

大孔树脂纯化短梗五加中主要有效成分 金丝桃苷和 Chiisanoside 的工艺研究

赵 岩,郭 雪,祝洪艳,蔡恩博,何忠梅,刘双利,杨 鹤,郜玉钢*,张连学*

吉林农业大学中药材学院,长春 130118

摘 要:研究大孔树脂优化短梗五加叶中有效成分金丝桃苷和 chiisanoside 的富集、纯化工艺。通过静态吸附与解吸实验对 7 种型号的大孔树脂进行筛选,并对所选树脂进行工艺参数考察。D101 树脂对有效成分的吸附和解吸效果最佳,最优条件为以生药浓度 0.3 g/mL 上样 70 mL,用 110 mL 70% 的乙醇溶液进行洗脱。纯化后的金丝桃苷和 chiisanoside 收率分别为 88.40% 和 93.07%。D101 树脂对两种有效成分的吸附性能良好,该工艺对于富集两种有效成分可提供一定的依据。

关键词:大孔树脂;短梗五加;金丝桃苷;chiisanoside

中图分类号:R284

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.S.028

Purification of Main Effective Components Hyperin and Chiisanoside in *Acanthopanax sessiliflorus*. by Macroporus Resin

ZHAO Yan, GUO Xue, ZHU Hong-yan, CAI En-bo, HE Zhong-mei, LIU Shuang-li,

YANG He, GAO Yu-gang*, ZHANG Lian-xue*

College of Chinese Medicine Material, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China

Abstract: To study the enrichment and purification technology of effective components from the leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* by macroporous resin. Explore 7 macroporous resins by using the test of static adsorption and desorption, and optimize the process parameters. The D101 macroporous resin was found to have better adsorption and desorption. The optimum conditions for purification process were as follows: the sample concentration was 0.3 g/mL; sample volume was 70 mL; 70% ethanol with 110 mL to elute. The purity rate of the obtained hyperin and chiisanoside were 88.40% and 93.07%. D101 is an ideal resin for adsorption, the process can provide a certain basis on the enrichment of hyperin and chiisanoside.

Key words: macroporous resin; *Acanthopanax sessiliflorus*; hyperin; chiisanoside

短梗五加 [*Acanthopanax sessiliflorus* (Rupr. et Maxim) Seem.] 为五加科五加属植物,也称“无梗五加”。短梗五加叶、根和果实均可入药,具有抗氧化、保肝护肝、抗癌、抗血栓及抗血小板凝集的作用^[1-5]。自 2008 年短梗五加被列入新资源食品以来,随着产品种类的增多,人们对于短梗五加活性成分及作用的研究也不断深入^[6,7],研究表明 chiisanoside 和金丝桃苷为短梗五加叶中的主要活性成分,具有多种药理活性,其中 chiisanoside 有显著地抗氧化、抗炎及抑制胰脂肪酶和治疗糖尿病作用^[8,9],金

丝桃苷能够减轻小鼠急性肝损伤。本研究以 chiisanoside 和金丝桃苷为指标,采用 HPLC-ELSD 法对大孔树脂型号进行筛选并对 D101 树脂的工艺参数进行了优化,确定富集纯化有效成分的条件。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪(Waters 1525 二元泵, Waters 2424 型蒸发光检测器, Waters 2707 自动进样器,美国 Waters 公司); KH-300DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); ZD-85 气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司); 大孔树脂 D101、HPD100、X-5、AB-8、S-8(沧州宝恩化工有限公司), DM130、NKA-9(郑州勤实科技有限公司)。

短梗五加叶采收于吉林省临江市,经吉林农业

收稿日期:2016-08-08 接受日期:2016-09-21

基金项目:国家公益性行业科研专项(201303111);吉林省科技发展计划(20140204013YY, 20150307012YY)

* 通讯作者 E-mail: gaoyugang_2006@163.com; zlx863@163.com

大学张连学教授鉴定为五加科植物短梗五加(*Acanthopanax sessiliflorus* Seem.);金丝桃苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,货号:B20631,纯度 $\geq 98\%$)Chiisanoside 对照品为实验室自制,纯度 $\geq 98\%$;实验用乙腈为色谱纯,色谱分析用水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金丝桃苷和 chiisanoside 的含量测定方法

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Odyssll C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(35:65, v/v);流速:1 mL/min;柱温:40 ℃。

2.1.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称定金丝桃苷 2 mg、chiisanoside 20 mg,加甲醇适量溶解于 10 mL 容量瓶中并定容至刻度,混匀即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备

取短梗五加提取液加适量水,超声并定溶于 10 mL 容量瓶中,混匀,过 0.22 μm 滤膜备用。

2.1.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 2、6、8、10、12 μL,注入液相色谱仪,以进样样品质量为横坐标(x),峰面积(y)为纵坐标进行 Log-log 线性回归,得到回归方程,金丝桃苷: $y = 1.739696x + 5.409298$ ($R^2 = 0.9991$), chiisanoside: $y = 1.626320x + 5.018378$ ($R^2 = 0.9990$)。结果表明金丝桃苷在 0.4 ~ 2.4 μg、chiisanoside 在 4 ~ 24 μg 内线性关系良好。

2.2 大孔树脂纯化短梗五加叶有效成分

2.2.1 大孔树脂预处理

取各型号大孔树脂适量于无水乙醇中浸泡 24

h,使其充分膨胀,弃去上层漂浮的碎树脂。再用无水乙醇淋洗至加少量水无浑浊现象出现,用蒸馏水淋洗至无醇味。用 5% 氢氧化钠溶液浸泡 4 h,用蒸馏水冲洗至中性,用 5% 的盐酸溶液浸泡 4 h,用水冲洗至中性备用。

2.2.2 上样液的制备

取干燥后的短梗五加叶粗粉适量,用 70% 的乙醇冷浸 24 h,超声提取 3 次,过滤后合并提取液。将提取液减压浓缩至无醇味,加蒸馏水混匀并定容至 1000 mL(含生药 0.2 g/mL,金丝桃苷 0.258 mg/mL,chiisanoside 3.097 mg/mL)。

2.2.3 大孔树脂静态吸附实验

选取不同极性、已经处理过的 7 种型号大孔树脂: D101 型、HPD100 型、X-5 型、AB-8 型、S-8 型、DM130 型、NKA-9 型树脂,每种型号树脂 3 份,每份各 5 g(抽干)。分别放入 150 mL 具塞磨口三角瓶中,精密加入上样液 50 mL,置于恒温振荡器中,室温静态吸附 12 h。滤过树脂,收集滤液,按 2.1 项下方法计算有效成分质量浓度并计算吸附率。滤过后的树脂放入三角瓶中,加入 70% 乙醇 100 mL,室温水浴振荡 12 h,取上清过滤并计算解吸率,结果见表 1,计算公式如下:

$$\begin{aligned} \text{吸 附 量} &= \frac{(\text{样品溶液浓度} - \text{吸附后溶液浓度}) \times \text{溶液体积}}{\text{树脂质量}} \\ \text{吸 附 率} &= \frac{\text{样品溶液浓度} \times \text{体积} - \text{吸附后溶液浓度} \times \text{溶液体积}}{\text{样品溶液浓度} \times \text{溶液体积}} \\ \text{解 吸 液} &= \frac{\text{解吸液浓度} \times \text{解吸液体积}}{(\text{样品溶液浓度} - \text{吸附后溶液浓度}) \times \text{溶液体积}} \end{aligned}$$

表 1 不同型号树脂的吸附与解吸性能测定结果

Table 1 Determination results of adsorption and desorption capacity indexes of resins

树脂型号 Resin type	吸附量		吸附率		解吸率	
	Absorption amount(mg/g)		Adsorption rate(%)		Elution rate(%)	
	金丝桃苷	Chiisanoside	金丝桃苷	Chiisanoside	金丝桃苷	Chiisanoside
NKA-9	1.08	21.30	41.72	68.78	67.29	93.59
S-8	1.43	21.38	55.44	69.09	73.83	97.12
DM130	1.72	25.44	60.88	82.13	83.75	92.41
AB-8	1.39	22.97	54.09	74.17	86.76	87.20
D101	2.09	25.70	80.87	82.97	90.93	89.89
HPD100	1.58	24.20	66.48	78.14	92.65	95.86
X-5	1.83	24.01	70.54	77.51	78.58	80.56

从表中可知,D101、HPD100、X-5 树脂对金丝桃苷和 chiisanoside 的吸附性能较好,D101、HPD100 两种树脂对有效成分解吸率较高,综合考虑,选取 D101 为最佳型号大孔树脂。

2.2.4 上样液浓度的选择

分别吸取 50、100 mL 上样液,加水定容至 100

mL;取 150、200 mL 上样液浓缩至 100 mL,超声混匀。将处理好的 D101 树脂 15 g 湿法装柱,分别将各浓度上样液倒入树脂,吸附 2 h 后以 1 mL/min 的速度过柱,收集过柱液。用 100 mL 蒸馏水冲柱后用 100 mL 70% 乙醇溶液洗脱,用液相检测过柱液和洗脱液中有效成分的质量浓度,结果见表 2。

表 2 上样浓度对纯化有效成分的影响

Table 2 The influence of sample concentration of active components

上样浓度 Loading concentration	吸附量 Absorption amount (mg/g)		吸附率 Adsorption rate (%)		解吸率 Elution rate (%)	
	金丝桃苷	Chiisanoside	金丝桃苷	Chiisanoside	金丝桃苷	Chiisanoside
0.1 g/mL	0.70	8.71	68.57	85.82	77.33	87.98
0.2 g/mL	1.58	17.91	76.96	93.67	92.81	96.41
0.3 g/mL	2.58	25.17	89.97	91.36	87.32	93.05
0.4 g/mL	3.62	35.45	88.32	92.98	89.11	92.79

从表中可知,上样浓度越大,树脂对两种有效成分的吸附量越大,且当生药浓度在 0.3 g/mL 以上时有效成分的吸附率和解吸率较高,但考虑实际实验中,样品浓度浓缩过大时样液流速慢,出现柱子堵塞的状况,所以选择生药浓度为 0.3 g/mL 时为最佳上样浓度。

2.2.5 上样量的确定

将处理好的树脂按“2.2.4”方法装柱,取 0.3 g/mL 样液连续上样,流速为 1 mL/min,每 10 mL 过柱液为 1 管并编号,进液相检测,泄漏曲线如下图所示。

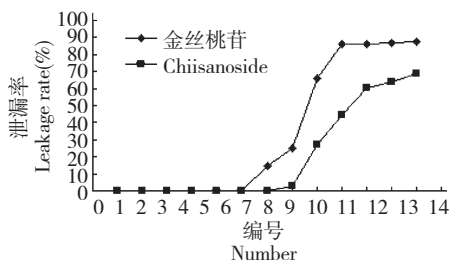


图 1 泄漏曲线

Fig. 1 Leak curve

从图中能够看出,金丝桃苷从第 6 管开始泄漏,chiisanoside 从第 8 管开始泄漏,考虑到前期实验显示短梗五加叶中 chiisanoside 的含量较大,金丝桃苷含量较少,综合考虑吸附结果,将上样量确定在 7 管,即 70 mL。

2.2.6 洗脱剂的选择

按上述所选条件上样,用适量蒸馏水冲洗至流出液无色。配制 10%、30%、50%、70% 和 95% 的乙醇溶液,分别用同等体积、不同浓度的乙醇溶液洗脱,流速为 1 mL/min。测定洗脱液中金丝桃苷和 chiisanoside 的含量,计算解吸率,结果如图 2。

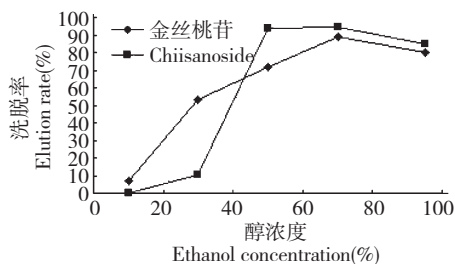


图 2 乙醇浓度对金丝桃苷与 chiisanoside 洗脱效果的影响

Fig. 2 The influence of ethanol concentration on hyperin and chiisanoside

从图中可知,醇浓度在 70% 时,金丝桃苷洗脱率较高,浓度在 50%、70% 时 chiisanoside 的洗脱效果接近平衡状态,浓度在 95% 时两种成分均有所下降,可能是由于提取液中其他成分的干扰。为了达到最佳的解吸效果,选择 70% 的醇来进行洗脱。

2.2.7 洗脱剂用量的确定

处理过的树脂按确定的条件上样,水洗过后,用 70% 的乙醇溶液以固定流速洗脱,每 10 mL 洗脱液为 1 管并编号,测定每管中有效成分的含量并绘制洗脱曲线。

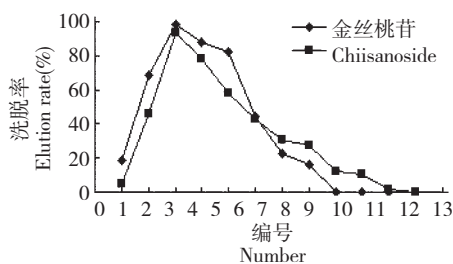


图3 洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve

从图中可知,9号管中已经检测不到金丝桃苷,此时金丝桃苷已经被完全洗脱下来,而chiisanoside在11管时接近洗脱完全,可将洗脱液用量确定在110 mL。

2.2.8 验证实验

取处理好的D101大孔树脂3份,按照上述最优条件做平行实验,将收集后的洗脱液进行干燥,并称重。经过计算得出金丝桃苷的收率分别为88.40%、87.65%、87.32%,chiisanoside的收率为92.13%、93.07%、92.18%。

3 讨论

大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂,是一种吸附性和筛选行相结合的多孔性高分子材料,因其具有成本低、选择性好、吸附速度快、吸附容量大、易洗脱等优点,近年来被广泛应用于中药研究中^[10,11]。不同型号的大孔树脂极性强弱不同,对中药有效成分的富集纯化效果也有差异^[12,13]。实验采用NKA-9(强极性)、S-8(强极性)、DM130(中等极性)、AB-8(弱极性)、D101(弱极性)、HPD100(非极性)、X-5(非极性)7种型号树脂,研究不同极性对有效成分纯化效果的影响,从中可以看出弱极性和非极性树脂吸附与解吸性能较好,其中D101树脂较优。

实验还研究上样浓度、上样量、洗脱剂的选择和洗脱剂用量四个工艺参数,结果表明最优工艺条件为生药浓度0.3 g/mL上样70 mL,用110 mL 70%的乙醇溶液进行洗脱,该条件下两种有效成分能够被完全洗脱,且收率较高,可以达到有效富集纯化金丝桃苷和chiisanoside的目的,为有效成分的大量制备提供一定依据。金丝桃苷和chiisanoside是短梗五加叶中主要成分且具有很好的药理活性,本实验首次对这两种成分进行共同提取并采用HPLC-

ELSD对其纯化过程的含量进行检测,为合理有效的利用短梗五加提供一定参考。

参考文献

- Hao XM(郝旭梅), Bao JC(鲍建才), Yang ZH(杨智慧), et al. Antioxidant activity of polysaccharide from the leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* Seem. *Packag Food Machin*(包装与食品机械), 2011, 29(4): 1-3.
- Liang QM, Yu XF, Qu SC, et al. *Acanthopanax senticosides* B ameliorates oxidative damage induced by hydrogen peroxide in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Eu J Pharmacol*, 2010, 627: 209-215.
- Sun QY(孙秋艳), Liu Y(刘艳), Wang Q(汪茜), et al. Study on antitumor effects of chlorogenic acid on Lewis and A549 lung carcinoma. *West China J Pharm Sci*(华西药学期刊), 2010, 25: 536-538.
- Song Y(宋洋), Yang CJ(杨春娟), Yu K(于凯), et al. *In vivo* antithrombotic and antiplatelet activities of a quantified *Acanthopanax sessiliflorus* fruit extract. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2011, 9: 141-145.
- Zheng Y(郑颖), Jin YP(金银萍), Wang YP(王英平), et al. Progress in chemical constituents and pharmacological activities of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Special Wild Econ Animal Plant Res*(特产研究), 2012, 1: 72-75.
- Li H(李鹤), Hu WZ(胡文忠), Jiang AL(姜爱丽), et al. Research advance on the active constituents of different parts of *Acanthopanax sessiliflorus* and its edible and medicinal values. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2016, 6: 372-374.
- SK Jung, HJ Lee, KW Lee, et al. Bioactivities and action mechanisms of *Acanthopanax* species. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21: 1227-1233.
- Jung HJ, Nam JH, Choi J, et al. Anti-inflammatory effects of chiisanoside and chiisanogenin obtained from the leaves of *Acanthopanax chiisanensis* in the carrageenan and Freund's complete adjuvant-induced rats. *J Ethnopharmacol*, 2005, 97: 359-367.
- Yoshizumi K, Hirano K, Ando H, et al. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 335-341.
- Zhang X(张旭), Wang JY(王锦玉), Tong Y(仝燕), et al. Application and prospect of macroporous resin technology in extraction and purification of traditional Chinese medicine. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 286-288.