

· 药物制剂与药品质量控制 ·

## 芦荟多糖的分离纯化及其相对分子质量和含量测定\*

党秀丽<sup>1</sup>, 刘雪英<sup>1</sup>, 王庆伟<sup>2</sup>, 张生勇<sup>1</sup>, 盖守昌<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学药学院药物化学教研室, 西安 710032; 2. 第四军医大学唐都医院药剂科, 西安 710032)

**摘要** 目的 研究库拉索芦荟多糖的分离纯化, 测定分离得到的纯化多糖 PSA2 的相对分子质量及其多糖和蛋白质的含量。方法 采用水提醇沉法提取粗多糖, 反复冻融法除蛋白质, DEAE-cellulose 52 和 Sephadex G-100 凝胶色谱柱纯化多糖, 得到纯化组分(PSA2), 高效凝胶渗透色谱(HPGPC)法测定 PSA2 的相对分子质量, 苯酚-硫酸法测定其多糖含量, 考马斯亮蓝 G-250 法测定其蛋白质含量。结果 PSA2 的相对分子质量为 8 457.4, 其多糖含量为 61.0%, 蛋白质含量为 0.7%。结论 多糖的提取工艺简单可行, HPGPC 法, 苯酚-硫酸法和考马斯亮蓝 G-250 法准确快捷。

**关键词** 芦荟多糖; 分离; 纯化; 相对分子质量; 含量测定

中图分类号 R927.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)01-0067-04

### Isolation, Purification, Determination of Relative Molecular Mass and Content in Polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller

DANG Xiu-li<sup>1</sup>, LIU Xue-ying<sup>1</sup>, WANG Qing-wei<sup>2</sup>, ZHANG Sheng-yong<sup>1</sup>, Gai Shou-chang<sup>1</sup> (1. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**ABSTRACT Objective** To isolate and purify the polysaccharide from *Aloe barbadensis*, determine relative molecular mass, total sugar content and protein content of the purified fraction (PSA2). **Methods** To adopt the method of water lifts and the alcohol immerse to extract the rude polysaccharides from *Aloe barbadensis* Miller. Rude polysaccharide was deproteinized by repeated freeze-thaw method, purified by DEAE - cellulose 52 and Sephadex G-100 columns, and the purified polysaccharide was termed as PSA2. HPGPC was used to determined the molecular weight of PSA2, the contents of the total soluble sugar and protein of PSA2 were determined by the phenol-sulfuric acid method and coomassie brilliant blue method, respectively. **Results**

The HPGPC showed relative molecular mass of PSA2 was 8 457.4. The contents of total sugar and protein were 61.0% and 0.7%, respectively. **Conclusion** The extraction technology is simple and feasible, the HPGPC, phenol-sulfuric acid and coomassie brilliant blue are precise and rapid.

**KEY WORDS** Polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller; Isolation; Purification; Relative molecular mass; Content determination

芦荟为百合科多年生常绿肉质草本植物, 分布于热带和亚热带地区, 是应用广泛的天然药用植物, 其种类包括变种在内共有 600 多种, 其中具有重要药用价值的为库拉索芦荟(*Aloe barbadensis* Miller)、木立芦荟(*Aloe arborescens* Miller)和中国芦荟(*Aloe vere* L. var. *chinensis*) 等。芦荟所含多糖类是芦荟凝胶中的主要活性物质, 它有很多功效, 如抗氧化<sup>[1]</sup>, 促进细胞再生, 抗衰老<sup>[2]</sup>, 防治艾滋病, 抗癌及提高免疫力等<sup>[3]</sup>。但是目前对于芦荟的应用多见于化妆品行业, 限于活

性部位及成分的提取工艺及深入研究, 它蕴藏的巨大药用价值尚未开发。笔者在本实验研究库拉索芦荟多糖的分离纯化, 并对其纯化多糖的相对分子量及其中的多糖和蛋白质的含量进行测定, 为后续库拉索芦荟多糖的开发利用奠定基础。

#### 1 仪器与材料

**1.1 主要材料与试剂** 3 年生库拉索芦荟(杨凌原野绿色食品有限公司); D-甘露糖, D-葡萄糖(上海试剂二厂, AR 级); 苯酚(上海试剂一厂, AR 级; 重蒸后使用); 标准系列多糖 Dextran Blue(相对分子质量 2 000 000), T-5(相对分子质量 5 000), T-12(相对分子质量 12 000), T-25(相对分子质量 25 000), T-80(相对分子质量 80 000)及 Sephadex G-100(美国 Sigma 公司)和 DEAE - cellulose 52(英国 Whatman 公司), 其他试剂均为分析纯。

**1.2 主要仪器** 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); 数显剪切乳化搅拌机(上海标本模型厂); 紫外分

收稿日期 2011-08-06 修回日期 2011-10-15

基金项目 \* 国家科技重大专项(2011ZXJ09104-02C)

**作者简介** 党秀丽(1988-), 女, 陕西榆林人, 在读硕士, 研究方向: 天然产物。电话: (0) 13891995717, E-mail: xiulidang@163.com。

**通讯作者** 刘雪英(1972-), 女, 山东人, 博士, 研究方向: 新药设计合成及药理学研究。电话: 029-84774473809, E-mail: weiyngxuan427@163.com。

光光度计 (Backman coulter DU800); 电动搅拌器 (江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂); 离心机 (上海手术器械厂); 优普 UPT 系列超纯水器 (上海优普实业有限公司); 冷冻干燥机 (VisTis SP Techcare); BSZ-100 自动部分收集仪 (上海沪粤明科学仪器有限公司); Agilent 1100 型液相色谱仪 (美国 HP 公司); 微孔滤膜 (上海海凡滤材有限公司, 孔径 0.45 μm)。

**2 方法与结果**

**2.1 芦荟多糖的提取工艺** 采用水提醇沉法提取芦荟多糖, 方法如下: 取已成熟的 3 年生库拉索芦荟鲜叶, 洗净, 去刺, 剥皮, 取内层凝胶用搅拌机榨汁, 冷藏过夜, 次日浆液过多层纱布以除去纤维质, 向滤液中加入 95% 乙醇使其终浓度为 80%, 静置过夜, 离心 (5 000 r · min<sup>-1</sup>, 10 min) 得多糖沉淀, 取沉淀复溶后再加 95% 乙醇沉淀 3 次来完成多糖的初步纯化, 结束后高速离心取沉淀并加水溶解, 于 -80 °C 反复冻融 10 次, 4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 除去变性蛋白质, 滤液在透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 中对双蒸水透析 3 d, 离心除去小分子化合物和水的不可溶物, 上清液于 -80 °C 冰箱中预冻过夜, 后冷冻干燥, 其操作条件为: 冷阱温度: -60 °C, 真空度: 10 ~ 20 Pa, 干燥时间为 30 h, 得白色絮状固体为库拉索芦荟粗多糖 (PSA)。

**2.2 芦荟多糖的分离纯化** 参照文献 [4]。将 PSA 用去离子水溶解, 配制成浓度为 5% 的多糖溶液, 离心, 上清液用 DEAE - cellulose 52 层析柱分离 (2.6 mm × 90 cm), 分别用浓度为 0, 0.1, 0.3, 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 的氯化钠溶液洗脱, 洗脱液用自动收集仪收集 (每管 6 mL), 隔管苯酚-硫酸法显色, 以洗脱管数-吸光度值 (A) 绘制洗脱曲线 (见图 1)。根据曲线, 分别收集洗脱液, 透析, 冻干, 计算产率。

从图 1 可以看出, 图 1D 没有明显的洗脱峰, 说明其几乎没有多糖。A, B, C 中多糖的产率分别为

86.9%, 3.1%, 0.74%, 把 0 mol · L<sup>-1</sup> 氯化钠洗脱液冻干的多糖 (PSA1) 进一步分离。将 PSA1 溶解于去离子水配制成浓度为 5% 的糖溶液, 离心, 上清液用 Sephadex G-100 层析柱分离 (2.6 mm × 90 cm), 洗脱液为去离子水, 洗脱管数-吸光度绘制洗脱曲线 (见图 2), 收集洗脱液, 透析, 冻干 (PSA2)。

**2.3 高效液相凝胶渗透色谱法检测均一性** 参照文献 [5]。色谱条件: 色谱柱 TSK-Gel G-4000; 缓冲液为磷酸二氢钠, 浓度为 0.02 mol · L<sup>-1</sup>; 流速为 0.4 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温为 35 °C; 进样量为 20 μL。纯化产物 PSA2 经高效凝胶渗透色谱 (high performance gel permeation chromatography, HPGPC) 法检测显示为一对称洗脱峰, 说明其均一性良好, 是均一多糖, 其保留时间为 27.437 min, 见图 3。

**2.4 ASP2 相对分子质量的测定** 参照文献 [5]。采用 HPGPC 测定 PSA2 的相对分子质量。

**2.4.1 色谱条件** 色谱柱 TSK-Gel G-4000; 缓冲液为磷酸二氢钠, 浓度为 0.02 mol · L<sup>-1</sup>; 流速为 0.4 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温为 35 °C; 进样量为 20 μL。

**2.4.2 回归方程的制备** 将相对分子质量为 5 000, 12 000, 25 000, 50 000, 80 000 的标准葡聚糖、葡萄糖 (常以葡萄糖的流出体积作为 V<sub>t</sub>) 和 Dextran T-2000 (常以蓝色葡聚糖的流出体积作为 V<sub>0</sub>) 分别溶于缓冲液中, 制成浓度为 0.02 mol · L<sup>-1</sup>, 按相对分子质量从小到大顺序分别进样 20 μL, 记录各个色谱图的保留时间 V<sub>e</sub>, 其保留时间分别为: 28.198, 27.03, 24.742, 22.358, 20.625, 30.234 和 12.876 min。分配系数与 V<sub>t</sub>, V<sub>0</sub> 和 V<sub>e</sub> 有以下关系:  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ,  $K_{av}$  和 lgM 存在线性关系, 以分配系数  $K_{av}$  为横坐标, 标准品的 lgM 为纵坐标, 得线性回归方程  $lgM_w = -2.61233K_{av} + 6.11864$ ,  $R^2 = 0.9599$ 。

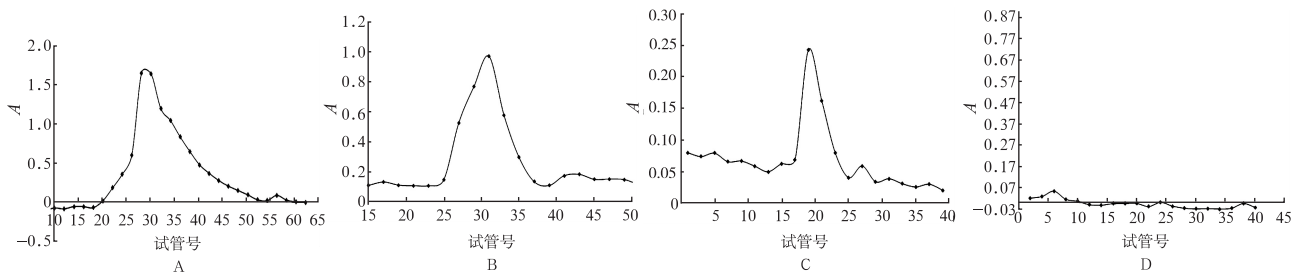


图 1 PSA 经 DEAE-cellulose 52 层析柱梯度洗脱曲线

A. 0 mol · L<sup>-1</sup> 氯化钠; B. 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氯化钠; C. 0.3 mol · L<sup>-1</sup> 氯化钠; D. 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 氯化钠

Fig. 1 Gradient elution curves of PSA by DEAE-cellulose 52 chromatographic column

A. 0 mol · L<sup>-1</sup> NaCl; B. 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaCl; C. 0.3 mol · L<sup>-1</sup> NaCl; D. 0.5 mol · L<sup>-1</sup> NaCl

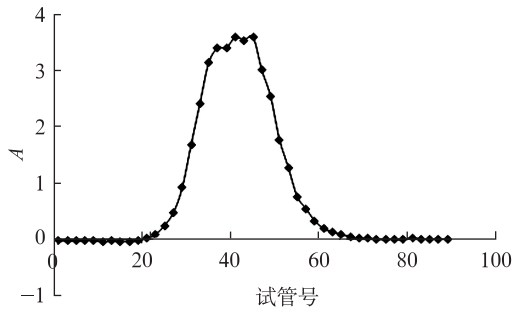


图2 PSA1 经 Sephadex G-100 层析柱洗脱曲线

Fig. 2 Gradient elution curves of PSA1 by Sephadex G-100 chromatographic column

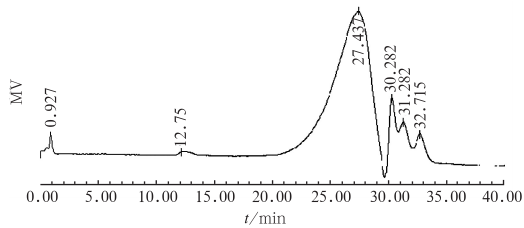


图3 PSA2 的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of PSA2

**2.4.3 PSA2 分子量测定** 将浓度为  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ASP2 溶液  $20 \mu\text{L}$  于相同色谱条件下进样分析,记录保留时间为  $R_t = 27.434 \text{ min}$ ,代入回归方程求得相对分子质量为  $8457.4$ 。

**2.5 苯酚-硫酸法测定多糖含量** 参照文献[6]。

**2.5.1 最大吸收波长以及标准品的确定** 取葡萄糖,甘露糖和 PSA2 适量,加水溶解配制成  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,照紫外分光光度法操作,在  $400 \sim 550 \text{ nm}$  范围扫描,葡萄糖,甘露糖和芦荟多糖的紫外吸收光谱曲线形状基本一致,除了芦荟多糖与甘露糖的紫外吸收光谱在  $430$  与  $490 \text{ nm}$  处各有一个吸收峰,而葡萄糖仅有  $490 \text{ nm}$  的吸收峰,所以多糖的测定以甘露糖为标准品,更能准确反映真实的多糖含量值。

**2.5.2 甘露糖标准溶液制备** 精密称取  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  干燥至恒质量的甘露糖  $20 \text{ mg}$  至  $100 \text{ mL}$  量瓶,并用双蒸馏水定容备用。

**2.5.3 标准曲线的测定** 从甘露糖标准溶液中分别取  $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6$  及  $1.8 \text{ mL}$  置于有塞的试管中,各以纯化水补至  $2.0 \text{ mL}$ ,然后加入  $6\%$  苯酚  $1.0 \text{ mL}$ ,摇匀后加入浓硫酸  $5.0 \text{ mL}$ ,摇匀冷却,室温放置  $20 \text{ min}$ ,于  $490 \text{ nm}$  测定吸光度 ( $A$ ),以  $2.0 \text{ mL}$  水同样显色操作为空白,横坐标为甘露糖微克数 ( $B$ ),纵坐标  $A$ ,得标准曲线为:  $A = 0.0089B - 0.0545, R^2 = 0.9988$ 。

**2.5.4 样品总糖含量测定** 取 ASP2  $10.0 \text{ mg}$ ,加去离子水溶解,转移入  $100 \text{ mL}$  量瓶中,定容至刻度,准确吸取  $2.0 \text{ mL}$ ,按“2.5.3”项方法,显色测定  $A$ ,根据甘露糖的标准曲线计算其多糖含量为  $61\%$ 。

**2.6 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量**

**2.6.1 考马斯亮蓝 G-250 的配制** 精密称取考马斯亮蓝 G-250 试剂  $100 \text{ mg}$  溶于  $95\%$  乙醇  $50 \text{ mL}$  中,转移至  $1000 \text{ mL}$  量瓶,加入  $85\% (W/V)$  的磷酸  $100 \text{ mL}$ ,用双蒸馏水定容于  $1000 \text{ mL}$ ,滤纸过滤除去不溶物。

**2.6.2 蛋白质标液的配制** 精密称取牛血清白蛋白  $100 \text{ mg}$ ,用  $0.9\%$  氯化钠溶液溶解并定容  $100 \text{ mL}$  量瓶中,成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的蛋白标液。

**2.6.3 标准曲线的制备** 分别取  $0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 \text{ mL}$  蛋白标液置于  $10 \text{ mL}$  试管中,加  $0.9\%$  氯化钠溶液至  $0.01 \text{ mL}$ ,每管均加入考马斯亮蓝 G-250 试剂  $5.00 \text{ mL}$ ,涡旋振荡器混匀。 $2 \text{ min}$  后于  $595 \text{ nm}$  波长处测定其吸光度(以  $0 \text{ mL}$  标液为空白对照)。每个浓度平行做 3 次,求出平均吸光度值。以吸光度值 ( $Y$ ) 对蛋白质标液浓度 ( $X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 做线性回归,得标准曲线为:  $Y = 0.0068X + 0.7158, R^2 = 0.9958$ 。

**2.6.4 样品测定** 配制  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  多糖溶液,用考马斯亮蓝 G-250 法测定其蛋白质含量,其含量仅为  $0.7\%$ 。

### 3 讨论

加醇沉淀的过程应边加醇边搅拌,保证芦荟凝胶内部的醇浓度均一,以得到更多的沉淀。笔者在本研究用水提醇沉法提取库拉索芦荟多糖,纯化后的多糖里面仍然含有部分蛋白质,单糖,寡糖和无机盐,这些成分对多糖的生物活性影响不大,但是芦荟中多糖的含量较小,进一步优化提取工艺,提高多糖产量,并对多糖的组成和结构进行分析是研究的关键。

除去多糖中蛋白质,一般采用 Sevage 法。此法需要反复处理样品多次,有机试剂消耗量大,在除去蛋白质变性胶状物同时会带走部分多糖,只能除去游离蛋白质对于糖复合物则效果不佳。本实验采用反复冻融脱蛋白效果十分理想,此法不带有有机试剂,没有化学污染,能减少由有机试剂导致的多糖活性下降和溶剂残留。

库拉索芦荟多糖的含量测定大多以葡萄糖为标准品<sup>[7-8]</sup>,在本实验中,把葡萄糖、甘露糖和芦荟多糖做对照,发现多糖的成分以甘露糖为主,所以以甘露糖为标准品更具有准确性。

从有关芦荟多糖的文献报道中可以看出不同的产



地、种植条件、采样时间、提取方法都会影响多糖的含量,同时多糖的结构和性质也会有差异,接下来将对PSA2 的理化性质和分子结构做深入研究和分析。

参考文献

[1] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68 (1): 54-58.

[2] 李天东,罗英,李俊刚. 芦荟多糖生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(5):2033-2035.

[3] 李云政,秦海元. 国内外芦荟应用与研究[J]. 化工进展, 2009,19(2):19-22.

[4] XIANG D, SU F, MEI C, et al. Structure characterization of

polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81 (4): 942-947.

[5] 颜军,刘崑,邬晓勇,等. 柴胡多糖的分子量测定及单糖组成分析[J]. 安徽农业科学,2010, 38 (9):4550-4552.

[6] 张志强,王旭彤. 芦荟多糖的提取与含量测定[J]. 中国现代药物应用,2009,3(14):39-40.

[7] 倪爱东,严德江,徐先祥. 大黄多糖的提取及含量测定[J]. 药物鉴定,2007,16 (13):10-11.

[8] 周垠辉,诸爱士,冯晟. 山药多糖提取工艺研究[J]. 浙江科技学院学报,2009,21(4):323-326.

DOI 10.3870/yydb.2012.01.0.026

# 小儿消咳片中白屈菜红碱的含量测定\*

赵磊<sup>1</sup>,刘嘉乐<sup>1</sup>,李岩<sup>2</sup>,孙艳涛<sup>3,4,5</sup>

(1. 吉林省四平市食品药品检验所,136000 ;2. 吉林省神经精神病医院,四平 136000;3. 吉林师范大学化学学院,四平 136000;4. 江苏大学化学化工学院,镇江 212013;5. 吉林师范大学环境友好材料制备与应用省部共建教育部重点实验室,四平 136000)

**摘要** 目的 建立高效液相色谱(HPLC)法测定小儿消咳片中白屈菜红碱的含量测定方法。方法 采用 HPLC 法,色谱柱:Zorbax SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈-1% 三乙胺溶液(磷酸调 pH 为 3.0)(25 : 75),检测波长:269 nm;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。结果 白屈菜红碱在 8.25~825.00 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好( $r=0.9998$ ),平均加样回收率为 96.80%,RSD 为 1.11% ( $n=6$ )。结论 该方法简便快捷,准确,重复性好,灵敏度高,可用于小儿消咳片的质量控制。

**关键词** 小儿消咳片;白屈菜红碱;色谱法,高效液相;含量测定

中图分类号 R286;R927.2 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)01-0070-03

## Content Determination of Toddaline in *Xiao'er Xiaoke* Tablets by HPLC

ZHAO Lei<sup>1</sup>, LIU Jia-le<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, SUN Yan-tao<sup>3,4,5</sup>(1. Institute for Food and Drug Control of Siping City, Jilin Province, 136000, China;2. Mental Derangement Hospital of Jilin Province, Siping 136000, China;3. College of Chemistry, Jilin Normal University, Siping 136000, China;4. Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;5. Key Laboratory of Preparation and Applications of Environmental Friendly Materials, Ministry of Education China, Jilin Normal University, Siping 136000, China)

**ABSTRACT Objective** To establish a HPLC method for determination of toddaline in *xiao'er xiaoke* bablets. **Methods** Zorbax SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile -1% triethylamine (pH 3.0 adjusted by phosphoric acid) (22 : 78). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and detection wavelength was set at 269 nm. **Results** The linear range of gastrodin was 8.25-825.00 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.9998$ ). The average recovery was 96.80% ( $n=6$ ) (RSD=1.11%). **Conclusion** This method is simple, accurate and reproductive, which can be used for the quality control of *xiao'er xiaoke* bablets.

**KEY WORDS** *Xiao'er xiaoke* bablets;Toddaline;HPLC;Content determination

小儿消咳片收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第 8 册<sup>[1]</sup>,由白屈菜、百部、天冬、南沙参、白前、侧柏叶、木蝴蝶等 7 味药组成,用于治疗急慢性气管炎,痰热或燥痰咳嗽。目前原标准未对其中的有效成分进行含量测定,笔者建立高效液相色谱(HPLC)法<sup>[2-3]</sup>,

测定白屈菜红碱的含量,该方法简便、准确,专属性强,重复性好,能有效地控制该制剂的质量。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津), Solution 色谱软件系统;PB-10 型酸度计(德国赛多利斯