



对萹猴桃苷E提取分离纯化工艺的研究

乔方良, 蒋益萍, 夏天爽, 刘爱军, 赵凯, 辛海量

Study on the extraction, separation and purification process of actinoside E

QIAO Fangliang, JIANG Yiping, XIA Tianshuang, LIU Aijun, ZHAO Kai, XIN Hailiang

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202407001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

HPLC-MS/MS同时测定感冒安颗粒中5种黄酮成分的含量

Simultaneous determination of five flavonoids in Ganmao' an granules by HPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(9): 402-406 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202403030

MT-1207对小鼠血糖、血脂和动脉粥样硬化的作用

Effects of MT-1207 on blood glucose, blood lipids and atherosclerosis in mice

药学实践与服务. 2024, 42(11): 487-494 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202306011

黄芪甲苷衍生物治疗慢性心力衰竭小鼠的药效评价及作用机制研究

Efficacy and mechanism of astragaloside IV derivatives on chronic heart failure in mice

药学实践与服务. 2024, 42(5): 190-197 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310004

星点设计-效应面法优化仑伐替尼混合胶束的制备工艺

Optimization of the preparation process for lenvatinib mixed micelles by central composite design-response surface methodology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 495-502 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202403019

巴戟天丸组方对A β 损伤成骨细胞的作用及基于网络药理学的机制研究

The roles of Bajitianwan formula on A β -injured osteoblasts and the mechanism based on network pharmacology

药学实践与服务. 2024, 42(7): 285-290, 296 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202305011

基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

Study on the pharmacological effects and mechanism of Gegen-Zhimu herb pair in preventing and treating Alzheimer's disease by UHPLC-Q/TOF-MS metabolomics strategy

药学实践与服务. 2025, 43(1): 30-40 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202409035



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

对萼猕猴桃苷 E 提取分离纯化工艺的研究

乔方良¹, 蒋益萍¹, 夏天爽¹, 刘爱军², 赵 凯³, 辛海量¹ (1. 海军军医大学药理学系生药学教研室, 上海 200433; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药学研究室, 上海 200437; 3. 河北凯盛医药科技有限公司, 河北 石家庄 050035)

[摘要] 目的 优选对萼猕猴桃苷 E 的提取分离纯化工艺。方法 以对萼猕猴桃苷 E 的含量为指标, 采用单因素考察结合正交试验确定对萼猕猴桃苷 E 的最佳提取工艺; 通过优化大孔吸附树脂柱、硅胶柱和 ODS 柱的色谱条件, 对提取物进行分离纯化。结果 对萼猕猴桃苷 E 的最佳提取工艺为: 以 25 倍量的 55% 乙醇 95 °C 加热回流 1 h。优化的分离纯化工艺为: D101 型大孔树脂柱以 50% 乙醇洗脱 7 BV; 硅胶柱以乙酸乙酯-乙醇 10 : 1 洗脱 5 BV; ODS 柱重复纯化 50% 甲醇洗脱部分, 最终得到对萼猕猴桃苷 E 单体化合物。整个工艺对萼猕猴桃苷 E 的转移率为 53.70%, 得率为 0.35%, 纯度达 99.9%。结论 该工艺稳定可行, 可为对萼猕猴桃苷 E 的开发利用提供物质基础。

[关键词] 对萼猕猴桃苷 E; 提取; 分离纯化; 色谱

[文章编号] 2097-2024(2025)00-0001-07

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202407001

Study on the extraction, separation and purification process of actinoside E

QIAO Fangliang¹, JIANG Yiping¹, XIA Tianshuang¹, LIU Aijun², ZHAO Kai³, XIN Hailiang¹ (1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy Research, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 3. Hebei Kingsci Pharmaceutical Technology Co., LTD, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction, separation and purification process of actinoside E. **Methods** Single factor experiment combined with orthogonal test was used to determine the optimal extraction process of actinoside E using its content as an index. The extracts were separated and purified by optimizing the chromatographic conditions of macroporous resin, silica gel and ODS column. **Results** 25 times amount of 55% ethanol with heating reflux at 95 °C for one hour were used as the optimal extraction process of actinoside E. The optimum separation and purification process was as follows: D101 macroporous resin column was eluted with 7 BV of 50% ethanol, silica gel column was eluted with 5 BV of ethyl acetate-ethanol (10 : 1) and 50% methanol eluted fraction was purified repeatedly by ODS column to obtain actinoside E. The transfer rate of actinoside E in the whole process was 53.70%, the yield was 0.35%, and the purity was 99.9%. **Conclusion** The process is stable and viable, which can provide material foundation for the development and utilization of actinoside E.

[Key words] actinoside E; extraction; separation and purification; chromatography

对萼猕猴桃 *Actinidia valvata* Dunn 是猕猴桃科猕猴桃属中型落叶藤本植物, 分布于安徽、浙江、江西等地^[1]。其根和根茎作猫人参入药, 具有清热解毒、消肿的功效^[2], 临床常用于治疗肺癌、肝癌及消化道肿瘤^[3]。随着猫人参药材的需求量不断增加, 在生产过程中, 有大量的枝叶未得到有效利用, 造成了自然资源的浪费。从中药资源开发利用的角度出发, 课题组前期首次对非传统药用部位对萼猕猴桃叶进行了大量研究, 发现对萼猕猴桃叶中

含有较多的黄酮类成分, 具有较强的抗心肌缺血作用和抗氧化活性^[4-7]。其中对萼猕猴桃苷 E 是课题组首次从对萼猕猴桃叶中发现的新黄酮苷类化合物, 在叶中含量高, 药理活性显著, 具有很好的开发前景。作为一个新化合物, 如何得到高纯度的对萼猕猴桃苷 E 并对其开发利用, 成为一项亟待解决的问题。因此, 本文以对萼猕猴桃苷 E 为研究对象, 对其提取分离纯化工艺进行优化, 以此获得高纯度的对萼猕猴桃苷 E, 为后续对萼猕猴桃苷 E 的药代动力学研究及药理活性研究奠定物质基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦

[基金项目] 上海市科委生物医药领域科技支撑项目课题 (23S21901000)

[作者简介] 乔方良, 硕士研究生, Email: 1956714565@qq.com

[通信作者] 辛海量, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药鉴定、资源、药理学研究, Email: hailiangxin@163.com

科技公司); 2500Y 多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司); BT25S 十万分之一电子天平(德国塞利多斯公司); SYG-A2-6 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); IS-RDV1 恒温振荡器(苏州捷美电子有限公司)。

1.2 试剂与耗材

对萹猕猴桃苷 E(纯度 $\geq 98\%$, 自制); 无水乙醇、乙酸乙酯、甲醇为分析纯试剂(上海泰坦科技股份有限公司); 甲酸(上海麦克林生化科技股份有限公司)、乙腈(德国 Merck 公司)、甲醇(上海泰坦科技股份有限公司)为色谱纯试剂; 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); D101 型、AB-8 型、DM130 型、HPD100 型、NKA-9 型大孔吸附树脂(北京瑞达恒辉科技发展有限公司); 柱层析硅胶(100~200 目、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); ODS 填料(日本 YMC 公司)。

1.3 药材

对萹猕猴桃叶样品为 2008 年 5 月采自浙江省衢州市常山县, 经海军军医大学辛海量教授鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物对萹猕猴桃 *Actinidia valvata* Dunn 的叶。样品于 60 °C 烘箱烘干, 粉碎过三号筛, 得对萹猕猴桃叶粉末, 置干燥器中密封保存。

2 方法与结果

2.1 对萹猕猴桃苷 E 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C18(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)(梯度洗脱: 0~35 min, 10%~40% B); 流速: 1 ml/min; 柱温: 26 °C; 检测波长: 265 nm; 进样量: 10 μ l。对照品及样品色谱图见图 1。

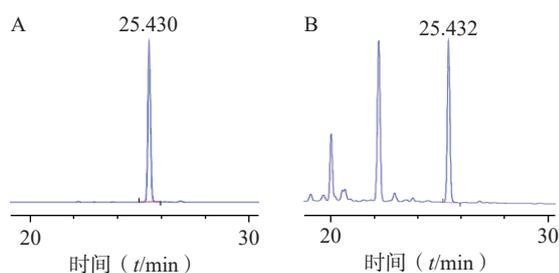


图 1 对萹猕猴桃苷 E 对照品(A) 和对萹猕猴桃叶提取液(B)HPLC 图

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取对萹猕猴桃苷 E 对照品 15.77 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 加色谱纯甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 1.577 mg/ml 的对萹猕猴桃苷 E 对照品溶液, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备

精密称取对萹猕猴桃叶粉末 2 g, 置于 250 ml 圆底烧瓶中, 加入 55% 乙醇 50 ml, 95 °C 回流提取 1 h, 过滤后滤液定容至 50 ml, 摇匀, 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 备用。

2.1.4 方法学考察

(1) 线性关系考察

精密吸取对萹猕猴桃苷 E 对照品溶液 0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、5.0 ml, 分别置于 5 ml 容量瓶中, 色谱纯甲醇溶解定容, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以对萹猕猴桃苷 E 浓度(mg/ml)为横坐标(c), 其峰面积(mAU*s)为纵坐标(A), 绘制标准曲线。回归方程为 $A = 11127c + 31.985$, $R^2 = 0.9998$, 表明对萹猕猴桃苷 E 在 0.047~1.577 mg/ml 范围内与其峰面积线性关系良好。

(2) 精密度试验

精密吸取同一浓度的对萹猕猴桃苷 E 对照品溶液连续进样 6 次, 记录其峰面积, 相对标准偏差(RSD)为 1.29%, 表明仪器精密度良好。

(3) 稳定性试验

精密称取对萹猕猴桃叶粉末 2 g, 按“2.1.3”项下方法进行制备, 分别于室温 0、4、8、12、16、24 h 进样测定, 记录峰面积, RSD 为 0.21%, 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

(4) 重复性试验

称取对萹猕猴桃叶粉末 6 份, 每份 2 g, 按“2.1.3”项下方法进行制备, 进样测定并记录峰面积, RSD 为 1.07%, 表明该方法重复性良好。

(5) 加样回收率试验

精密称取已知对萹猕猴桃苷 E 含量的对萹猕猴桃叶粉末 9 份, 每份 1 g, 分别加入相当于本底量 80%、100%、120% 的已知浓度的对萹猕猴桃苷 E 对照品溶液, 按“2.1.3”项下方法进行制备, 进样分析并计算加样回收率。对萹猕猴桃苷 E 的平均加样回收率为 101.16%, RSD 为 1.95%, 表明该方法准确可靠。

2.2 对萹猕猴桃叶提取工艺研究

以对萹猕猴桃苷 E 的含量为指标, 单因素考察乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度对对萹猕猴桃苷 E 含量的影响, 并通过四因素三水平 $L_9(3^4)$

正交试验优选对萼猕猴桃苷E的最佳提取工艺。

2.2.1 单因素考察

(1) 乙醇浓度考察

精密称取6份对萼猕猴桃叶粉末,每份5g,按料液比1:10分别加入45%、55%、65%、75%、

85%、95%乙醇,90℃回流提取1h,滤液定容至50ml,测定对萼猕猴桃苷E含量。结果表明,对萼猕猴桃苷E的含量随乙醇浓度的增加呈现先升高后降低的趋势,当乙醇浓度为65%时对萼猕猴桃苷E含量最大(图2A)。

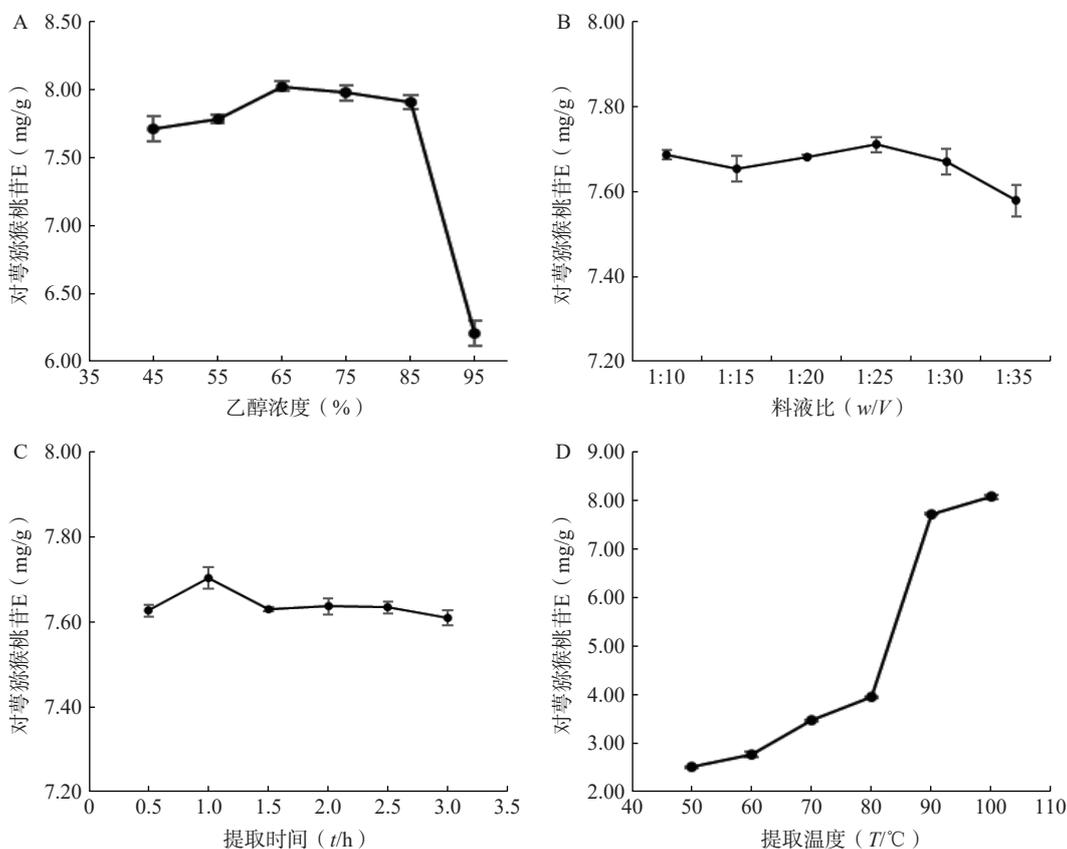


图2 单因素对对萼猕猴桃苷E含量的影响

(2) 料液比考察

精密称取6份对萼猕猴桃叶粉末,每份5g,分别按料液比1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35加入65%乙醇,90℃回流提取1h,滤液定容至相应体积。结果表明,料液比过大时,对萼猕猴桃苷E含量下降,其在料液比为1:25时含量最大(图2B)。

(3) 提取时间考察

精密称取6份对萼猕猴桃叶粉末,每份5g,按料液比1:25加入65%乙醇,90℃回流提取1次,提取时间分别为0.5、1、1.5、2、2.5、3h,滤液定容至125ml。结果表明,对萼猕猴桃苷E含量在提取时间为1h时最大(图2C)。

(4) 提取温度考察

精密称取6份对萼猕猴桃叶粉末,每份5g,按料液比1:25加入65%乙醇,分别于50、60、70、80、90、100℃回流提取1h,滤液定容至125ml。

结果表明,对萼猕猴桃苷E含量随着提取温度的升高而不断增加,温度升高到90℃时,对萼猕猴桃苷E含量骤然提升,当提取温度为100℃时其含量最大(图2D)。

2.2.2 正交试验考察

根据单因素实验考察结果,确定影响对萼猕猴桃苷E提取率的因素为乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)4个因素,每个因素选取3个水平,设计 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验,优化对萼猕猴桃苷E的提取工艺。重复试验正交结果及直观分析见表1,方差分析见表2,结果表明,影响对萼猕猴桃苷E含量的主次因素为提取温度>乙醇浓度>料液比>提取时间,其中提取温度和乙醇浓度有显著性差异($P < 0.05$)。综合考虑,确定对萼猕猴桃苷E的最佳提取工艺为 $A_1B_2C_2D_2$,即以对萼猕猴桃叶粉末25倍量的55%乙醇,95℃回流提取1h。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果及直观分析 ($n=3$)

| 编号 | A(%) | B(w/V) | C(t/h) | D(T/°C) | 对萹猕猴桃苷E含量(mg/g) | | |
|-------|---------|---------|---------|---------|-----------------|------|------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 55(1) | 1:20(1) | 0.5(1) | 90(1) | 7.94 | 7.98 | 7.87 |
| 2 | 55(1) | 1:25(2) | 1(2) | 95(2) | 7.99 | 7.98 | 8.09 |
| 3 | 55(1) | 1:30(3) | 1.5(3) | 100(3) | 7.89 | 7.85 | 7.98 |
| 4 | 65(2) | 1:20(1) | 1(2) | 100(3) | 7.87 | 7.81 | 7.77 |
| 5 | 65(2) | 1:25(2) | 1.5(3) | 90(1) | 7.85 | 7.99 | 7.97 |
| 6 | 65(2) | 1:30(3) | 0.5(1) | 95(2) | 7.91 | 7.93 | 8.05 |
| 7 | 75(3) | 1:20(1) | 1.5(3) | 95(2) | 7.91 | 7.91 | 7.81 |
| 8 | 75(3) | 1:25(2) | 0.5(1) | 100(3) | 7.84 | 7.75 | 7.81 |
| 9 | 75(3) | 1:30(3) | 1(2) | 90(1) | 7.88 | 7.97 | 7.87 |
| K_1 | 71.57 | 70.87 | 71.08 | 71.32 | | | |
| K_2 | 71.15 | 71.27 | 71.23 | 71.58 | | | |
| K_3 | 70.75 | 71.33 | 71.16 | 70.57 | | | |
| k_1 | 7.95 | 7.87 | 7.90 | 7.92 | | | |
| k_2 | 7.91 | 7.92 | 7.91 | 7.95 | | | |
| k_3 | 7.86 | 7.93 | 7.91 | 7.84 | | | |
| R | 0.09(2) | 0.05(3) | 0.02(4) | 0.11(1) | | | |

表2 对萹猕猴桃叶提取工艺方差分析

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 |
|------|--------|-----|-------|-------|---------|
| A | 0.037 | 2 | 0.019 | 4.989 | 0.019* |
| B | 0.014 | 2 | 0.007 | 1.856 | 0.185 |
| C | 0.001 | 2 | 0.001 | 0.167 | 0.847 |
| D | 0.061 | 2 | 0.031 | 8.161 | 0.003** |
| 误差 | 0.067 | 18 | 0.004 | | |
| 合计 | 0.181 | 26 | | | |

注: $f_1=2, f_2=18, F_{0.05(2, 18)}=3.55; *P<0.05, **P<0.01$.

2.2.3 最佳提取工艺验证实验

根据优选出的提取方法制备3份对萹猕猴桃叶提取液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,所测对萹猕猴桃叶中对萹猕猴桃苷E的提取率为99.32%,得率为0.80%,RSD均小于1%,表明所选工艺稳定,可用于对萹猕猴桃叶中对萹猕猴桃苷E的提取。

2.3 对萹猕猴桃苷E分离纯化工艺考察

2.3.1 大孔树脂柱纯化对萹猕猴桃苷E工艺考察

(1)大孔树脂预处理

取5种型号的大孔树脂D101、AB-8、DM130、HPD100、NKA-9适量,置于250 ml锥形瓶内,倒入高于树脂层3 cm的95%乙醇,置摇床振摇12 h,继续用95%乙醇洗涤,直至洗涤液不浑浊。然后加入蒸馏水至摇床振摇清洗,直至无醇味。

(2)大孔树脂型号的筛选

精密称取已处理的上述树脂各0.5 g,置于50 ml具塞锥形瓶中,分别加入最佳提取工艺制备的对萹猕猴桃叶浓缩提取液10 ml,盖紧瓶塞,置于恒温振荡器中振摇12 h(150 r/min),达到饱和吸附后过滤,收集未吸附溶液,测定未吸附液中对萹猕猴桃苷E的含量,计算各树脂的吸附率。将上述静态吸附过的树脂用吸水纸吸干溶液,各用10 ml 75%乙醇溶液解吸附,相同条件下振摇,收集解吸附液,测定溶液中对萹猕猴桃苷E的含量,计算各树脂的解吸附率。结果见表3,综合吸附和解吸附性能考虑,最终根据权重大小选择D101型大孔树脂进行后续实验。

表3 不同型号大孔树脂对对萹猕猴桃苷E静态吸附和解吸附的测定结果

| 树脂型号 | 吸附率(%) | 解吸率(%) | 权重(%) |
|--------|--------|--------|-------|
| D101 | 91.54 | 96.67 | 88.49 |
| AB-8 | 88.71 | 98.01 | 86.94 |
| DM130 | 62.10 | 89.80 | 55.76 |
| HPD100 | 87.82 | 97.25 | 85.41 |
| NKA-9 | 87.15 | 97.64 | 85.09 |

(3)上样液浓度考察

称取5份已处理的D101大孔树脂20 g,湿法装柱,分别加入浓度为0.07、0.16、0.24、0.33、

0.55 mg/ml 的对萼猕猴桃叶提取液 5 ml, 完全吸附后加 3 BV 水除杂, 3 BV 95% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 测定洗脱液中对萼猕猴桃苷 E 的量。结果表明, 对萼猕猴桃苷 E 的转移率随上样液浓度的增加

而升高(图 3A), 当上样液浓度大于 0.55 mg/ml 时, 其流动性变差, 不予考虑, 因此选择 0.55 mg/ml 作为合适的上样液浓度。

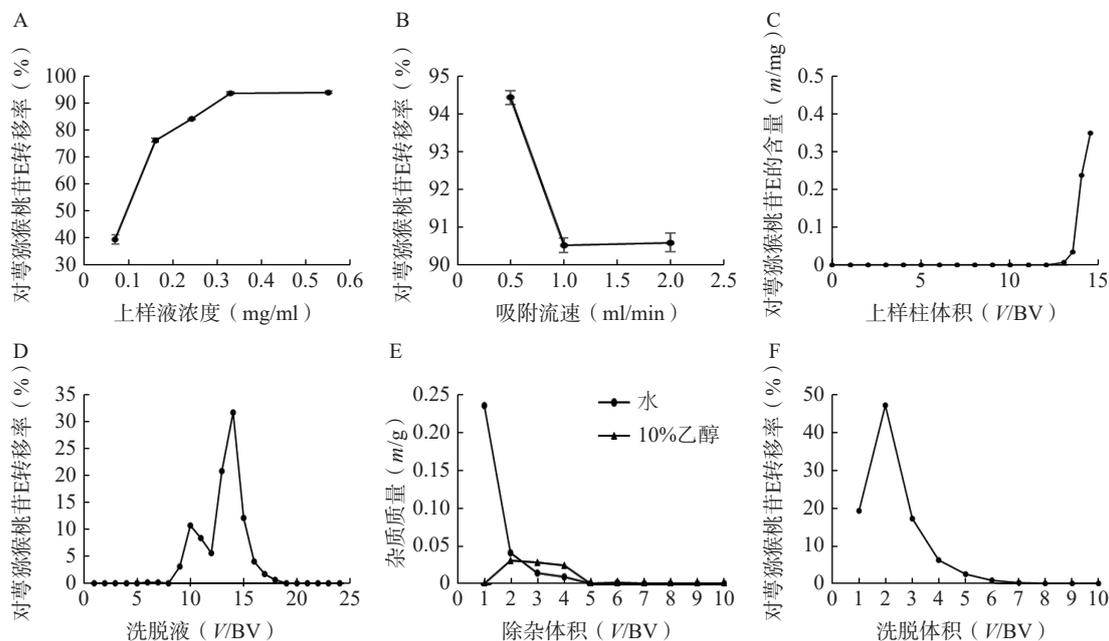


图 3 D101 型大孔树脂纯化对萼猕猴桃叶提取液工艺考察结果

(4) 吸附流速考察

称取 3 份已处理的 D101 大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 量取浓度为 0.55 mg/ml 的上样液 5 ml, 分别以 0.5、1、2 ml/min 的流速上柱吸附, 完全吸附后加 3 BV 水除杂, 3 BV 95% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 测定对萼猕猴桃苷 E 的量。结果表明, 吸附流速增大, 对萼猕猴桃苷 E 的转移率下降(图 3B), 故选择 0.5 ml/min 作为合适的吸附流速。

(5) 最大上样体积考察

称取已处理的 D101 大孔树脂 20 g(1 BV=30 ml), 湿法装柱, 制备一定体积的浓度为 0.55 mg/ml 的上样液, 吸附流速为 0.5 ml/min, 收集流出液(每 15 ml 收集 1 管), 根据泄露曲线确定最大上样量。结果表明, 当上样体积大于 12 BV 时, 流出液中检测到对萼猕猴桃苷 E, 且泄露量逐渐增大(图 3C), 因此确定上样量为 12 BV。

(6) 梯度洗脱曲线考察

称取已处理的 D101 大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 量取浓度为 0.55 mg/ml 的上样液 12 BV, 吸附流速为 0.5 ml/min, 完全吸附后, 加水和 10%、30%、50%、70%、95% 乙醇各 4 BV 依次洗脱, 收集各段洗脱液, 每 1 BV 为 1 份。结果显示, 水和 10% 乙醇洗脱液中有极少量的对萼猕猴桃苷 E, 其主要集

中在 30% 和 50% 乙醇洗脱液中(图 3D), 故选择水和 10% 乙醇除杂, 50% 乙醇洗脱。

(7) 除杂溶剂用量考察

称取已处理的 D101 大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 量取浓度为 0.55 mg/ml 的上样液 12 BV, 以 0.5 ml/min 的流速上样吸附, 加水和 10% 乙醇除杂, 均冲洗 10 BV, 按柱体积收集各段除杂液, 将其烘干称重。结果表明, 水和 10% 乙醇除杂液烘干质量均在第 5 BV 后无明显变化(图 3E), 因此除杂体积均控制在 5 BV。

(8) 洗脱溶剂用量考察

称取已处理的 D101 大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 量取浓度为 0.55 mg/ml 的上样液 12 BV, 吸附流速为 0.5 ml/min, 依次加水和 10% 乙醇各 5 BV 除杂, 50% 乙醇洗脱 10 BV, 收集洗脱液, 测定洗脱液中对萼猕猴桃苷 E 的量。结果表明, 7 BV 后洗脱液中对萼猕猴桃苷 E 的量基本可以忽略(图 3F), 因此选择 50% 乙醇洗脱液的用量为 7 BV。

(9) D101 型大孔树脂柱纯化对萼猕猴桃苷 E 工艺验证

称取已处理的 D101 型大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 量取浓度为 0.55 mg/ml 的上样液 12 BV, 以 0.5 ml/min 的流速进行动态吸附, 完全吸附后, 依次

加水和 10% 乙醇各 5 BV 除杂, 50% 乙醇 7 BV 洗脱, 除杂和洗脱流速均为 2 ml/min, 收集洗脱液, 测定对萼猕猴桃苷 E 的含量, 计算该步骤中对萼猕猴桃苷 E 的转移率, 并将洗脱液浓缩干燥至恒重, 备用。结果表明, 在大孔树脂纯化步骤中, 对萼猕猴桃叶中对萼猕猴桃苷 E 的转移率为 91.36%。该纯化工艺稳定可行, 可用于对萼猕猴桃叶提取液的纯化。

2.3.2 硅胶柱纯化对萼猕猴桃苷 E 工艺考察

(1) 硅胶柱装填

称取 200 ~ 300 目硅胶适量, 用初始比例的洗脱液充分溶胀后湿法装柱, 尽可能地排出柱子中的气泡, 待其沉降后加入洗脱液充分冲洗压实, 直至硅胶层界面不再下降。收集 D101 型大孔树脂 50% 乙醇洗脱部分所得的干燥样品, 适量甲醇溶解后与 100 ~ 200 目硅胶按质量比 1 : 1 ~ 1 : 1.5 于 50 °C 水浴锅上充分混匀蒸干, 干法上样后在其表面加一层空白硅胶, 以不同比例的洗脱液洗脱, 收集各段洗脱液, 测定对萼猕猴桃苷 E 的含量。

(2) 不同洗脱系统的考察

①二氯甲烷-甲醇洗脱系统的考察: 采用湿法装柱干法上样的方式进行硅胶柱色谱, 依次用二氯甲烷-甲醇 15 : 1、10 : 1、8 : 1、5 : 1、3 : 1、1 : 1、1 : 5、0 : 1 洗脱, 每个梯度洗脱 5 BV, 收集各段洗脱液, 测定对萼猕猴桃苷 E 的含量。结果表明, 对萼猕猴桃苷 E 主要集中在 10 : 1 和 8 : 1 洗脱部位(图 4A), 可选择二氯甲烷-甲醇 8 : 1 洗脱 5 BV 进行硅胶柱色谱。

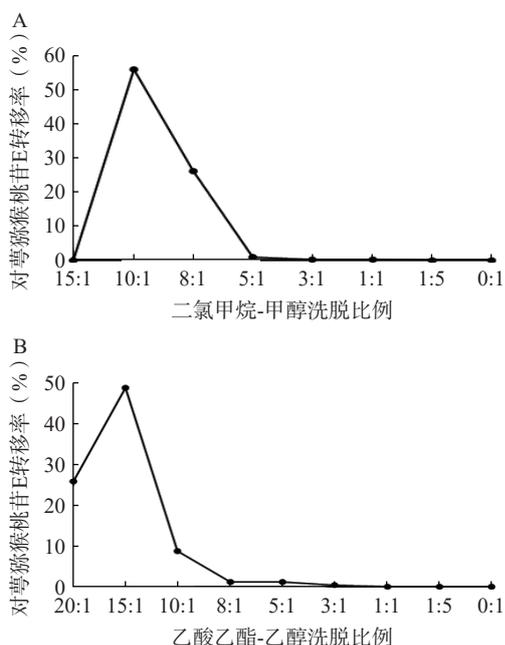


图 4 硅胶柱色谱不同洗脱系统考察结果

②乙酸乙酯-乙醇洗脱系统的考察: 依次用乙酸乙酯-乙醇 20 : 1、15 : 1、10 : 1、8 : 1、5 : 1、3 : 1、1 : 1、1 : 5、0 : 1 洗脱, 其余步骤同上。结果显示, 对萼猕猴桃苷 E 在 10 : 1 条件下基本已完全洗脱(图 4B), 因此可选择乙酸乙酯-乙醇洗脱系统 10 : 1 洗脱 5 BV。

在硅胶柱色谱实验中, 使用上述两种洗脱体系所得对萼猕猴桃苷 E 的转移率分别为 82.09%、83.21%, 两者相差不大, 考虑到洗脱溶剂的毒性安全性问题, 选择乙酸乙酯-乙醇系统作为硅胶柱色谱步骤的洗脱体系。

(3) 硅胶柱纯化对萼猕猴桃苷 E 工艺验证

硅胶柱色谱采用湿法装柱干法上样的方式进行操作, 上样后以乙酸乙酯-乙醇 10 : 1 洗脱 5 BV, 收集洗脱液, 测定洗脱液中对萼猕猴桃苷 E 的含量, 得该步骤对萼猕猴桃苷 E 的转移率为 83.52%。

2.3.3 ODS 柱纯化对萼猕猴桃苷 E 工艺考察

将浸泡在甲醇中的 ODS 填料倒入色谱柱中, 待其沉降完全后以初始洗脱比例 30% 甲醇溶液置换柱子中的纯甲醇溶液。将硅胶柱色谱所得的洗脱液浓缩干燥后用少量甲醇溶解过滤膜后进行湿法上样, 待样品完全吸附后, 依次用 30%、40%、50% 甲醇各洗脱 2 BV, 分段收集 50% 甲醇洗脱部分, 通过液相色谱结果进行合并, 合并液再次以相同条件进行 ODS 柱色谱, 最终得到较纯的对萼猕猴桃苷 E 单体化合物(图 5), 该步骤中对萼猕猴桃苷 E 的转移率为 70.37%, 其纯度为 99.9%, 表明该方法分离纯化效果较好。

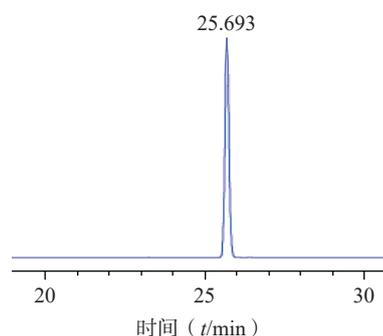


图 5 ODS 柱色谱所得对萼猕猴桃苷 E 的 HPLC 图

2.4 对萼猕猴桃苷 E 提取分离纯化工艺验证

按照优选的对萼猕猴桃苷 E 提取分离纯化方法对其工艺进行验证。称取对萼猕猴桃叶粉末 25 g, 以 25 倍量 55% 乙醇 95 °C 回流提取 1 h, 滤液减压浓缩。将已处理的 D101 型大孔树脂进行湿法装柱, 量取浓度为 0.55 mg/ml 的上样液 12 BV, 吸附流速为 0.5 ml/min, 依次加水和 10% 乙醇各 5 BV

除杂, 50% 乙醇 7 BV 洗脱, 洗脱液浓缩干燥。硅胶柱采用湿法装柱干法上样的方式进行柱色谱, 上样后以乙酸乙酯-乙醇 10:1 洗脱 5 BV, 收集并浓缩干燥洗脱液。ODS 柱经上样后依次用 30%、40%、50% 甲醇各洗脱 2 BV, 分段收集 50% 甲醇洗脱部分, 较纯部分合并后再次以相同条件进行 ODS 柱色谱, 最终得到黄色粉末状物质, HPLC 进样检测, 与对照品比对后确定该物质为对萼猕猴桃苷 E。该提取分离纯化工艺所得对萼猕猴桃苷 E 的转移率为 53.70%, 得率为 0.35%, 纯度为 99.9%, 表明该方法稳定可行, 可用于对萼猕猴桃叶中对萼猕猴桃苷 E 的提取分离纯化。

3 讨论

中药的提取方法包括热回流提取、水煎煮提取、超声辅助提取等方法^[8], 在前期提取方法及提取试剂的考察中, 我们使用了水及不同浓度的乙醇考察提取溶剂对对萼猕猴桃叶中对萼猕猴桃苷 E 提取率的影响, 结果表明, 乙醇浓度在 60% 左右时其提取率最大。此外, 通过对超声提取法、热回流提取法及渗漉法三种提取方法的比较, 发现热回流提取法具有时间较短、节省溶剂、提取率较大的优势, 因此在本实验中选用乙醇回流提取法进行单因素考察和正交试验。

在回流提取实验的单因素考察中, 除了乙醇浓度、料液比、提取时间和提取温度外, 提取次数也是一个重要的考察因素。本实验发现, 第 2 次回流提取所得的提取液中对萼猕猴桃苷 E 含量极低, 基本可以忽略, 因此在实验中确定提取次数为 1 次。

大孔吸附树脂柱色谱是分离纯化黄酮类化合物常用的方法之一^[9], 其吸附与解吸附性能对化合物的转移率有很大影响。本实验中, 我们对 D101 型大孔树脂进行静态吸附与解吸附动力学考察, 分别在不同时间点吸取未吸附液及解吸附液, 测定对萼猕猴桃苷 E 的含量。结果显示, D101 型大孔树脂属于慢速吸附型树脂, 在上样时, 应尽量降低流速, 增加样品与树脂的接触时间, 其解吸附能力较强, 洗脱时可加大流速。

葡聚糖凝胶柱和 ODS 柱常作为化合物精制纯化的关键一步。前者主要是依据分子筛原理, 由于化合物的分子量不同, 在凝胶柱中受到的阻滞作用也不同, 导致分子量大的化合物先被洗脱下来^[10];

后者是根据化合物极性的不同进行分离的, 由于反相柱中固定相极性小于流动相极性, 致使极性较大的化合物先从柱中流出。在硅胶柱色谱后, 我们发现对萼猕猴桃叶洗脱液中主要成分为两个黄酮苷类化合物, 两者结构式仅有一个乙酰基之差, 使用葡聚糖凝胶柱始终无法完全分离。其中对萼猕猴桃苷 E 的极性与另一黄酮类化合物相比极性较小, 通过高效液相色谱可以将两个化合物分离, 且分离度较好。因此, 选用 ODS 反相柱进行纯化, 最终得到对萼猕猴桃苷 E 单体化合物。

本实验从中药资源非药用部位的开发利用角度出发, 对对萼猕猴桃叶进行研究, 首次设计出一条稳定可行、重复性好的提取分离纯化工艺对对萼猕猴桃叶中分离得到对萼猕猴桃苷 E, 整个工艺操作简单, 提取效率高, 所得对萼猕猴桃苷 E 纯度为 99.9%。作为一个新化合物, 其药物开发过程有很长的路要走, 本实验所做的提取分离纯化工艺研究为对萼猕猴桃苷 E 进一步的药代动力学研究、安全性药理研究等内容的实施奠定了物质基础。

【参考文献】

- [1] 中国植物志编委. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 218.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-1[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 548-549.
- [3] 陈豪, 潘坤官, 何丽君. 抗癌中药猫人参研究概况 [J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 9-11.
- [4] 石珪, 贾敏, 张婷婷, 等. 不同生长时段对萼猕猴桃叶中黄酮类成分的含量分析 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(10): 795-798.
- [5] XIN H L, WU Y C, SU Y H, et al. Novel flavonoids from the leaves of *Actinidia valvata* Dunn: structural elucidation and antioxidant activity[J]. *Planta Med*, 2011, 77(1): 70-73.
- [6] 辛海量. 抗心肌缺血的对萼猕猴桃叶组合物: CN201510213371.2 [P]. 2018-08-21.
- [7] 辛海量, 凌昌全, 曲丽萍, 等. 对萼猕猴桃苷 E、F 在制备抗心肌缺血药物中的应用: CN201110271050. X[P]. 2013-02-06.
- [8] 李伟. 黄酮类化合物提取方法概述 [J]. 农产品加工, 2023(14): 75-78.
- [9] 陈丛瑾. 大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的研究进展 [J]. *化学与生物工程*, 2010, 27(11): 1-4.
- [10] 梁耀光, 吕巧莉. 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 分离苷类的研究进展 [J]. 广东化工, 2013, 40(13): 101, 93.

【收稿日期】 2024-07-01 【修回日期】 2025-01-13

【本文编辑】 李春德