

芦荟苷 A、B 以及异芦荟色苷 D 的同时分离纯化

李 婷¹ 钟 英² 王 芝¹ 万金志^{1*}¹中山大学药学院药物分析实验室 广州 510006; ²中国农村技术开发中心 北京 100045

摘要:首次采用反相中压制备色谱从芦荟中一次分离制备得到芦荟苷 A、B 以及异芦荟色苷 D。以库拉索芦荟丙酮粗提物为原料,采用中压制备色谱系统:SCO 色谱柱(40 cm × 26 cm 30 ~ 50 μm) 流动相甲醇-0.5% 乙酸水(33:67, V/V) 流速 20 mL/min, 等度洗脱方式,柱温室温,检测波长 254 nm,收集波长 356 nm 对芦荟样品进行分离制备,得到三种化合物单体。经高效液相色谱、紫外、红外、质谱及核磁共振等方法分析表明所得到的三种化合物分别是异芦荟色苷 D、芦荟苷 A 和芦荟苷 B,其纯度分别达到了 98.0%、96.0% 和 98.9%。该方法简便,产品质量高,一次制备可以得到多种单体,为芦荟成分的测定与药理活性的研究提供了条件。

关键词: 芦荟苷 A、B; 异芦荟色苷 D; 中压制备色谱

中图分类号: 0685

文献标识码: A

Isolation and Purification Simultaneous of Aloins A and B and Isoaloeresin D

LI Ting¹ ZHONG Ying² WANG Zhi¹ WAN Jin-zhi^{1*}

¹Laboratory for Pharmaceutical Analysis and Quality Evaluation, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; ²China Rural Technology Development Center Beijing 100045, China

Abstract: A medium pressure preparative liquid chromatography (MPLC) was used to isolate the aloins A and B and isoaloeresin D from *Aloe vera* simultaneously for the first time. The crude material extracted by acetone, was performed with ODS column (40 cm × 26 cm 30-50 μm) by using isocratic elution with methanol-0.5% acetic water (33:67 v/v) as the mobile phase at a flow rate of 20 mL/min. The detecting and collecting wavelengths were set at 254 nm and 356 nm respectively and the column temperature was room temperature. Three compounds were identified as aloins A and B and isoaloeresin D by using UV, IR, MS and NMR, and their purities were 98.0%, 96.0% and 98.9%, respectively. The method was convenient and active constituents with high purity could be obtained simultaneously, which provided conditions to investigate the constituents and their activities of *Aloe vera*.

Key words: Aloins A and B; isoaloeresin D; medium pressure preparative liquid chromatography (MPLC)

芦荟为百合科(Liliaceae)芦荟属(*Aloe* L.)多年生常绿肉质植物。芦荟苷、异芦荟色苷 D 是芦荟的主要药效成分^[1]。其中,异芦荟色苷 D 具有特别的抗炎、抗氧化作用,已引起医药领域的高度关注,成为研究开发的热点。同时,在芦荟成分分析的研究中我们发现芦荟药材、芦荟叶提取物、芦荟产品中的芦荟苷都是以光学异构体芦荟苷 A 和 B 的混合体存在,两者的区别在于分子中 C-10 位的构型不同,芦荟苷 A 为 R 型,芦荟苷 B 为 S 型。在溶液状态下,芦荟苷 A 和 B 之间可以相互转化,以往评价芦荟制品的质量多以芦荟苷 A 和 B 混合物的含量作

为指标。两者的生物活性与毒性是否相同未见研究报道,因此有必要对其进行分离纯化,对它们的生

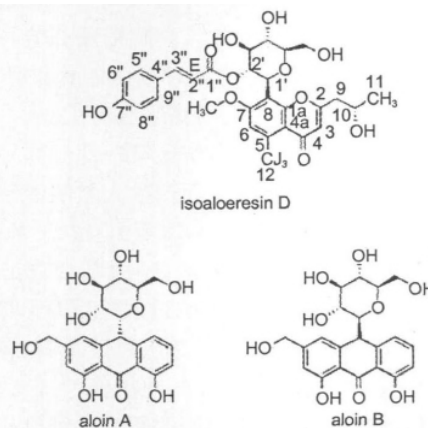


图 1 异芦荟色苷 D 以及芦荟苷 A 和 B 的化学结构
Fig. 1 Structures of isoaloeresin D and aloins A and B

收稿日期: 2010-11-10

接受日期: 2011-06-22

基金项目: 2005 年度广东省中医药管理局计划项目(1050163);
2005 年度珠海市科技计划项目(PC20051072)

* 通讯作者 Tel: 86-013326660067; E-mail: jinzhiwan2004@yahoo.com.cn

物活性与毒性分别进行研究,在对芦荟制品中芦荟苷的含量测定时,也应考虑单独测定以保证产品的有效性与安全性。

国内外关于芦荟苷的研究多涉及提取方法与含量测定^[3-6],对于芦荟苷 A 和 B 的分离制备报道不多^[7,8],且均需结合柱层析分离,操作繁琐,实验耗时长,效率不高。关于异芦荟色苷 D 的研究报道也较少^[2]。本实验采用中压制备液相色谱从芦荟中一次分离制备得到异芦荟色苷 D、芦荟苷 A 和芦荟苷 B 三种高纯度化合物,分离操作简单,产物纯度高,制备量比较大,通过该方法可以制备得到足够量的三种单体化合物,供药理、毒理研究以及分析测定对照品用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

EZ Purifier III 快速中压制备系统(上海利穗化工科技有限公司),PC 软件工作站。Waters1525 高效液相色谱仪,Waters717 型自动进样器,2996 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站(美国 waters 公司)。TSQ 型三重四极杆液相色谱-串联质谱联用仪(美国 San Jose 公司),Finnigan Surveyor MS 泵,Finnigan Surveyor 自动进样器,Xcalibur 1.3 工作站,LC Quan 数据处理软件(美国 Thermo Finnigan 公司)。TENSOR37 红外光谱仪(德国 Bruker 公司)。Bruker Avance III 400 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。LCMS-IT-TOF 高分辨质谱仪(日本岛津公司)。SY-1000E 多用途恒温超声提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司),DZF-6051 SH 型真空干燥箱(益恒实验仪器有限公司),CHRIST ALPHA 1-4LSC(德国马丁·克莱斯特冷冻干燥设备有限公司),AL204 型电子天平(瑞士 Metter Toledo 公司),Dragon-med 移液枪(Toppette 公司),RE-3000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 材料

芦荟苷 A 对照品(中国药品生物制品检定所,110787-200504),甲醇(色谱纯,TEDIA 公司),甲醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司),丙酮(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司),乙酸(分析纯,广州化学试剂厂),超纯水(PureLab Ultra 超纯水系统,英国 ELGA 公司)。芦荟药材粉末,云南元江万绿生物有限公司。

2 试验方法

2.1 实验方法

2.1.1 色谱条件

制备色谱条件:SCO 柱(40 cm × 26 cm),自填充 ODS-AQ30 ~ 50 μm 填料;流动相:甲醇-0.5% 乙酸水(体积比为 33:67);流速:20 mL/min;柱温为 25 °C;检测波长:254 nm;收集波长:356 nm;进样体积:1.2 mL

分析色谱条件:Nucleodur C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相:A:0.5% 乙酸水溶液,B:甲醇;洗脱程序(0 ~ 20 min:60% A - 33% A,40% B - 67% B;20 ~ 22 min,33% A - 60% A,67% B - 40% B);流速:1 mL/min;柱温为 25 °C,DAD 扫描波长范围为 190 ~ 370 nm,紫外检测波长为 254 nm 和 356 nm,进样量为 10 μL。

2.1.2 分离样品的制备

称取 25.0 g 芦荟药材粉末,置于 1000 mL 烧杯中,加入 500 mL 丙酮,搅匀,超声 30 min 后离心,收集上层清液,于旋转蒸发仪 60 °C 回收溶剂,所得浸膏于真空干燥箱 60 °C 减压干燥,得到棕黄色有光泽的芦荟粗提物粉末,密封保存于 10 °C 以下,备用。

2.1.3 分析样品的制备

取上述芦荟粗提物粉末 0.511 g,用适量 75% 甲醇超声溶解,配制成 200 mg/mL 的溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,样品供分析用。

2.1.4 样品分析

取 2.1.3 项下的样品溶液适量,用甲醇稀释 20 倍后进行分析。芦荟粗提物的分析结果^[2]见图 2,其中成分 1 ~ 3 分别为异芦荟色苷 D(isoaloesin D)、芦荟苷 B(aloin B)和芦荟苷 A(aloin A)。

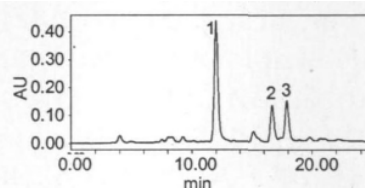


图 2 芦荟粗提物 HPLC 分析图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of the crude extract of aloe

2.1.5 样品分离纯化

取 2.1.3 项下的芦荟样品溶液,按 2.1.1 项下的中压制备色谱条件进行分离纯化,进样 1.2 mL,根据收集波长记录曲线分别精确收集异芦荟色苷

D、芦荟苷 A 和芦荟苷 B 所在部分的洗脱液,用旋转蒸发仪回收甲醇后,减压干燥得到异芦荟色苷 D 的黄色固体粉末,经冷冻干燥分别得到芦荟苷 A 和芦荟苷 B 的淡黄色疏松粉末。图 3 为异芦荟色苷 D、芦荟苷 A 和芦荟苷 B 的制备色谱图,提取纯化率分别为 85.8%、30.3% 和 32.7%。

3 结果与讨论

3.1 纯度检查

分别取 2.1.5 项下分离纯化得到的异芦荟色苷 D、芦荟苷 A 和芦荟苷 B 粉末适量,用甲醇溶解,0.45 μm 的微孔滤膜过滤,用分析型高效液相色谱仪

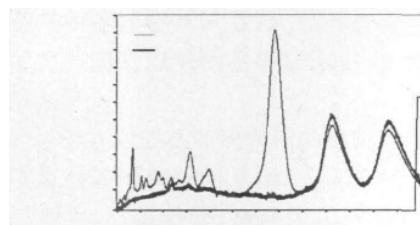


图 3 样品的制备色谱图

Fig. 3 MPLC chromatogram of the sample

分析,按峰面积按归一化法计算出异芦荟色苷 D、芦荟苷 A、芦荟苷 B 的纯度分别为:98.0%、96.0% 和 98.9%。图 4 为制备获得的三种组分的 HPLC 纯度分析图。

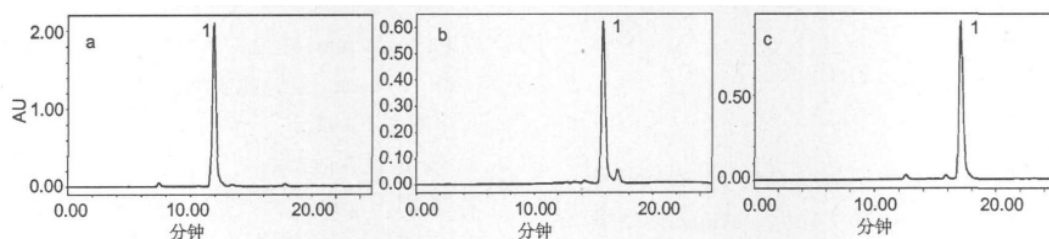


图 4 化合物 1~3 的 HPLC 纯度分析图

Fig. 4 HPLC chromatograms of compounds 1-3 (a-c)

3.2 结构鉴定

经 UV、IR、MS、NMR 等光谱鉴定,确定化合物 1、2 和 3 分别为异芦荟色苷 D、芦荟苷 B、芦荟苷 A。

化合物 1 为黄色固体,UV (MeOH) λ_{max} : 229.1, 299.9 nm; IR (KBr) ν_{max} : 3446, 1649, 1602, 1514, 1383 cm^{-1} ; HR-MS m/z : 555.1891 [$\text{M} - \text{H}$] $^{-}$; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.04 (1H, s, H-3), 6.79 (1H, s, H-6), 3.88 (3H, s, 7-OCH₃), 2.76 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-9), 4.25 (1H, m, H-10), 1.35 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-11), 2.72 (3H, s, H-12), 4.98 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1'), 5.58 (1H, t, $J = 9.9$ Hz, H-2'), 3.47 (1H, m, H-5'), 3.78 (2H, m, H-6'), 6.11 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2''), 7.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3''), 7.51 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5'', H-9''), 6.75 (2H, $J = 8.6$ Hz, H-6'', H-8''); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 167.4 (s, C-2), 112.5 (d, C-3), 182.3 (s, C-4), 116.8 (s, C-4a), 144.6 (s, C-5), 112.6 (s, C-6), 162.0 (s, C-7), 111.8 (s, C-8), 159.6 (s, C-1a), 44.6 (t, C-9), 66.0 (d, C-10), 23.7 (q, C-11), 23.6 (q, C-12), 57.1 (q, 7-OCH₃), 72.3 (d, C-1'), 83.0 (d, C-2'), 77.9 (d, C-3'), 72.8 (d, C-4'),

73.8 (d, C-5'), 63.1 (t, C-6'), 168.0 (s, C-1''), 114.7 (d, C-2''), 146.6 (d, C-3''), 127.0 (s, C-4''), 131.1 (d, C-5'', C-9''), 117.2 (d, C-6'', C-8''), 161.3 (s, C-7''). 以上数据与文献^[9]报道的异芦荟色苷 D 一致。

化合物 3 色谱保留时间与芦荟苷 A 对照品一致;紫外光谱一致;改变色谱流动相极性后,色谱保留时间仍然与芦荟苷 A 对照品一致;经 LC-MS/MS 分析两者分子离子峰 m/z 均为 417 [$\text{M} - \text{H}$] $^{-}$, 碎片离子相同;红外光谱与对照品一致,故可以确定化合物 3 是芦荟苷 A。

化合物 2 紫外光谱与化合物 3 相同;LC-MS/MS 分析分子离子峰 m/z 为 417 [$\text{M} - \text{H}$] $^{-}$, 二级质谱图与 3 完全相同,结合样品的来源和处理方法的一致,红外光谱与对照品一致,可以确定 2 为芦荟苷 B。

3.3 讨论

制备色谱条件可以由高效液相色谱分析条件线性放大并优化而得到。但不同于分析色谱,制备色谱要求在达到一定分离度的前提下尽可能获得较多的产品,因此制备色谱不是分析色谱的简单放大,放大过程通常要考虑色谱柱尺寸、填料、流量、操作压

力、进量、产品纯度、回收率以及色谱分离效果等因素^[10]。利用线性放大技术,考虑从以下几方面对制备条件进行优化:

3.3.1 填料粒径及柱尺寸

相关研究^[11]表明在中压制备液相色谱中,填料粒径直接影响着柱效、负荷能力及压力。使用小颗粒填料,可以获得较高的柱效。故本实验采用粒径 30~50 μm 的 C₁₈ 硅胶填料,芦荟苷 A 和 B 可以获得较理想的分离。增加柱长,可以明显的提高分离度,故采用 40 cm 柱长。

3.3.2 洗脱梯度

由于样品中三个目标组分所占的比例较大,在分析型高效液相色谱条件的基础上,利用反相色谱方法制备时,分别采用 26%、28%、30%、33% 甲醇水溶液(含 0.5% 乙酸)的溶剂系统等度洗脱,发现出峰时间和分离总时间变化不大,约为 4 h,当选用 33% 甲醇-0.5% 乙酸水溶液洗脱时,难分离的芦荟苷 A 和 B 基本可实现基线分离(见图 3),分离效果最好,因此最终选择该条件等度洗脱。

3.3.3 进样量及流速

流速过大会使各组分分离度下降,流速过低则使样品出峰时间推迟、峰变宽,为缩短分离时间并保持良好的分离度,将流速定为 20 mL/min。文献^[12]表明,在分离度满足要求的前提下,制备型 HPLC 中可以采用小的进样体积但增加样品浓度(质量超载^[13])或保持较小的样品浓度但增加进样体积(体积超载)两种操作方式,提高制备量。本实验中,逐步增加样品上柱量 100、200、240 mg 直至 300 mg,分别考察了进样体积 2、1.5 mL 和 1.2 mL 时的分离效果,结果表明进样体积增大,色谱峰的分度下降,在进样体积为 1.2 mL 时目标组分峰之间有良好分离。因此本实验选择控制进样量,增加样品浓度的方法获得较大的制备量,最终的条件是进样体积 1.2 mL,进样量 240 mg。

3.3.4 样品溶解条件

选择的溶剂应该对样品的溶解度高,不影响分离效果,容易处理。本文比较了丙酮、乙醇、甲醇及 75% 甲醇溶液,其中经 75% 甲醇溶液溶解的样品在制备柱上的洗脱色带最均匀,对样品的分离效果最好。故实验采用 75% 甲醇溶液溶解样品,合适的浓度为 200 mg/mL。

3.3.5 样品回收

羟基蒽醌类的芦荟苷稳定性差,相关研究表明,

芦荟苷 A 和 B 在一定条件下可以相互转化,在乙醇、甲醇、水中稳定性依次递减^[14]。对光、热、氧均不稳定,不宜加热处理,应注意低温避光保存,相对稳定的环境为:温度 4 °C,避光(固态)以及 pH = 1 的酸性环境(液态)^[15]。因此将收集的流分先用旋转蒸发仪 30 °C 条件下除去甲醇,再经冷冻干燥除去水分,得到淡黄色疏松粉末。

4 结论

芦荟苷 A 和 B 一般在正相高效制备色谱中都较难实现基线分离,且芦荟苷 B 不稳定,目前市场上也只见芦荟苷 A 的对照品,未见芦荟苷 B 的对照品出售。已有的方法多采用硅胶柱层析与制备液相色谱相结合,需反复操作,长时间的分离过程中,芦荟苷 A、B 会发生转化,使分离效力大大降低,不利于工业化生产。而本文采用中压制备系统通过调整色谱条件,一次性分离出芦荟中三个目标成分,具有简便快捷、自动化程度高、效率高等优点,所得的高纯度产品可作为分析测定的对照品和供医药学研究使用,也为工业化的生产奠定了基础。

参考文献

- 1 Chen GH(陈国和),Liu YX(刘玉鑫),Zhang XS(张新申) *et al.* Chemical components of aloe and their separation and measurements. *Chem Res App* (化学研究与应用), 2002, 14: 133.
- 2 Preparative isolation and purification of isoaloeresin D and aloin from *Aloe vera* by high-speed counter-current chromatography. *China Herb Med* 2010 2: 148-152.
- 3 Hou DY(侯冬岩),Hui RH(回瑞华),Wu S(吴师) *et al.* Determination of aloin by HPLC and the antioxidation effect of flowers of aloe. *J Zhejiang Univ*(浙江大学学报), 2004, 31: 438-441.
- 4 Bao GR(包国荣),Chen D(陈丹),Huang SQ(黄声强) *et al.* Research on determination method of aloin. *Chin J Pharm Anal*, 1997, 17: 338-339.
- 5 Chen H(陈惠),Jiang XM(姜秀梅),Wang QF(王巧峰) *et al.* Determination of aloin in aloe barbadensis by HPLC. *J Fourth Mil Med Univ*(第四军医大学学报) 2005 26: 1070-1072.
- 6 Li JM(李静梅),Wu Y(吴颖). Determination of aloin in aloe or the products of aloe by HPLC. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技) 2003 24: 76-77.

(下转第 945 页)

min、温度 58 ℃、功率 300 W、液料比 14:1 (mL: g)、提取 2 次。

黑莓果渣提取物对应花色苷含量与清除 DPPH·活性之间呈正的直线相关,由此可以初步推断黑莓果渣中花色苷为其主要清除自由基活性物质。

参考文献

- 1 Wu WL(吴文龙),Gu Y(顾烟). Blackberry introduction and cultivation. *J Plant Resour Environ*(植物资源与环境学报),1994,3:45-48.
- 2 Wu WL(吴文龙),Li WL(李维林),Lv LF(闫连飞),et al. Comparison of nutrient constituents in fresh fruit of different cultivars of blackberry. *J Plant Resour Environ*(植物资源与环境学报) 2007,16:58-61.
- 3 Qian H(钱骅),Zhang WM(张卫明),Zhao BT(赵伯涛),et al. Study on processing technology of fruit and vegetable beverage of blackberry. *Food Sci Technol*(食品科技) 2006,9:186-189.
- 4 Zhao HF(赵慧芳),Wang XM(王小敏),Lv L(闫连),et al. Study on the extraction and assay method of anthocyanin in blackberry fruits. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2008,29:176-179.
- 5 Shi Y(石岳),Zhang XL(张秀玲),Zou Y(邹阳). Response surface methodology & its application in food industry. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2007,12:56-57.
- 6 Kalaimahan T, Tapabrata P. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethyl-cellulase from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb Technol*,1995,17:1043-1049.
- 7 Ingrid E, Chun H, David GP, et al. Antioxidant assessment of an anthocyanin enriched blackberry extract. *Food Chem*, 2007,101:1052-1058.
- 8 Subramani S, Casimir CA, Gerard K. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem* 2002,50:2432-2438.
- 9 Chen XX(陈欣欣),Xu SY(许时婴). Extraction of anthocyanins and polyphenols from blackberry juice-processing waste. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2006,26:135-139.
- 10 Ma QY(马庆一),Xu SY(许时婴),Xiong WD(熊卫东),et al. Study on the free radical scavenging active components in sweet potato stems. *Food Sci*(食品科学),2003,24:145-148.
- 11 He L(何玲),Tang AJ(唐爱均),Hong F(洪峰). Study on the property of red grape red pigment. *J Northwest Sci-tech Univ Agric For, Nat Sci*(西北农林科技大学学报,自科版) 2005,33:73-76.
- 7 Huang DF(黄丹凤),Cao XL(曹学丽),Zhao H(赵华). Preparative separation of aloin diastereoisomers by high-speed countercurrent chromatography combined with silica gel column chromatography. *Chin J Chromatogr*(色谱),2006,24:42-45.
- 8 Wu W(吴炜),Sun PD(孙培东),Wang JX(王建新). Isolation of barbaloin and isobarbaloin by semi-preparative HPLC. *Chin J Spectr Lab*(光谱实验室) 2008,25:951-954.
- 9 Okamura N, Hine N, Harada S, et al. Three chromone components from *Aloe vera* leaves. *Phytochemistry*,1996,43:495-498.
- 10 Cheng XW(程小卫),He ML(何美莲). Linear magnifying technology in high preparative performance liquid chromatography. *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志) 2005,20:332-333.
- 11 Wang ZX(王志祥),Zhang ZB(张志炳),He ZM(何志敏),et al. Study on scale up of preparative high performance liquid chromatography separation process (I) packing size. *Chem Ind Times*(化工时刊) 2001,15:28-31.
- 12 Guiochon G, Katti A. Preparative liquid chromatography. *Chromatographia*,1987,24:165-189.
- 13 Wang ZX(王志祥),He ZM(何志敏),Yu GZ(于国忠). Mass overload of high preparative performance liquid chromatography. *J Chem Eng Chin Univ*(高校化学工程学报),1997,11:83-87.
- 14 Wang P(王普),Chen B(陈波),Yao SZ(姚守拙). Comparison in different solvents on the stability of aloin at the same temperature. Collections of the 4th Cross-Strait Academic Conference of Analytical Chemistry Proceedings(第四届海峡两岸分析化学学术会议论文集) 2006.
- 15 Yue YP(岳银屏),Wu Q(吴强),Xin X(邢旭). Study on the stability of aloin. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技) 2006,27:86-95.

(上接第 881 页)