

接受选择性培养基中的各种成分及生长条件,完整、正常的细胞则能在其中生长繁殖。

混合菌群中李斯特氏菌的复苏

通常来说,食品中的李斯特氏菌含量低,其它正常的微生物大量存在,致病菌如大肠菌也较李斯特氏菌多。这就需要:

(1) 当有其它能较快繁殖且能复苏的菌群存在时,测定李斯特氏菌的复苏能力。

(2) 测定在选择性培养基上李斯特氏菌属和李斯特氏菌特异性生长的能力。

将等量受热损伤的李斯特氏菌与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及沙门氏菌属(大约 10^6 个/mL)同放于一个复苏培养基内于加选择性试剂前培养4h,将受损伤细胞菌株加至BAM法的培养基中。测定结果表明95%以上的细胞均受损伤。而相同数量的金黄色葡萄球菌、大肠菌及沙门氏菌属均对李斯特氏菌的复苏无影响,且干扰本法对李斯特氏菌的检测。

与BAM法比较

方法的比较多集中在会引起食物中

毒,能危及生命的奶酪样品。FDA/BAM法与RSK法相比概括如下:在22份天然污染的奶酪样品中,8份样品2种方法均能给出阳性结果。RSK(Resuscitation selection kit)法可对另外4份样品确证检验为李斯特氏菌。所有的阳性样品可经典型菌落的分离及用API—50CH法及BAM法的确证实验证实。

在第二次随机取样的调查中,6份鸡肉馅均能用BAM及RSK法检出存在李斯特氏菌。此小样本调查说明,当样品不含李斯特氏菌时,RSK法不产生假阳性。另外,6份由超级市场购买的奶酪和牛肉用两种方法均未检出李斯特氏菌。

本文推荐所用的试剂是可行的,因大部分试剂的使用已被报导过。这些试剂均在实验室内作过条件试验。Farber和Peterkin已在他们的文章中对培养基和试剂的选择作过详尽的探讨。

需要时可用经典法来对李斯特氏菌作确证试验。此法与市售大部分抗体法及DNA法有很高的相关性。

(陈森译,辛显桐审校 天津市食品卫生监督检验所)

植物中多糖的测定(综述)

韩玉莲 罗雪云 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

从60年代开始,国内外医学专家就对多糖进行了广泛的研究。研究资料^[1~4]表明,多糖类成分不仅是一种非特异性免疫增强剂,而且具有降血糖、降血脂、抗血凝及止吐等多种生理活性。特别是多聚葡萄糖具有显著的抗癌活性,更引起广泛的注意。据报道^[5]这种主要由D-葡萄糖 $\beta_{1\rightarrow3}$ 键相互缩合所成的

多糖,用量在 $2\sim 15\text{mg/kg.Bw}$ 时,在鼠体内就能发挥抗肿瘤作用,其有效率可高达90%。例如:从香菇(*lentinus edodes*)分离出的香菇多糖(*lentinan*),^[6]具有 $1\rightarrow 3-\beta-D$ -葡萄糖糖链,从灵芝属真菌树舌(*Ganoderma applanatum*)(pers)子实体中分离出的多种灵芝糖^[7]都具有显著的

抗癌活性。这类多糖还有许多。这些植物大分子多糖类的生理活性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品、天然食品的推崇,多糖以其无毒副作用,而且又是营养、辅助医疗等功能性保健品的有效成分,被当今世界所重视。目前,国内外关于多糖的药理、药化及其临床应用等方面的报道很多。本文拟对近年来有关多糖的分离、提纯及定性、定量测定作一综合介绍。

1 多糖的性质〔5,7,8〕

多糖存在于自然界中的高等植物、细菌、真菌、藻类及动物体内,尤其是中草药中。它是由十个以上的一种或多种单糖通过贰键连接而成的大分子化合物,结构复杂。其性质不同单糖,如甜味和强还原性已经消失。多糖大多为无定形化合物,分子量比较大而且常随来源不同而异,在水中的溶解度通常随分子的增大而降低,不溶于有机溶剂。

植物中的多糖种类很多,通常按其生物体内的功能分为两类。一类为非水溶性的,主要是形成植物的支持组织,如植物中的纤维素。另一类为可溶于热水或胶体溶液的,经酶或酸催化水解生成寡糖或单糖以供应能量。常见组成多糖的单糖有D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖、D-木糖和L-阿拉伯糖。

2 多糖的测定

多糖与其他成分共存于植物体中,故要提取纯粹的多糖必须从植物体中除去其他杂质,然后再进行分离精制。值得注意的是,同一类多糖由于分离和纯化方法不同或植物来源不同,其性质往往会有很大

的差别。〔9〕按照多糖的特性,其测定步骤分为多糖的提取、分离;多糖的鉴定;多糖含量的测定。

2.1 多糖的提取与分离〔8,10〕

从植物中提取多糖,主要是根据其不同的溶解度选择一种溶剂进行。最常用的为水(冷或热)、稀盐、稀酸、稀碱以及二甲亚砜等溶剂。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。

在用上述溶剂萃取之前,一般先用石油醚、乙醚等有机溶剂提取,除去脂溶性杂质。然后再将提取液浓缩,即以等量或数倍的乙醇、甲醇或丙酮等沉淀析出。提取时要防止降解。用稀酸提取的时间宜短,温度最好不高于5℃。用稀碱提取时,为防止降解常通以氮气或加入硼氢化钾。稀酸、稀碱提取液应迅速中和浓缩,分次加入乙醇、丙酮沉淀。对冷水不溶而温水可溶的多糖,在萃取时,采用热萃取,趁热过滤,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类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溶液、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,可以沉淀带有不同羧基数目的多糖。

用冷水或温水萃取多糖时,植物中的蛋白质会一起被提取,再用乙醇沉淀时亦会一起沉淀出来。可选择使蛋白质沉淀而保留多糖的试剂来处理。如酚、三氯乙酸等,但处理的时间必须短,温度要低,以避免多糖降解。也可以连续数次地加入氯仿/戊醇(或丁醇)=4:1溶液,使与蛋白质生成凝胶物而除去蛋白(Sevag

法)。^{〔11〕}离心收集上清液,然后水溶液透析除去游离氨基酸、单糖等小分子水溶性成分。此法在避免降解上有较好的效果。如若半乳糖醛酸含量高,可与蛋白质的碱性氨基酸形成氢键,直接用 Sevag 法脱蛋白比较困难。若先用果胶酶处理,^{〔12,13〕}以水解其中的半乳糖醛酸与蛋白质形成的氢键的连接,再用 Sevag 法脱蛋白就容易多了。

当用碱溶液萃取多糖时,大部分蛋白质会分解或变质。因此,多糖加乙醇等从水溶液中沉淀时,可使蛋白质残留在母液中而除去。对碱稳定的糖蛋白在硼氢化钾存在下,用稀碱温和处理可以把这种结合蛋白质分开。

综上所述,大多数多糖的提取、分离,是按其特性采用分级沉淀、反复溶解等多种分析方法,直至获得各物理常数恒定的粗多糖。

2.2 多糖的鉴定

多糖是生物高分子化合物,要测定其完整的结构是困难的。但发现多糖的活性与分子量、溶解度、粘度和糖链结构有关,所以多糖的鉴定一般包括纯度、分子量以及组成多糖的各个单糖的鉴定。

2.2.1 纯度鉴定^{〔5,8,10〕}

经纯化的多糖体即使是纯品,其微观也不均一。通常在精制的各个阶段应测定其灰分、含氮量、功能团($-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHO}$)的摩尔比、比旋度、粘度、水解后各种单糖的含量。一般说来,反复精制直到这些数值不再变动,方能断定该多糖较纯粹。近年来,高压电泳法是纯度鉴定的常用方法,如中性多糖因其导电性弱,分子量大在电场中移动速度慢,故常采用高压电泳,用硼酸盐缓冲液($\text{pH}9 \sim 12$)进行。电泳的支持物可用

纸、醋酸、纤维素薄膜。如采用玻璃纤维纸,可以使用有腐蚀性的显色剂。其他如聚丙烯酰胺凝胶电泳,琼脂糖电泳,凝胶柱层析、气相色谱及浊度滴定等方法也可用于纯度鉴定。

2.2.2 分子量的测定

多糖的分子量可从几万到几百万,而且虽经提纯但常是不同大小分子的混合物。因此,所测得的分子量只是一种统计平均值。测定高分子化合物分子量的许多物理方法,一般也适用于多糖。如沉降法、光散射法、粘度法等等。近年来常采用的方法是凝胶过滤法、凝胶电泳法、蒸汽压法及高压液相。^{〔14〕}凝胶过滤法是在不同型号的 Sephadex 或 Sepharose 柱层析上测定多糖的分子量,该法用量少操作简便,但需要一系列结构相似的已知分子量的多糖作标准曲线。凝胶电泳法测分子量是类似于蛋白质的物理方法,只是染色液改用高碘酸西夫试剂,缓冲液改用硼酸盐,一般区带较宽。高压液相色谱法测定多糖的分子量^{〔15〕}以二甲亚砷作载体,用已知分子量的样品作标准。化学方法常用末端基测定法,不分支的糖链,通常具有一还原性末端与一非还原性末端,如具有分支链则非还原和还原末端比例增加,可测量出末端数目再推算出数均分子量。末端分析较好的方法有甲基化法、高碘酸氧化法。

2.2.3 多糖组成成分的测定

如前所述,多糖是大分子化合物,故要鉴定多糖的结构首先要了解它是由那些单糖组成以及各种单糖之间的比例。一般是将甙键用酸,^{〔16,17〕}酶、甲醇水解或选择性降解,将大分子裂解成各种片段,各自分析,然后拼凑成一整个化合物。

酸水解是常用的一种方法,可根据需

要控制条件进行,如酸的浓度、温度、时间等。用硫酸 1~3mol/L、100℃、6~8h 封管或回流完全水解,水解物用 Ba(OH)₂ 或 BaCO₃ 中和。用三氟醋酸 2mol/L、100℃、8min~14min 密封水解,水解物常温减压干燥。多糖中有对酸较不稳定的甙键可部分水解,呋喃型糖

残基较吡喃型糖残基易水解,在杂多糖中,戊糖轻微水解就可先脱落下来。对酸较稳定的甙键,一些难溶性的多糖,可碾成细粒,使其分散于溶液中,加甲酸共热以促进溶解,再用稀硫酸水解。酸水解产物可用纸层析、薄层层析及气、液色谱层析法鉴定(见表 1)。

表 1 测定多糖组成的层析方法

方 法	展 开 剂	显 色 剂	参考文献
硅胶 60F ₂₅ 高效 预制板薄层	正丁醇:吡啶:水=8:2:1	α-萘酸	(17)
硅胶 G 预制板	氯仿:甲醇:17%氨水=4:4:2	0.2 茚三酮乙醇	(16)
硅胶板	异丙醇:丙酮:0.1mol/L 乳酸=2:2:1	苯胺、邻苯二甲酸	(1)
纤维素纸层析	醋酸乙酯:吡啶:水=2:1:2	苯胺、邻苯二甲酸	(14)
纤维素薄层层析	正丁醇:吡啶:醋酸:水=30:10:6:8 醋酸乙酯:正丁醇:吡啶:醋酸:水 =25:25:20:15:5	苯胺、邻苯二甲酸	(14)
慢速新华层析 滤纸	醋酸乙酯:吡啶:水=10:4:3 正丁基:醋酸:水=4:1:5	苯胺、邻苯二甲酸	(16)

某些单糖在纸层和薄层上分离不易判断时(R_f 值相距较近时),也常采用某些单糖的特殊检测方法。例如鼠李糖用硫酸基乙酸法,半乳糖用半胱氨酸硫酸法等。

2.3 多糖含量的测定

2.3.1 比色或滴定法测定多糖含量

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、纯化出来,然后显色、比色测定。所用的显色剂有吡啶—硫酸、蒽酮—硫酸、苯酚—硫酸、3,5—二硝基水杨酸。1947 年 Dishe^[18] 等人报道了吡啶—硫酸法,该法是将多糖用硫酸先水解生成葡萄糖醛酸,然后与吡啶显色,即可获得重复性好的结果。此法适于酸性多糖含量的测定。50 年代 Yemm^[19] 和 Dubois^[20] 先后又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,再将

其与蒽酮或苯酚缩合成有色化合物,在适当的波长下比色测定。在 90 年代 AOAC (美国公职分析化学家协会)将苯酚硫酸法列为标准方法。上述三种比色法都只是测量总多糖含量,不能排除还原性杂质(包括单糖)的干扰。董文慧^[21] 等人 1990 年在以上三种方法的基础上,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)。他们用漩涡混合器进行醇沉淀分离,在碱性条件下以过氧化氢处理,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。本法与吉林省药品标准规定的伯川法^[22] 比较, DNS 法操作简便、准确,适于工业分析应用。

Fehling 滴定法^[8] 早已应用于多糖的定性分析,后被发展为多糖含量的

定量测定。此法虽然快速,但需在沸腾状态下滴定,温度、滴定速度等影响较大,而且不能排除还原糖的干扰。1993年周学敏^[23]等人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,做工作曲线,测定多糖含量。实验证明,本法可消除样品中还原性杂质对多糖含量测定的影响,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含量。因此,间接碘量滴定法所测结果更接近实际多糖含量。

2.3.2 气相色谱法 (GLC)^[10,2]

气相色谱法可定性、定量分析多糖的组分及含量。常采用衍生物法以增加其挥发性。一般是将多糖酸水解物或甲醇解(用盐酸-甲醇)物。用三甲基硅烷基化(TMS)或三氟乙酰化(TFA)转化为硅烷化产物或乙酰化产物进行气相层析分析。但乙酰化之前,糖先用 KBO_4 或 NaBH_4 作还原剂还原成开链的糖醇化合物较好。多糖用甲醇解方式把半缩醛甲基化,形成甲基糖甙而后TMS化,异构物减少,有利于分辨。常以甘露醇或肌醇为内标,用已知的各种单糖作标准。

多糖气相色谱分析法常用的担体有Chrom, ChromosorbW, Aw-DMCS-Chromosorb W等等,固定液如 ECNSS-M, SE-30, SE-52, OV-225, OV-210, OV-17……等。与其他方法比较,该法所需样品很少(μg),较灵敏可靠。

近年来,高效液相色谱法越来越多地用于测量植物中的多糖。它分析速度快,可以直接进样,不必制备成衍生物,而且

有较高的分辨率。

3 参考文献

- 1 张思巨,等. 党参多糖的研究. 中草药, 1987; 18(3): 2~4
- 2 季晖,等. 人工虫草菌丝多糖的分离提取及其降血糖作用研究. 中国药科大学学报, 1993; 24(1): 39~42
- 3 周爱如,等. 银耳多糖抗肿瘤作用的研究. 北京医科大学学报, 1987; 19(3): 15
- 4 吴寿金,等. 降血糖植物多糖的研究概况. 中草药, 1992; 23(10): 153~157
- 5 林启寿编著. 中草药成分化学. 北京: 科学出版社, 1977, 97~105, 97~105
- 6 G Chihara, et al. Nature, 1969; (222): 687
- 7 王宪楷主编. 天然药物化学. 人民卫生出版社, 1986
- 8 药物研究所编著. 中草药有效成分提取与分离. 中国科学院上海科学技术. 上海科学技术出版社, 1983
- 9 Shida. M, et al. Carbohydrate. Res, 1975; 41: 211
- 10 张翼伸. 多糖的结构测定. 生物化学与生物物理学报, 1983; 5(13)
- 11 Miyazaki T, et al. Chem Pharm Bull 1974; 22(6): 1360
- 12 李润秋. 人参多糖的成分分析. 中草药, 1985; 16(9): 5~7
- 13 曹立亚. 人参多糖化学的研究进展. 中草药, 1989; 20(6): 36~41
- 14 耿俊贤. 了哥王多糖的分离和鉴定. 中草药, 1988; 19(3): 6~8
- 15 Manners. D. J, et al. Carbohydrate Res. 1971; 17: 109
- 16 刘训红. 太子参多糖的研究. 中草药, 1993; 24(3)
- 17 顾玉斌. 中药白术免疫活性成分多糖的研究. 中国药理学杂志, 1993; 28(5): 275~277
- 18 Dishe. Z. A. New specific color reaction of hexuronic acid. J. Biol Chem, 1947; 167, 189
- 19 Yemm. E. W. Willis. A. J.. The estimation of carbohydrate in plants by anthrone. J. Biochem 1954; 57: 508
- 20 Dubois M, et al. Anal Chem, 1956; 28: 350

(下接第55页)