RP-HPLC用于芦荟多糖的单糖组成研究

林 雪，贾敬芬，黄琳娟，王仲孚*
(西北大学生命科学学院，西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室，陕西 西安 710069)

摘 要： 采用水提醇沉法提取芦荟多糖，用三氟乙酸(TFA)水解，通过1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生水解后的单糖，衍生物用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析，紫外检测，研究了三种常见芦荟多糖的单糖组成及摩尔比。结果表明：利用RP-HPLC研究芦荟多糖的单糖组成简便易行，并且芦荟多糖因品种不同存在单糖组成差异。从而建立了研究芦荟多糖的新方法。

关键词： 芦荟多糖；衍生化；1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮；反相高效液相色谱

Study on the Use of RP-HPLC in Analysis of *Aloe* Polysaccharide Composition

LIN Xue, JIA Jing-fen, HUANG Lin-juan, WANG Zhong-fu*
(Key Laboratory of Ministry of Education for Western China Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: In this article, *Aloe* polysaccharide was extracted by water and precipitated by ethanol. The polysaccharide was hydrolyzed by TFA. A method for the derivatization of polysaccharide hydrolysate with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) was used to study the composition and molar ratio of three different species of *Aloe* by RP-HPLC. Results showed that the method of using RP-HPLC on studing *Aloe* polysaccharide composition is simple and convienient, and the *Aloe* polysaccharides

收稿日期：2005-06-27 *通讯作者
作者简介：林雪(1980-)，女，硕士研究生，主要从事糖及糖生物工程方向的研究。

表2 方法精密度及回收率
Table 2 The method precision and recovery

组分	样品含量(mg)	添加量(mg)	测定值	回收率(%)	RSD(%)
果糖	130	104	239	103	0.96～1.3
葡萄糖	124	97	216	96	0.83～1.24
蔗糖	188	126	316	100	1.1～1.71

果糖标准，另外1份不加，按实验方法平行测定5次，计算回收率(回收率为：加标样品测出量减去样品测出量，再除以标准加入量)及相对标准偏差，结果见表2所示。实验表明3种糖的平均回收率分别为103%、96%和100%，表明该方法具有较高的准确度。3种糖的峰面积相对标准偏差(RSD)均小于2%，说明此检测方法精密度较高。

3 结 论

采用固相萃取预分离去除柑橘汁中的色素、多酚、有机酸、酯类物质等干扰组分，以Agilent Zorbax Carbohydrate(4.6×250mm，5μm)糖分析柱为固定相，80%乙腈为流动相，柱温25±2℃。本方法的相对标准偏差0.83%～1.71%，标准回收率96%～103%。此方法简便快速，结果准确可靠，为果汁中糖组成的分析提供了一种好方法。

参考文献：

[1] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
[2] 杨亚玲, 孟冬玲, 孙海林, 等. 固相萃取和高效液相色谱法测定水果中的糖[J]. 云南化工, 2003, 30(2): 28-30.
[3] 周红, 杨祥良, 张晓昱, 等. 半纤维素菌株发酵液中单糖及二糖的分析[J]. 武汉化工学院学报, 2002, 24(4): 17-19.
[4] 王璐, 耿永勤, 王岚, 等. 烟草中主要糖的高效液相色谱测定研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2004, 26: 199-202.
[5] 石瑞. 单糖的分析方法及进展[J]. 四川食品与发酵, 1997, (1): 29-33.
[6] Svob Troje Z, Frobe Z, Pervoic D. Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 775(1): 101.
[7] Mullin W J, Emmons D B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography[J]. Food research international, 1997, 30(2): 147-151.

content and sugar composition show differences among different species. Thus, a new method to study *Aloe* polysaccharide composition is established.

Key words: *Aloe* polysaccharide; derivatization; 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone; RP-HPLC
中图分类号: S682.19 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)04-0192-04

多糖是广泛存在于自然界的天然高分子化合物，它由单糖通过糖苷键连接而成。在生物体内，多糖常与蛋白质或脂类形成糖蛋白或糖脂复合物，在细胞代谢活动中扮演重要角色。早在上世纪60 年代，人们就发现多糖复杂的生物活性和功能。它可以调节免疫功能，促进蛋白质和核酸的生物合成，调节细胞的生长，提高生物体的免疫力，具有抗肿瘤、抗癌和抗爱滋病(AIDS) 等功效,又因多糖毒性极小，所以对多糖类物质的研究将成为继蛋白质和核酸之后的探索生命奥妙的第三里程碑[1]。

研究发现，芦荟多糖是高效的机体免疫促进剂，能通过恢复和提高机体的免疫功能起到抗肿瘤的作用，并且毒副作用很小[2]。不同的芦荟品种，多糖所含的各种单糖的比例是不同的，甚至同一品种不同种植条件下生长的芦荟，多糖的成分、含量和肽链的结构都可能不同。

现有的研究报道多利用气相色谱法(GC)分析芦荟多糖的单糖组成[3,4]。而少见利用高效液相色谱法(HPLC)研究芦荟多糖的单糖组成。因为糖类物质不具有发色基团，不能用紫外检测。而衍生化方法可以使糖类样品带上发色基团，使紫外检测信号增强，大大提高检测灵敏度，某些种类的糖类物质经衍生反应后极性变化，使原本难以分离的成分可以用简单的、人们熟悉的分离模式分离开来。应用PMP 作为衍生化试剂可以在温和的反应条件下与糖链进行定量反应(见图1)，并用于单糖的组成分析[5~7]，检测限可以达到pmol。 本文在研究单糖的RP-HPLC 分析的基础上用PMP 衍生化方法研究芦荟多糖的单糖组成，并对美国库拉索芦荟、日本木立芦荟及中华芦荟这三个常见的品种进行分析，这对研究其它生物中的多糖具有参考价值。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与试剂

Waters2695_2996 型高效液相色谱仪，色谱柱(Symmetry C_{18}，5μm，3.9×150mm) 美国Waters 公司；Eppendorf 离心机；电热恒温水浴锅。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、鼠李糖(Rha)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、三氟乙酸(TFA)(分析纯) 上海医药集团；乙腈(色谱纯) Fisher 公司；氢氧化钠、乙酸胺、盐酸、无水乙醇、丙酮、乙醚(分析纯) 天津化学试剂厂。

实验用中华芦荟(*Aloe vera L. var. chinesis* (Haw.) Berger)、日本木立芦荟(*Aloe arborescens*. Mill.)、美国库拉索芦荟(*Aloe barbadensis*. Miller.) 本实验室栽培(植龄为1～2 年)。

1.2 芦荟多糖的提取

采用水提醇沉法提取芦荟多糖，具体方法：取芦荟鲜叶(300g)，洗净，去掉叶尖和叶基，在去离子水中浸洗，榨汁，加入一倍的水，90℃超声波场中浸提30min[8]，抽滤，取上清液，滤渣再提取，将所得滤液减压浓缩至15ml，然后向浓缩汁中加入等量的95% 乙醇，静置，高速离心分离得多糖沉淀，反复三次。沉淀依次用乙醇、丙酮、乙醚洗涤，然后真空干燥，得到芦荟粗多糖。

1.3 多糖的水解

称取芦荟粗多糖0.2g，加入2mol/L 的TFA 溶液2ml，封管，110℃水解2h，然后真空干燥样品。

1.4 衍生物的制备

1.4.1 标准单糖混合液的衍生

分别称取Gal、Rha、Glc 和Man 各0.018g，Xyl 0.015g，溶于7.5ml 0.3 mol/L NaOH 溶液中。取该溶液75μl 与50μl 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液混合,在70 ℃下反应30min，反应机理如图1 所示。冷却至室温，加入75μl 0.3 mol/ L HCl 进行中和,中和后的溶液放入真空干燥箱中，于100℃下烘干。烘干后的物质用1ml 的去离子水及1ml 的氯仿溶解，充分振荡后除去有机相。重复3 次。水相溶液经0.45μm 滤膜过滤后，用水稀释至5ml，置于冰箱中保存备用。

1.4.2 芦荟多糖的衍生

将水解后的芦荟多糖按1.4.1的方法进行衍生化处理。

1.5 HPLC 条件

流动相：100mmol/ L 醋酸胺缓冲溶液(pH5.5)/ 乙腈(体积比为78:22)，等度洗脱，流速1ml/min；紫外检测波长:245nm；进样量：10μl；柱温：室温。

2 结果与分析

2.1 线性关系和最小检测限的考察

配制含5 种单糖均为0.01mmol/ml 的混合标准溶液，分别取1、5、10、20、50μl 于进样瓶中，定容到1ml 进行HPLC 分析。根据UV 测定的峰面积对相应单糖的进样浓度进行线性回归。再将标准溶液逐级稀释，依

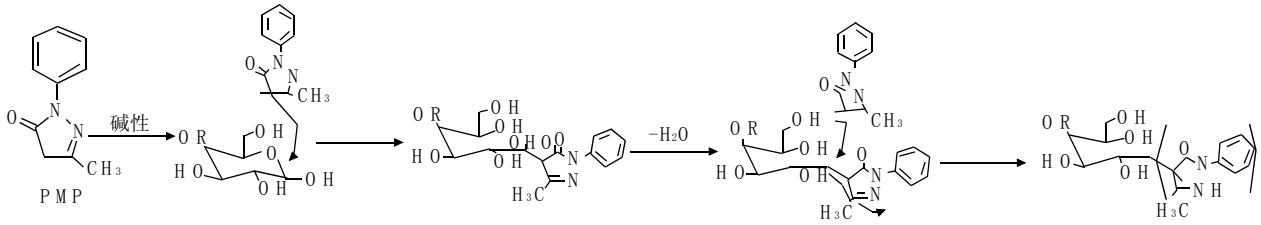

图1　糖链与衍生化试剂PMP的反应机理

Fig.1　Mechanism of glycan derivatization using PMP as derivate

次进样，计算当信噪比为3时所对应的标准溶液的质量浓度以确定最低检测限(LOD)，结果见表1。

表1　5种单糖的标准曲线

Table 1　Calibration curves for five monosaccharides

单糖	相关系数	标准曲线(×10⁴)	最低检测限(ng)
Man	0.9998	Y=0.47x+24.6	0.18
Rha	0.9993	Y=0.25x+11.4	0.17
Glc	0.9989	Y=0.12x+5.8	0.86
Gal	0.9975	Y=0.49x+24.9	1.34
Xyl	0.9987	Y=0.42x+16.8	1.53

2.2　进样精密度和方法重复性考察

考察所建立方法在相同操作条件下短时间内的精密度：5种单糖衍生物的工作溶液，连续7次重复进样分析。在连续进样7次的情况下，半乳糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖的进样精密度(RSD，n=7)分别为2.25%、2.19%、2.38%、2.22%和2.47%。

考察所建立的PMP柱前衍生-HPLC方法整体操作的重复性：同一批标准样品平行配制3份混合溶液进行衍生处理，每一个样品连续进样3次，得到3个平行样中5种单糖峰面积的相对标准偏差。在同时进行的3个衍生化反应中，半乳糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖的进样精密度(RSD，n=3)分别为1.58%、1.12%、0.98%、1.88%和0.91%。

从上述数据可以看出，无论是进样精密度还是方法重复性的峰面积的标准偏差值均小于3%，　PMP柱前衍生化方法适用于单糖及简单的单糖组成分析。

2.3　粗多糖得率的比较

表2给出了三个不同品种的芦荟按照水提醇沉法所得到的芦荟粗多糖的量的差异，由表可知，不同的芦荟品种在相同的提取条件下所得到的粗多糖的量不尽相同，其中木立芦荟的粗多糖得率最高，而库拉索芦荟最低。

2.4　芦荟多糖的PMP衍生物分析

图2给出了混合标准单糖的PMP衍生物的高效液相色谱图。图3、4、5分别给出了库拉索芦荟、木立芦荟和中华芦荟粗多糖的PMP衍生物的高效液相色谱图。

表2　不同品种芦荟的粗多糖得率比较

Table 2　Comparsion of polysaccharide content of three different species of *Aloe*

品种	鲜重(g)	粗多糖(g)	粗多糖得率(%)
库拉索芦荟	300	1.26	0.42
木立芦荟	300	4.05	1.35
中华芦荟	300	1.44	0.48

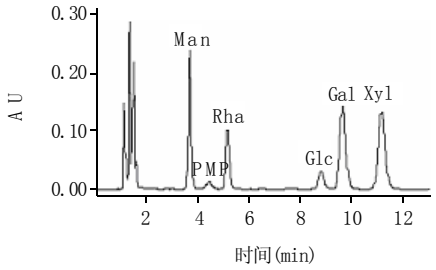

图2　混合标准单糖的PMP衍生物的色谱图

Fig.2　RP- HPLC chromatogram of the PMPderivatives of 5 standard monosaccharide

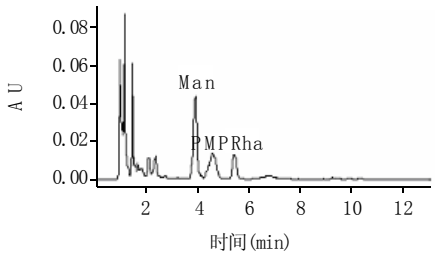

图3　库拉索芦荟多糖水解衍生物的色谱图

Fig.3　RP-HPLC chromatogram of the dervatives of *Aloe* emodin polysaccharide hydrolysate

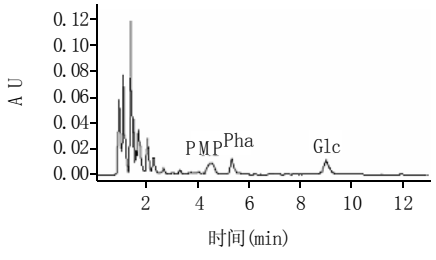

图4　木立芦荟多糖水解衍生物的色谱图

Fig.4　RP-HPLC chromatogram of the derivatives of cande labra *Aloe* polysaccharide hydrolysate

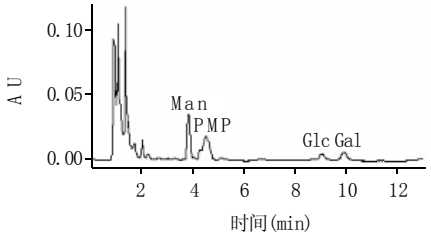

图5 中华芦荟多糖水解衍生物的色谱图

Fig.5 RP-HPLC chromatogram of the dervatives of chinesis *Aloe* polysaccharide hydrolysate

各峰的出峰时间和所代表的化合物如表3所示。通过图3、4、5与图2对比可知，各品种的芦荟粗多糖的单糖组成存在差异，用面积归一法计算[3]，各种单糖组成的摩尔比如表4所示。

表3 标准单糖及多糖水解衍生物的保留时间(min)

Table 3 Retention time of standard monosaccharide and polysaccharide hydrolysate derivatives

成分	标准单糖	库拉索芦荟	木立芦荟	中华芦荟
甘露糖(Man)	3.868	3.815		3.841
鼠李糖(Rha)	5.402	5.310	5.301	
葡萄糖(Glc)	9.089		8.955	8.838
半乳糖(Gal)	9.892			9.923
木糖(Xyl)	11.468			

表4 不同种芦荟的单糖组成差异

Table 4 The difference of sugar composition ratio of three different species of *Aloe*

品种	多糖组成	摩尔比(面积归一法计算)
库拉索芦荟	甘露糖、鼠李糖	2.7:1.0
木立芦荟	鼠李糖、葡萄糖	1.7:3.0
中华芦荟	甘露糖、葡萄糖、半乳糖	14.0:1.7:2.0

由表可见，芦荟多糖的单糖组成随品种的不同而有差异，其中库拉索芦荟粗多糖中含有甘露糖和鼠李糖，摩尔比为2.7:1.0；木立芦荟粗多糖中含有鼠李糖和葡萄糖，摩尔比为1.7:3.0；中华芦荟粗多糖中含有甘露糖、葡萄糖和半乳糖，摩尔比为14.0:1.7:2.0，这与文献[3]所报道的相符合。

3 讨 论

气相色谱法具有选择性好、样品用量少、分辨率高、灵敏度高的优点，但由于糖类物质结构中通常含有NH、OH、SH等极性基团，这些基团的内氢键作用增强了分子内部的吸引力，使得一般糖和糖醇具有沸点高、挥发性低、难气化、热稳定性差等特点。与GC比较，HPLC分析糖类物质时不存在挥发性限制的问题，同时HPLC的多种分离模式可满足大部分不同性质糖的分离分析，已成为目前糖类物质分析的最主要方法。本文对HPLC分析芦荟多糖进行了研究，发现不同品种的芦荟其多糖的单糖组成存在差异。在后续的研究中还对5种单糖的衍生产物进行了质谱分析，以Glc为例，在511和533处分别有[mH^+]和[mNa^+]两个主峰。此法简便易行，对芦荟多糖的定性与定量分析建立了新的方法，有利于深入了解芦荟，研究不同品种、不同产地芦荟的特性，从而加速芦荟的合理开发和利用。并且还可用作其它寡糖的分析研究。

参考文献：

[1] 戴红, 张宗才, 张新申, 等. 芦荟多糖及其分离分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 5-7.

[2] 倪同汉. 芦荟研究利用现状和展望[J]. 日用化学工业, 1997, (2): 33-37.

[3] 王俊玲, 齐祥明, 宗志敏, 等. 芦荟多糖的分离纯化及性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 130-132.

[4] Lehrfeld J. Structural studies of the D_2 glucomannan isolated from *Aloe Vahombe*[J]. Analysis Biochemistry, 1981, 115(2): 410-418.

[5] 徐瑾, 张凌怡, 李彤, 等.单糖的柱前衍生化高效液相色谱及胶束电动毛细管色谱分析的对比研究[J]. 色谱, 2003, (4): 363-366.

[6] James J Pitt, Jeffrey J Gorman. Oligosaccharide characterization and quantitation using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization and matrix-assisted lasser desor-ption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 248: 63-75.

[7] Daotian Fu, Rdger A. O'Neill monosaccharide composition analysis of oligosacchar-ides and glycoproteins by HPLC[J]. Analysis Biochemistry, 1995, 227: 377-384.

[8] 吴广枫, 张拥军, 汤坚. 超声波用于芦荟多糖提取的研究[J]. 食品科技, 2001, (6): 23-24.

[9] 崔莉凤, 王微. 气相色谱法测定芦荟及芦荟干粉中的多糖[J]. 色谱, 2003, 21(1): 88-90.

[10] 林新华, 陈俊, 陈伟, 等. 芦荟多糖的分离提取与含量测定[J]. 福建医科大学学报, 2003, 67(2): 214-215.

信 息