸性多糖分别洗脱下来,但如果柱为碱性(即OH-型),则中性多糖也能吸附。另外,某些多糖还能与硼酸形成络合物,采用硼酸型AIER或硼酸溶液作流动相,从而使糖类物质能在AIER上进行分离纯化。如黄芪用水提取,经Pb(OAc)<sub>2</sub>沉淀除去蛋白质,加乙醇可使多种糖沉淀出来。粗多糖再溶于水,通过硼酸型DEAE-纤维素柱,以0.01mol/L硼砂溶液洗脱,再用乙醇、丙酮处理,可得黄芪多糖成分AG-1。其他黄芪多糖成分如AH-1和AH-2等,也用同样的工艺进行分离纯化。吴亚林等通过DEAE-Sepharose fast flow阴离子交换层析得到纯化的无花果多糖。

## 多糖分离纯化实例

### 香菇多糖的分离纯化研究

#### 实验流程:



#### 实验结果

##### 1、超滤结果

通过两次不同分子量的超滤膜的分离,可以从香菇出多糖中分离出两个组分: LNT I

2009-8 volume30

和LNT II. 其中, LNT I 分子量为100kDa 以上; 而LNT II 的分子量在5kDa 和100kDa 之间; 至于5kDa 以下的多糖由于分子量小, 没有生物活性, 弃去. 通过超滤的方法可以快速高效地将粗多糖分成两个组分, 为进一步纯化提供便利. 而且, 实验证明, 超滤法还有一定的脱色作用.

## 2、DEAE-52 纤维素纯化

取225.667mg 的 LNT I 经DEAE-52 纤维素层析柱, 收集流出液, 并用苯酚-硫酸法测定为多糖含量, 测得其含糖量为59.0318mg, 此为中性多糖 (LNT I a). 再用0.1M-0.5MNaCl 梯度洗脱, 得到的洗脱液经苯酚-硫酸法测定糖分布为单一对称洗脱峰 (图1). 洗脱液即为酸性多糖 (LNT I b). 测得其多糖含量为 83.0016mg. LNT I a 和LNT I b 的糖量之和为 142.0334mg, 得率为62.94%. 从色泽上看, 香菇粗多糖为黄褐色液体, LNT I a 和LNT II a 都为无色透明的物质; LNT I b 和LNT II b都为淡黄色物质, 说明DEZE-纤维素层析柱具有较好的脱色效果.

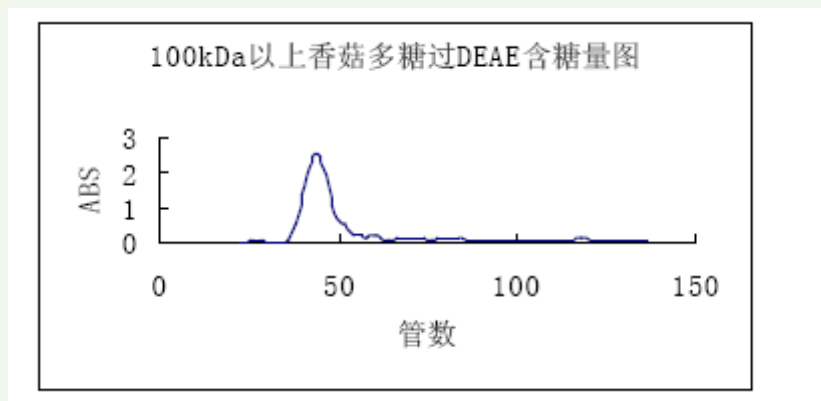


图1 苯酚-硫酸法测100kDa 以上酸性多糖含量图

## 3、Sephadex G-200 凝胶柱层析

将LNT I b 组分过Sephadex G-200 凝胶层析柱, 得到色谱 (图2). 色谱图中只出现一个峰, 这说明, 该组分中可能只有一种蛋白. 用部分收集器收集下来的收集液苯酚-硫酸法测得单一糖洗脱峰 (图3). 对比图2 和图3, 发现两者的峰的形状相似, 出峰的时间也基本相同. 这说明, LNT I b 很可能是蛋白多糖.LNT I b 过完Sephadex G-200 凝胶柱后的糖含量为 43.179mg, 得率为52.02%; 冻干后, 干粉重41.256mg, 可知LNT I b 组分的多糖含量为95.55%.

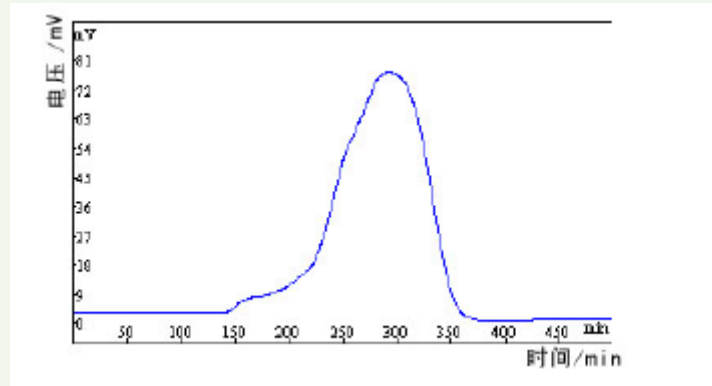


图2 100kDa 以上酸性糖过G200 凝胶柱层析色谱图

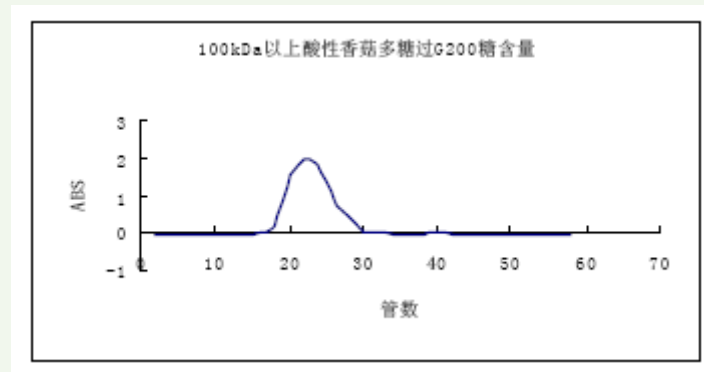


图3 苯酚-硫酸法测100kDa 以上酸性多糖含量图

#### 4 多糖的纯度鉴定

取LNT I b 组分进行电泳检测，并分别进行糖染和银染。在银染电泳图谱和糖染电泳图谱都呈现单一条带，且两条带的位置基本相同，这说明LNT I b 为单一成分，纯度较高，而且也证实了LNT I b 为蛋白多糖的假设。

#### 实验结论：

1 利用超滤法快速分离多糖的不同组分，再分别对这些组分利用DEAE-52 纤维素层析进一步纯化，最后用Sephadex G-200 凝胶柱层析和聚丙烯酰胺凝胶连续电泳检测多糖纯度。建立了一套高效快速的香菇多糖提取方法。通过上述方法，从香菇浓缩液中纯化的LNT I b 的多糖含量为95.55%。

2 通过Sephadex G-200 凝胶柱层析和聚丙烯酰胺凝胶连续电泳检测，可以证实LNT I b 为蛋白多糖。

## 学习园地

凝胶过滤填料 GCL-2000 可用于分离多糖，且分离范围较宽，GCL-2000 应该如何装填？

### 柱子装填

- 1、计算所需填料体积
- 2、使用合适的缓冲液，准备浓度为 40%-60%的匀浆液。
- 3、关闭出口，小心向层析柱倾倒匀浆液。根据柱体积，一个灌装管可能是必须的。
- 4、插入并固定顶端调节器放置在匀浆液表面。
- 5、打开泵出口，开启泵，缓冲溶液以高于操作流速的 10%-20%的流速流过层析柱。
- 6、柱床稳定后，关闭柱子出口，调节柱床顶端调节器的位置。

### 平衡

用 2-5 柱体积的缓冲溶液冲洗柱子，或者直至基线稳定即可。

### 样品的准备和上样量

通常来讲，样品用缓冲溶液溶解，通过过滤的方法去除一些不溶物。根据柱体积计算上样量。如果是分级分离，达到较高的分辨率，上样量一般为柱体积的 0.1%-1.0%，如果是一般的制备分离，上样量可高达柱体积的 5%。对于缓冲溶液的置换或者脱盐，上样量为柱体积的 15%-25%。样品蛋白质的浓度应该是 1-20mg/ml。

### 流速

建议的线性流速的范围是 5-50cm/h.

### 洗脱

如果是缓冲溶液置换，要确保在上样之前，用要求的缓冲溶液平衡层析柱。

### 再生

用 5 倍柱体积的 0.1M 的 NaOH 以 5-50cm/h 的流速冲洗柱子。通过用数个柱体积的 DIW 或是缓冲溶液冲洗层析柱来去除腐蚀剂。然后，测定柱子的 PH 值，确保系统已经回复到平衡状态。

2009-8 volume30

**保存**

对于短期保存（小于等于两周）可以贮存在有 0.02%叠氮化钠,20%乙醇。0.1MNaOH 的 DIW 中。

对于长期，应保存在 4-8℃的条件下。不要冷冻。

**有效期**

5 年

北京总公司：

地址：北京回龙观西大街龙冠大厦 719 室  
邮编：102208  
热线：(10)-51528296, 51528297, 51528298,  
传真：(10)-51528299  
邮箱：sales@prep-hplc.com  
网站：www.prep-hplc.com

上海办事处：

地址：上海张江益丰路 55 弄春港丽园 67 号 201 室  
邮编：201203  
电话：021-58950178  
传真：021-58950178