

中药多糖成分前处理及检测方法研究进展

周伟娥^{1,2,3}, 周学锋², 王宇阳², 凌云¹, 李平^{2,3*}, 张峰^{1*}

(1. 中国检验检疫科学研究院 食品安全研究所, 北京 100176; 2. 中日友好医院临床医学研究所, 免疫炎症疾病北京市重点实验室, 北京 100029; 3. 中国医学科学院/北京协和医学院 研究生院, 北京 100730)

摘要: 多糖是中药的重要活性成分之一, 具有降血脂、降血糖、增强免疫、抗肿瘤、抗氧化、抗凝血、抗炎症、抗衰老等活性。该类物质具有极性大、分子量高、结构难确证等特点, 成为中药多糖新药开发的瓶颈。该文综述了近10年关于中药多糖成分的前处理及检测方法, 以期对中药多糖定性定量分析, 质量控制水平的提高, 多糖药物深度开发和中药物质基础的全面研究提供参考。

关键词: 中药; 多糖; 前处理; 检测方法

中图分类号: O657; G353.11 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)09-1168-08

Research Progress on Pretreatment and Analysis Methods for Polysaccharides in Traditional Chinese Medicine

ZHOU Wei-e^{1,2,3}, ZHOU Xue-feng², WANG Yu-yang², LING Yun¹, LI Ping^{2,3*}, ZHANG Feng^{1*}

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection & Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Beijing Key Lab of Immune-mediated Inflammatory Diseases, Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 3. Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Abstract: Polysaccharides are one of the important active ingredients in traditional Chinese medicine, which have hypolipidemic, hypoglycemic, immune-enhancing, anti-tumor, antioxidant, anticoagulant, anti-inflammatory, anti-aging activities, etc. It has become a bottleneck for development of new polysaccharide medicines in traditional Chinese medicine as they contain the characteristics of strong polarity, large molecular weight and difficult to confirm for structure. The pretreatment and analysis methods for polysaccharides in traditional Chinese medicine are reviewed in this article, aiming to provide references for qualitative and quantitative analysis of polysaccharide components in traditional Chinese medicine, improvement of quality control, in-depth development of polysaccharide medicines and comprehensive research on the substance basis of traditional Chinese medicine.

Key words: traditional Chinese medicine; polysaccharide; pretreatment; analysis methods

糖类属于多羟基或多羟基酮及其衍生物或聚合物, 包括单糖、寡糖和多糖, 是广泛存在于中药中的有机化合物^[1]。单糖是该类物质的基本单元, 可通过共价键结合生成寡糖和多糖^[2]。其中多糖类化合物具有广泛的生物活性。大量研究表明, 中药多糖具有降血脂、降血糖、增强免疫、抗肿瘤、抗氧化、抗凝血、抗炎症、抗衰老等生物活性^[3], 是近年来中药药效物质基础的研究重点, 具有广阔的新药开发前景^[4]。但该类成分具有极性大、分子量高、结构难确证等特点, 成为中药多糖定性定量分析的难点以及新药开发的瓶颈^[5]。本文综述了近10年关于中药多糖的前处理和检测方法, 前处理方法包括提取方法和分离净化技术, 检测方法包括检测技术以及结构分析技术。其中新型含量检测技术包括高效毛细管电泳法(HPCE)、高效阴离子交换色谱法(HPAEC)、气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC); 新型结构分析技术有傅里叶变换红外光谱法(FTIR)、核磁共振波谱法(NMR)、高分辨质谱法(HRMS)等, 以期对中药多糖定性定量分析和质量控制, 多糖药物深度开发和中药药效物质基础的全面研究提供参考, 以进一步保证多糖药物的临床疗效及安全性。

收稿日期: 2020-05-17; 修回日期: 2020-06-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFF0211000)

* 通讯作者: 李平, 博士, 研究员, 研究方向: 中医药治疗糖尿病肾病, E-mail: lp8675@163.com

张峰, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全与检测分析技术, E-mail: fengzhang@126.com

1 中药多糖前处理方法

前处理技术是为了最大限度地提取、分离、净化和富集中药中的多糖，便于分析检测。但由于多糖极性高、结构易受破坏，且中药基质复杂、干扰物质多，增大了提取和净化难度，加之提取过程中有机试剂的用量较多，所以需寻找一个选择性强、操作简便、提取效率高、绿色环保且稳定的前处理技术解决中药多糖的检测问题。目前，许多前处理技术应用于中药多糖成分的提取、分离和净化，各前处理方法的优缺点见表1，需要根据检测的要求以及多糖性质进行选择。

表1 中药多糖成分的前处理方法及其优缺点

Table 1 The advantages and disadvantages of the pretreatment method for polysaccharide in traditional Chinese medicine

Pretreatment method	Application	Advantages	Disadvantages
热水提取法	提取、分离	设备要求低、操作简单、成本低	共提取杂质多，增加分离纯化难度
酸提法	提取	设备要求低、操作简单、成本低	易造成糖类水解，需控制好pH值
碱提法	提取	设备要求低、操作简单、成本低	易造成糖类水解，需控制好pH值
酶提法	提取	专一性好、提取纯度高	价格昂贵，受温度和pH值影响大
超声辅助法	提取	设备要求低、操作简单、成本低、减少试剂使用、提高提取效率	超声波属于机械剪切力，会造成中药糖类结构的破坏
微波辅助法	提取	设备要求低、操作简单、成本低、减少试剂使用、能耗低、提高提取效率	微波热效应会造成水分迅速蒸发，阻碍糖类的溶出且高温会造成糖类结构的改变和分解
高压脉冲电场辅助法	提取	传质快速、能耗低、减少试剂使用、提取效率高、低成分污染	多糖提取中应用较少
动态高压微射流辅助法	提取	提取时间短、提取效率高、绿色环保	快速碰撞、瞬时切割、瞬间压力降低的作用易切断糖链
加速溶剂萃取法	提取、分离、净化	萃取迅速、自动化程度高、萃取剂使用较少	高温高压条件易破坏中药糖类的结构和生物活性
超临界流体萃取法	提取、分离、净化	萃取效果好、效率高、绿色环保	设备价格昂贵、耗时长
柱层析法	分离、净化	设备简单、可分离净化富集组分	操作较繁琐
透析法	分离、净化	设备简单、无污染、能耗低，且不破坏中药多糖的生物活性	需与提取方法结合应用
超滤分离法	分离、净化	无需高温、操作简便、能耗低，不破坏中药糖类活性	易产生膜污染和堵塞

1.1 提取方法

1.1.1 传统提取方法 热水提取法^[6]、酸碱提法^[7-8]、酶提法^[9]、超声辅助法^[10]、微波辅助法^[11]等属于中药多糖传统的提取方法，均以极性溶剂提取为基础。这些技术主要是将中药进行粉碎、过筛等处理后，以水、乙醇等极性溶剂提取，并利用水浴加热、振荡、超声、微波、加酶、加酸碱等提高提取效率。如王锋等^[12]将灵芝粉碎，过60目筛后，采用5% NaOH溶液进行超声辅助提取，再用热水浴浸提后获得灵芝粗多糖，采用苯酚-硫酸法测得多糖含量为67.8 mg/g，提取效率为单纯热水提取法和超声辅助提取法的1.5~3.0倍。可见酸碱溶液可以提高酸性糖类的提取效率且纯度较高，并利于糖类与蛋白质间结合型的转化。此外，酶提法易受提取时间、提取温度和pH值等因素的影响，主要通过单因素、正交实验和响应面法等试验设计优化提取工艺^[7]。丁霄霄等^[13]采用水浴加热，石油醚除脂，用纤维素酶、木瓜蛋白酶和半纤维素酶复合酶恒温水浴下辅助提取灵芝药材，采用苯酚-硫酸法测得灵芝多糖得率为3.73%，明显高于单纯热水提取法的得糖率(1.28%)。酶提取明显提高了得糖率，但处理条件较严格。总之，传统前处理技术具有设备要求低、操作简单、成本低等优势，但耗时长、有机溶剂用量大、共提取的杂质较多等，增加了分离净化的难度。

1.1.2 新型提取方法 高压脉冲电场辅助法、动态高压微射流辅助法、加速溶剂萃取法和超临界流体萃取法属于中药多糖成分的新型提取方法，这些技术均需与溶剂提取相结合。与传统提取方法相比，新型提取技术能够明显提高多糖得率，加快提取速度，且更加绿色环保。高压脉冲电场辅助法和动态高压微射流辅助法利用高压电场或大气高压实现对中药多糖的有效提取，提取时间远少于热水提取法，多糖得率明显高于热水提取法。如刘航等^[14]比较了高压脉冲电场辅助提取法和传统热水法提取海带多糖，结果表明，高压脉冲电场辅助提取法的提取时间是传统热水提取法的1/2，多糖提取效率提高

45%，降低了能耗。寇玉^[15]比较了传统热水提取法与动态高压微射流辅助热水法提取荷叶多糖，结果表明，两者提取温度相当，而后者多糖得率高于前者，且提取时间短于前者。另外，加速溶剂萃取法是利用高温高压条件实现对中药多糖的有效提取，该法操作更简便、提取时间更短、能耗更低、多糖得率更高，但需避免高温高压条件对中药多糖结构和活性的破坏。如陈德力等^[16]采用加速溶剂萃取法提取弯柄灵芝多糖，在提取温度 180 ℃，提取时间 12 min，静态循环提取 2 次的最佳条件下，多糖得率为 $(12.66 \pm 1.05)\%$ ；与热水提取法 $(0.37 \pm 0.09)\%$ 相比，提取时间缩短 15 倍，多糖得率提高 34.22 倍。而超临界流体萃取法是在超临界状态下，使用绿色流动相进行提取、分离中药多糖，利于环保。如杨孝辉等^[17]用乙醚脱脂，超临界 CO₂ 流体萃取淮山多糖，在压力 35 MPa、温度 45 ℃、夹带剂(90% 乙醇)用量 150 mL、时间 2.5 h 的最佳条件下，淮山多糖萃取率最高。

1.2 分离净化方法

1.2.1 传统分离净化方法 溶剂提取后的中药多糖溶液大多含有无机盐、脂质、蛋白质、色素等杂质，需进一步分离纯化。传统分离净化方法包括有机试剂法、蛋白酶法、活性炭或过氧化氢净化法、分级沉淀法。其中，有机试剂法常用于去除蛋白质、脂质及色素。常用的有机试剂为石油醚^[13]、三氟乙酸^[8,18-19]、无水乙醇^[6,12-13]、丙酮^[6,19]、乙醚等^[19]及其混合溶剂^[6]。其中 Seavage 试剂(正丁醇：氯仿，按一定比例混合)是常用的去除蛋白质的混合有机溶剂，而石油醚、乙醚等常用于去除脂质^[20-22]。但有机试剂毒性较高且用量较大，易造成多糖成分损失且破坏其结构。若需保持中药多糖的生物活性，可选择蛋白酶法去除中药多糖中的蛋白质^[20]。蛋白酶具有专一性，作用条件温和、绿色环保，但价格较昂贵。活性炭、过氧化氢常用于除去中药多糖中的色素^[23-24]。活性炭一般用于去除鞣质色素，但其疏松多孔、无选择性，会降低中药糖类含量，且炭残留除净较困难。过氧化氢适用于去除含不饱和双键、芳香环和羟基的色素，但其氧化性较强，可能会造成多糖结构的改变。此外，分级沉淀法一般包括有机试剂沉淀法^[25]、季铵盐沉淀法^[26]等。有机试剂沉淀法利用多糖易溶于水，不溶于乙醇的特性，以不同浓度的乙醇实现不同多糖的分级沉淀而分离出多糖。季铵盐沉淀法是利用季铵盐与多糖形成不溶性的化合物而从溶液中分离出多糖，主要用于酸性多糖的分离纯化。

1.2.2 新型分离净化方法

1.2.2.1 柱层析法 柱层析法是中药多糖的新型分离净化方法，主要利用选择性吸附和分子筛的作用提高中药多糖纯度。根据萃取柱的类型，主要采用阴离子交换柱^[27]、大孔树脂柱^[28-29]和凝胶柱^[30]分离净化中药多糖。杨波等^[28]将玉竹粉碎后用热水法提取，采用苯酚-硫酸法测定玉竹粗多糖的纯度为 65.229%，当进一步通过 AB-8 大孔树脂净化后，多糖纯度增至 78.64%，而用 D-101 大孔树脂净化后多糖纯度为 73.79%。大孔树脂柱利用选择性吸附和分子筛作用，可获得纯度更高的极性大和分子量大的多糖，且 AB-8 大孔树脂效果比 D-101 大孔树脂更好。董雯雯等^[30]利用离子葡聚糖凝胶柱层析法净化北五味子粗多糖，NaCl 洗涤后，经过一系列操作可得到 3 种分子量的多糖组分(SCP-I、SCP-II 和 SCP-III)。

1.2.2.2 透析法 透析法是利用一定孔径的半透膜使小分子透过，大分子截留的原理，通常将中药溶液装入透析袋，用自来水、蒸馏水透析，将中药多糖大分子物质截留在半透膜中，而无机盐、单糖、双糖等小分子物质透过，实现多糖与小分子寡糖或单糖的分离纯化，比大孔树脂和活性炭吸附法的纯化效果更好。如丁晨等^[31]采用热水提取法提取中华芦荟多糖，分别采用 MD-77 透析袋、AB-8 型大孔吸附树脂、活性炭净化样品，苯酚-硫酸法测定多糖含量，结果表明，透析法的多糖得率(86.60%)明显高于大孔树脂吸附法(10.56%)以及活性炭吸附法(8.21%)。

1.2.2.3 超滤法 超滤分离法即膜分离技术，根据相对分子质量差别实现高分子和小分子溶质的分离。该法可在较低压力下明显提高中药多糖的纯度。如冯孟鑫等^[32]采用水提醇沉法提取人参果多糖，超滤法净化，在 0.1 MPa 下超滤 40 min，采用苯酚-硫酸法测定多糖含量，结果表明，纯化后人参果样品的多糖纯度为 77.5%，是未经超滤纯化的多糖纯度(24.5%)的 3.2 倍。

1.3 其他前处理方法

近年来，也有文献采用径向流色谱新技术^[33]去除中药多糖中的蛋白质，该方法简单、环保，适合工业化生产，但仪器较贵。另外，当单一方法无法满足需求时，将多种前处理技术联用也是比较常用

的策略^[34]。

2 中药多糖检测方法

2.1 含量检测技术

2.1.1 传统含量检测技术 化学分析法、光谱法、薄层色谱法(TLC)等是用于中药多糖含量测定的传统技术。其中化学分析法包括比色法和滴定法,光谱法包括紫外-可见分光光度法和近红外分光光度法。而比色法与紫外-可见分光光度法相结合常用于中药多糖的含量测定^[35-36]。杨勤等^[37]比较了苯酚-硫酸和蒽酮-硫酸比色法对地参多糖的显色反应,并用UV-2450型紫外-可见分光光度仪分别在488 nm和625 nm处测定多糖含量。结果表明,苯酚-硫酸法的精密度和稳定性更高,更利于地参多糖含量测定,测得其平均含量为14.41%。TLC具有操作简单、快速、成本低等优点,可实现对中药多糖的单糖组成及含量的测定。邓勇等^[38]以乙酸乙酯-吡啶-醋酸-水(7.0:3.0:0.2:1.4)为展开剂,苯胺-邻苯二甲酸为显色剂,采用薄层扫描仪于410 nm波长下扫描定量虫草多糖,该方法检测限、定量限分别为0.02~0.10 μg和0.08~0.40 μg,灵敏度偏低,不利于低含量中药多糖的测定。而近红外光谱的光谱图复杂,信号重叠严重,很难找出光谱图吸收峰的归属来直接分析样品信息,通常需建立模型才能进行定性和定量^[39],因此目前较少用于中药多糖的含量测定。

2.1.2 新型含量检测技术

2.1.2.1 高效毛细管电泳法(HPCE) HPCE是以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,根据样品中各组分之间淌度和分配行为的差异而实现分离,是近年发展较快的分析技术之一。该方法应用于中药多糖的单糖组成以及含量测定时效果良好,测定多糖含量的能力与化学分析法相当,但需进行柱前衍生,且常与毛细管区带电泳(CZE)的分离机制和紫外检测(UV)器相结合应用。如郭怀忠等^[40]用热水提取黄精多糖和玉竹多糖,1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行衍生化,结果表明,苯酚-硫酸法测定的多糖含量(4.39%~7.24%)与CZE-UV法(4.24%~7.86%)相当,经过硫酸降解多糖,CZE-UV法还能测定黄精和玉竹多糖的单糖组成及其含量。

2.1.2.2 高效阴离子交换色谱法(HPAEC) HPAEC是检测中药多糖的单糖组成及含量的常用离子色谱法。因中药多糖含有O—H基团,易生成带负电荷的阴离子,利于检测。本课题组利用该技术测定了不同产地葛根^[41]以及山银花^[21]多糖的单糖组成及含量。如吴寒秋等^[21]采用超声辅助水溶液提取山银花多糖,Sevage溶液(正丁醇:氯仿,1:5)多次萃取除蛋白,三氟乙酸溶液水解多糖,CarboPac PA20色谱柱分离,HPAEC测定多糖的单糖组成以及含量。结果表明,该方法灵敏度高,重复性好,无需衍生,操作简便,准确可靠,为中药山银花的质量评价提供了参考。

2.1.2.3 气相色谱法(GC) GC适用于低沸点、易挥发、热稳定组分分析,但中药多糖的沸点较高、极性较强,不能直接进行GC检测,需经过柱前衍生。衍生剂包括三氟乙酸盐、乙酸盐、三甲基硅醚、甲醚、三甲基硅烷、糖腈乙酸盐和三甲基硅烷基烷基脲等^[42-44],其中乙酸盐是常用的衍生化剂^[43-46]。如王鑫彤等^[45]采用热水提取肉苁蓉多糖,乙醇沉淀,三氯乙酸除蛋白,透析净化,硫酸水解多糖,乙酸酐衍生化,DB-5毛细管柱分离,GC-氢火焰离子化检测器(FID)测定肉苁蓉多糖的单糖组成及含量。该方法具有所需样品量少、灵敏度高、准确度高等优势,常用于中药多糖中单糖组成的定性定量分析。随着分析技术的开发,发展了GC串联质谱(MS)的新技术,进一步减少样品的用量。李莉等^[46]采用水浴加热提取肉桂多糖,三氟乙酸水解,乙酸酐衍生化,HP-5MS毛细管柱分离,GC-MS鉴定肉桂多糖的6种化合物并测定含量,结果表明,D-呋喃葡萄糖的比例最大,占38.64%。另外GC-MS也是目前用于中药多糖鉴定和定量的有效手段。

2.1.2.4 高效液相色谱法(HPLC) HPLC是根据不同组分在固定相和流动相中吸附或分配系数的差异而达到分离的方法。该技术可串联各类检测器,广泛应用于中药多糖的单糖组成以及含量检测,常采用氨基柱、糖色谱柱及C₁₈色谱柱对中药多糖进行分离。HPLC可串联的检测器包括蒸发光散射器(ELSD)、示差折光检测器(RID)、紫外检测器(UV)、荧光检测器(FLD)、四极杆质谱检测器(MS)、三重四极杆质谱检测器(MS/MS)等。一般情况,HPLC串联ELSD、RID等通用型检测器时,样品无需柱前衍生。黄超等^[47]采用热水提取茯苓水溶性多糖,三氟乙酸水解多糖后无需衍生,即可采用Shodex

Asahipak NH2P-50 4E 糖色谱柱分离单糖, 运用 HPLC-ELSD 测定茯苓水溶性多糖中的单糖组成和含量比例。该法可在 20 min 内完成分析, 定量限为 0.44~4.43 μg 。于雷等^[48]用热水提取, 石油醚、乙酸乙酯及无水乙醇净化后无衍生化, 即可用 Agilent Zorbax NH₂ 色谱柱分离, HPLC-RID 测定怀地黄鲜品及生品的单糖和低聚糖含量。该方法在 25 min 内完成分析, 定量限为 2.41~2.88 μg 。可见, HPLC-ELSD 及 HPLC-RID 技术无需衍生化, 操作方便、快速, 利于中药多糖的含量测定。

由于中药糖类成分基本无紫外-可见吸收基团或荧光基团, 当利用 UV、FLD 检测器测定时, 均需柱前衍生化。而 PMP 衍生化是 HPLC-UV 较常用的衍生化方法。李卫燕等^[8]采用碱溶液提取, 无水乙醇沉淀, 三氟乙酸水解多糖及 PMP 衍生化后, 在 250 nm 波长下利用 HPLC-UV 测定当归酸性多糖中的单糖含量。另有研究^[49]比较了 HPLC 和 HPCE 测定洋甘菊多糖中单糖含量, 发现 HPCE 比 HPLC 的线性范围宽, 但 HPLC 的精密度、重复性及稳定性均略优于 HPCE。因此, 目前 HPLC-UV 更常用于中药多糖的分析。目前应用的荧光衍生化试剂包括氨基吡啶类、酰肼类、苯胺类和氨基苯甲酸酯类等, 其中氨基苯甲酸酯类衍生剂较常用。张其安等^[50]采用水溶解蜂蜜样品后, 用氨基苯甲酸衍生化, Sinochrom ODS-BP 柱分离, HPLC-FLD 测定蜂蜜中果糖、葡萄糖和麦芽糖含量。该方法在 20 min 内完成分析, 检出限为 96~240 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 且色谱峰干扰少, 具有选择性高、灵敏度高、受外界条件影响小等优点。

质谱(MS)属于通用型检测器, 具有适用范围广、灵敏度高、检测速度快等特点, 弥补了传统 ELSD、RID、UV、FLD 检测器灵敏度低、选择性差、重复性差等缺点, 在中药多糖的含量测定中显示出较大的发展潜力。赵孟欣等^[22]用 Kro-masil-C₁₈ 色谱柱分离, HPLC-MS 测定枸杞多糖中各类单糖含量, 采用电喷雾离子源和正离子模式(ESI⁺), 并在选择离子扫描模式(SIM)下对 PMP 衍生化单糖产物进行定量, 该法通过母离子即可进行准确定量, 检出限和定量限分别可达 0.003~0.05 mg/L、0.01~0.15 mg/L。Gao 等^[51]采用 UPLC-MS/MS 测定防风多糖中各类单糖含量, 并通过 ESI⁺ 和多反应监测模式(MRM)对 PMP 衍生化单糖产物进行定量, 通过母离子和子离子精准定量, 检出限和定量限分别可达 1.50~2.49 ng/mL、4.94~8.21 ng/mL。近年来, 电雾式检测器(CAD)作为一种新型通用检测器, 灵敏度远高于 ELSD 和 RID 检测器, 已被成功应用于中药多糖的单糖组成以及含量检测。梁琰等^[19]采用高效液相色谱联用电雾式检测器(HPLC-CAD)检测灵芝多糖的组成和含量, 该方法无需衍生可在 12 min 完成样品分析, 检出限和定量限分别为 0.01~0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.02~0.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 具有简便、快速、重复性高、稳定性好和灵敏度高等特点。

2.2 结构分析技术

2.2.1 传统结构分析技术 研究多糖的单糖组成是分析多糖结构的基础。通常将中药多糖水解成单糖后, 经过衍生化、中和、过滤等操作后, 再利用 TLC、HPCE、GC、HPAEC 及 HPLC 等技术实现对多糖的单糖组成检测^[21,39,41,46,48]。其中 GC、HPAEC 和 HPLC 的应用较广泛, 这些技术可以检测出多糖的单糖组成及其含量比。另外, 高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)是凝胶渗透色谱(GPC)和 HPLC 的结合产物, 常用于中药多糖分子量大小和分布范围的检测^[52]。为进一步得到更多的结构信息, 高碘酸氧化^[53]、Smith 降解^[53]和甲基化分析^[54]等化学方法被用于中药多糖的结构分析。高碘酸氧化可通过高碘酸的消耗量以及甲酸的生成量判断多糖中糖苷键的位置和连接方式等结构信息。Smith 降解是将高碘酸氧化物还原后进行水解而推测出糖苷键的键型及其位置等信息。甲基化分析则是通过甲基化试剂将单糖的游离残基全部甲基化, 并通过还原和乙酰化反应后采用 GC-MS 检测^[53], 从而能推断各单糖的连接方式。此外, 采用 PMP 衍生化标记单糖后, 可利用 HPLC-MS 提供的分子一级质谱(即母离子信息)对中药多糖中的单糖标记物结构进行确认和测定^[22]。再者, HPLC-MS/MS 可提供分子的一级和二级质谱结构信息(即母离子和子离子碎片)对中药多糖的单糖进行确认后测定^[54]。另外, 糖谱法是多糖通过化学或系列定位酶切等技术获得多糖降解产物片段, 并联用色谱等手段实现对中药多糖分离鉴定的技术^[55]。该技术在一定程度上可表征一类多糖降解产物的结构特征, 且 1 种多糖只有 1 个特征糖谱, 可作为中药多糖的指纹图谱。

2.2.2 新型结构分析技术

2.2.2.1 傅里叶变换红外光谱法(FTIR) 红外光谱(IR)是一种电磁波, 多糖结构中的基团能够呈现

特异的红外吸收光谱，因此 IR 可用于中药多糖结构分析。目前 IR 主要使用波数为 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 的波段检测多糖成分，是目前解析多糖结构的一种重要手段。随着仪器技术的发展，FTIR 技术在 IR 的基础上被开发，其灵敏度、信噪比、分辨率、扫描速率、重现性及波长准确性等方面具有很大的改善，该技术主要用于中药多糖基团结构和糖苷键连接方式的分析。Zhao 等^[56] 利用 FTIR 技术在 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 波段对玉竹多糖的结构进行解析，图谱显示， $1\ 740$ 、 $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 处有吸收，判断存在 $\text{COO}-\text{R}$ 基团，而 $1\ 420\ \text{cm}^{-1}$ 有吸收峰表明此处为对称的羧酸阴离子。此外， 930 、 $815\ \text{cm}^{-1}$ 有吸收峰，表明有果糖且为 β -型糖苷键连接方式。

2.2.2.2 核磁共振波谱法(NMR) NMR 是利用磁场作用检测分子中原子核性质及其与周围化学环境的相互作用而实现结构分析。该技术不破坏多糖样品，可准确反映多糖的整体真实结构，是目前中药多糖结构分析的主要技术。随着高磁场技术的发展，NMR 可分为 $^1\text{H}-\text{NMR}$ 、 $^{13}\text{C}-\text{NMR}$ 和二维 NMR 谱 (2D-NMR)。这些技术可提供单糖残基的类型，各糖残基中 C、H 化学位移归属，各糖残基间的连接位置和连接顺序等结构信息。Chen 等^[57] 采用该技术鉴定白芨须根中一位新多糖结构，主要通过 $^1\text{H}-\text{NMR}$ 的 5 个异头氢的化学位移信息 $\delta\ 5.32$ 、 4.99 、 4.98 、 4.91 、 $5.32\ \text{ppm}$ 推断出 β -吡喃糖基和 α -吡喃糖基；通过 $^{13}\text{C}-\text{NMR}$ 中 5 个异头氢的化学位移信息 $\delta\ 101.26$ 、 100.04 、 99.51 、 97.8 、 $174.6\ \text{ppm}$ 鉴定出糖醛酸杂质，结合 2D-NMR 鉴定出各残基的连接位置为 1, 6-链接 β -D 吡喃糖等结构信息，促进了中药多糖结构分析。

2.2.2.3 高分辨质谱法(HRMS) 随着质谱技术的发展，HRMS 技术在中药多糖的结构解析中显示出巨大的发展潜力。HRMS 具有灵敏度高、分辨率高、扫描速度快等特点，可为中药未知多糖提供精确的分子质量及相关结构信息。目前，HRMS 主要有飞行时间质谱 (TOF)、静电场轨道阱 (Orbitrap) 等应用于中药多糖的结构分析。廖俊昭^[58] 采用高效液相色谱-电喷雾离子源-飞行时间质谱法 (HPLC-ESI-Q-TOF MS) 鉴定人参粗多糖的部分酸水解产物，结合标准二糖提供的 MS 和 MS/MS 提供的结构信息确定人参多糖的糖苷键类型主要为 1, 3 糖苷键和 1, 4 糖苷键类型，为中药的指纹性多糖图谱研究提供了新方法。另外，张亚丽等^[59] 采用高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱法 (HPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 鉴别黄连的多糖结构，应用二级、三级及多级质谱 (MS^n) 分析了黄连多糖中单糖的裂解规律，可获得高灵敏度和高分辨的质谱数据，并首次鉴定出黄连多糖中的核糖和岩藻糖，为鉴定中药未知多糖的结构奠定了良好基础。另外，HRMS 可结合其他检测技术实现更多维的中药多糖结构解析。王莹等^[60] 采用 GPC-RID 测定注射用黄芪多糖的重均分子量 (M_w) 及其分布，采用多角度激光光散射法 (MALLS) 及基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法 (MALDI-TOF MS) 测定黄芪多糖的 M_w 及其结构。通过 3 种方法的测定和相互验证，初步确定了注射用黄芪多糖的单元结构信息，最终准确而可靠地获得黄芪多糖的 M_w 。

3 结论与展望

近年来，随着中医药研究的深入，中药多糖在医药行业具有巨大的开发前景。目前由于中药多糖种类繁多、结构复杂，研究尚不充分，上述的中药多糖前处理以及检测方法为中药多糖的含量测定、多糖的单糖组成分析、多糖分子量以及结构分析提供了参考。目前，寻找一种环保、成本低、提取效率高的前处理技术是中药多糖成分的重要内容之一，而高压脉冲电场辅助提取法、动态高压微射流辅助提取法、加速溶剂萃取法和超临界流体萃取法是近年来用于提取中药多糖成分的新兴技术。相比于传统技术，新型技术具有绿色污染低、提取效率高等特点。此外，越来越多的学者逐步挖掘 HPLC-HRMS 及其相关联用技术用于中药多糖检测。该方法能够提供中药多糖的 M_w 、数均分子量、分子量分布、多糖成分单元结构、多糖的单糖组成以及含量等重要信息，所测数据准确、可靠，在中药多糖的表征方面具有很好的应用潜力，将有助于中药多糖成分的进一步开发利用。

参考文献：

- [1] Rodriguez J, O'Neill S, Walczak M A. *Nat. Prod. Rep.*, **2018**, 35(3): 220-229.
- [2] Chen Y, Yao F K, Ming K, Wang D Y, Hu Y L, Liu J G. *Molecules*, **2016**, 21: 1705. doi: 10.3390/molecules21121705.

- [3] Xie J H, Jin M L, Morris G A, Zha X Q, Chen H Q, Yi Y, Li J E, Wang Z J, Gao J, Nie S P, Shang P, Xie M Y. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **2015**, 56(Supp 1): S60 – S84.
- [4] Yu Y, Shen M Y, Song Q Q, Xie J H. *Carb. Polym.*, **2018**, 183: 91 – 101.
- [5] Li L F, Wong T L, Han Q B. *Chin. Nat. Med.*, **2019**, 17(12): 883 – 886.
- [6] Qiao L J, Wang A P, Ayixiaguli B, Hailiqian T. *J. Food Saf. Qual.* (乔丽洁, 王安平, 阿依夏古丽·巴斯卡, 海力茜·陶尔大洪. 食品安全质量检测学报), **2020**, 11(1): 59 – 65.
- [7] Zhu Y, Li Q, Mao G H, Zou Y, Feng W W, Zheng D H, Wang W, Zhou L L, Zhang T X, Jun Y, Yang L Q, Wu X Y. *Carb. Polym.*, **2014**, 101: 606 – 613.
- [8] Li W Y, Li P, Cao W. *Sci. Technol. Eng.* (李卫燕, 李萍, 曹蔚. 科学技术与工程), **2015**, 15(10): 151 – 154.
- [9] Song Y R, Sung S K, Jang M, Lim T G, Cho C W, Han C J, Hong H D. *Int. J. Bio. Macromol.*, **2018**, 116: 1089 – 1097.
- [10] Zhang L, Wang M. *Int. J. Bio. Macromol.*, **2017**, 95: 675 – 681.
- [11] Rostami H, Gharibzahedi S M T. *Carb. Polym.*, **2016**, 143: 100 – 107.
- [12] Wang F, Luo L L, Zhang X Q. *China Brew.* (王锋, 罗丽兰, 张秀清. 中国酿造), **2015**, 34(7): 129 – 132.
- [13] Ding X X, Li F W, Shang Y L, Wang D J, Wang J, Bu W L, Yu X H. *Food Res. Dev.* (丁霄霄, 李凤伟, 商曰玲, 王笃军, 王杰, 卜雯丽, 余晓红. 食品研究与开发), **2020**, 41(5): 34 – 53.
- [14] Liu H, Feng L Q, Liu X J. *Mod. Chem. Ind.* (刘航, 冯立强, 刘兴江. 现代化工), **2016**, 36(7): 75 – 78.
- [15] Kou Y. Influence of Dynamic High-pressure Microfluidization on Extraction, Structure and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Lotus Leaf. Nanchang: Nanchang University (寇玉. 动态高压微射流技术对荷叶多糖提取、结构及抗氧化活性影响的研究. 南昌: 南昌大学), **2013**.
- [16] Chen D L, Wang X B, Lü W, Jia L W, Zheng W, Zheng X L. *China Pharm.* (陈德力, 王小兵, 吕伟, 贾立伟, 郑威, 郑希龙. 中国药师), **2016**, 19(11): 2032 – 2035.
- [17] Yang X H, Guo J. *Shandong Chem. Ind.* (杨孝辉, 郭君. 山东化工), **2018**, 47(23): 34 – 36, 38.
- [18] Li L F, Wong T L, Zhang J X, Zhou L S, Bai S P, Fung H Y, Cheng H Y, Zhang Q W, Zheng H M, Bao W R, Ma D L, Leung C H, Zhang G, Bian Z X, Lyu A P, Han Q B. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2020**, 185(5): 113235. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113235.
- [19] Liang Y, Zhao Z G, Zhang M M, Liu Q, Geng Y L, Wang X, Zhao H Q. *Sci. Technol. Food Ind.* (梁琰, 赵志国, 张敏敏, 刘倩, 耿岩玲, 王晓, 赵恒强. 食品工业科技), **2020**, 23(3): 37 – 39.
- [20] Tang T T, Wu D, Wei Q, Xue J, Liang S S. *Guangzhou Chem. Ind.* (唐甜甜, 吴迪, 魏晴, 薛娟, 梁珊珊. 广州化工), **2020**, 48(7): 86 – 88, 131.
- [21] Wu H Q, Zhao D, Qi H W, Xu X L, Zhang F. *Food Ind.* (吴寒秋, 赵丹, 戚华文, 许秀丽, 张峰. 食品工业), **2018**, 39(1): 270 – 273.
- [22] Zhao M X, Wang Z L, Meng Z, Li J G, Li H P, Liu W Y. *Chin. J. Chromatogr.* (赵孟欣, 王泽岚, 孟哲, 李吉光, 李和平, 刘万毅. 色谱), **2019**, 37(11): 1162 – 1172.
- [23] Qin Y D, Wang R B, Zhou J J. *Chin. Tradit. Patent Med.* (秦亚东, 汪荣斌, 周娟娟. 中成药), **2015**, 37(12): 2783 – 2786.
- [24] Chang M Q, Che X Q, Jiang R J. *China Pharm.* (常明泉, 车向前, 江蓉敬. 中国药师), **2017**, 20(5): 893 – 895.
- [25] Li H F, Guo S B, Man S L, Fan Y Y, Wang T T, Li X, Gao W Y. *China J. Chin. Mater. Med.* (李红法, 郭松波, 满淑丽, 范亚亚, 王婷婷, 李霞, 高文远. 中国中药杂志), **2015**, 40(11): 2112 – 2116.
- [26] Huang J, Zou Y, Wang W, Li Q, Wu H Y, Zhao T, Mao G H, Zhang M, Yang L Q. *Chem. Res.* (黄靖, 邹焯, 王未, 李倩, 吴慧玉, 赵婷, 茆广华, 张敏, 仰榴青. 化学研究), **2015**, 40(11): 2112 – 2116.
- [27] Yan G L, Zhang F, Jin J, Ding J, Zhang Y Q, Liu Y H. *Chin. J. Inform. Tradit. Chin. Med.* (闫光玲, 张锋, 金娟, 丁洁, 张永清, 刘玉红. 中国中医药信息杂志), **2019**, 26(2): 97 – 101.
- [28] Yang B, Han F B, Yang B. *Food Res. Dev.* (杨波, 韩凤波, 杨波. 食品研究与开发), **2014**, 35(23): 67 – 70.
- [29] Zhang T T. *Chem. Eng.* (张涛涛. 化学工程师), **2020**, 34(4): 84 – 88.
- [30] Dong W W, Lin S Q, Li G M, Zhao Z C, Huang Z L, Fu J, Yin B, Liu Y Y, Jia F J, Yang S F. *Shandong Agric. Sci.* (董雯雯, 林树乾, 李桂明, 赵增成, 黄中利, 傅剑, 殷斌, 刘月月, 贾凤娟, 杨世发. 山东农业科学), **2019**, 51(7): 117 – 120.
- [31] Ding C, Guo B X, Xu C. *J. Anhui Agric. Sci.* (丁晨, 郭彬歆, 徐琛. 安徽农业科学), **2012**, 40(28): 14008 – 14011.
- [32] Feng M X, Bai G C, Ma K Y, Hou W Z, Wang J Y, Gao S S, Ma C H. *Cent. South Pharm.* (冯孟鑫, 白光灿, 马恺悦, 侯文珍, 王佳宇, 高山山, 马长华. 中南药学), **2016**, 14(3): 254 – 258.
- [33] Shao P, Liu Q, Chen C B, Qin M P, Sun P L. *Curr. Biotechnol.* (邵平, 刘青, 陈纯彬, 秦敏朴, 孙培龙. 生物技术进展), **2013**, 3(6): 427 – 432.
- [34] Zhang X, An J W, Wang W J, Liu S H, Cai Y J, Wang S S, Liang J D. *Asia – Pac. Trad. Med.* (张鑫, 安加文, 王文佳, 刘思海, 蔡远俊, 王珊珊, 梁建东. 亚太传统医药), **2020**, 16(3): 43 – 46.
- [35] Závřel T, Očenášová P, Sinetova M A, Červený J. *Bio-protocol*, **2018**, 8(15): e2966.
- [36] Xiao Z Q. *China Med. Her.* (肖作奇. 中国医药导报), **2015**, 12(4): 159 – 164.

- [37] Yang Q, Gu W C, Zhou N, Zhang L S, Yang D Q. *Food Sci. Technol.* (杨勤, 谷文超, 周浓, 张兰胜, 杨德全. 食品科技), **2020**, 45(1): 343–350.
- [38] Deng Y, Zhang J L, Wang L Y, Zhao J, Li S P. *Chin. J. Pharm. Anal.* (邓勇, 张杰良, 王兰英, 赵静, 李绍平. 药物分析杂志), **2018**, 38(1): 13–21.
- [39] Li L H, Liu Y N, Mao R, Wang P, Yin L, Dou Z Y. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (李丽红, 刘亚男, 毛睿, 王飘, 尹莉, 窦志英. 时珍国医国药), **2019**, 30(5): 1090–1093.
- [40] Guo H Z, Chen C Y, Zhao H R. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae*(郭怀忠, 陈春英, 赵焕荣. 中国实验方剂学杂志), **2011**, 17(6): 54–59.
- [41] Zhao D, Nie B, Song K, Chen H, Hong Y H, Wu W J, Zhang F. *Chin. J. Anal. Lab.* (赵丹, 聂波, 宋昆, 陈虹, 洪云鹤, 吴文杰, 张峰. 分析实验室), **2017**, 36(7): 745–749.
- [42] Yang F R, Su Q, Li R Y, Gao J P. *China Med. Herald* (杨丰裕, 苏强, 李瑞燕, 高建平. 中国医药导报), **2011**, 8(17): 34–36, 40.
- [43] Liu Y J, Xiao L, Luo L M, Gong L M, Liu T S, Chen N H. *J. Int. Pharm. Res.* (刘应蛟, 肖岚, 罗林明, 龚力民, 刘塔斯, 陈乃宏. 国际药学研究杂志), **2018**, 45(6): 472–478.
- [44] Chen Y R, Mao X Y, Jin W W, Luo H J, Li T. *Prog. Mod. Biomed.* (陈艳蕊, 毛欣月, 金文闻, 罗琥捷, 李涛. 现代生物医学进展), **2011**, 11(S1): 4632–4635.
- [45] Wang X T, Wang W, Wu H Y, Wang S M, Liu H Y, Li Q, Jia Q D, Zhang S Y, Zhao T, Zhang M, Yang L Q. *J. Jiangsu Univ. : Med. Ed.* (王鑫彤, 王未, 吴慧玉, 汪松美, 刘红阳, 李倩, 贾清东, 张胜洋, 赵婷, 张敏, 仰榴青. 江苏大学学报: 医学版), **2016**, 26(3): 254–257.
- [46] Li L, Shi J Y. *J. Chin. Med. Mater.* (李莉, 石俊英. 中药材), **2013**, 36(4): 578–580.
- [47] Huang C, Wan M, Chen S H, Ye X C, Gao H, Chen L. *China Pharm.* (黄超, 万鸣, 陈树和, 叶晓川, 高欢, 陈蕾. 中国药师), **2020**, 23(1): 148–150.
- [48] Yu L, Li X K, Zhang H F, Zhang J, Liu J, Yang Y. *Chin. J. Pharm. Anal.* (于雷, 李晓坤, 张华锋, 张杰, 刘炯, 杨云. 药物分析杂志), **2013**, 33(6): 977–982.
- [49] Chen L, He X M, Meng L, Ma X L. *Food and Drug*(陈蕾, 何新苗, 孟磊, 马晓丽. 食品与药品), **2019**, 21(5): 347–351.
- [50] Zhang Q A, Wang J, Dai J X, Du P F, Wang S Q, Lu D M, Yang S B. *Food Sci.* (张其安, 王娟, 戴建晓, 杜培粉, 王素轻, 卢德梅, 杨少波. 食品科学), **2011**, 32(14): 249–252.
- [51] Gao Y Y, Jiang Y, Chen G C, Li S S, Yang F, Ma Q. *Molecules*, **2018**, 23: 1924.
- [52] Peng F, Ye Z L, Li D K, Yang Y W, Zhou D Z. *Chin. Trad. Patent Med.* (彭菲, 叶正良, 李德坤, 杨悦武, 周大铮. 中成药), **2014**, 36(5): 1098–1100.
- [53] Li K, Li S Y, Wang D, Li X X, Wu X K, Liu X J, Du G H, Li X R, Qin X M, Du Y G. *Molecules*, **2019**, 24: 3644.
- [54] Zhong S F, Liu Y P, Li Y P, Luo H B. *Chin. J. Anal. Lab.* (钟少芬, 刘煜平, 李阳苹, 罗鸿斌. 分析实验室), **2016**, 35(11): 1285–1289.
- [55] Wu D T, Cheong K L, Wang L Y, Lv G P, Ju Y J, Feng K, Zhao J, Li S P. *Carb. Polym.*, **2014**, 103: 100–109.
- [56] Zhao P, Li X, Wang Y, Yan L Y, Guo L P, Huang L Q, Gao W Y. *Carb. Polym.*, **2020**. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115836.
- [57] Chen Z Y, Zhao Y, Zhang M K, Yang X F, Yue P X, Tang D K, Wei X L. *Carb. Polym.*, **2020**, 227: 115362.
- [58] Liao J Z. Establishing Saccharide Mapping of Three Chinese Herb Medicine Polysaccharides by Liquid Chromatography Coupled with Time of Flight – Mass Spectrometry. Nanchang: Nanchang University(廖俊昭. 基于液相色谱 – 飞行时间质谱对三种中草药多糖的糖谱研究. 南昌: 南昌大学), **2015**.
- [59] Zhang Y L, Gao J, Miao X Z, Zhang X, Liu Y G, Tan P. *World Chin. Med.* (张亚丽, 高简, 苗祥贞, 张潇, 刘永刚, 谭鹏. 世界中医药), **2017**, 12(11): 2775–2778.
- [60] Wang Y, Xu W Y, Li L X, Jin H Y, Ni J, Ma S C. *Acta Pharm. Sinica*(王莹, 许玮仪, 李丽潇, 金红宇, 倪健, 马双成. 药学学报), **2019**, 54(2): 348–353.

(责任编辑: 丁 岩)