板栗多糖研究进展

李红燕,王应杏,李晓幸,李胜辉　(河北大学化学与环境科学学院,药物化学与分子诊断重点实验室,河北保定 071002)

摘要　板栗为药食两用的果中珍品,多糖是板栗的主要活性成分之一,在此综述了国内外有关板栗多糖的提取、分离纯化、含量测定、化学结构和生物活性等方面的研究进展,为推进板栗向功能产品和医药用品等多领域延伸、充分利用我国板栗资源优势提供理论依据。
关键词　板栗;多糖;提取;分离纯化;化学结构;生物活性
中图分类号　S509.9　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517 - 6611(2015)31 - 082 - 03

Research Advances in Polysaccharides of *Castanea mollissima* Blume

LI Hong-yan, WANG Ying-xing, LI Xiao-xing et al　(Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis, College of Chemistry and Environment Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002)

Abstract　*Castanea mollissima* Blume fruits can be used as medicine and food. Polysaccharide is one of the main active components of *Castanea mollissima* Blume fruits. In this paper, the recent progresses of polysaccharide from *Castanea mollissima* Blume were summarized on extraction, purification, content, structure and biological activities. This paper will benefit for the further study of *Castanea mollissima* Blume polysaccharides in functional products and medicinal supplies, and provide the theoretical basis for the full use of Chinese chestnut resources.
Key words　*Castanea mollissima* Blume; Polysaccharide; Extraction; Separation and purification; Chemical structure; Biological activity

板栗为壳斗科(Fagacaea)栗属(*Castanea*)植物 *Castaneamollissima* Blume 的果实,素有“干果之王”的美誉。板栗性温,味甘,有益气补脾、厚肠胃、补肾强筋、活血止血、清热解毒、止泻治咳等功效。临床上,板栗还可用于治疗反胃、泄泻、腰腿软弱、吐血、便血、金疮等症[1]。板栗对肾虚有良好的疗效,故又名“肾之果”。我国板栗品种资源丰富,地域分布辽阔。我国板栗产量约占世界总产量的 3/4,为世界之最[2]。据文献报道,板栗种仁中含有丰富的淀粉、多糖、蛋白质、维生素、微量元素等,营养价值高[3]。近年来,国内外学者已经从板栗中分离得到具有多种生物活性的多糖类物质,如抗氧化、抗凝血、抗肿瘤、抗疲劳和升高白细胞等。笔者在此对近年来国内外有关板栗多糖的提取、分离纯化、含量测定、化学结构和生物活性等方面的研究进展进行综述。

1　板栗多糖的提取方法

1.1　水提取法　水提取法是传统的提取多糖的方法,可分为冷水提和热水提 2 种。冷水提取法主要得到的是存在于细胞壁外一些较易溶解的多糖类物质,而热水穿透能力强,可透过细胞壁将细胞内的多糖提取出来。杨利剑[4]采用热水法提取湖北罗田板栗多糖,其得率为 13.2%。李润丰等[5]研究发现热水浸提法提取河北迁西板栗的最佳条件为温度 60 ℃、料液比 1∶20、提取 1.5 h 的多糖得率为 9.85%。戴成国[6]采用热水浸提法提取陕西镇安板栗中的多糖,通过正交试验法得到最佳提取条件为料液比 1∶30、温度 85 ℃、提取 3 h、重复提取 2 次的得率为 12.64%。水提取法提取时间较长,对多糖的化学结构和生物活性有可能产生影响。目前,一般采用水提法和其他辅助方法相结合,以缩短提取时间且提高多糖的提取率。

1.2　超声波提取法　超声波提取法是利用超声波辐射产生的空化效应、热效应和机械作用,形成高压、高温的环境,加速胞内有效物质的释放、扩散和溶解,提高提取率[7]。刘齐等[8]分别采用超声波提取法、水提取法和碱提取法提取湖北罗田板栗壳中的多糖,发现超声波提取率较高,为 5.99%。李润丰等[5]采用超声波辅助提取法提取板栗多糖的得率为 10.67%,高于热水浸提法的得率(9.85%)。杨芳等[9]采用超声波辅助提取板栗中多糖,得率为 13.94%,提取时间对板栗多糖的提取得率影响最大。戴成国[6]通过超声波辅助法提取陕西镇安板栗中的多糖,当料液比为 1∶25、超声功率为 150 W、在 75 ℃提取 3 h 的得率为 14.17%。

1.3　亚临界水提取法　亚临界水提取法是在一定的压力下,当水温加热到 100 ~ 374 ℃时,水仍然保持液体状态,但与常温常压水相比更类似于有机溶剂,水的极性在较大范围内变化,可实现天然产物中有效成分从水溶性成分到脂溶性成分的连续提取[10-11]。邵亭亭等[12]采用亚临界水萃取板栗多糖,通过水料比、温度、时间和压力对提取条件进行了优化,确定其最佳的提取条件为水料比 20 ml/g、压力 5.0 MPa、温度 150 ℃、时间 10 min,提取得率为 14.89%。亚临界水萃取法的提取得率和提取时间均优于热水浸提多糖。亚临界提取法具有高效、省时等优点。

1.4　加压溶剂萃取法　加压溶剂萃取法是在较高的温度(50 ~ 200 ℃)和压力(6.8 ~ 20.4 MPa)下用有机溶剂萃取固体或半固体的自动化方法。梁雪等[13]采用加压溶剂萃取法提取燕龙板栗中的多糖,通过对提取温度、时间、压力和循环次数的研究,发现最佳提取条件为提取温度 70 ℃、萃取压力 6 MPa、提取时间 8 min、提取 2 次时板栗多糖的提取率最高,为 20.14%。加压溶剂萃取法溶剂用量少,萃取快速且效率高,对多糖结构和生物活性的影响小。

此外,对板栗中多糖的提取方法还有碱提取法[7]、酸提取法[13]、微波提取法[13]等。

基金项目　河北省自然科学基金(B2015201069);河北省教育厅项目(QN2014131);保定市科学研究与发展计划项目(14ZF083)。
作者简介　李红燕(1981 -),女,山东夏津人,助理研究员,博士,从事多糖化学结构与生物活性研究。
收稿日期　2015-09-22

2　板栗多糖的分离纯化

多糖分离纯化的方法有分级沉淀法、凝胶过滤法、亲和层析法、活性炭脱色法、季铵盐沉淀法、透析法、金属络合物法、离子交换层析法等。比较常用的方法为:提取后的粗多糖通过透析除去小分子的杂质,Sevag 法、蛋白酶法等脱蛋白,活性炭或大孔树脂等脱色,离子交换柱色谱法按照多糖组分所带的电荷分离和凝胶渗透柱色谱法按照多糖分子量的大小分离,从而得到均一的多糖组分。经纯化后的多糖组分采用比旋光度法、凝胶过滤法、高效凝胶渗透色谱法、电泳法、超离心法等对其纯度进行鉴定,并参照分子量标准品对其相对分子量进行表征。邵亭亭[14]对罗田板栗粗多糖采用乙醇分步沉淀法,通过加入终浓度为 40%、60% 和 80% 的乙醇,按照多糖分子量的大小分级得到 3 种多糖组分 CP1、CP2 和 CP3,采用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱对 CP3 组分进一步纯化。李清宇等[15]从陕西镇安板栗中提取得到粗多糖,经 DEAE-52 纤维素柱层析分离得到多糖组分 CPS-1 和 CPS-2;CPS-1 和 CPS-2 采用 Sephadex G-100 柱层析进一步分离,收集单一对称的洗脱峰,分别得到多糖组分 CPS-a 和 CPS-b;以蓝色葡聚糖和标准葡聚糖为分子量标准品,经液相渗透色谱法检测 CPS-a 和 CPS-b 的分子量分别为 34.5 和 52.1 kDa。

3　板栗多糖含量测定

可采用蒽酮 - 硫酸法、苯酚 - 硫酸法等方法对多糖的含量进行测定。原理为多糖在浓硫酸作用下水解为单糖,再脱水形成糠醛衍生物,与蒽酮或苯酚形成有色化合物,通过紫外分光光度法测定其吸光度值来测定总糖含量。李润丰等[16]采用蒽酮 - 硫酸法测得河北迁西板栗多糖的含量为 12.67%。单舒筠等[17]采用蒽酮 - 硫酸法对河北迁西和辽宁丹东板栗多糖的含量进行测定,二者总多糖含量分别为 58.98% 和 35.83%。

4　板栗多糖的化学结构研究

多糖的分子量较大,化学结构比较复杂。多糖的化学结构主要包括单糖组成、分子量、糖苷键的类型、连接方式、连接顺序、分支度、取代基等。多糖的结构特征对其生物活性具有重要的影响[18-20],明确多糖的化学结构是进行其生物功能研究和开发应用的前期基础。但多糖结构的复杂性影响了对其活性及作用机理的研究。近年来,随着波谱技术的发展,可采用核磁共振波谱、气质联用色谱、质谱等先进的仪器分析手段,并结合计算科学、生物化学、免疫学等,对多糖的结构进行分析和改造,并对多糖的药理作用和构效关系等各个方面进行研究,推动多糖类药物的发展。

李清宇等[15]从陕西镇安板栗中分离纯化得到多糖组分 CPS-a 和 CPS-b,气相色谱分析表明,CPS-a 主要由葡萄糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成,其摩尔比为 7.1∶6.2∶5.1∶4.1;CPS-b 由葡萄糖、果糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成,摩尔比为 7.1∶6.4∶6.2∶5.0∶4.1。杨利剑[4]通过气相色谱分析发现湖北罗田板栗多糖由葡萄糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成。陈和生等[21]通过纸色谱和气相色谱分析表明罗田板栗多糖由葡萄糖、甘露糖、木糖和阿拉伯糖组成,比例为 0.58∶1.00∶0.33∶0.18,平均分子量为 164.0 kDa。邵亭亭[14]从罗田板栗中分离纯化得到多糖组分 CP3,薄层和气相色谱法分析表明 CP3 主要由葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖组成,其摩尔比为 1.00∶0.71∶0.64∶4.94;刚果红试验发现 CP3 含有三股螺旋结构。Yang 等[22]发现板栗硬化后,细胞壁中 1,3-连接的果糖、1,3-和 1,6-连接的葡萄糖含量减少,而 1,4-连接的阿拉伯糖、1,6-连接的半乳糖和 1,3-连接的木糖含量均增加。Moine 等[23]从西班牙栗的脱木素综纤维素碱提取物中纯化出葡萄糖醛酸木聚糖,结构为线性 β-1,4-连接的吡喃木糖,每 6 个木糖中有一个在 C-2 位取代的 4-O-甲基葡萄糖醛酸。Barbat 等[24]从西班牙栗和刺阿干树的脱木素踪纤维素碱提取物中分离得到木聚糖,结构为 4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖和木聚糖。目前,有关板栗多糖报道主要集中于多糖的提取方面,对其精细化学结构方面的报道较少,这与多糖结构本身的复杂性有很大的关系。

5　板栗多糖的生物活性研究

多糖作为重要活性成分,日益引起国内外研究学者的关注。目前,国内外有关板栗多糖的文献主要从以下几个方面对其生物活性进行了研究。

5.1　抗氧化活性　Wang 等[25]对辽东丹东板栗叶中多糖的抗氧化活性进行研究,发现粗多糖 CLP 和纯化后的多糖 CLP1 对羟基自由基、超氧阴离子和过氧化氢均具有中等强度的清除能力。邵亭亭[14]分析发现罗田板栗多糖具有抗氧化活性,分级沉淀后多糖对 DPPH 自由基的清除率增加,大小依次为 $CP_3 > CP_2 > CP_1 > CP$;当 CP_3 浓度为 1 mg/ml 时,对 DPPH 自由基的清除率为 84.82%。李润丰等[26]对板栗热水提取多糖的抗氧化活性进行研究,发现板栗热水提多糖对脂质体氧化、Fenton 反应产生的羟自由基和 NO_2^- 自由基均具有一定的消除或抑制作用,且活性与浓度呈正相关性。邵亭亭等[12]分析发现罗田板栗多糖在相同浓度下,亚临界水萃取的抗氧化活性均高于常规热水提取多糖。板栗沸水提多糖 CPS 对过氧化氢的清除效果与 Vc 相当,纯化后多糖 CSP1 对羟自由基、超氧阴离子和过氧化氢的清除作用均降低[1]。戴成国[6]研究发现陕西镇安板栗多糖在体外对还原力和 DPPH 自由基、超氧阴离子、羟基自由基的清除能力随着多糖浓度的增大而增强。

5.2　抗肿瘤活性　邵亭亭[14]研究发现罗田板栗多糖组分 CP_3 浓度为 1 mg/ml 时,对人肝癌细胞 HepG2 和宫颈癌细胞 HeLa 的抑制率分别为 32.79% 和 12.08%。梁雪[27]研究发现燕龙板栗多糖浓度为 300 μg/ml 时,对人肝癌细胞 Bel-7402、肺癌细胞 A-549 和子宫癌细胞 HCT-8 的生长抑制率分别为 69.5%、51.4% 和 55.3%,且有剂量依赖关系。Barbat 等[24]从西班牙栗中分离得到 4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖,其可抑制人表皮癌细胞 A-431 的增生、迁移和侵袭的能力,此活性与其聚合度、4-O-甲基葡萄糖醛酸与木糖的比例以及 4-O-甲基葡萄糖醛酸在木糖骨架上的分布密切相关。

5.3　抗凝血、升高白细胞活性　罗田板栗多糖可明显增强昆明种小鼠的凝血时间,升高小鼠的白细胞[4,21]。板栗多糖

对机体损伤有保护作用。聂牧等[28]对板栗热水提多糖的抗动脉血栓作用进行研究,发现板栗多糖(100、200 mg/kg)可明显延长小鼠出血时间、凝血时间及血栓形成时间,降低血流波动性。板栗多糖抗动脉血栓作用机制与其抗血小板和抗凝血有关。

5.4 抗疲劳作用 李清宇等[15]研究发现陕西镇安板栗多糖中等剂量为 200 mg/(kg·d)时,抗疲劳作用优于低剂量 100 mg/(kg·d)和高剂量 400 mg/(kg·d)的效果,中等剂量的板栗多糖能显著提高小鼠的运动耐力,降低运动后血乳酸和血尿素氮的含量,提高肌糖原和肝糖原的含量。

6 展望

板栗作为药食两用的果中珍品,很早就被作为药物治疗各种疾病。研究表明,板栗中含有丰富的多糖类物质,药理试验发现板栗多糖具有抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、升高白细胞和抗疲劳等多种生物学活性。目前对板栗的开发应用尚处于初级阶段。我国为板栗种植大国,产量为世界之最。目前我国主要以鲜板栗直接出口,产品附加值低。针对我国板栗产业发展的现状,应加大科技创新投入,运用现代科技手段大力提升板栗的精深加工能力,如对板栗中活性多糖的结构及其生物活性进行系统研究,研究开发高附加值的功能产品和医药用品等,为充分利用我国板栗资源优势拓展新的应用途径。

参考文献

[1] 何玲玲,王新,刘彬,等. 板栗多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2010,26(2):72-75.

[2] 霍婷,杨建华,薛文通,等. 板栗的综合开发与应用[J]. 食品工业科技,2008,29(7):297-300.

[3] DE VASCONCELOS M C B M,BENNETT R N,ROSA E A S,et al. Composition of European chestnut(*Castanea sativa* Mill.)and association with health effects:Fresh and processed products[J]. Journal of the science of food and agriculture,2010,90:1578-1589.

[4] 杨利剑. 板栗多糖的提取、成分分析及活性测定[J]. 武汉理工大学学报,2010,32(11):14-16.

[5] 李润丰,常学东,陈雪娜. 板栗多糖提取工艺的研究[J]. 林产化学与工业,2011,31(2):96-100.

[6] 戴成国. 板栗多糖的分离纯化、结构分析及体外抗氧化研究[D]. 西安:陕西师范大学,2011:26,45.

[7] 邬方宁. 超声提取技术在现代中药中的应用[J]. 中草药,2007,38(2):315-316.

[8] 刘齐,杨芳,杜萍,等. 3 种方法对板栗壳多糖提取的比较[J]. 食品科学技术学报,2013,31(3):57-63.

[9] 杨芳,曹银,廖绪标,等. 板栗多糖的超声波辅助提取技术[J]. 湖北农业科学,2012,51(12):2552-2555.

[10] 张海辉,武妍,段玉清,等. 亚临界水萃取米糠蛋白工艺与功能性研究[J]. 农业机械学报,2011,42(11):139-143.

[11] SMITH R M. Extractions with superheated water[J]. Journal of chromatography A,2002,975(1):31-46.

[12] 邵亭亭,张海晖,段玉清,等. 亚临界水萃取板栗多糖及其清除自由基活性研究[J]. 食品科技,2012,37(12):156-160.

[13] 梁雪,杨越冬,杜彬,等. 用加压溶剂萃取法提取板栗多糖的工艺条件[J]. 经济林研究,2013,31(3):98-102.

[14] 邵亭亭. 板栗多糖的分离纯化、结构鉴定及其活性研究[D]. 镇江:江苏大学,2013:32-35,50.

[15] 李清宇,杨颖,贾琳斐,等. 板栗多糖的分离纯化、结构分析及抗疲劳作用的研究[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(7):767-772.

[16] 李润丰,常学东,狄小丽. 蒽酮-硫酸法测定板栗多糖含量[J]. 河北科技师范学院学报,2010,24(2):54-59.

[17] 单舒筠,孙博航,高慧媛,等. UV 和 HPLC 法分别测定板栗种仁中总多糖和没食子酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(12):983-986.

[18] GHOSH T,CHATTOPADHYAY K,MARSCHALL M,et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides:From structure-activity analysisto clinical evaluation[J]. Glycobiology,2008,19:2-15.

[19] MELO F R,PEREIRA M S,FOGUE D,et al. Antithrombin-mediatedanticoagulant activity of sulfated polysaccharides[J]. Journal of biological chemistry,2004,279:20824-20835.

[20] MAO W J,FANG F,LI H Y,et al. Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*[J]. Carbohydrate polymers,2008,74:834-839.

[21] 陈和生,孙振亚,李汉东,等. 罗田板栗多糖的分离纯化及成分分析[J]. 中国药学杂志,2002,37(1):63-64.

[22] YANG B,JIANG G X,GU C Q,et al. Structural changes in polysaccharides isolated from chestnut (*Castanea mollissima* Bl.) fruit at different degrees of hardening[J]. Food chemistry,2010,119:1211-1215.

[23] MOINE C,KRAUSZ P,CHALEIX V,et al. Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*[J]. Journal of natural products,2007,70:60-66.

[24] BARBAT A,GLOAGUEN V,MOINE C,et al. Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-methylglucuronoxylan from *Castanea sativa* 2. Evidence of a structure-activity relationship[J]. Journal of natural products,2008,71:1404-1409.

[25] WANG X,KONG Y,LIU B,et al. Isolation,purification and antioxidant activities of polysaccharides from the leaves of *Castanea mollissima* Bl.[J]. Journal of Liaoning University,2011,38(1):54-59.

[26] 李润丰,刁华娟,彭友舜,等. 板栗多糖的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(8):21-25.

[27] 梁雪. 板栗不同品种(系)多糖结构和活性的初步研究[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院,2013:52.

[28] 聂牧,王云,郭守东,等. 板栗多糖抗动脉血栓形成的作用[J]. 食品科学,2015,36(11):187-190.

(上接第 81 页)

[26] HUANG M B,SHAO M G,ZHANG L,et al. Water use efficiency and sustainability of different long-term crop rotation systems in the Loess Plateau of China[J]. Soil & tillage research,2003,72:95-104.

[27] 徐学选,陈国良,穆兴民. 不同干旱强度对糜子产量的影响及其在估产中的应用[J]. 水土保持学报,1994,14(6):41-47.

[28] 张美俊,杨武德,乔治军,等. 不同糜子品种萌发期对干旱胁迫的响应及抗旱性评价[J]. 草地学报,2013,21(2):302-307.

[29] 贾根良,代惠萍,冯佰利,等. PEG 模拟干旱胁迫对糜子幼苗生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2008,28(10):2073-2079.

[30] 张盼盼,冯佰利,王鹏科,等. 干旱条件下糜子叶片衰老与保护酶活性变化[J]. 干旱地区农业研究,2010,28(2):99-104.

[31] 冯晓敏,张永清,李鹏,等. 糜子幼苗对不同强度干旱胁迫的形态与生理响应[J]. 干旱地区农业研究,2013,31(2):176-183.

[32] 闫江艳,张永清,冯晓敏,等. 干旱胁迫及复水对不同黍稷品种根系生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2012,32(2):348-354.

[33] 郭礼坤. 逆境成苗生态生理研究(2)-干旱条件下药剂处理种子对提高糜子成苗的作用[J]. 中国科学院西北水土保持研究所集刊,1988(8):26-31.

[34] 刘天鹏,董孔军,何继红,等. 糜子育成品种芽期抗旱性鉴定与评价研究[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(4):746-752.

[35] 王海茹,张永清,董文晓,等. 水氮耦合对黍稷幼苗形态和生理指标的影响[J]. 中国生态农业学报,2012,20(11):1420-1426.

[36] 李鹏,张永清,闫江艳,等. 不同基因型黍子幼苗对低磷胁迫的生理响应[J]. 江苏农业学报,2012,28(6):1306-1311.

[37] 张美俊,乔治军,杨武德,等. 不同糜子品种对低氮胁迫的生物学响应[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(3):661-669.

[38] 李占成,张丽丽,李玮,等. 盐胁迫对糜子种子发芽的影响[J]. 作物杂志,2010(6):122-123.

[39] 刘敏轩,张宗文,吴斌,等. 黍稷种质资源芽、苗期耐中性混合盐胁迫评价与耐盐生理机制研究[J]. 中国农业科学,2012,45(18):3733-3743.

[40] 冯晓敏,张永清. 水分胁迫对糜子植株苗期生长和光合特性的影响[J]. 作物学报,2012,38(8):1513-1521.

[41] 李鹏,张永清. 低磷胁迫对不同黍稷品种光合特性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2012(7):35-39.

[42] 代惠萍,冯佰利,高金锋,等. 糜子叶片衰老与活性氧代谢研究[J]. 干旱地区农业研究,2008,26(1):217-220.

[43] 代惠萍,冯佰利,贾根良,等. 糜子根系与旗叶协同衰老的生理生化机理研究[J]. 西北植物学报,2008,28(8):1663-1668.

[44] 张永清,苗果园. 切断深层根对黍子根系及地上部营养生长的影响[J]. 干旱地区农业研究,2006,24(1):134-137.

[45] 陈心想,何绪生,耿增超,等. 生物炭对不同土壤化学性质、小麦和糜子产量的影响[J]. 生态学报,2013,33(20):6534-6542.