

库拉索芦荟多糖的分离纯化和含量测定

陈伟,陈俊,林新华,黄丽英,罗红斌(福建医科大学药理学系,福建 福州 350004)

摘要:目的 分离纯化库拉索芦荟多糖并建立含量测定方法。方法 醇沉法提取库拉索芦荟多糖, Sephadex G-100凝胶柱色谱纯化。以甘露糖为标准,苯酚 硫酸法测定库拉索芦荟多糖含量。结果 经分离纯化得到的主要组分库拉索芦荟多糖 I含量为 81.11%,测定平均回收率为 100.3%。结论 该方法可从库拉索芦荟中提取分离纯度较高的多糖,含量测定方法简便、快速、重现性好。

关键词:库拉索芦荟;多糖;分离;纯化;测定

中图分类号: S567.2; R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)02-0131-03

Isolation, purification and determination of the polysaccharide of *Aloe barbadensis*

CHEN Wei, CHEN Jun, LIN Xin-hua*, HUANG Li-ying, LUO Hong-bin (Department of Pharmaceutical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To isolate, purify the polysaccharide of *Aloe barbadensis* Miller and establish the content determination method. **METHOD** The polysaccharide was precipitated with ethanol and further purified on Sephadex G-100 column. Its total soluble sugar content was detected colorimetrically by the phenol-sulfuric acid method with mannose as standard. **RESULTS** The total sugar content of polysaccharide I was 81.11%. The average recovery was 100.3%. **CONCLUSION** It is possible to extract and isolate purified polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller. And the determination method is simple, rapid and well reproducible.

KEY WORDS: *Aloe barbadensis* Miller; polysaccharide; isolation; purification; determination

芦荟为百合科多年生肉质草本植物,广泛分布于热带、亚热带地区。芦荟种类繁多,其中具有代表性的药用品种有库拉索芦荟 (*Aloe barbadensis* Miller)、木立芦荟 (*Aloe arborescens* Miller)、中华芦荟 (*Aloe vera* L. var. *chinensis*)等。据国内外的研究报道,芦荟所含的主要生物活性成分为蒽醌类物质和多糖。多糖是芦荟叶凝胶部分除去水分外的主要成分,具有免疫调节作用及抗肿瘤、抗病毒、抗衰老等功效^[1-4]。本实验以 McAnalley 冷处理法提取库拉索芦荟多糖,用葡聚糖凝胶柱色谱进行纯化,并建立其含量测定方法。

1 仪器与试剂

7530型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);高效凝胶柱色谱(Pharmacia);BS-100A自动部分收集器(上海精科实业有限公司)。葡聚糖凝胶 Sephadex G-100(Pharmacia);无水乙醇(中国成都金山化工试剂厂,AR);硫酸(上海化学试剂有限公司,AR);苯酚(上海试剂一厂,AR;重蒸后使用);D-甘露糖(上海试剂二厂,AR);D-葡萄糖(中国医药上海试剂公司,AR)。其他试剂均为分析纯,水为二

次蒸馏水。

2 方法

2.1 库拉索芦荟粗多糖的提取

取已成熟的新鲜芦荟叶片,洗净,去刺,剥皮,分离凝胶部分粉碎匀浆,浆液过 100目筛除去纤维质。过筛液汁中加入无水乙醇至 80%,4℃放置过夜,5000 r/min 离心得多糖沉淀,冷冻干燥后得浅灰褐色芦荟粗多糖。

2.2 库拉索芦荟多糖的纯化

Sephadex G-100凝胶充分溶胀后装柱,用蒸馏水平衡 48h。取芦荟粗多糖溶于蒸馏水中,离心除去不溶物,上清液上柱分离,用蒸馏水洗脱,洗脱速度 5 mL/20 min,自动收集器收集 5 mL/管。检测并收集主要峰部分,冷冻干燥得白色芦荟多糖 I。

2.3 苯酚 硫酸法

精密称取甘露糖 100.0 mg 置 100 mL 量瓶中,蒸馏水溶解并定容至刻度,摇匀,制得 1.000 mg/mL 甘露糖标准贮备液。准确移取甘露糖标准贮备液 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50,

基金项目:福建省科技厅重点攻关课题(2002J015)

通讯作者:林新华

3.00, 3.50, 4.00, 4.50 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 加水至刻度。分别取上述溶液 2.00 mL 置具塞试管中, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 快速加入 5.0 mL 浓硫酸, 静置 20 min, 以试剂空白为参比, 在 490 nm 波长处测定吸光度。

3 结果

3.1 库拉索芦荟多糖的紫外吸收光谱

库拉索芦荟多糖水溶液以蒸馏水为参比, 在 200 ~ 340 nm 波长范围内扫描。实验结果表明, 芦荟多糖在 200 nm 波长附近有特征吸收峰, 因此考虑采用紫外法替代苯酚 硫酸法作为芦荟多糖凝胶柱色谱分离的检测方法。

3.2 库拉索芦荟多糖的纯化

过柱收集液分别以紫外法 (200 nm) 和苯酚 硫酸法检测洗脱峰位置, 结果表明在芦荟多糖凝胶柱色谱分离中紫外法 (200 nm) 与苯酚 硫酸法检测的洗脱峰一致, 见图 1。而紫外检测法不需消耗样品, 同时具有测定速度快、检测灵敏度高的优点。因此, 实验中选用紫外法作为凝胶柱色谱的检测方法。

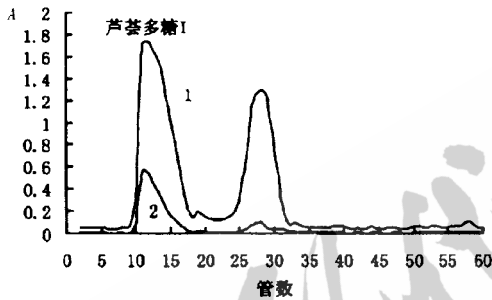


图 1 芦荟粗多糖凝胶柱色谱纯化

Fig 1 Purification of crude polysaccharide on Sephadex G-100 column
1. 紫外法 (200 nm); 2. 苯酚 硫酸法
1. UV (200 nm); 2. Phenol-sulfuric acid method

3.3 芦荟多糖纯度鉴定

芦荟多糖 1 经高效凝胶柱色谱检测为单一对称洗脱峰, 表明其为均一多糖, 结果见图 2。API 的平均分子量约为 1500×10^3 。

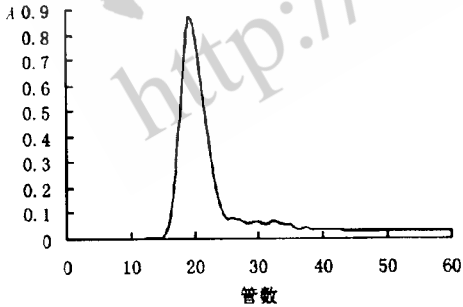


图 2 芦荟多糖 1 纯度鉴定

Fig 2 Purity detection of API

3.4 芦荟多糖含量测定

3.4.1 吸收光谱的绘制 分别取甘露糖、葡萄糖标准溶液和芦荟多糖溶液 2.0 mL, 用苯酚 硫酸法显色, 以试剂空白为参比, 在 350 ~ 550 nm 波长范围内扫描, 结果见图 3。

实验结果表明, 芦荟多糖与甘露糖在 430 nm 与 490 nm 处

各有一吸收峰, 且两者吸收曲线形状相似, 而葡萄糖仅有 490 nm 的吸收峰。

3.4.2 标准曲线的绘制 按“2.3”方法测定甘露糖各标准液吸光度, 以吸光度为纵坐标, 甘露糖浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $A = 12.27C - 0.0037$ (C 为甘露糖浓度, 单位 mg/mL), $r = 0.999$ 。

3.4.3 稳定性试验 甘露糖和芦荟多糖的苯酚 硫酸法显色产物的吸光度稳定性见表 1。

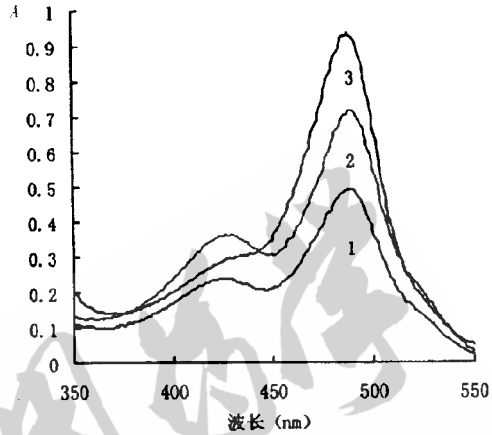


图 3 吸收光谱

Fig 3 Spectrums
1. 芦荟多糖; 2. 甘露糖; 3. 葡萄糖
1. API; 2. mannose; 3. glucose

表 1 稳定性试验结果

样品	时间 (min)					
	5	10	20	30	60	120
甘露糖	0.674	0.670	0.668	0.665	0.658	0.651
芦荟多糖	0.821	0.819	0.821	0.821	0.818	0.816

从表 1 可见, 显色产物在 2 h 内稳定性良好。

3.4.4 精密度试验 平行取 6 份的甘露糖和芦荟多糖溶液, 苯酚 硫酸法显色后测定, 甘露糖的浓度为 0.0531, 0.0516, 0.0521, 0.0542, 0.0542, 0.0539 mg/mL , 平均值为 0.0532 ± 0.0011 , RSD 为 2.1%; 芦荟多糖浓度为 0.0652, 0.0666, 0.0675, 0.0672, 0.0675, 0.0672 mg/mL , 平均值为 0.0669 ± 0.0009 , RSD 为 1.3%。

3.4.5 回收率实验 取芦荟多糖 1 溶液 5 份, 分别加入不同浓度的甘露糖标准液, 进行回收实验, 测定结果见表 2。

表 2 芦荟多糖 1 回收率测定结果

Tab 2 Results of recovery test					
芦荟多糖量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.0811	0.0400	0.1214	100.8		
0.0406	0.0500	0.0913	101.4		
0.0406	0.0600	0.0997	98.5	100.3	1.2
0.0203	0.0700	0.0903	100.0		
0.0203	0.0800	0.1011	101.0		

3.4.6 样品测定 精密称取芦荟多糖 10.0 mg , 加水溶解, 定量转移入 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。准确吸取 2.00 mL 按“2.3”实验方法显色, 测定吸光度, 计算芦荟多糖

的含量(以甘露糖计)。结果表明纯化后的芦荟多糖 I 的糖含量为 81.11%,显著高于粗多糖(25.30%)。

4 讨论

4.1 库拉索芦荟多糖经 Sephadex G-100 凝胶柱色谱分离可得到不同分子量的两个多糖成分,其中多糖 I 为主要成分。利用芦荟多糖的紫外吸收特征对洗脱过程进行检测,具有快速、灵敏、不消耗样品的优点,可替代苯酚-硫酸法。

4.2 关于苯酚-硫酸法测定多糖含量的报道中,实验方法有所差异,主要不同在于是否加热以及加热的温度和时间^[5-7]。本实验通过实验证明,通过快速加入浓硫酸时所产生的热量即可使糖充分显色,不需加热。但实验中应注意硫酸试剂的含水量,如含水量偏高,则会影响测定结果。

采用苯酚-硫酸法测定多糖含量时,不同单糖显色产物的最大吸收波长与吸收值有一定差异。因此,选择合适的标准物质是实验的关键。在现有的文献报道中,芦荟多糖的测定均以葡萄糖为标准^[8-10]。而结构分析表明芦荟多糖的主要组成单糖是甘露糖,本实验通过甘露糖、葡萄糖和芦荟多糖的苯酚-硫酸法显色产物的吸收光谱特征比较,也证明了芦荟多糖的吸收光谱与甘露糖基本一致,而与葡萄糖不同。因此,本实验采用甘露糖为标准测定芦荟多糖,能更准确地反映其含量。

参考文献

- [1] Peng SY, Noman J, Curtin G, *et al*. Decreased mortality of Norman Murine Sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan[J]. *Mol Biother*, 1991, 3(2): 79.
- [2] Yates KM, Rosenberg LJ, Harris CK, *et al*. Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1992, 35(1-2): 177.
- [3] 李克才,陈钦耀,曹明霞,等.芦荟多糖对多刺裸腹蚤的生物学效应—一种抗衰老药物的筛选试验[J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 1999, 23(1): 107.
- [4] 王宝珍,张天斌,马冰如.黑麦粗多糖的总糖含量测定研究[J]. *白求恩医科大学学报*, 1995, 21(3): 275.
- [5] 刘友平,李祖伦,陈红,等.分光光度法测定川牛膝中多糖含量[J]. *成都中医药大学学报*, 1997, 20(4): 49.
- [6] 邓俊林,许平,王志勇.茶叶多糖的分离纯化及分析[J]. *重庆师范学院学报*, 1998, 15(2): 35.
- [7] 陈丹,包国荣,陈卫琳.斑纹芦荟与库拉索芦荟原胶中多糖含量研究[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(6): 359.
- [8] 郑荣珍,方仲根,叶海辉.蕃拉芦荟水溶性多糖的分离与鉴定[J]. *热带作物学报*, 2000, 21(3): 49.
- [9] 陈丹,包国荣,黄鑫,等.闽产木立芦荟多糖的分离纯化及初步分析[J]. *福建医科大学学报*, 2002, 36(2): 193.

收稿日期: 2003-07-16

[1] Jae KL, Myung KL, Yeo PY, *et al*. Acemannan purified from Aloe