

文章编号: 1007-2985(2009)01-0079-05

气相色谱检测芦荟中海藻糖方法的建立^{*}

赵 华^{1,2}, 何聪芬², 秦允荣², 刘 蕾², 钟 秦¹

(1. 南京理工大学化工学院, 江苏 南京 210094; 2. 北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100037)

摘 要: 用 1-甲基咪唑、氯化羟胺、乙酸酐将海藻糖衍生化, 以气相色谱法作为定量分析手段, 建立了植物组织中微量海藻糖定量检测方法。用该方法对同一种糖类衍生物进行多次分析, 其特征峰保留时间误差在 3 s 内; 能将 D-葡萄糖、乳糖、蔗糖和海藻糖进行分离。海藻糖在 $(3.697 \sim 28.661) \times 10^{-9}$ g 检测量范围内其相关系数为 0.998 6。利用本实验建立的植物组织中微量海藻糖定量检测的方法, 分别对 3 年生、5 年生库拉索芦荟和半年生海藻糖合成酶基因转化芦荟凝胶中海藻糖的含量进行测定, 结果表明: 5 年生库拉索芦荟凝胶中海藻糖含量是 3 年生的 1.59 倍, 每 10 g 凝胶匀浆中分别为 1.103×10^{-5} g 和 6.905×10^{-6} g; 每 10 g 半年生海藻糖合成酶基因转化芦荟凝胶匀浆中海藻糖含量为 1.614×10^{-5} g, 是 3 年生的 2.33 倍。证明目的基因成功转入芦荟并已经表达。

关键词: 气相色谱; 海藻糖; 定量分析; 库拉索芦荟

中图分类号: T Q041

文献标识码: A

海藻糖是一种稳定的非还原性双糖, 在自然界中广泛存在。细菌、酵母、真菌、昆虫和植物中都发现海藻糖。海藻糖具有很好的稳定性, 非特异性保护^[1]与抗辐射^[2]、吸水、防腐等特性^[3]。现在已经有许多试验证实植物体内积累的海藻糖有利于植物抵御诸如干旱、高盐、寒冷等恶劣环境^[4-5]。建立植物组织中海藻糖的定量检测方法, 对于耐旱、耐盐、耐寒植物的筛选和海藻糖合成酶基因转化植物的鉴定有重要意义。但除了几种更苏植物组织中海藻糖含量相对较高外, 大多数植物体内含量非常低微, 所以建立一种植物组织中微量海藻糖的定量检测方法对于检测只有微量海藻糖存在的植物很有必要。海藻糖已经在食品工业、分子生物学、农业、医药工业、化妆品等方面得到了一定程度的应用, 建立植物组织中微量海藻糖的定量检测方法将为海藻糖在这些领域中的定量检测奠定一个很好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海藻糖: 生化试剂, 购自北京化学试剂公司。乳糖: HG0405, 购自北京华广生化公司。蔗糖: 分析纯, 购自北京北化精细化学品有限责任公司。D-葡萄糖, 纯度 > 99.5%, 购自北京益利精细化学品有限公司。1-甲基咪唑: 纯度 99.0% (GC), 购自美国 Sigma 公司。乙酸酐、无水硫酸钠、氯化羟胺、二氯甲烷: 分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器及色谱条件

气相色谱仪: Agilent 6890N; 毛细管色谱柱: Agilent HP-5; 检测器: 氢离子火焰检测器; 自动进样器: Agilent 7683 Seris Injector。均购自美国安捷伦科技有限公司。高纯氢发生器: SGH-300。购自北京东方精华苑科技有限公司。

气相色谱条件为: 气化室温度 250 °C; 检测器温度 300 °C; 进样量 1.0 μ L; 分流比 30:1; 升温程序 50 ~ 220 °C (20 °C/min), 220 ~ 260 °C (10 °C/min), 保持 5 min, 260 ~ 270 °C (10 °C/min), 保持 13 min。

* 收稿日期: 2008-02-25

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2007AA100404); 北京市教委和北京基金委科技重点项目 (KZ200410011006)

作者简介: 赵 华 (1965-), 男, 山西稷山人, 北京工商大学化学与环境工程学院副教授, 主要从事生物化工分离研究
通讯作者: 何聪芬 (1966-), 女, 河北石家庄人, 教授, 博士, 主要从事应用生物技术研究。E-mail: hecf@th.bitbu.edu.cn

1.3 溶液的配制

标准溶液配制: D- 葡萄糖 25.2 g/L; 乳糖 21.2 g/L; 蔗糖 10.0 g/L; 海藻糖 25.1 g/L; 氯化羟胺 100.0 g/L; 以上标准溶液均以 1- 甲基咪唑为溶剂.

1.4 样品衍生化处理

将 A, B, C, D, E 溶液按上述衍生化体积配比配置好后, 按照胡磊等^[6]的方法进行衍生化.

1.5 计算公式

样品检测质量浓度 $C = \frac{C_s \times V_s}{V_s + V_h + V_a + V_d}$, 样品检测质量 $M = \frac{C}{S + 1}$. 其中: C_s 为样品的质量浓度; V_s 为样品的体积; V_h 为氯化羟胺溶液的体积; V_a 为乙酸酐的体积; V_d 为二氯甲烷的体积; S 为气相色谱的分流比.

1.6 标准曲线的制定

分别从 1.3 中配置的海藻糖标准液中取出 5 μ L(A), 10 μ L(B), 15 μ L(C), 20 μ L(D), 40 μ L(E), 将 5 个不同质量浓度的海藻糖标准液按衍生化过程将 A, B, C, D, E 衍生化. 并对 5 个不同质量浓度的海藻糖衍生物进行气相色谱分析. 其中根据实验方法 1.2 中气相色谱条件设置气相色谱的分析参数.

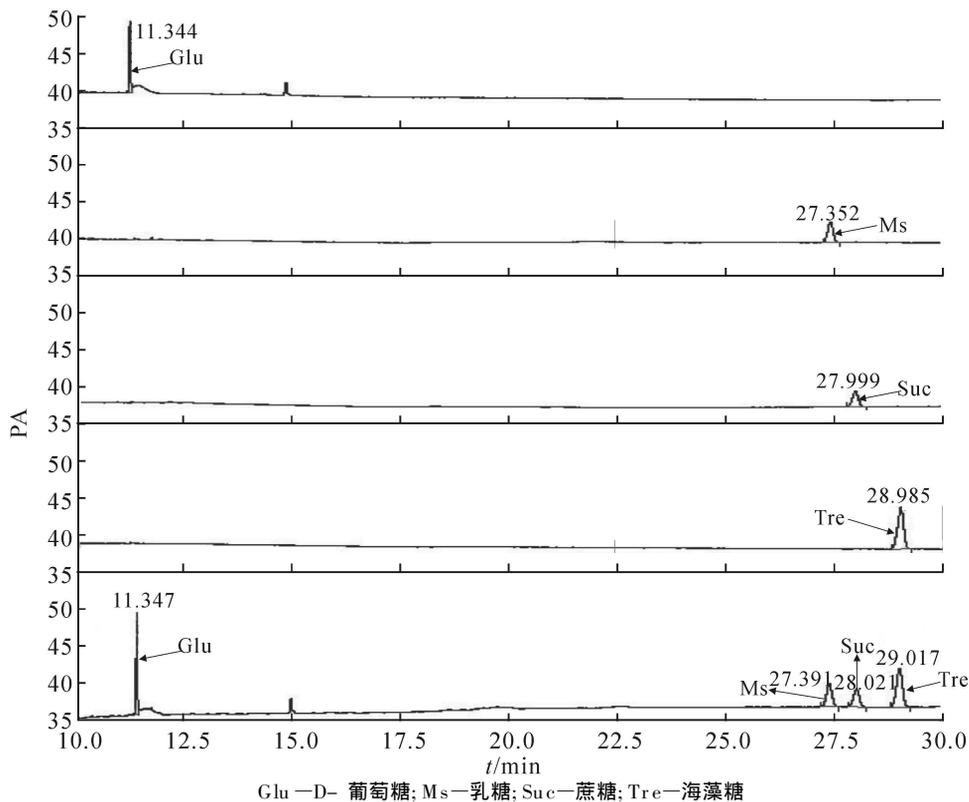
1.7 库拉索芦荟的处理

库拉索芦荟鲜叶(3 年生, 5 年生)和转海藻糖合成酶基因芦荟(半年生)由北京市植物资源研究开发重点实验室提供. 库拉索芦荟凝胶中单、寡糖的提取根据何聪芬^[7]等人的方法并做适当修改: 取库拉索芦荟鲜叶洗净、去皮, 添加 0.5%果胶酶, 打浆后得到芦荟鲜叶凝胶匀浆, 加入 30 mL 无水乙醇, 20 $^{\circ}$ C 超声 30 min, 80 $^{\circ}$ C 水浴, 灭酶 5 min, 获得芦荟凝胶中单糖和寡糖乙醇溶液, 10 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 35 $^{\circ}$ C 旋转蒸发仪浓缩, 获得库拉索芦荟凝胶中的单糖寡糖浓缩液. 气相色谱条件同 1.2.

2 结果与分析

2.1 气相色谱分离 D- 葡萄糖、乳糖、蔗糖和海藻糖能力

用气相色谱对 D- 葡萄糖、乳糖、蔗糖和海藻糖的衍生物进行分析, 其检测量分别为 D- 葡萄糖 7.390 ng, 乳糖 6.217 ng, 蔗糖 2.933 ng, 海藻糖 7.361 ng. 混合物的衍生物气相色谱分析图谱见图 1.



Glu—D- 葡萄糖; Ms—乳糖; Suc—蔗糖; Tre—海藻糖
图 1 4 种糖类衍生物单一及混合分析气相色谱图

从图 1 中可以看出: D- 葡萄糖是单糖, 海藻糖是双糖, 其衍生物特征峰的保留时间相差 14. 093 min, 具有很好的分离效果; 乳糖、蔗糖和海藻糖都是双糖, 海藻糖衍生物与乳糖衍生物、蔗糖衍生物特征峰的保留时间相差分别为 1. 623 min 和 0. 993 min, 特征峰没有重叠, 具有较好的分离效果. 说明此分离条件既适合单糖和双糖也适合于双糖之间的分离.

将糖类衍生物单一分析和混合分析的特征峰保留时间进行比较, 确定是否具有良好的分析的重现性. 比较结果见表 1.

表 1 糖类衍生物单一分析和混合分析的特征峰保留时间比较 min

名称	单一组分	混合组分	相差时间
D- 葡萄糖衍生物	14. 913	14. 922	0. 009
乳糖衍生物	27. 351	27. 392	0. 041
蔗糖衍生物	27. 999	28. 022	0. 023
海藻糖衍生物	28. 995	29. 015	0. 020

从表 1 中可看出: 2 次气相色谱分析中 D- 葡萄糖衍生物、乳糖衍生物、蔗糖衍生物、海藻糖衍生物特征峰的保留时间分别相差 0. 009 min (0. 54 s), 0. 041 min (2. 46 s), 0. 023 min (1. 38 s) 和 0. 020 min (1. 20 s). 说明此分离条件对单糖和双糖的分析具有良好的重现性.

2. 2 标准曲线的制定

对 5 个质量浓度梯度的海藻糖标准溶液进行衍生化, 用气相色谱对其进行分析, 得出海藻糖含量和海藻糖衍生物特征峰面积的对应关系, 结果列于表 2.

表 2 海藻糖检测质量和海藻糖衍生物特征峰面积对应关系

海藻糖标样	A	B	C	D	E
海藻糖含量/ng	3. 679	7. 361	11. 357	14. 589	28. 661
海藻糖衍生物特征峰面积	45. 2	95. 2	152. 2	180. 5	378. 4

通过 MS office 2003 Excel 对海藻糖的检测质量与海藻糖衍生物特征峰面积关系进行分析, 得出线性方程 $Y = 0. 075X + 0. 328 3$, 其中 Y 为海藻糖检测质量(单位为 10^{-9} g), X 为海藻糖衍生物特征峰面积, 相关系数为 0. 998 6. 海藻糖检测质量与其衍生物特征峰面积线性关系见图 2.

实验结果表明该分析方法对海藻糖质量浓度在 114. 6~ 888. 5 mg/L 之间, 海藻糖在 $(3. 697 \sim 28. 661) \times 10^{-9}$ g 的检测量之间具有较好的相关性, 该分析方法适合微量的海藻糖检测.

2. 3 库拉索芦荟中海藻糖含量与其生长阶段的关系

将 3 年生和 5 年生库拉索芦荟鲜叶按照 1. 7 所述进行处理, 单、寡糖提取物的衍生物气相色谱分析的特征峰面积见图 3 和图 4.

对气相色谱图中海藻糖衍生物的特征峰面积进行定量, 并通过标准曲线进行计算, 得出 3 年生和 5 年生库拉索芦荟凝胶中海藻糖含量. 比较结果见表 3.

表 3 3 年生和 5 年生库拉索芦荟凝胶中海藻糖含量的比较

芦荟	特征峰面积	匀浆质量/g	每 10 g 匀浆海藻糖的含量/ μ g
3 年生	7. 3	6. 798 7	6. 90
5 年生	15. 8	7. 356 1	11. 03

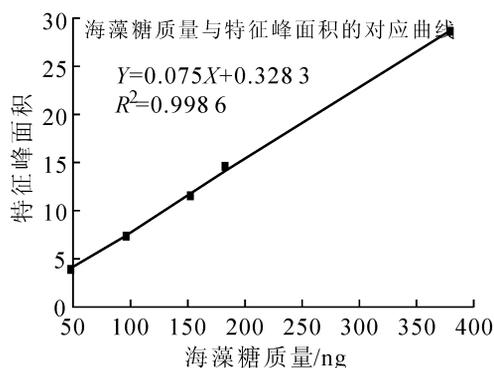


图 2 海藻糖检测质量与其衍生物特征峰面积线性关系

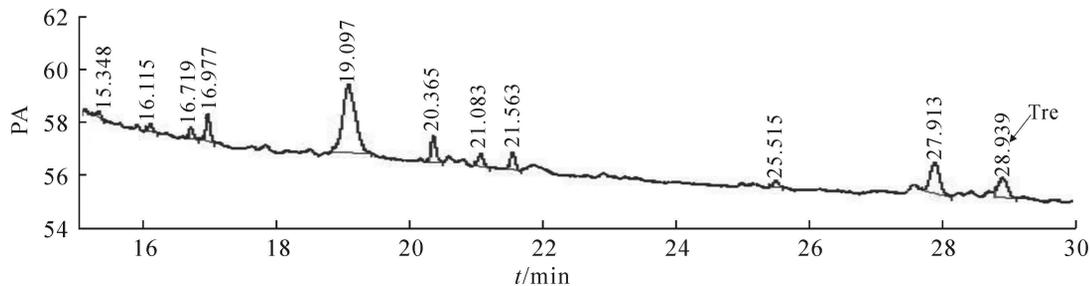


图 3 3 年生库拉索芦荟单、寡糖提取物的衍生物气相色谱分析

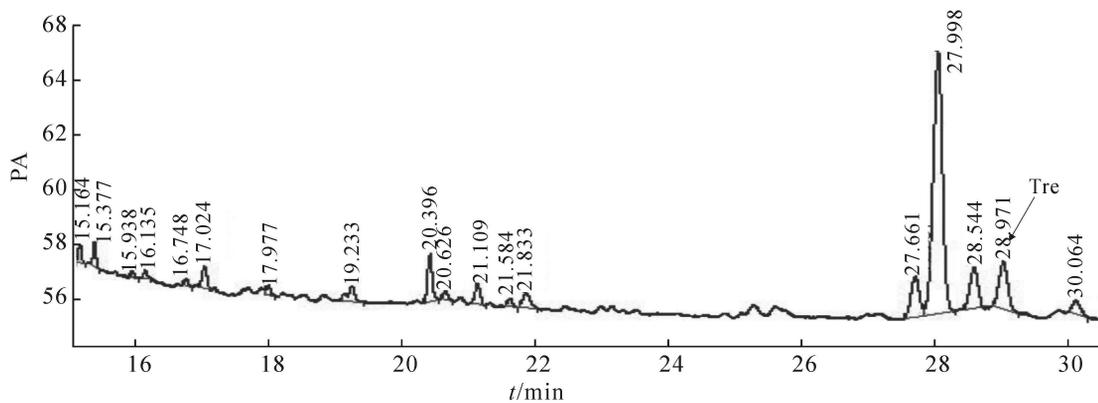


图 4 5 年生库拉索芦荟单、寡糖提取物的衍生物气相色谱分析

由表 3 可以看出:5 年生库拉索芦荟凝胶中每 10 g 匀浆所含的海藻糖是 3 年生库拉索芦荟凝胶中的 1.59 倍以上. 芦荟凝胶中海藻糖的含量随着种植时间的延长其含量得到积累, 这也符合库拉索芦荟表现出来的在一定生长阶段当中、库拉索芦荟的抗逆性随着种植时间的增长而增强的生理特性. 该实验表明了该分离条件适合于库拉索芦荟凝胶中海藻糖含量的分析.

2.4 海藻糖合成酶基因转化芦荟海藻糖的含量

对海藻糖合成酶基因转化芦荟(转基因芦荟)鲜叶海藻糖含量分析的气相色谱图见图 5.

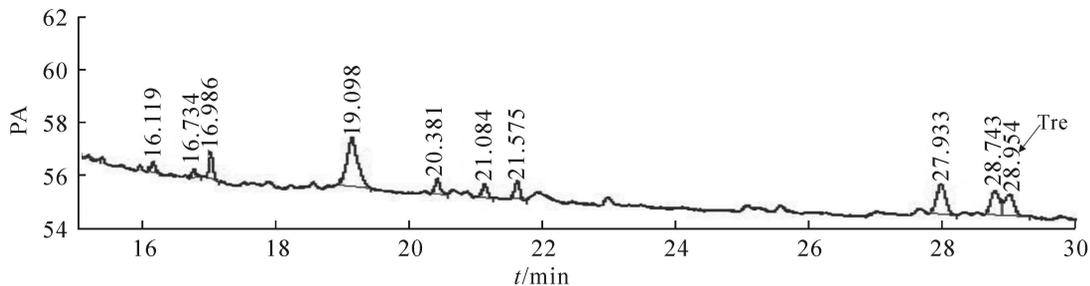


图 5 转海藻糖合成酶基因库拉索芦荟单、寡糖提取物的衍生物气相色谱分析

对气相色谱图中海藻糖衍生物的特征峰面积进行定量, 并通过标准曲线进行计算, 得出转基因芦荟中海藻糖的含量, 并将 3 年生库拉索芦荟与转基因芦荟凝胶中的海藻糖含量进行比较, 比较结果见表 4.

表 4 3 年生和转基因库拉索芦荟凝胶中海藻糖含量的比较

名称	特征峰面积	匀浆质量/g	每 10 g 匀浆海藻糖的含量/ μg
3 年生芦荟	7.3	6.798 7	6.90
转基因芦荟	10.2	3.631	16.1

转基因芦荟鲜叶中每克匀浆所含的海藻糖高于 3 年生库拉索芦荟鲜叶中每克匀浆所含的海藻糖。转海藻糖合成酶基因芦荟的海藻糖含量是 3 年生库拉索芦荟的 2.33 倍左右。说明海藻糖合成酶基因已成功转入库拉索芦荟中, 并成功表达。

3 结语

(1) 本实验通过衍生化的方法将 D- 葡萄糖、乳糖、蔗糖和海藻糖快速转变为挥发性物质, 并通过气相色谱对其衍生物进行分析。分析结果表明, 该分离条件适合单糖和双糖、双糖和双糖之间的分离。(2) 在气相色谱上对 4 种糖类的衍生物的混合物进行分析, 并对照在同样的分离条件下, 各糖类衍生物的特征保留时间, 发现其特征峰的保留时间最大的差异为 2.46 s, 考虑仪器的误差, 认为该方法具有较好的重现性。(3) 对 5 个不同质量浓度的海藻糖进行气相色谱分析, 海藻糖的检测质量与其衍生物特征峰面积之间的线性关系为 $Y = 0.075X + 0.3283$, 相关系数为 0.9986, 说明该方法在 $(3.697 \sim 28.661) \times 10^{-9}$ g 的检测量范围内具有较好的相关性。(4) 通过本实验建立的海藻糖定量分析方法对芦荟中海藻糖含量进行分析可知: 5 年生的库拉索芦荟鲜叶中海藻糖含量是 3 年生的 1.59 倍。由此推测, 库拉索芦荟凝胶中海藻糖的含量随其种植时间的增长而增加。农科院提供的海藻糖合成酶基因转化芦荟中每 10 g 凝胶匀浆中海藻糖的含量高于本实验室提供的未转基因的库拉索芦荟, 说明其海藻糖合成酶基因已成功转入, 并进行了表达。

参考文献:

- [1] 赵晓峰, 吴荣书. 海藻糖的功能特性及其应用 [J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(2): 151-154, 114.
- [2] 简文杰, 江滨伟, 庞杰, 等. 新型食品添加剂——海藻糖的生产及其应用 [J]. 现代商贸工业, 2003(6): 48-50.
- [3] 唐传核. 海藻糖的开发现状及应用前景 [J]. 中国食品用化学品, 1997(3): 1-4.
- [4] 程池. 天然生物保存物质—海藻糖的特性和应用 [J]. 食品与发酵工业, 1996(1): 59-64.
- [5] 刘传斌, 云战友, 冯朴荪, 等. 海藻糖的制备及其对双歧杆菌活性的保护作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10(2): 118.
- [6] 胡磊, 郭蓓, 王乐. 分析植物组织中海藻糖的气质联用及毛细管气相色谱法 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4): 474-478.
- [7] 何聪芬, 冯婷, 赵华, 等. 芦荟凝胶中海藻糖的提取与检测 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 346-348.

Establishment of GC to Detect Trehalose in Aloe

ZHAO Hua^{1,2}, HE Cong-fen², QIN Yuirong², LIU Lei², ZHONG Qin¹

(1. School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China; 2. College of Chemistry and Environment Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China)

Abstract: To determine the content of trehalose in transgenic Aloe by gas chromatography (GC), 1-Methylimidazol, Hydroxylammonium chloride and Acetic anhydride were used to derivative the trehalose. The difference of the retention time among the same carbohydrate derivatives is 3s by this method. And it can separate the glucose, milk sugar, sucrose and trehalose clearly. The results showed a good linear relationship within a range from 3.697×10^{-9} g to 28.661×10^{-9} g, and the liner correlation coefficient of the trehalose is 0.9986. The content of trehalose in the three year, five year aloe (*Aloe vera*. L) and aloe transformed by ostA were determined by GC. The results show that the trehalose of the five year aloe (*Aloe vera*. L) is 1.59 times as great as the three year. The content of trehalose in five year aloe is 1.103×10^{-5} g per 10g, and 6.905×10^{-6} g per 10g in three year aloe. The content of trehalose is 1.614×10^{-5} g per 10g in aloe transformed by ostA which is 2.33 times as great as the three year aloe (*Aloe vera*. L). The results prove that the ostA gene from *E. coli* is successfully transformed to aloe and expressed.

Key words: gas chromatography; trehalose; quantificational analysis; *Aloe vera*. L

(责任编辑 易必武)