

HIGH QUALITY & EXPERT

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 128 期

糖类的分离纯化及 HPLC 分析



2020 年 3 月

第 128 期 糖类的分离纯化及 HPLC 检测

Part one 多糖

多糖 (Polysaccharides, PS), 又称多聚糖, 是由 10 个以上的单糖通过苷键连接而成的, 具有广泛生物活性的天然大分子化合物。它广泛分布于自然界高等植物、藻类、微生物 (细菌和真菌) 与动物体内。20 世纪 60 年代以来, 人们逐渐发现多糖具有复杂的、多方面的生物活性和功能:

(1) 多糖可作为广谱免疫促进剂, 具有免疫调节功能, 能治疗风湿病、慢性病毒性肝炎、癌症等免疫系统疾病, 甚至能抗 AIDS 病毒。如甘草多糖具有明显的抗病毒和抗肿瘤作用, 黑木耳多糖、银杏外种皮多糖和芦荟多糖可抗肿瘤和增强人体免疫功能。

(2) 多糖具有抗感染、抗放射、抗凝血、降血糖、降血脂、促进核酸与蛋白质的生物合成作用。如柴胡多糖具有抗辐射, 增强免疫功能等生物学作用, 麦冬多糖具有降血糖及免疫增强作用, 动物黏多糖具有抗凝血、降血脂等功能。

(3) 多糖能控制细胞分裂和分化, 调节细胞的生长与衰老。如爬山虎多糖具有抗病毒和抗衰老作用, 银杏外种皮粗多糖具有抗衰老、抗过敏、降血脂、止咳祛痰、减肥等功能。

一、粗多糖的制备

生物体中的多糖, 通过用热水提取, 乙醇沉淀, 色素和蛋白质的去除, 最终获得精制的粗多糖, 下边是对关于精制粗多糖的具体介绍。

1.1 多糖的提取

表1 显示的是从真菌、藻类和高等植物中提取制备粗多糖的过程。总体而言, 从真菌、藻类和植物中提取多糖的方法以水提法为主, 也有采用酶解的方法进行提取, 但是还是存在一些差异。对于真菌而言, 需要先发酵, 然后用不同温度的热水进行提取。对于植物, 则根据提取部位不同, 如根、茎、叶、果皮、果肉、种子或整个植物, 方法略有差异。比如从茎、叶子、果皮和整棵植株中提取多糖, 由于这些部位常含有色素和一些脂类物质, 所以在提取前, 常会选择用乙醇、丙酮、甲醇或石油醚进行预处理, 以便除去一些脂类、色素和小分子物质, 然后再用热水进行提取。相比而言, 果肉和根部所含色素等小分子物质较少, 则常常直接用高温的水进行提取。对于藻类, 因其中也会含有不同类型的色素, 也会先用有机溶剂去除色素和小分子物质, 然后再用热水进行提取。表1显示真菌、藻类和高等植物的多糖的沉淀剂大多是乙醇, 也有个别采用丙酮。

表1 粗糖的制备

属类	研究对象	粗糖的制备
真菌	大杯香菇	热水提取→Sevag法去除蛋白→乙醇沉淀→冷冻干燥
	冬虫夏草	热水提取→乙醇沉淀→活性炭去色素→Sevag法去除蛋白 →乙醇沉淀→冷冻干燥

	杏鲍菇	沸水提取→乙醇沉淀→冷冻干燥
植物	荷叶	95%乙醇去除小分子→沸水提取→乙醇沉淀 →Sevag法去除蛋白→冷冻干燥
	心叶青牛胆	甲醇去除小分子→丙酮沉淀→三氯乙酸去除蛋白
	石斛粉末	丙酮和甲醇去除小分子→热水提取→乙醇沉淀
	荔枝果肉	乙醇去除小分子→热水提取→乙醇沉淀→冷冻干燥
	龙葵	石油醚和乙醇去除小分子→蒸馏水提取→乙醇沉淀
藻类	海带	石油醚去除小分子→热水提取→乙醇沉淀 →Sevag法去除蛋白→透析→冷冻干燥
动物	乌贼墨汁	上清液用木瓜蛋白酶酶解蛋白→沸水使酶失活 →Sevag法去除蛋白→乙醇沉淀

1.2 多糖中杂质的去除

粗多糖中往往混杂着蛋白质、色素、低聚糖等杂质，必须分别除去。

1.2.1 蛋白质的去除

去除蛋白质常用的方法有Sevag法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法、酶解法等。其中以Sevag法最常用，Sevag试剂是由一定比例的氯仿和正丁醇试剂组成，通常选择氯仿:正丁醇=4:1 (v/v)。为了将蛋白尽可能多的去除，往往需要数次重复操作。另外，该方法很难将结合蛋白去除，往往是除去蛋白的同时，多糖也损失掉了。因而采用Sevag法去除蛋白存在以下几个缺点：（1）有机试剂用量大；（2）试剂毒性大，污染严重；（3）效率低等缺点。近年，有些研究者采用酶解和经典方法相结合来去除蛋白，该方法是在提取的过程中先加入合适的蛋白酶，将蛋白和多糖分离开，再采用Sevag法去除蛋白，该方法既提高了多糖的提取率，又减少了有机溶剂的使用。

1.2.2 色素的去除

从生物体内提取的多糖，尤其是从植物的茎、叶和果皮中提取的多糖往往含有大量的色素，这些色素严重影响着多糖的品质。目前，去除这些色素的方法主要有三种：（1）通过柱层析的方法进行去除色素，例如大孔树脂罗门哈斯的FPA98Cl。（2）通过吸附法去除色素，例如活性炭。（3）通过氧化法去除色素，例如低浓度的H₂O₂。

1.2.3 小分子的去除

尽管在从生物体中提取多糖时，很多研究者选择用乙醇、丙酮、甲醇或石油醚进行预处理，但是经过乙醇沉淀，蛋白和色素的去除后，多糖中依然存在很多小分子，尤其是一些无机盐、单糖和寡糖。对于无机盐、单糖和寡糖等小分子物质，可以采用透析法、超滤法等去除。

二、多糖的分离和纯化

经过前期对多糖的提取，去除蛋白质、色素、小分子等物质得到粗多糖，而这些粗多糖其实是由很多分子量、结构不同的多糖混合而成。为了得到纯的多糖即均一性多糖，仍需进一步对这些粗多糖进行

分离纯化。

2.1 分步沉淀法

多糖的结构和分子量不同，其极性大小不同，在有机溶剂（如醇或酮）中的溶解度不同，根据这一原理，可以依此增加醇浓度，从而将多糖按分子量从大到小的沉淀出来。但是分级沉淀法一般得不到均一性多糖。仍需要借助柱层析法等进一步纯化，方可得到均一性的多糖。

2.2 柱层析法

要获得均一性的多糖，一般是先经过阴离子交换柱进行粗步纯化，然后再用凝胶柱进一步纯化。有些多糖也采用大孔树脂柱进行纯化。下面对这三种柱层析法进行详细介绍。

2.2.1 阴离子交换法

一般使用阴离子交换柱对真菌、藻类和高等植物的多糖进行初步分离。阴离子交换色谱常用的介质有DEAE-纤维素、DEAE-琼脂糖凝胶、DEAE-葡萄糖凝胶。最常用的有DEAE-52和DEAE-Sepharose。例如用DEAE-52柱对大杯香菇等菌类、玉米等植物、桑黄等藻类粗多糖进行分离纯化。使用DEAE-52填料进行多糖的初步分离纯化，该柱子一般直径偏大，其中以2.6cm最多，操作过程中流动相的流速也较快，流速一般在0.7-2ml/min之间，以1ml/min最多，至于柱子的长度，选择范围较广，从25-100cm不等。DEAE-Sepharose柱也常被用在对菌类、植物和藻类粗多糖的初步分离纯化中，在选择层析柱的直径、流速和长度的方面与DEAE-52相似。DEAE-52或DEAE-Sepharose柱的流动相都是纯水和不同浓度的NaCl溶液。

2.2.2 凝胶色谱法

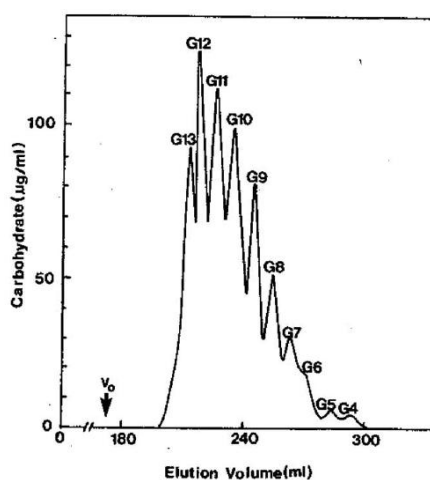
凝胶色谱法根据被分离组分尺寸大小与凝胶的孔径关系实现分离，类似于分子筛的作用。常用的凝胶有葡聚糖凝胶（Sephadex G）、Sephadex LH-20、聚丙烯酰胺凝胶Toyopearl HW等。多糖的进一步分离往往会选择用各种凝胶进行分离纯化。选择使用哪一种凝胶对多糖进行纯化的标准是多糖的分子量，不同种类和型号的凝胶能够分离多糖类型和分子量范围不同。凝胶柱的柱子规格常具有长而细的特点，直径以1.6cm偏多。无论什么类型的凝胶柱，流动相多为蒸馏水或者一定浓度的NaCl溶液。

东曹的Toyopearl HW填料骨架为含羟基的亲水性聚甲基丙烯酸树脂，由于不含糖基，与其他做多糖的填料相比，不会和糖类样品发生非特异性相互作用。

TOYOPEARL	分子量排阻范围		Sephadex
	右旋糖酐	蛋白	
HW-40	100 – 7,000	100 – 10,000	LH-20, G-25
HW-50	500 – 20,000	500 – 80,000	G-75, G-100, G-150
HW-55	1,000 – 200,000	1,000 – 700,000	G-100, G-200
HW-65	10,000 – 1,000,000	50,000 – 1,000,000	6B, 4B
HW-75	100,000 – 10,000,000	500,000 – 50,000,000	4B, 2B

化合物	TOYOPEARL填料	备注
酸性环糊精 / Acidic cyclodextrin	SP-650C, HW-40F	专利
酸性寡糖 / Acidic oligosaccharide	DEAE-650M	1-100 mM KCl梯度
抗肝炎多糖 / Anti-hepatitis polysaccharide	DEAE-650C	专利
支链低聚果糖 / Branched fructooligosaccharide	HW-40S	专利
致癌物抑制剂 / Carcinogen promoting inhibitor	HW-65F	专利
性腺A / Gonaderan A	DEAE-650	专利
紫草多糖 / Lithosperman A	DEAE-650	专利
麦芽戊糖苷 / Maltopentoside	HW-40S	流动相: 水
多糖 / Polysaccharide	HW-65F	流动相: 0.1 M NaCl
淀粉 / Starch	HW-75F	
TX-1多糖 / TX-1 polysaccharide	HW-65F	专利

草菇中的蘑菇糖原: 具有抗癌活性



层析柱: TOYOPEARL HW-50S (2.2 cm I.D. x 50 cm) + TOYOPEARL HW-40S (2.2 cm I.D. x 100 cm); 串联
流动相: 0.1 N NaOH 流速: 0.5 mL/min A. Misaki et al., Agric. Biol. Chem., 50 (1986) 2171

2.2.3 大孔树脂柱色谱

大孔树脂柱色谱是利用大孔树脂的选择性吸附作用和分子筛作用分离纯化多糖。比如用AB-8大孔树脂从青钱柳叶中分离纯化出均一性多糖。

2.3 超滤法

超滤是以压力为推动力的膜分离技术,应用膜分离原理将小分子溶质和溶剂除去而留下大分子溶质,从而使大分子物质得到纯化。

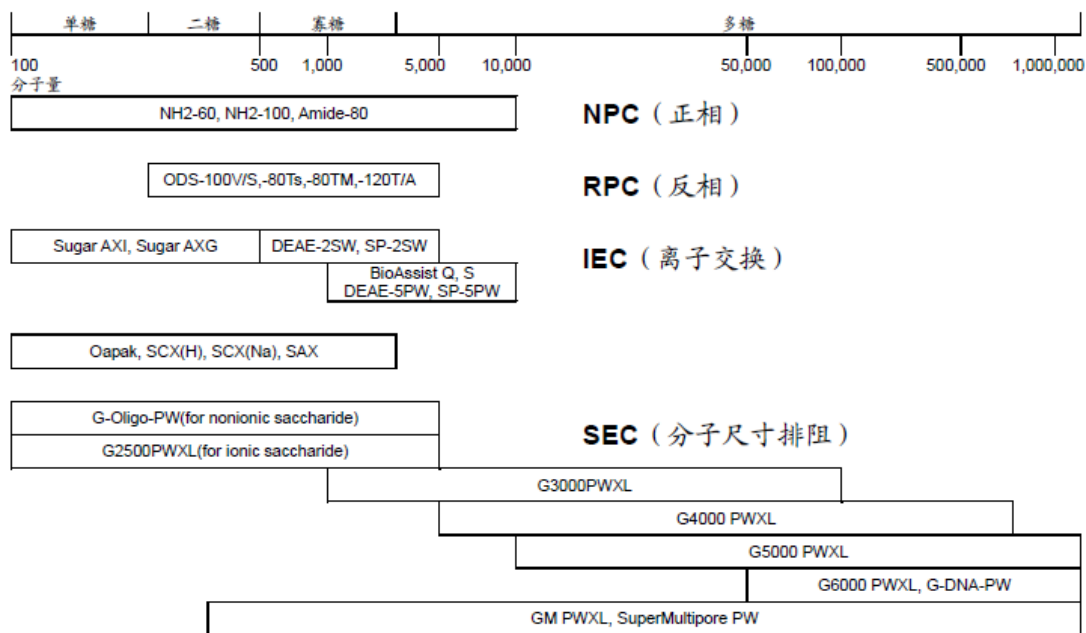
表2 粗糖的进一步分离纯化

属类	对象	填料	流动相	获得的多糖
真菌	大杯香菇粗多糖	DEAE-52(2.6×30cm) → Sephadex G-100(2.6×60cm)	H ₂ O, 0.3,0.45M NaCl→ 0.1M NaCl	均一性多糖 LGPS-1
	杏鲍菇粗多糖	DEAE-52(2.6×40cm) → Sephadex G-100 (1.3×50cm)	H ₂ O, 0.2,0.3,0.5M NaCl →H ₂ O	均一性多糖 IPS-1和IPS-2
植物	荷叶粗多糖	DEAE-52(2.5×50cm) → Sephadex CL-6B (2.5×100cm)	H ₂ O → 0.1M NaCl	均一性多糖 LLP

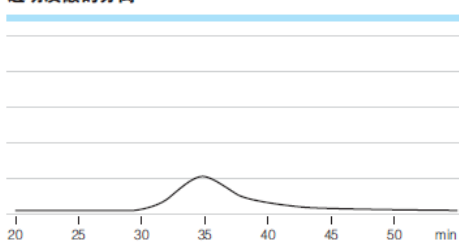
	荔枝果肉粗糖	DEAE-52(2.6×60cm) → Sephadex G-100 (2.0×40cm)	H ₂ O, 0.1,0.2,0.3M NaCl →H ₂ O	均一性多糖 LP1,LP2,LP3
藻类	桑黄粗多糖	DEAE Sepharose FF(2.6×40cm) → Sephacryl S-400 HR (1.5×60cm)	0-0.2M NaCl →H ₂ O	均一性多糖 PL-A11

三、多糖的 HPLC 分析

通常情况下，使用尺寸排阻的柱子，用于多糖的分析。



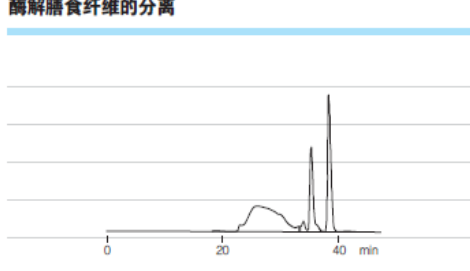
透明质酸的分离



色谱柱: TSKgel G6000PW (7.5 mm I.D. x 60 cm)
TSKgel G5000PW (7.5 mm I.D. x 30 cm)

淋洗液: 0.1 mol/L 磷酸钠水溶液
流速: 0.3 mL/min
温度: 40°C
检测: RI
进样量: 100 μL, 100 mg/L
样品: 透明质酸

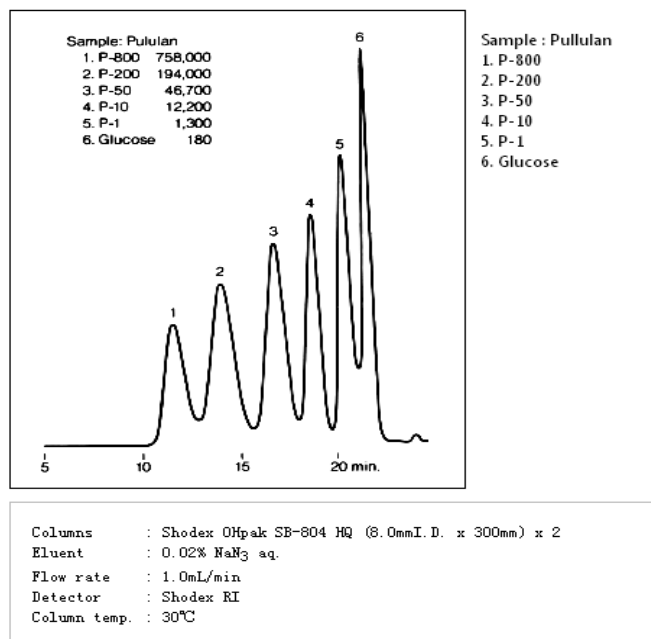
酶解膳食纤维的分离



色谱柱: TSKgel G2500PWx (7.8 mm I.D. x 30 cm x 2)
TSKguardcolumn PWx (6.0 mm I.D. x 4.0 cm)

淋洗液: 水
流速: 0.5 mL/min
温度: 80°C
检测: RI
样品: 难消化性糊精混杂商品

使用水溶性尺寸排阻色谱柱OHpak SB-804 HQ分析普鲁兰(Pullulan)标准品。



四、多糖纯化分析的设备

多糖是由糖苷键结合的糖链，至少要超过10个以上的单糖组成的聚合糖高分子碳水化合物，这类物质的一个显著特点是几乎都没有紫外吸收，或者很弱，在检测手段上有它的独特方法。



1、多糖纯化系统针对多糖没有紫外吸收的特点特别选配原装进口Shodex示差折光检测器和Rheodyne 7725i手动进样阀，保证系统的灵敏度和稳定性。

2、输液泵选配高精度柱塞泵，采用电子阻尼控制(Electrical Dump Control)和多点流量校正技术，有效控制流量脉动，保证最低基线噪声和流量的精准。

设备特点：

- ① 双柱塞设计，压力脉动小，流速稳定；采用进口红宝石柱塞和单向球阀，精度高、寿命长；泵头接触溶液材料为不锈钢或PEEK、红宝石、PTFE，耐受有机溶剂，如氯仿、石油醚等。
- ② 标配UV检测器，搭配钨灯，可实现190-700nm全波长检测。可同时检测两个波长；外置式石英流通池，方便拆卸和清洗，可根据泵的流量更换相应规格流通池，避免因流通池太小而导致背压过高需要分流或流通池太大检测灵敏度降低的问题。
- ③ 除了紫外检测器，可扩展联接其它在线检测器：示差折光检测器、蒸发光检测器、电导检测器等。
- ④ 主要部件均有独立液晶面板，直观显示当前运行参数，所有参数均可通过电脑的操作软件控制或通过面板控制，软件控制保证了操作的简便，面板控制方面，用户据需要与其它仪器或部件灵活组合使用。
- ⑤ QuikSepHG玻璃层析柱，无需工具只需手拧柱头密封，操作简便；四氟和不锈钢柱头设计耐受各种有机溶剂，不锈钢筛网耐用易清洗，耐压玻璃柱管，最高耐受7bar压力。
- ⑥ 柱床可调层析柱，无死体积、可在位清洗，上、下可调柱床高度，规格齐全。
- ⑦ 专用色谱工作软件，功能强大，可设定各种参数及编辑色谱过程、生成报告，实现从分析到制备一体化的工作界面。
- ⑧ 自动组份收集器适用于各种需要对流体组份进行分离后收集的场合，包括高效液相色谱系统、层析系统、生化产品制备及提纯应用等。

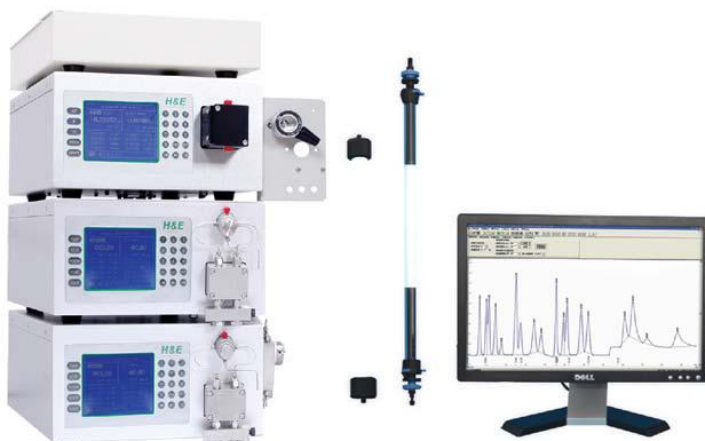
Part two 单糖和寡糖

下面继续把单糖和寡糖的分离纯化也做个简单的介绍。

糖类化合物的分析包括三个步骤，提取、纯化和分析。在糖提取的步骤中，选择水、稀释的碱溶液和有机溶剂在不同的温度下对糖样品进行提取，提取溶剂的选择需要根据目标成本来确定。糖纯化的过程可以使用萃取、分级沉淀、盐析、衍生、酶解、水解、柱色谱（包括纤维素、离子交换树脂、凝胶、HPLC法等）方法。糖分析中，最常用的方法是色谱分离（包括气相色谱法、毛细管电泳和液相色谱法）并与合适的检测技术联用（包括紫外、示差、蒸发光散射、质谱和核磁共振等）。

由于糖类的提取和纯化都是类似的，前面做了详细的介绍，所以单糖和寡糖的提取和纯化步骤，这里就不再赘述了，重点说说单糖和寡糖的高压制备和HPLC分析。

一、高压制备设备



QuikSep 制备型中高压层析系统根据流速范围有50 ml/min至3000ml/min，根据客户对产品制备量的要求，来选择不同型号的系统。

1. QuikSep 系列纯化系统秉承天然产物纯化系统的所有优点，并根据合成产物的特性，要求大量、快速的处理样品，因此在输液泵选择上选用流量更高的型号；
- 2、输液泵单向阀选用特有的PTFE材料，对石油醚、乙酸乙酯、丙酮、氯仿等一些强有机溶剂耐受性更

好，更适合正相体系！

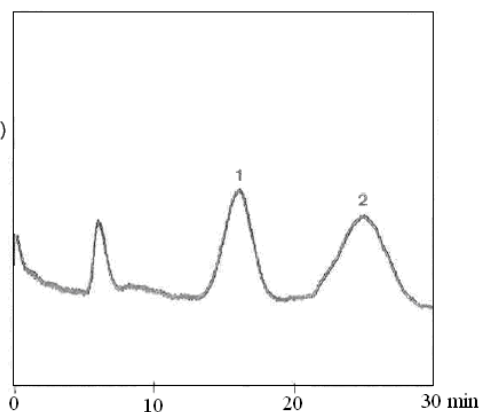
二、单糖、寡糖类样品制备填料的选择----FUJI CHROMATOREX NH SG Silica Gel

迄今为止，大多数糖类的分离介质仅仅局限在分析级别，但是富士硅胶研发出用于制备色谱的新的氨基硅胶。当使用高水相为流动相时，一般的氨基填料会暴露出很多问题。氨基硅胶的pH值很高，一般pH为9.0，在这样高的pH条件下，目标化合物一般都会变性，并且会毁坏硅胶基质的表面。考虑到这些问题，富士公司研发出新的氨基硅胶填料，称之为NH SG硅胶。NH SG硅胶可以最小化甚至是避免上述问题，并且对糖类化合物进行更好的分离。

众所周知，NH官能团会和酮或者羧基发生反应。但是，NH SG硅胶填料可以在有机相/水的流动相体积下分离大多数的糖类化合物，而不发生上述化学反应。NH SG硅胶在正相条件下使用，尤其是亲水相互作用模式（HILIC）。作为典型的HILIC模式，在增加水相比例的条件下，洗脱增强。

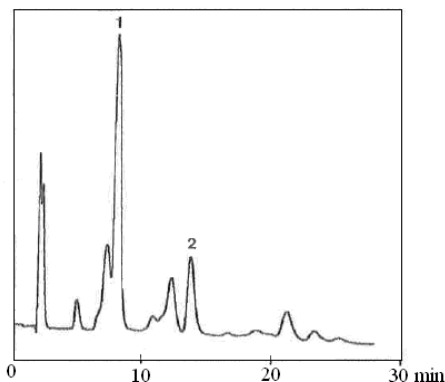
1. 单糖和二糖的分离

Column: 20 x 360 mm glass column
Silica: NH MB100-75/200SG (50g)
Mobile phase: Acetonitrile/H₂O 75/25(w/w)
Pressure: 44 kPa
Flow rate: 16 ml/min
Detection: RI detector
Samples: 1. Fructose
2. Sucrose



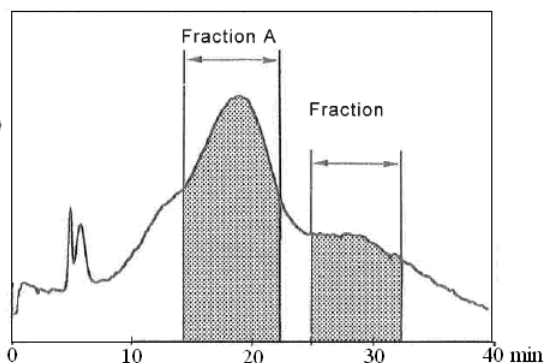
2. 寡糖的分离

Column: 4.6x250mm HPLC column
Silica: NH SPS100-5SG
Mobile phase: Acetonitrile/H₂O 70/30(w/w)
Flow rate: 2 ml/min
Detection: RI detector
Samples: 1. Isomaltose
2. Isomaltotriose

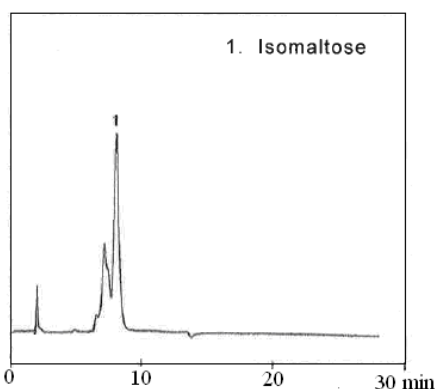


2-1 寡糖的制备

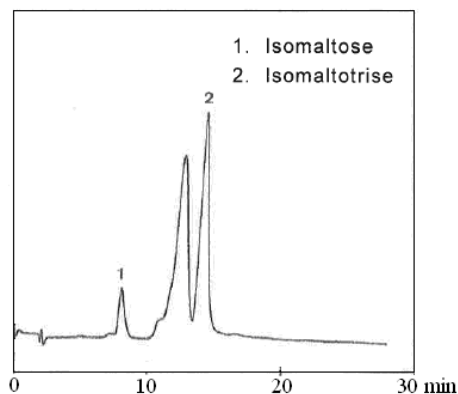
Column: 20 x 360 mm glass column
 Silica: NH MB100-75/200SG (50g)
 Mobile phase: Acetonitrile/H₂O 70/30(w/w)
 Pressure: 73 kPa
 Flow rate: 16 ml/min
 Detection: RI detector



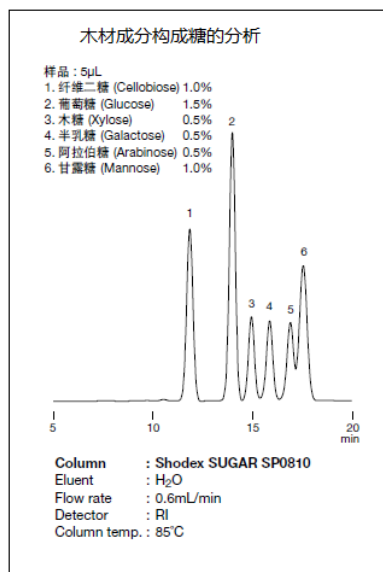
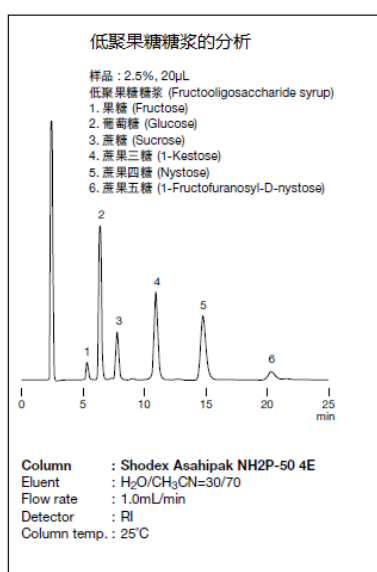
(2-2) Fraction A

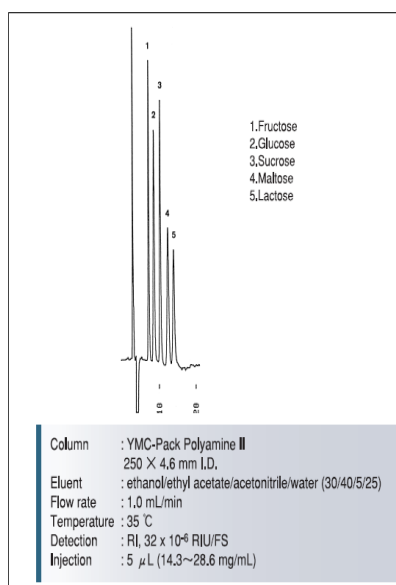
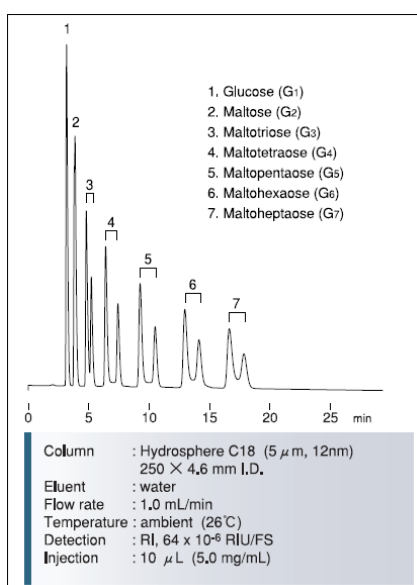
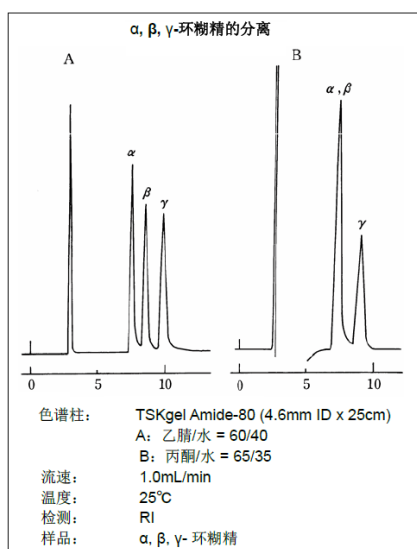
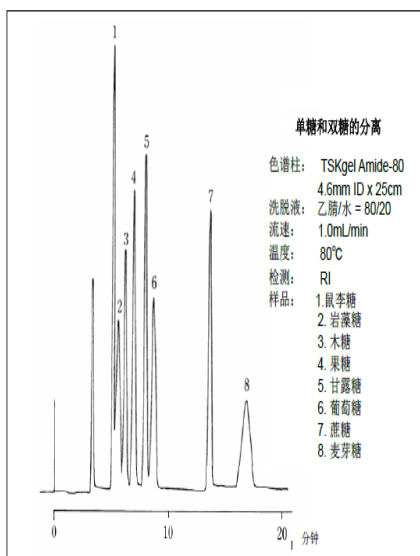


(2-3) Fraction B



三、单糖和寡糖的HPLC分析





北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话 : 010-59812370/1/2/3

公司官网 : www.prep-hplc.com

邮 箱 : sales@prep-hplc.com

微信公众号 : 北京慧德易