

山茱萸中马钱苷在乙腈水体系的分配行为

Distribution behavior of loganin in cornus officinalis in acetonitrile water system

谭鹏程 夏志勇 张斌贝 殷俊 周湘江 曾星星*

Tan Pengcheng, Xia Zhiyong, Zhang Binbei, Yin Jun, Zhou Xiangjiang, Zeng Xingxing*

(长沙医学院 410219 长沙医学院药学院湖南省新型药物制剂研发重点实验室 410000 一流应用学科药学 410000)

(Changsha Medical College 410219; Hunan Provincial Key Laboratory of New Drug Formulation Research and Development, School of Pharmacy,

Changsha Medical College, 410000; First class applied discipline pharmacy, 410000)

摘要: 对山茱萸的乙腈/水提取液中的马钱苷在诱导相分离后在两相中的分配行为进行了研究,建立了乙腈/水分相体系分离纯化马钱苷的新方法。重点对能使乙腈/水体系分相的诱导剂的种类进行研究,也分析了诱导剂的组成比例以及用量、乙腈与水的比例和温度对马钱苷分配行为的影响。在温度为 30℃ 时,山茱萸的乙腈/水(体积比 1:1)提取液中加入 NaCl 与 MgSO₄ 组成的混盐(质量比 1:1)分相诱导剂后,马钱苷的萃取率达到 92.34%。

Abstract: The distribution behavior of loganin in the acetonitrile/water extract of *Cornus officinalis* was studied after induced phase separation in the two phases, and a new method for separating and purifying loganin in the acetonitrile/water phase system was established. The focus was on studying the types of inducers that can separate the acetonitrile/water system, and the effects of the composition and dosage of inducers, the ratio of acetonitrile to water, and temperature on the distribution behavior of loganin were also analyzed. At a temperature of 30 °C, the extraction rate of loganin reached 92.34% when a mixed salt of NaCl and MgSO₄ (mass ratio 1:1) was added to the acetonitrile/water (volume ratio 1:1) extraction solution of *Cornus officinalis*.

关键词: 诱导相分离; 马钱苷; 乙腈水提取液; 山茱萸; 分离纯化

Keywords: Induced phase separation; Loganin; Acetonitrile water extract; *Cornus officinalis*; Separation and purification

糖尿病已成为现代社会的高发疾病。糖尿病的可能病因较多^{错误!未找到引用源。},治疗也比较麻烦。预防和治疗^{错误!未找到引用源。}。在医药和食品两个领域迫在眉睫。山茱萸是一种中药^{错误!未找到引用源。},具有滋补强精的作用,在《本草纲目》等典籍^{错误!未找到引用源。}中有明确记载。现代研究表明,山茱萸具有预防糖尿病、增强免疫力、延缓衰老的作用^{错误!未找到引用源。}。可用于腰膝压痛、尿频、体虚、盗汗等^{错误!未找到引用源。}的临床治疗。山茱萸在原产地有着悠久的直接服用^{错误!未找到引用源。}历史,其深加工产品也在不断发展^{错误!未找到引用源。}。环醚萜是山茱萸的特征成分^{错误!未找到引用源。},而马钱苷是山茱萸的重要活性成分^{错误!未找到引用源。},是一种萜类化合物,主要以苷的形式存在,因含有极性官能团而溶于水和甲醇,主要存在于果肉、细胞核中,也在 2020 版中国药典的质量控制指标^{错误!未找到引用源。}中。马钱苷具有增强免疫力、防治心血管疾病、抗炎、镇静催眠等作用,并具有提高抵抗力、防治心血管疾病、镇静镇静等作用^{错误!未找到引用源。}。

近年来,一种高效的分离提纯方法得到了快速发展,如诱导相萃取中的双水相体系。其主要应用有蒸发诱导相分离对聚酰胺膜结构及性能的调控^{错误!未找到引用源。}、雾化辅助非溶剂诱导相分离法制备聚丙烯酰胺^{错误!未找到引用源。}、YCl₃ 诱导牛血清白蛋白液相分离的研究^{错误!未找到引用源。}、雾化辅助非溶剂诱导相分离法制备聚合物膜及其应用研究^{错误!未找到引用源。}、环氧树脂基反应诱导相分离材料的研究进展^{错误!未找到引用源。}、聚乙烯醇缩丁醛的甲苯-乙醇溶液及其非溶剂诱导相分离研究^{错误!未找到引用源。}等。

本文研究了以有机溶剂和无机盐为诱导剂,对乙腈/水系相效率的影响进行了探讨,在乙腈/水系统中,筛选出了适用于马钱苷分相的诱导剂,建立了马钱苷在乙腈/水体系中分离纯化的新方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

表 1-1 实验仪器

Table 1-1 Experimental Instruments

型号	仪器名称	厂家
P1202 型	HPLC 高效液相色谱仪	大连依利特
AS 系列	超声波清洗机	天津奥特塞恩斯仪器有限公司
C30 型	玻璃仪器气流烘干器	巩义市英砢予华仪器厂

AL204101 型	梅特勒电子天平	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
MX-S	漩涡混匀仪	上海菁华科技仪器有限公司
3-5N 型	医用离心机	长沙恒诺仪器设备有限公司
KQ-3000DB 型	超声波清洗器	巩义市予华仪器有限责任公司
KQ-300E 型	超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司

1.2 实验材料

山茱萸干熟果实(湖南桃园产,湖南高桥药材大市场购)粉碎,孔径 250 μm 筛选,马钱苷的标准品(批号:BZP0317,合肥博美生物科技有限公司)色谱纯。

表 1-2 实验试剂

Table 1-2 Experimental Reagents

试剂名称	纯度级别	厂家
乙腈	色谱纯	天津大茂化学试剂厂
乙腈	色谱纯	安徽天地高纯溶剂有限公司
甲醇	色谱纯	安徽天地高纯溶剂有限公司
甲醇	色谱纯	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
磷酸	分析纯	天津化学有限公司
甲酸	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
正丁醇	分析纯	江苏强盛功能化学股份有限公司
碳酸氢钠	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
二氯甲烷	分析纯	天津市恒兴化学试剂制造有限公司
碳酸钠	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
磷酸一氢钾	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
硫酸镁	分析纯	天津市恒兴化学试剂制造有限公司
硫酸钾	分析纯	天津市恒兴化学试剂制造有限公司
溴化钾	分析纯	上海麦克林生化科技有限公司
硫酸铵	分析纯	天津化学试剂有限公司
氯化钠	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司

试剂名称	纯度级别	厂家
氯化钾	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
氯化镁	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
无菌注射器	~	江阴市医疗器械有限公司
0.45um 注射器过滤器	~	杭州特种纸业股份有限公司

2.实验方法结果

2.1 标准溶液的配制

在 25 ml 容量瓶中精确称得上马钱苷对照品 10 mg, 加入甲醇, 稀释到刻度, 摇动, 得到 400 mg/L 质量浓度的对照品贮剂。

2.2 样品溶液的制备

在 50ml 锥形瓶中加入 0.5g 山茱萸果实粉末, 并超声 30min 进行提取, 过滤至 50ml 锥形瓶中, 加入乙腈/水(体积比 1 : 1)溶液成刻度, 摇匀提取, 冷藏备用。

2.3 诱导相分离萃取过程

将 0.3 毫升的有机溶液或 0.3 克的无机盐添加到 3 毫升的提取液中。在混合后, 用 10000 r/分钟离心 10 分钟, 获得上相和下相。上部相是有机相, 下部相是水相, 分别读取上部和下部相的体积, 上部和下部相溶液穿过 0.45 μ. m 的滤膜, 在将滤液稀释 5 倍之后, 进行液相色谱分析。

相关计算公式如下:

$$R = V_b/V_t; K = \rho_b/\rho_t; Y = V_b \rho_b / (V_b \rho_b + V_t \rho_t) \times 100\%$$

式中, R 为相比, K 为分配系数, V_t 是上相体积(mL), V_b 是下相的体积(mL); ρ_t 为上相马钱苷质量浓度(mg/L), ρ_b 为下相马钱苷质量浓度(mg/L); Y 为马钱苷萃取率。

2.4 色谱条件选择

使用文献报道的山茱萸 HPLC 指纹图谱法, 色谱柱为 Sino Chrome ODS-BP 柱(4.6mm × 250mm, 5 μ. m), 以 0.1%甲酸溶液和乙腈为流动相, 梯度洗脱检测波长 260nm, 柱温 30℃, 流速 1mL/min, 进样量 10 μ. l。

表 2-4 梯度洗脱表

Table 2-4 Gradient elution table

Time (min)	A(%)	B(%)
0~15	98→96	2→4
15~50	96→84	4→16
50~57	84→82	16→18
57~67	82→75	18→25
67~87	75→10	25→90
87~95	10	90

3.结果与讨论

3.1 诱导剂的选择

考察有机溶剂、无机盐等因素对乙腈/水分离效果的影响。所用的无机盐及有机溶剂对马钱子苷分配行为的影响结果如表 1。在常温下, 按照 2.1.4 方法, 在提取液中添加诱导剂, 并分相之后, 展开液相色谱分析, 对相关参数进行计算, 列于表 3-1。

表 3-1 诱导剂种类对马钱苷分配行为的影响

Table 3-1 Effects of inducer types on the distribution behavior of loganin

诱导剂类型	相分离	分相情况	R	K	Y/%
二氯甲烷	是	上相: 1.1ml 下相: 1.9ml	1.727	5.085	89.78
MgSO ₄	是	上相: 2.2ml 下相: 0.8ml	0.364	0.189	6.4
Na ₂ CO ₃	是	上相: 1.8ml 下相: 1.2ml	0.666	~	~
(NH ₄) ₂ SO ₄	是	上相 2.4ml 下相: 0.60ml	0.250	0.669	14.3
NaCl	是	上相: 1.0ml 下相: 2.0ml	2.000	0.234	31.9
KCl	是	上相: 0.9ml 下相: 2.1ml	2.333	0.829	65.9

MgCl ₂	是	上相: 0.8 下相: 2.2ml	2.750	0.906	71.0
-------------------	---	-------------------	-------	-------	------

从表 3-1 可见, 能诱导分相并获得较高萃取率的是二氯甲烷、氯化钾、氯化镁、以及较低的氯化钠。从萃取率的角度考虑, 二氯甲烷、硫酸镁、氯化钠和硫酸铵均是促进山茱萸提取液分相的良好诱导剂且硫酸镁、硫酸铵的分相情况较好, 但是从选择性看, 氯化钠诱导剂分离效果较好而在上相中的浓度较高与硫酸镁、硫酸铵做混盐, 能更好的使上相中高浓度的马钱苷进入水相中, 从而提高萃取率。因此, 在考虑萃取率又考虑分离的选择性时, 可从高选择性的氯化钠与高萃取率的二氯甲烷、硫酸镁、硫酸铵的混合物组成的分相诱导剂中筛选。

3.2 诱导剂组成的选择

将 3.1 确定的几种分相情况好的诱导剂氯化钠以及硫酸镁和硫酸铵以不同的比例混合后, 加入乙腈/水(体积比 1:1)3ml 山茱萸提取物, 按 2.1.4 计算。结果如表 3-2 所示。

表 3-2 诱导剂的组成对马钱苷分配行为的影响

Table 3-2 Effects of inducer composition on the distribution behavior of loganin

诱导剂组成	分相情况	R	K	Y/%
0.1g 氯化钠+0.2g 硫酸铵	上相: 1.2ml 下相 1.8ml	1.5001	9.9374	7.93
0.15g 氯化钠+0.15g 硫酸铵	上相: 1.15ml 下相 1.85ml	1.6091	9.6275	9.94
0.2g 氯化钠+0.1g 硫酸铵	上相: 1.11ml 下相: 1.89ml	1.7032	9.0683	31.31
0.1g 氯化钠+0.2g 硫酸镁	上相: 1.15ml 下相: 1.85ml	1.6092	3.8679	3.33
0.15g 氯化钠+0.15g 硫酸镁	上相: 1.05ml 下相 1.95ml	1.8572	7.0783	4.00
0.2g 氯化钠+0.1g 硫酸镁	上相: 1.10ml 下相: 1.90ml	1.7272	5.0581	2.23
300 μ. L 二氯甲烷+0.1g 氯化钠	上相: 1.15ml 下相: 2.15ml	1.8691	7.0076	0.70

由表 3-2 可得出诱导剂组成中 0.15g 氯化钠与 0.15g 硫酸镁构成的混盐所获得的萃取率是在表格中最高的。

3.3 提取液中乙腈与水体积比对分配行为的影响

取乙腈与水不同体积比的山茱萸提取物 3ml, 分别加入质量比为 1:1 的氯化钠和硫酸镁混合盐 0.3g, 按 2.1.4 计算相分离。结果如表 3-3 所示。

表 3-3 乙腈与水的体积比对马钱苷分配行为的影响

Table 3-3 Effect of volume ratio of acetonitrile to water on the distribution behavior of loganin

V(乙腈) : V(水)	分离情况	R	K	Y/%
3:7	不分离	无	无	无
2:3	不分离	无	无	无
1:1	上相: 1.05ml 下相 1.95ml	1.857	2.707	83.40
3:2	上相: 1.75ml 下相 1.25ml	0.714	2.748	66.25
7:3	上相: 2.18ml 下相 0.92ml	0.422	3.876	62.06

由表 3-3 可见, 在乙腈水容积比为 1 : 1 的情况下, 因其具有较大的 R 比值而使提取效果最好, 因此, 选择了体系为 1 : 1 的比值。

3.4 混盐加入量对马钱苷分配的影响

固定提取液中乙腈与水的体积比 1 : 1, 在每 3mL 的提取液中分别加入质量比 1 : 1 的氯化钠和硫酸镁的混合盐 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5g, 进行分相, 根据 2.1.4 节进行相分离计算, 结果如表 3-4 所示。

表 3-4 混盐加入量对马钱苷分配的影响

Table 3-4 Effect of mixed salt addition on the distribution of loganin

混盐加入量	分离情况	R	K	Y/%
0.1	上相:1.3ml 下相: 1.7ml	1.308	4.285	84.86
0.2	上相:1.2ml 下相: 1.8ml	1.500	5.276	88.78
0.3	上相 1.05ml 下相 1.95ml	1.857	2.707	83.40
0.4	上相:1.2ml 下相: 1.8ml	1.500	4.929	88.08
0.5	上相:1.2ml 下相: 1.8ml	1.500	5.806	89.70

由表 3-4 可见当混盐用量为 0.5g 时, 萃取率最大且无盐沉淀, 每 3ml 乙腈/水(体积比 1:1)萃取液中加入 0.5g 混合盐作为相诱导剂。

3.5 温度对马钱苷分配的影响

在固定提取液中乙腈与水的体积比为 1 : 1, 在每 3 mL 提取液中, 添加质量比为 1 : 1 的氯化钠和硫酸镁的混盐 0.5 g, 将其放入不同的温度水浴中, 加热 30 min, 按照 2.1.4 节的方法, 进行分相与计算。计算相关参数, 结果如表 3-5 所示。

表 3-5 温度对马钱苷分配的影响

Table 3-5 Effect of temperature on the distribution of loganin

温度	分离情况	R	K	Y/%
20	上相: 1.2ml 下相: 1.8ml	1.500	9.316	90.30
30	上相: 1.2ml 下相: 1.8ml	1.500	12.054	92.34
40	上相: 1.3ml 下相: 1.7ml	1.308	7.549	88.30
50	上相: 1.4ml 下相: 1.6ml	1.143	7.545	88.29

由表 3-5 可见 30℃时萃取率达到最大值, 随着温度升高萃取率降低, 故选择 30℃水浴中加热 30min 来对样品加入量对马钱苷分配的影响。在以上确定的最佳条件下, 将 0.5 茛菪粉加入 50 mL 乙腈/水(体积比 1 : 1)中, 分离纯化目标物, 马钱苷下相提取率为 92.34%。

4. 结论

利用加入诱导剂相法分离纯化马钱苷, 萃取率可达 92.34%。研究了乙腈/水系统中的诱导剂种类、诱导剂组成、乙腈与水的配比; 通过对诱导剂添加量, 体系温度, 分配系数, 提取速度等因素的研究, 得出了马钱子苷提取分相的最佳分离条件。利用诱导相分离的方法进行分析, 有利于待测物质更容易与杂质分离, 特别是极性相差较大的杂质, 干扰较小, 萃取率较高, 故此法适用于马钱苷的分离纯化, 实验结果可为提取茛菪马钱苷及其后续产品开发提供依据。

参考文献:

- [1]张灵枝,邓旭铭,潘顺顺,等. EGCG 防治糖尿病作用及机制研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(5): 50-55.
- [2]刘东波,周佳丽,李坚,等. 营养干预在糖尿病治疗中的研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(6): 1-11
- [3]刘迪迪,邱军强,张华,等. 红松松仁提取物对糖尿病小鼠的降血糖活性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 20-28.
- [4]陈淑慧,纵伟. 基于文献计量学的茛菪研究现状分析[J]. 现代农业科技, 2020(6): 65-66.
- [5]孙建瑞,赵君峰,原江锋,等. 响应面法优化豫西山茛菪叶黄酮的提取及其抑菌和抗氧化活性[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 672-680.
- [6]诸葛秀红,韦日明,刘漫君,等. 茛菪提取物对认知障碍大鼠海马神经元的保护作用[J]. 南方农业学报, 2019, 50(12): 2812-2818.
- [7]李玥彤,隋怡,郝晓伟,等. 茛菪叶多糖的理化性质和抗氧化活性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(8): 109-116.
- [8]曹力,李格格,耿连欣,等. 茛菪果酒澄清工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中国酿造, 2020, 39(4): 185-189.

[9]李鹏冲,张立攀,关炳峰,等. 茛菪的营养成分[J]. 食品工业, 2020, 41(4): 319-323

[10]常玲彬. 茛菪多糖提取工艺优化及马钱苷含量测定[J]. 甘肃农业科技, 2011(11): 26-29

[11]王锋,姚瑞祺,钱拴提. 不同酵母对茛菪葡萄酒发酵的影响[J]. 山西农业科学, 2018, 46(9): 1550-1552.

[12]姚瑞祺,王锋,钱拴提. 响应面优化发酵型茛菪葡萄酒工艺研究[J]. 食品工业, 2016, 37(9): 11-14.

[13]任江红,马兆瑞,秦立虎,等. 茛菪发酵乳饮料加工技术研究[J]. 食品工业, 2015, 36(1): 99-102.

[14]张扬. 茛菪环烯醚萜苷的提取及生物活性评价[D]. 新乡: 河南科技学院, 2021.

[15]叶贤胜,赫军,张佳琳,等. 茛菪的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4605-4609.

[16]于晓,李松涛,刘建升,等. RP-HPLC 法同时测定忍冬藤中原酸、马钱苷、当药苷含量的研究[J]. 山东农业科学, 2015, 47(9): 124-126.

[17]国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 92.

[18]GAO X, LIU Y, AN Z, et al. Active components and pharmacological effects of *Cornus officinalis*: Literature review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 12: 633447.

[19]韩根利,刘宏胜,王树森,等. RP-HPLC 法同时测定茛菪萜类制剂中莫诺苷、马钱苷、茛菪新苷、齐墩果酸及熊果酸[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5168-5173.

[20]范倩,陈雪冰,荣莉,等. 茛菪化学成分、生物活性、复方应用及质量控制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7): 1244-1258.

[21]徐瑾,于银瑞,何燕. 蒸发诱导相分离对聚砜膜结构及性能的调控[J]. 高分子材料科学与工程: 1-11 [2023-03-21].

[22]王静,潘国元,赵国珂,刘秩群. 雾化辅助非溶剂诱导相分离法制备聚丙烯腈平板膜[J]. 石油化工, 2022, 51(12): 1426-1431.

[23]廖紫娟,郑禹,杨光参,王艳伟. YCL3 诱导牛血清白蛋白液相分离的研究[J]. 齐鲁工业大学学报, 2022, 36(06): 48-52.

[24]王静. 雾化辅助非溶剂诱导相分离法制备聚合物膜及其应用研究[D]. 北京化工大学, 2022.

[25]张磊,李亦灵,金子毅,郑亦婷,张丽. 环氧树脂基反应诱导相分离材料的研究进展[J]. 现代塑料加工应用, 2022, 34(01): 52-55.

[26]任海东,曹秀华,赵亮,唐博武,罗继业,郑华德,高粱. 聚乙烯醇缩丁醛的甲苯-乙醇溶液及其非溶剂诱导相分离研究[J]. 功能高分子学报, 2022, 35(04): 328-338.

[27]潘小红,赵薇,刘玉玲,等. 超声波辅助提取丹皮酚、马钱苷工艺条件的优化[J]. 中医药导报, 2020, 26(3): 1-5.

项目基金: 2022 年湖南省大学生创新创业项目, 湘教通 [2022]174 号—一般项目(4609)

作者简介: 谭鹏程 (2002-) 男, 汉, 湖南娄底人, 长沙医学院本科生在读, 主要研究方向: 药物分析

2. 通讯联系人:

曾星星 (1989-) 女, 汉, 湖南长沙人, 硕士研究生, 长沙医学院药学院讲师, 主要研究方向: 中药成分分析及质量控制研究