

大孔树脂联合 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶分离 纯化芦荟大黄素

张旭东, 杨嘉宏, 曹洁怡, 麦玉平, 王亮*

(吉林大学珠海学院, 药学与食品科学学院, 珠海 519041)

摘要: **目的** 对芦荟药材中芦荟大黄素进行分离纯化及含量测定。**方法** 以 DM301、X5、DM130 3 种大孔树脂的静态吸附率, 动态吸附率为指标, 分离芦荟大黄素, 用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶纯化芦荟大黄素, 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定芦荟大黄素的含量。**结果** 芦荟大黄素线性回归方程为 $Y=41131X-44.34(r^2=0.9993)$, DM301 大孔树脂联合 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶分离纯化芦荟大黄素效果好。**结论** 该方法快速、简便, 为芦荟中有效成分大黄素分离和测定提供了依据, 为大黄素的纯化提供了参考。

关键词: 芦荟大黄素; 大孔树脂; Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶; 分离纯化; 高效液相色谱法; 含量测定

Separation and purification of Aloe-emodin by macroporous resin and Sephadex LH-20

ZHANG Xu-Dong, YANG Jia-Hong, CAO Jie-Yi, MAI Yu-Ping, WANG Liang*

(College of Pharmacy and Food Science, Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China)

ABSTRACT: Objective To isolate, purify and determine the content of aloe-emodin in aloe vera. **Methods** The static adsorption rate and dynamic adsorption rate of three macroporous resins of DM301, X5 and DM130 were used to separate aloe-emodin. Sephadex LH-20 glucan gel was used to purify aloe-emodin, and high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine aloe-emodin content. **Results** The linear regression equation of aloe-emodin was $Y=41131X-44.3 (r^2=0.9993)$. The separation and purification of aloe-emodin by DM301 macroporous resin combined with Sephadex LH-20 dextran gel was effective. **Conclusion** The method is rapid and simple, which provides a basis for the separation and determination of the active ingredient emodin in aloe, and a reference for purification.

KEY WORDS: Aloe-emodin; macroporous resin; Sephadex LH-20 dextran gel; separation and purification; high performance liquid chromatography; determination

基金项目: 广东省大学生创新创业培养计划(201713684021)

Fund: Supported by the Guangdong Provincial College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (201713684021)

*通讯作者: 王亮, 硕士, 实验师, 主要研究方向为天然产物活性成分分析。E-mail: wagnliang8080@126.com

*Corresponding author: WANG Liang, Master, Technician, Zhuhai College of Jilin University, College of Pharmacy and Food Science, Zhuhai 519041, China. E-mail: wagnliang8080@126.com

1 引言

芦荟(*Aloe vera*(Haw.) Berg)是芦荟属的多年生常绿草本植物。其主要成分芦荟大黄素是天然存在的一种蒽醌类物质,具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤等药理作用^[1-5],在护肝、美容肌肤等也有很好的功效^[6,7]。目前对蒽醌类物质的提取方法有回流法、超声波提取法、微波提取法、超临界 CO₂ 萃取技术等^[8-11],但各有缺点,例如回流法时间长,产率低^[12],超声波噪音大,对人体有伤害^[13]等。其中分离纯化蒽醌类物质多采用的是大孔树脂法,而很少有人采用大孔树脂联合 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶进行分离纯化。而在分离纯化植物活性成分的方法中,大孔树脂因具有成本低、无污染、操作简单、选择性好、可再生等优点而备受人们关注^[14,15]。因此本研究采用大孔树脂和 Sephadex LH-20 凝胶分离纯化得到芦荟大黄素,再通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定所提取的芦荟大黄素含量,探讨不同型号大孔树脂联合 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶分离纯化的方法,选择最优的分离纯化方法及含量测定方法,以期为芦荟的开发利用提供科学理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

大孔吸附树脂 DM301、X5、DM130(西安东鸿化工公司); Sephadex LH-20(上海伊卡生物技术有限公司); 芦荟大黄素标准品(99%, 上海瑞楚生物科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇、甲醇、冰醋酸、乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾等(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); FC-95 自动馏分收集器、8823B 紫外检测仪(北京滨达创科技有限公司); KH-300E 超声波清洗器(江苏昆山永创仪器厂); SHB-120 循环水式多用真空泵、智能恒温电热套(郑州长城科工贸有限公司); LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); DMF-10A500 克多功能摇摆粉碎机(浙江温岭市铭大机械厂); HH-S4 数显恒温水浴(常州朗博仪器制造厂); AR224CN 电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海恒科仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 芦荟粗提液的制备

称取芦荟 10 g, 置于索氏提取器中, 加 150 mL 95%乙醇回流提取, 提取时间至虹吸时溶液颜色近无色时, 趁热抽滤, 滤纸用 95%乙醇洗 3 次, 弃去渣滓, 向抽滤后的溶液

中缓慢滴加 5%氢氧化钾溶液, 调节 pH 至 9~10, 静置 20 min, 抽滤, 滤饼用 95%乙醇洗 3 次, 合并洗液, 置于旋转蒸发仪上浓缩, 得到总蒽醌钾盐, 置于烘箱中干燥。将干燥后的产物溶于 95%的乙醇中, 水浴加热使沉淀悬浮, 抽滤, 得芦荟大黄素粗提液。

2.3.2 对照品溶液、供试品溶液的制备

精密称取芦荟大黄素对照品 3.07 mg, 加甲醇制成 0.1228 mg/mL 的溶液作为对照品溶液。

称取芦荟干药材经粉碎后的粉末 30 g, 95%乙醇回流提取 4 h 后, 溶液浓缩, 取经浓缩后的样品 2 mL, 在活化好的 DM301 大孔树脂柱上样, 收集前段。将收集的前段液合并后浓缩, 取浓缩后的溶液 2 mL, 在活化好的 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱洗脱, 收集前段, 浓缩后即得供试品溶液。

2.3.3 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-S(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇:水=71:29(V/V), 等梯度洗脱; 检测波长: 254 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.3.4 静态吸附实验

取适量大孔吸附树脂 DM301、X5、DM130, 分别加无水乙醇浸泡 24 h, 去除上层悬浮颗粒, 用蒸馏水洗至无醇味。分别称取 3 种树脂各 5 g, 置于 100 mL 三角瓶中, 每瓶中加入芦荟粗提液 10 mL, 置于摇床上振荡吸附 24 h。吸取上清液, 进行含量测定。大孔吸附树脂吸附量、吸附率的计算如下:

$$\text{吸附量}=(\text{母液浓度}-\text{滤液浓度})\times\text{滤液体积}/\text{干树脂量}$$

$$\text{吸附率}=(\text{母液浓度}-\text{滤液浓度})/\text{母液浓度}\times 100\%$$

$$\text{解吸附量}=\text{解吸附后滤液浓度}\times\text{溶液体积}/\text{干树脂量}$$

$$\text{解吸附率}=\text{解吸附量}/\text{吸附量}\times 100\%$$

2.3.5 动态洗脱分离及效果检测

选择吸附率和解吸附率最高的大孔吸附树脂型号, 进行预处理后, 装柱(2 cm×30 cm)。加芦荟粗提液 4 mL 进行洗脱。分别用 100 mL 的 60%、70%、80%甲醇依次洗脱树脂柱, 收集洗脱液, 进行检测。

2.3.6 Sephadex LH-20 纯化芦荟大黄素

芦荟粗提液经大孔吸附树脂柱层析后收集的前段收集液浓缩至 10 mL 后; Sephadex LH-20 进行柱层析, 吸取 4 mL 上样, 分别用 60%、70%、80%甲醇各 70 mL, 洗脱流速约为 60 mL/h, 洗脱做平行试验, 确定最佳流动相浓度。将检测结果接近的收集液进行合并浓缩, 即得纯化的芦荟大黄素。

3 结果与分析

3.1 系统适应性实验

理论塔板数按芦荟大黄素计算应不低于 5000。在色谱条件下进行分析, 供试品溶液色谱图与对照品溶液色谱

图, 在相同保留时间有同一色谱峰(10.02 min), 详见图 1~9。供试品的色谱峰与其他组分的色谱峰基线分离良好, 与相邻色谱峰分离度>1.5; 以芦荟大黄素色谱峰计算理论塔板数>5000。符合系统适应性试验要求。

3.2 动态洗脱分离及效果检测

选用不同浓度的甲醇, 对 DM301 大孔树脂分离纯化收集的前段溶液进行洗脱, 然后在 Sephadex LH20 凝胶柱上进行分离纯化, 详见图 2~9, 发现 70%的甲醇洗脱效果最好, 60%的甲醇洗脱效果次之, 80%甲醇洗脱杂质较多,

芦荟大黄素极性大过 Sephadex LH20 凝胶柱时, 先被洗脱下来, 只需要收集前段溶液即可。

3.3 大孔吸附树脂对芦荟大黄素的静态吸附

大孔树脂对芦荟大黄素静态吸附率大小分别是 DM301(79.7%)>DM130(68.4%)>X5(30.8%); 静态解析率 DM301(80.6%)>DM130(78.8%)>X5(45.5%); 其中大孔树脂 DM301 从静态吸附和解析率上明显优于其他 2 种树脂, 说明 DM301 对芦荟大黄素的一级纯化最为合适。

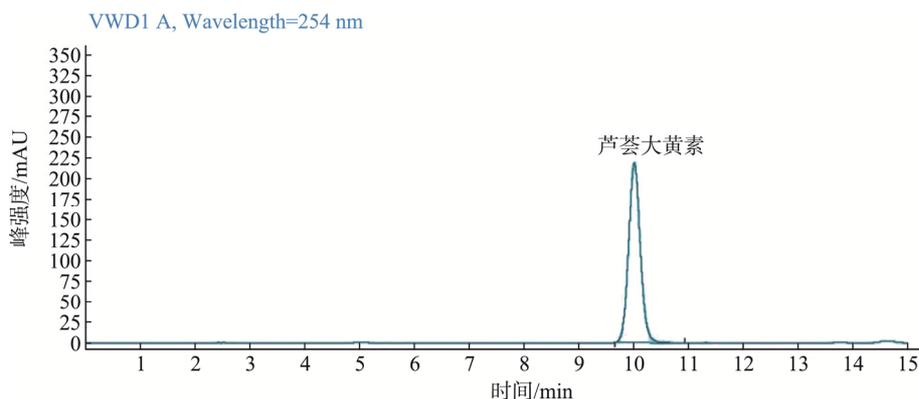


图 1 芦荟大黄素标准品 HPLC 图
Fig.1 HPLC diagram of aloe emodin standard

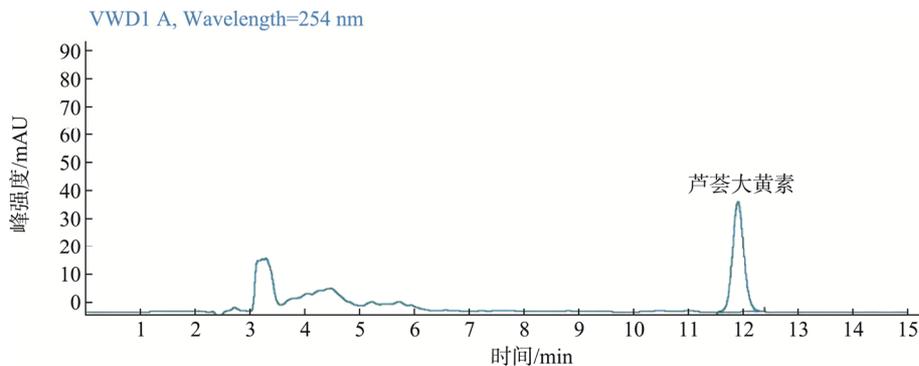


图 2 60%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素
Fig.2 60% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloe emodin

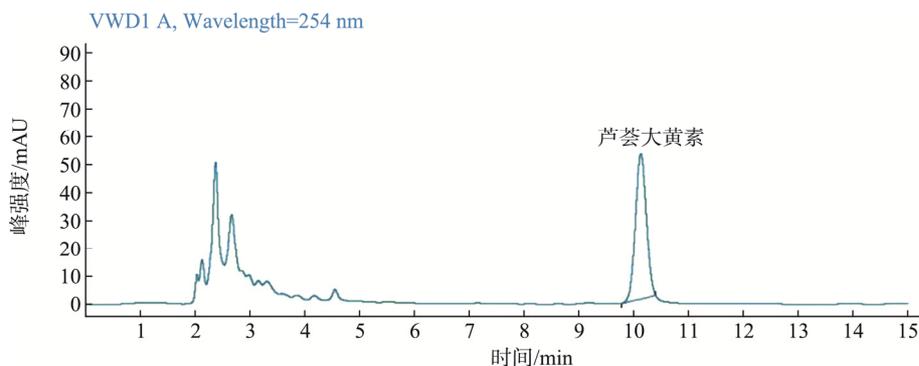


图 3 70%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素
Fig.3 70% methanol Sephadex HL-20 glucan gel elution aloe emodin

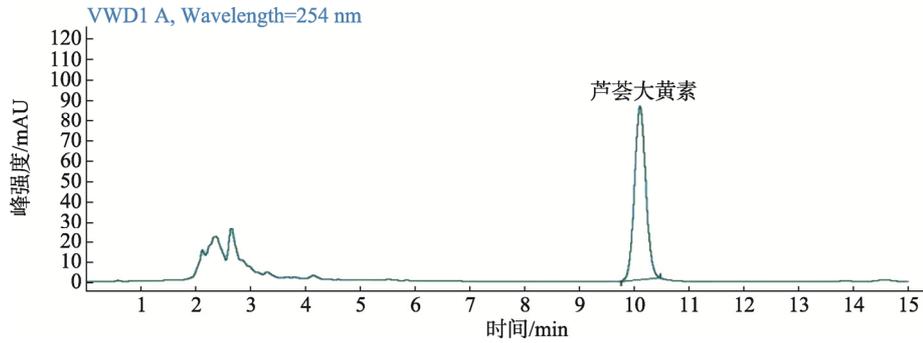


图4 80%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素
Fig.4 80% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloesin

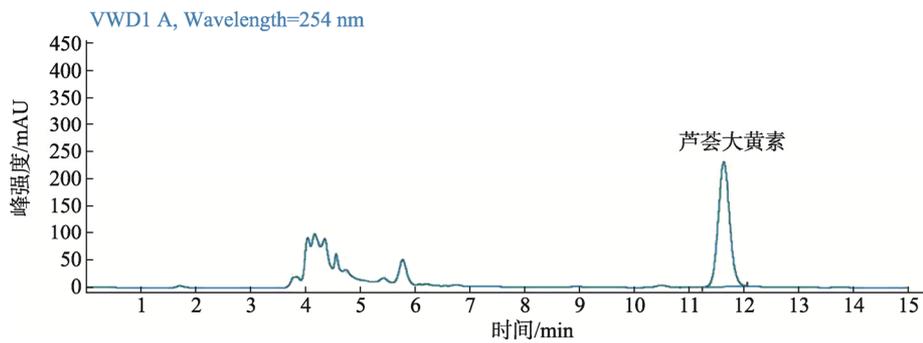


图5 70%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素(1~5 管)
Fig.5 70% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloesin (1-5 tubes)

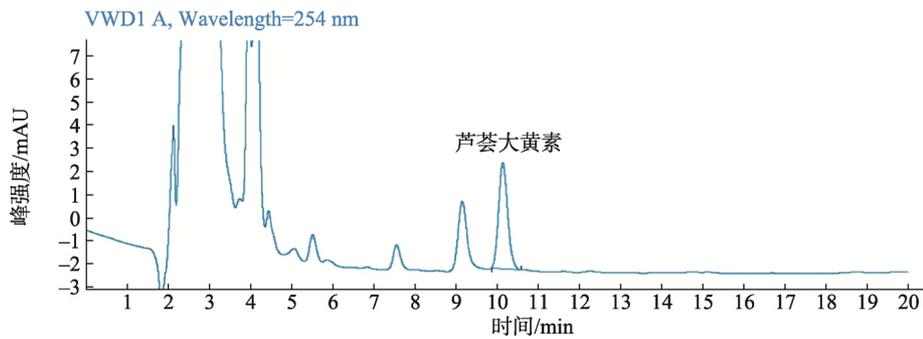


图6 70%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素(6~10 管)
Fig.6 70% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloesin (6-10 tubes)

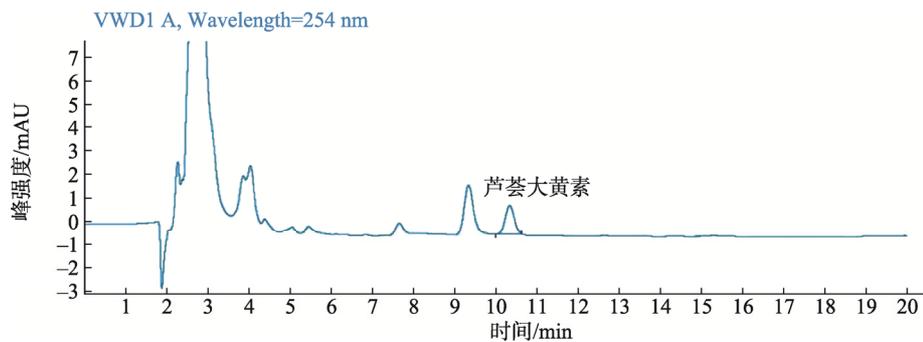


图7 70%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素(11~14 管)
Fig.7 70% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloesin (11-14 tubes)

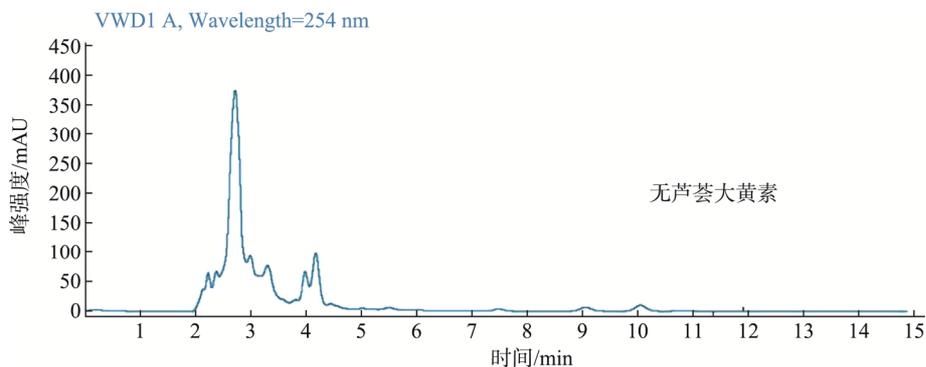


图 8 70%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素(15~18 管)
Fig.8 70% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloe emodin (15-18 tubes)

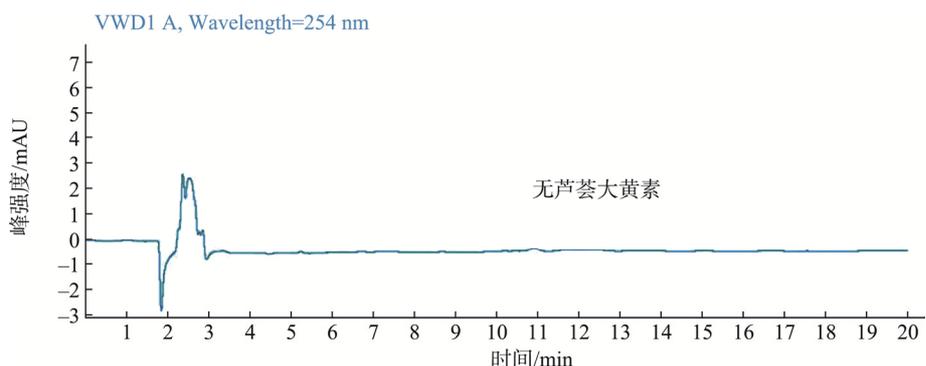


图 9 70%甲醇 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶洗脱芦荟大黄素(19~21 管)
Fig.9 70% methanol Sephadex LH-20 glucan gel elution aloe emodin (19-21 tubes)

3.4 样品含量测定

精密称取芦荟药材粉末 10 g, 按“2.3.2”项下进行供试品溶液制备操作, 按“2.3.3”项色谱条件下分析, 平行实验 3 次, 芦荟大黄素含量分别为 6.58 mg/g、6.43 mg/g、6.71 mg/g。

3.5 线性关系考察

精密吸取芦荟大黄素对照品溶液 1.0、3.0、4.0、5.0、7.0、8.0 mL, 依次用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为标准液。以芦荟大黄素平均峰面积为纵坐标(Y)、浓度为横坐标(X)进行线性回归, 方程为 $Y=41131X-44.34$ ($r^2=0.9993$), 结果表明芦荟大黄素在 12.28~122.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系。

3.6 精密度实验

精密称取芦荟药材粉末 10 g, 按“2.3.2”项下进行供试品溶液制备操作, 按“2.3.3”项色谱条件下分析, 连续进样 6 次后测定样品中芦荟大黄素的含量, 结果芦荟大黄素的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.96%。结果表明该方法精密度良好。

3.7 重复性实验

精密称取芦荟药材粉末 10 g, 共 6 份, 按“2.3.2”项制成供试品溶液, 按“2.3.3”项色谱条件进行分析, 测定每份

样品中芦荟大黄素的含量, 结果样品中芦荟大黄素平均含量为 6.35 mg/mL, 根据峰面积测定结果相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.67%, 表明芦荟大黄素重复性良好。

3.8 稳定性实验

精密称取芦荟粉末 10 g, 按“2.3.2”项制成供试品溶液, 再按“2.3.3”项色谱条件进行分析, 依次在 0、1、2、4、6、8 h 时, 测定样品中芦荟大黄素的含量, 芦荟大黄素含量峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.87%, 表明芦荟药材中芦荟大黄素在室温条件下可以稳定保存 8 h。

3.9 加样回收率实验

精密称取芦荟药材粉末 30 g, 取 1 份, 按“2.3.2”项制得供回收率用的供试品溶液, 按“2.3.3”项色谱条件进行分析, 见表 1, 结果得平均回收率为 100.04%, RSD%为 0.6506%, 说明该方法适合测定芦荟中的芦荟大黄素。

4 结论与讨论

芦荟大黄素的提取方法采用将提取后的芦荟浓缩液上 DM301 大孔树脂柱后再联合 Sephadex LH20 葡聚糖凝

胶进行初步分离纯化的方法,发现 DM301 大孔树脂有较好的分离效果,70%的甲醇洗脱效果最好。结果表明,DM301 大孔树脂联合 Sephadex LH20 葡聚糖凝胶分离纯化芦荟大黄素的效果良好,HPLC 测定含量方便,因此所用方法适用于芦荟药材中芦荟大黄素的分离纯化及含量测定,为芦荟药材的进一步开发和应用提供了理论支持。

表 1 加样回收率($n=6$)
Table 1 Sample adding recovery ($n=6$)

序号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.3684	0.37	0.7342	98.8648		
2	0.3643	0.37	0.7363	100.5405		
3	0.3629	0.37	0.7345	100.4324	100.0495	0.6506
4	0.3689	0.37	0.7385	99.8916		
5	0.3671	0.37	0.7393	100.5945		
6	0.3621	0.37	0.7320	99.9729		

参考文献

- 李牧, 杜智敏. 芦荟大黄素的药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(9): 765-768.
Li M, Du ZM. Research progress on pharmacological effects of aloe-emodin [J]. Chin J Clin Pharm, 2015, 31(9): 765-768.
- Chen R, Zhang J, Hu Y, et al. Potential antineoplastic effects of *Aloe-emodin*: A comprehensive review [J]. Am J Chin Med, 2014, 42(2): 275-288.
- Lin HD, Li KT, Duan QQ, et al. The effect of *Aloe emodon* induced photodynamic activity on the apoptosis of human gastric cancer cells: A pilot study [J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3431-3436.
- 肖丙秀, 郭俊明, 刘东海, 等. 芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长与细胞周期阻滞的关系[J]. 中草药, 2008, 39(5): 729-732.
Xiao BX, Guo JM, Liu DH, et al. Relationship between antiproliferation effects of aloe-emodin on growth of gastric cancer cells and cell cycle arrest [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2008, 39(5): 729-732.
- 张诚诚, 邵兵, 纪宏宇, 等. 芦荟大黄素抗肿瘤作用的药物传递系统研究进展[J]. 中国药师, 2018, 21(12): 124-127.
Zhang CC, Shao B, Ji HY, et al. Research progress in drug delivery systems of *Aloe-emodin* against tumor [J]. Chin Pharm, 2018, 21(12): 124-127.
- 廖蔚珍, 陈洪燕, 张丽萍. 高效液相色谱法测定肝胶囊中大黄素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(8): 479-480.
Liao WZ, Chen HY, Zhang LP. Content determination of emodin in *Hugan capsules* by HPLC [J]. Chin J Hospit Pharm, 2004, 24(8): 479-480.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
State Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 邵晶, 郭玫, 余晓晖, 等. 大黄中蒽醌的提取纯化工艺研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5864-5866.
Shao J, Guo M, Yu XH, et al. Research progress on the extraction and purification process of anthraquinone in rheum [J]. J Anhui Agric Sci, 2010, 38(11): 5864-5866.
- 叶殷殷, 曾元儿, 曹骋, 等. 大黄总蒽醌乙醇提取工艺优化实验[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2-4.
Ye YY, Zeng YE, Cao P, et al. The optimal design for alcohol extraction of the total anthraquinones in rheum [J]. Lishizhen Med Materia Med Res, 2010, 21(10): 2-4.
- 周春源, 旺建伟. 中药提取分离技术的研究进展[J]. 黑龙江中医药, 2016, 45(2): 68-69.
Zhou CY, Wang JW. Research progress of extraction and separation technology of traditional Chinese medicine [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2016, 45(2): 68-69.
- 姜欣欣, 李跃金, 陈维. 超临界 CO₂ 萃取技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 广东化工, 2015, 42(1): 53-54.
Jiang XX, Li YJ, Chen W. Research progress on supercritical CO₂ extraction technology of the traditional Chinese medicine ingredients [J]. Guangdong Chem Ind, 2015, 42(1): 53-54.
- 杨桂林, 袁叶飞. 中药有效成分提取分离方法的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(4): 434-436.
Yang GL, Yuan YF. Research progress on extraction and separation of effective components of traditional Chinese medicine [J]. J Southwest Med Univ, 2011, 34(4): 434-436.
- Zhang Y, Shufen LI, Xiwen WU, et al. Macroporous resin adsorption for purification of flavonoids in *hououyinia cordata thunb* [J]. Chin J Chem Eng, 2007, 15(6): 872-876.
- 黄玲艳, 黄宏轶, 汪元元, 等. 16 种常见可食花卉水提液的总多酚与总黄酮含量及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, (4): 311-314, 318.
Huang LY, Huang HY, Wang YY, et al. Total phenolic, flavonoid contents and antioxidant capacities of aqueous extract of 16 common edible flowers [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, (4): 311-314, 318.
- 林恋竹, 赵谋明. 反应时间对 DPPH 法、ABTS+法评价抗氧化性结果的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 63-67.
Lin LZ, Zhao MM. Effect of reaction time on DPPH and ABTS+ radical scavenging assays for antioxidant capacity evaluation [J]. Food Sci, 2010, 31(5): 63-67.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



张旭东, 本科, 主要研究方向为天然产物的活性成分分析。

E-mail: zhangxudong@126.com



王亮, 硕士, 实验师, 主要研究方向为天然产物活性成分分析。

E-mail: wagnliang8080@126.com