

金线莲苷的硅胶柱层析分离

苑歆¹, 石帆¹, 侯轶², 赖敏婷³, 胡松青^{1*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学轻工科学与工程学院, 广东广州 510640)(3. 广东雁归来养生产业有限公司, 广东梅州 514700)

摘要: 为进一步提高金线莲苷的分离纯化效率, 该研究以深度共熔溶剂提取的金线莲苷粗品为基础, 比较大孔树脂法和硅胶柱层析法分离金线莲苷的效果, 并优化了硅胶柱层析法分离金线莲苷的条件。实验结果表明, DM130 型大孔树脂对金线莲苷的吸附量仅为 24.69 mg/g, 解吸率为 17.89%, 且无法选择性的分离金线莲苷, 而硅胶柱层析法对金线莲苷的分离效果较好; 硅胶柱层析法分离金线莲苷的最佳条件为: 洗脱溶剂为乙酸乙酯: 乙醇: 乙酸=6: 4: 0.2 (V/V/V), 上样量为 0.60 g, 洗脱速率为 1.25 mL/min, 在此条件下, 金线莲苷的回收率可达 79.29%; 硅胶柱层析分离组分经半制备型高效液相色谱纯化所得的金线莲苷纯度大于 99.00%。该研究建立了一种简单高效的金线莲苷分离纯化流程, 有利于金线莲产业的发展, 为后续的研究工作提供理论支持。

关键词: 金线莲苷; 大孔树脂; 硅胶柱层析; 分离

文章编号: 1673-9078(2022)05-183-188

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0245

Separation of Kinsenoside by Silica Gel Column Chromatography

YUAN Xin¹, SHI Fan¹, HOU Yi², LAI Minting³, HU Songqing^{1*}

(1.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.School of Light Industry and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3.Guangdong Yanguilai Yangsheng Chanye Company Limited, Meizhou 514700, China)

Abstract: In order to improve separation and purification efficiency of kinsenoside from *Anoectochilus roxburghii*, in this study, the deep eutectic solvent crude extract of kinsenoside was prepared for the further separation, and the effect of macroporous resin chromatography and silica gel column chromatography on the separation of kinsenoside was compared. In addition, the conditions for the separation of kinsenoside by silica gel column chromatography were optimized. The results showed that the adsorption capacity and desorption rate of kinsenoside on DM130 macroporous resin were 24.69 mg/g and 17.89% respectively, and macroporous resin could not selectively separate kinsenoside while silica gel column chromatography had a good effect on the separation of kinsenoside. The optimal conditions for the separation of kinsenoside by silica gel column chromatography were measured as elution solvent of ethyl acetate/ethanol/acetic acid (6:4:0.2, V/V/V), loading volume of 0.60 g and elution rate of 1.25 mL/min. The kinsenoside recovery rate of 79.29% was obtained under these conditions. Then the elute fraction could be purified to >99.00% purity by semi-preparative high performance liquid chromatography. In this work, a simple and efficient process was established to separate and purify kinsenoside from the deep eutectic solvent crude extract, which is beneficial to the development of *Anoectochilus roxburghii* industry and provides theoretical support for subsequent research work.

Key words: kinsenoside; macroporous resin; silica gel column chromatography; separation

引文格式:

苑歆,石帆,侯轶,等.金线莲苷的硅胶柱层析分离[J].现代食品科技,2022,38(5):183-188,+42

YUAN Xin, SHI Fan, HOU Yi, et al. Separation of kinsenoside by silica gel column chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 183-188, +42

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.]

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 广东省科技计划项目 (2019A0103008)

作者简介: 苑歆 (1996-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品科学与工程,

E-mail: 13710616227@163.com

通讯作者: 胡松青 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术与

生物加工, E-mail: fesqhu@scut.edu.cn

又名金线兰, 是一种珍贵的多年生兰科开唇兰属植物, 主要分布于中国、日本、泰国以及其他东南亚国家和地区, 在我国福建、台湾和广东等地人们的日常生活中具有传统食用习惯, 属于地方特色食品。金线莲作为一种重要的经济作物, 不仅具有极高的观赏价值, 还具有广泛的药用价值。金线莲在我国被视为传统珍稀的中药材, 有清热凉血、平肝、祛湿、解毒等功效

[1,2], 民间誉之为“金草”、“神药”、“药王”。研究表明, 金线莲具有降血压^[3]、降血糖^[4]、抗肿瘤^[5]、保肝^[6]等多种生理活性, 且毒副作用低, 使用安全, 是治疗糖尿病、高血脂、肝炎等疾病重要的潜在药物^[7]。它的活性成分丰富, 包括内酯苷类、黄酮类、多糖类、三萜类等^[8]。

金线莲苷 (kinsenoside), 化学名 3R- β -D-吡喃葡萄糖氧基- γ -丁内酯, 是金线莲独有的特性成分^[9], 含量为 6.37%~22.66%^[10]。据文献报道, 金线莲苷具有降血糖^[11]、降脂^[12]、保肝护肝^[13-16]、抑制炎症^[17,18]等多种药理活性。目前, 从金线莲中分离纯化金线莲苷普遍处于实验室初步研究阶段, 常见流程包括溶剂萃取、大孔树脂吸附分离、制备色谱纯化等。Liu 等^[19]采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇对金线莲苷乙醇提取物 (1314 g) 进行萃取, 得到的正丁醇萃取物经 HPD 100 型大孔树脂和硅胶柱层析分离后, 最终得到 800 mg 金线莲苷。整个分离纯化流程长且步骤繁琐, 金线莲苷得率低, 难以实现规模化生产。

本课题组前期以深度共熔溶剂为提取溶剂结合柱提取法得到高含量的金线莲苷粗提液, 但粗提液中仍含有多酚、糖类等杂质。因此, 有必要对粗提液采取进一步的分离纯化以获得高纯度的金线莲苷。本文探讨并比较了大孔树脂法、硅胶柱层析法对金线莲苷分离纯化的效果, 建立了一种简单高效的金线莲苷分离纯化流程, 为金线莲苷的分离制备工艺奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金线莲干品由广东梅州雁归来养生产业有限公司惠赠; 薄层层析硅胶板, 青岛海洋化工有限公司; 柱层析硅胶, 上海源叶生物公司; 大孔树脂 NKA-9、AB-8、D101、DM130, 上海源叶生物科技有限公司; 乙酸乙酯, 上海泰坦科技公司; 乙醇, 天津百世化工有限公司; 氯仿、甲醇、冰醋酸, 天津大茂化学试剂厂; 高锰酸钾、碳酸钾、氢氧化钠, 广州化学试剂厂; 二硝基苯甲酸, 上海源叶生物科技有限公司; 氢氧化钾, 国药集团化学试剂公司; 茛三酮, 上海伯奥生物科技有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

BSZ-160F 电脑自动部份收集器, 上海精科实业有限公司; 恒流泵, 保定雷弗流体科技有限公司; 真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Agilent

1260Infinity II 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; Agilent 1260 Infinity II 蒸发光散射检测器, 美国安捷伦科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金线莲苷的提取

干燥的金线莲材料经粉碎机粉碎, 过筛, 收集物料粒径在 250~830 μm 之间的金线莲粉末, 准确称取 5 g 的金线莲粉末, 加入 20 mL 的由氯化胆碱和苹果酸按照 1:1 摩尔比组成的深度共熔溶剂 (含水量 40%), 室温下静置 3 h, 以径高比 1:10 装入玻璃层析柱, 使用提取溶剂以 40 mL/h 的流速进行洗脱, 收集前 60 mL 洗脱液, 即为金线莲苷粗提液。

1.3.2 金线莲苷的定性分析

采用薄层层析硅胶对金线莲苷进行快速定性分析。在距离层析板底部约 1 cm 处, 吸取样液点样, 样点直径不超过 0.5 cm, 吹干样点后放入装有展开剂 (乙酸乙酯:乙醇:冰醋酸=5:5:0.2, $V/V/V$) 的层析缸中, 当展开剂前端距离层析板顶部 1 cm 时, 完成层析。用 kedde 试剂进行显色, 计算金线莲苷的 R_f 值。

1.3.3 金线莲苷的定量分析

1.3.3.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil Plus C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (2:98, V/V), 等度洗脱, 流速 0.6 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL 。蒸发光散射检测器雾化温度和漂移管温度均为 60 $^{\circ}\text{C}$, 载体为氮气, 流速 1.7 L/min。

1.3.3.2 标准曲线及线性范围

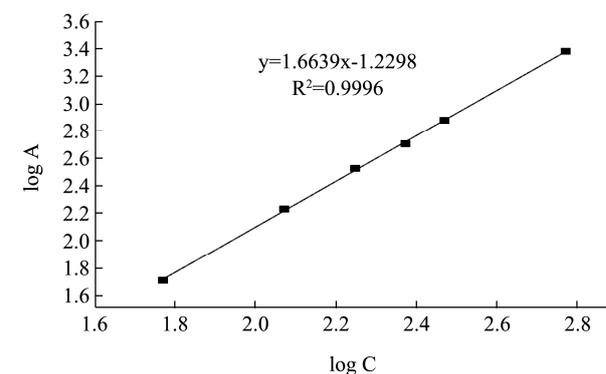


图1 金线莲苷的标准曲线

Fig.1 The standard curve of kinsenoside

将金线莲苷标准品用超纯水配置为浓度分别为 59.17、118.33、177.50、236.66、295.83、591.66 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液, 按照色谱条件进样, 记录峰面积。以峰面积积分值的对数值 ($\log A$) 为纵坐标, 以标准品溶液浓度的对数值 ($\log C$) 为横坐标, 绘制标准曲线。如图 1 所示。经计算, 金线莲苷含量的回归方程

为 $y=1.6639x-1.2298$ ($R^2=0.9996$), 在 59.17~591.66 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。该方程可用于后续研究中金线莲苷含量的测定。

1.3.4 金线莲苷的稳定性研究

将待测液置于冰箱冷藏室 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) 中, 分别在 0、2、4、6 和 12 h 时通过高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD), 记录峰面积并计算 RSD 值。

1.3.5 大孔树脂分离金线莲苷的研究

表 1 不同类型大孔树脂的性质

Table 1 Properties of different types of macroporous resins

树脂种类	极性	比表面积/(m^2/g)	颗粒尺寸/mm	孔径尺寸/nm
AB-8	中等极性	1150~1200	0.37~1.25	12~16
DM130	中等极性	450~500	0.37~1.25	10~11
NKA-9	极性	500~550	0.37~1.25	10~12
D101	非极性	480~520	0.37~1.25	25~28

1.3.5.1 大孔吸附树脂的筛选

本实验中所使用的 4 种大孔树脂的类型和性质如表 1 所示, 称取 5 g 预处理过的大孔树脂于锥形瓶中, 加入 20 mL 金线莲苷粗提液, 室温下于摇床中吸附 24 h 后过滤, 测定滤液中金线莲苷浓度, 计算吸附量。大孔树脂过滤后, 加入 20 mL 蒸馏水, 振摇 12 h 以充分洗去深度共熔溶剂, 随后再加入 20 mL 80%乙醇溶液, 振摇 12 h 后, 过滤, 测定解析液中金线莲苷的浓度, 计算解析率。

1.3.5.2 DM130 型大孔吸附树脂动态吸附曲线

称取适量 DM130 型湿树脂填充入直径为 2 cm 的玻璃层析柱中, 填充高度 20 cm, 加入浓度为 1 mg/mL 的金线莲苷提取液, 以 2 BV/h 的流速上样, 分别测定流出液在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 BV 时金线莲苷的浓度。以流出液体积为横坐标, 对应的金线莲苷浓度为纵坐标, 绘制 DM130 型大孔吸附树脂动态吸附曲线。

1.3.6 硅胶柱层析分离金线莲苷的研究

1.3.6.1 洗脱溶剂比例对金线莲苷分离的影响

分别选择不同的展开剂体系对金线莲苷标准品和分离纯化中间产物样品进行展开, 根据样品在薄层硅胶板上的显色斑点的比移值 R_f 值和拖尾情况选择最佳展开剂, 从而确定最佳洗脱溶剂, R_f 值的计算公式如下:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

式中:

R_f ——比移值;

a ——原点到斑点的距离;

b ——原点到展开剂前沿的距离。

1.3.6.2 上样量对金线莲苷分离的影响

根据单因素实验确定了最佳洗脱溶剂比例, 现考察金线莲苷的上样量对金线莲苷分离纯化的影响。将干燥的硅胶采用湿法装柱法填入直径为 2 cm 的玻璃

层析柱, 装柱径高比为 1:10, 分别称取上样量 0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 g 加载到硅胶床层顶面, 设置洗脱流速为 1 mL/min, 采用自动部分收集器以 10 mL/管收集洗脱液, 将收集的洗脱液进行薄层硅胶层析, 将显示含有金线莲苷显色反应的收集管经真空干燥 ($50\text{ }^\circ\text{C}$) 除去有机溶剂后, 用蒸馏水复溶, 通过 HPLC-ELSD 检测并计算金线莲苷的回收率。

1.3.6.3 洗脱速率对金线莲苷分离的影响

根据上述实验确定了最佳洗脱溶剂比例和上样量。现考察洗脱速率对金线莲苷分离纯化的影响。将干燥的硅胶采用湿法装柱法填入直径为 2 cm 的玻璃层析柱, 装柱径高比为 1:10, 称取金线莲苷粗品 0.6 g 加载到硅胶床层顶面, 设置洗脱速率分别为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mL/min。采用自动部分收集器以 10 mL/管收集洗脱液, 将收集的洗脱液进行薄层硅胶层析, 将显示含有金线莲苷显色反应的收集管经真空干燥 ($50\text{ }^\circ\text{C}$) 除去有机溶剂后, 用蒸馏水复溶, 通过 HPLC-ELSD 检测并计算金线莲苷的回收率。

1.3.7 金线莲苷的分离制备

采用 Agilent 1260 半制备型高效液相色谱-蒸发光检测器对金线莲苷进行分离制备。半制备色谱柱为 YMC-Pack ODS-A ($250\times 10\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为甲醇-水 (2:98, V/V), 等度洗脱, 流速 2.0 mL/min, 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 进样量为 100 μL 。ELSD 雾化温度和漂移管温度均为 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 载体为氮气, 流速 1.7 L/min。收集样品峰, 真空冷冻干燥后得到金线莲苷纯品。

1.3.8 数据统计与分析

实验数据均为三组平行, 采用 SPSS 22 对数据进行统计分析, 显著性水平为 $p<0.05$, 不同的字母表示具有显著差异, 采用 Origin 8.6 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 金线莲苷的定性分析

薄层层析硅胶法可用于金线莲苷分离纯化过程中间产物样品的快速检测。如图 2 所示, 样品 1 为金线莲苷标准品, 样品 2 为金线莲提取液, 经 kedde 试剂显色均为紫色斑点, 计算两者的 R_f 值均为 0.51。该方法可根据薄层层析硅胶板上斑点的位置及大小实现样品中金线莲苷的快速检测。



图 2 金线莲苷的定性分析

Fig.2 Qualitative analysis of kinsenoside

注: 1: 金线莲苷标准品; 2: 金线莲苷提取液。

2.2 金线莲苷的稳定性研究

随着储存时间的延长, 金线莲苷可能发生自降解或其他反应, 导致其含量降低。实验结果如表 2 所示, 在 4 °C 条件下, 0~12 h 内金线莲苷的稳定性良好。故金线莲苷样品可在 4 °C 下, 12 h 内完成进样测定。

表 2 金线莲苷的稳定性研究

Table 2 Study on the stability of kinsenoside

放置时间/h	峰面积	RSD/%
0	3208.88	
2	3171.34	
4	3198.11	1.46
6	3292.12	
12	3246.13	

2.3 大孔树脂分离金线莲苷的研究

2.3.1 大孔树脂的筛选

大孔树脂对化合物的分离受树脂极性、比表面积和孔径大小等多种因素影响^[20], 其性能主要体现在吸附和解吸两个方面, 一般来说, 吸附量越大, 解吸越容易, 则大孔树脂的性能越好。本实验通过比较吸附量和解吸率两个参数来选择适宜的大孔树脂, 用于金线莲苷粗提液的分离精制。

4 种不同型号大孔树脂对金线莲苷粗提液的静态吸附效果及 80%乙醇对各树脂的解吸效果如图 3、4 所示, 四种大孔树脂的吸附、解吸效果表现并不优良, 但 DM130 型大孔树脂的吸附效果和解吸效果均优于

其他三种树脂, 其吸附量可达 24.69 mg/g, 解吸率为 17.89%。原因可能是大孔树脂对于目标化合物的吸附作用与树脂的极性、孔径比表面积和目标化合物之间形成的静电作用力、氢键和尺寸共同作用的结果。因此, 选择 DM130 型大孔树脂用于后续研究。

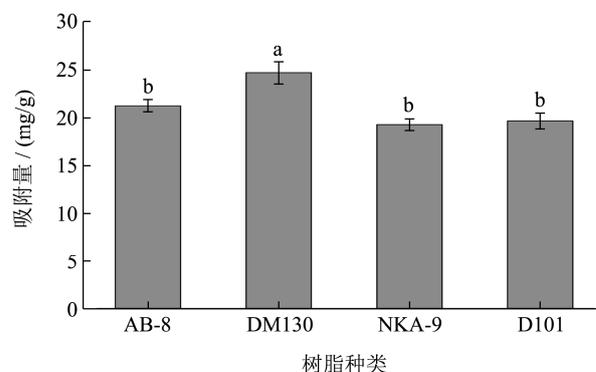


图 3 不同类型大孔树脂对金线莲苷的吸附量

Fig.3 Adsorption of kinsenoside on different macroporous resins

注: 不同小写字母表示差异性显著, $p < 0.05$; 下同。

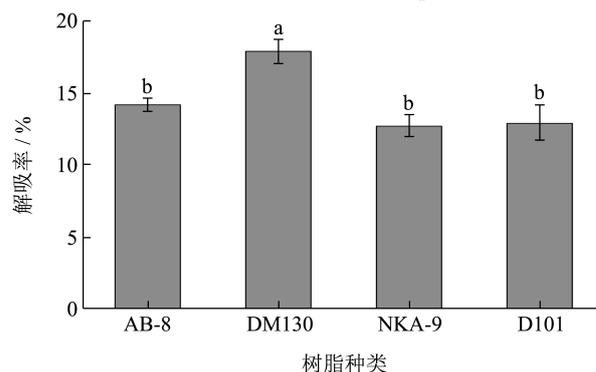


图 4 不同类型大孔树脂对金线莲苷的解吸率

Fig.4 Desorption of kinsenoside by different macroporous resins

2.3.2 DM130 型大孔树脂动态吸附曲线

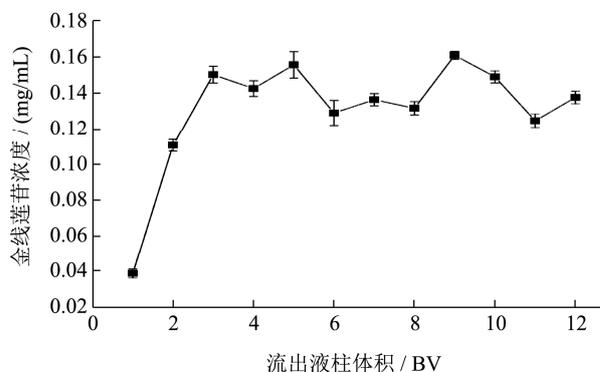


图 5 DM130 型大孔树脂动态吸附曲线

Fig.5 Dynamic adsorption curve of DM130 macroporous resin

DM130 型大孔树脂对金线莲苷的动态吸附曲线如图 5 所示, 当流出液体积由 1 BV 增至 3 BV 时, 金线莲苷的浓度由 0.04 mg/mL 迅速升至 0.15 mg/mL,

但当流出液体体积逐步增至 12 BV 时, 金线莲苷浓度在 0.12~0.16 mg/mL 范围内波动, 无明显变化。故易知 DM130 型大孔吸附树脂对金线莲苷无选择性吸附作用, 分离效果较差, 后续实验选择硅胶柱层析法用于金线莲苷的分离。

2.4 硅胶柱层析分离金线莲苷的研究

2.4.1 洗脱溶剂比例对金线莲苷分离的影响

配制不同比例组分的洗脱溶剂进行实验^[21], 各种洗脱溶剂对金线莲苷的分离结果如表 3 所示, 前 6 种展开剂不含乙酸, 斑点的拖尾现象比较严重, 而后 6 种展开剂均加入了少量乙酸, 斑点圆整清晰。拖尾严重的现象说明此种展开剂分离效果欠佳。虽然含有氯仿的洗脱溶剂体系分离效果较好, 但其毒性较大, 不适宜用于金线莲苷的分离纯化。7 号和 9 号展开剂能使金线莲苷展开充分, 且 R_f 值在 0.40~0.60 之间比较合适, 故本实验选择 9 号展开剂做硅胶柱分离的洗脱溶剂, 洗脱溶剂乙酸乙酯/乙醇/乙酸比例为 6:4:0.2(体积比)。

表 3 洗脱溶剂比例对金线莲苷分离的影响

Table 3 Effect of eluting solvent ratio on the separation of kinsenoside

编号	展开剂 (体积比)	拖尾	R_f 值
1	乙酸乙酯/乙醇 (8:2)	+	0.33
2	乙酸乙酯/乙醇 (7:3)	+	0.59
3	乙酸乙酯/乙醇 (6:4)	+	0.49
4	氯仿/甲醇 (8:2)	+	0.41
5	氯仿/甲醇 (7:3)	+	0.49
6	氯仿/甲醇 (6:4)	+	0.56
7	乙酸乙酯/乙醇/乙酸 (8:2:0.2)	-	0.37
8	乙酸乙酯/乙醇/乙酸 (7:3:0.2)	+	0.54
9	乙酸乙酯/乙醇/乙酸 (6:4:0.2)	-	0.51
10	氯仿/甲醇/乙酸 (8:2:0.2)	+	0.22
11	氯仿/甲醇/乙酸 (7:3:0.2)	+	0.44
12	氯仿/甲醇/乙酸 (6:4:0.2)	-	0.65

注: +表示拖尾且斑点可分辨; -表示不拖尾且斑点圆整清晰。

2.4.2 上样量对金线莲苷分离的影响

硅胶柱层析的分离效率会受到上样量的影响^[22]。分别称取金线莲苷粗品 0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 g, 探究上样量对分离纯化的影响, 结果如图 6 所示, 在 0.40~0.60 g 的上样量变化范围内, 上样量不断增加, 纯化效果逐渐变好; 当上样量为 0.60 g 时, 回收率最高可达 69.12%, 但当上样量继续增加时, 纯化效果逐渐变差, 推测其原因可能为层析柱填料洗脱能力有限,

已达到层析上限; 当上样量为 0.30 g 时, 回收率也可达到 60%左右, 推测其在可洗脱样品质量范围内, 金线莲苷纯化率与上样量的关系为多极值型曲线。

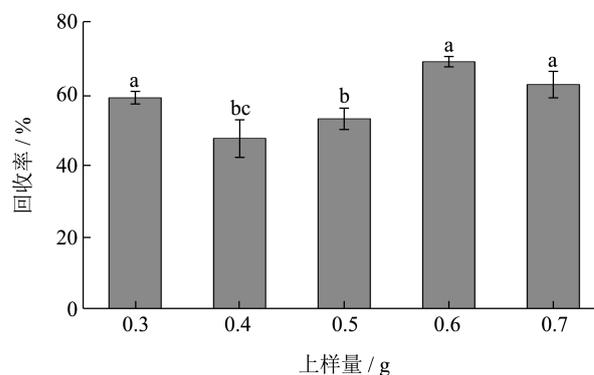


图 6 上样量对金线莲苷分离的影响

Fig.6 Effect of loading amount on the separation of kinsenoside

2.4.3 洗脱速率对金线莲苷分离的影响

硅胶柱的分离过程中, 洗脱速率的影响是比较明显的。洗脱速率过快, 目标化合物在未被分离的情况下便被洗脱, 分离效果不佳, 而洗脱速率过慢, 目标化合物可能会出现扩散现象, 从而导致分离效率较低。本实验选取了 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mL/min 五个流速点进行实验, 结果如图 7 所示, 在 0.5~1.25 mL/min 的流速范围内, 随着洗脱速率的不断增大, 金线莲苷的回收率不断增大; 当流速为 1.25 mL/min 时, 金线莲苷的分离纯化效果最佳, 回收率最高可达 79.29%; 当流速继续增大时, 纯化效果变差。

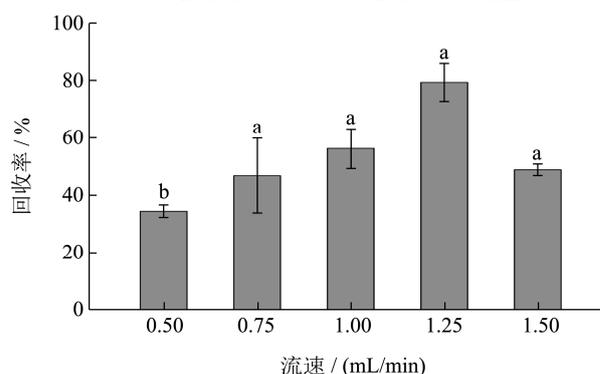


图 7 洗脱速率对金线莲苷分离的影响

Fig.7 Effect of elution velocity on the separation of kinsenoside

在乙酸乙酯/乙醇/乙酸比例为 6:4:2 (体积比)、上样量为 0.60 g、洗脱速率为 1.25 mL/min 的硅胶柱层析条件下获得的硅胶柱层析洗脱组分, 经半制备型高效液相色谱-蒸发光检测器进一步纯化, 在洗脱时间 10 min 时收集目标组分, 真空冷冻干燥后得到金线莲苷纯品, 纯度大于 99.00%。因此, 硅胶柱层析法分离结合半制备型高效液相色谱制备得到的金线莲苷纯度较高, 该方法切实有效。

3 结论

本实验首先采用 NKA-9、AB-8、D101、DM130 四种大孔树脂对金线莲苷深度共熔溶剂粗提液进行分离,结果表明四种大孔树脂分离效果较差,均不适用于金线莲苷的分离。最终确定采用硅胶柱层析方法分离金线莲苷,最佳条件为:洗脱溶剂比例为乙酸乙酯:乙醇:乙酸=6:4:0.2 (V/V/V),上样量 0.60 g,洗脱速率 1.25 mL/min,在此优化条件下,采用半制备型高效液相色谱-蒸发光检测器对金线莲苷进行分离制备,可以获取纯度大于 99.00%的金线莲苷纯品。本研究通过硅胶柱层析分离金线莲苷并结合半制备型高效液相色谱-蒸发光检测器对其进行制备,分离纯化流程操作简单高效,步骤少,纯化效果佳,为金线莲苷分离纯化工艺的研究打下坚实基础。

参考文献

- [1] YE Shenyi, WANG Zhen, SHEN Jiayu, et al. Sensory qualities, aroma components, and bioactive compounds of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl as affected by different drying methods [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 134: 80-88
- [2] LI Shuailing, WANG Zhian, SHAO Qingsong, et al. Rapid detection of adulteration in *Anoectochilus roxburghii* by near-infrared spectroscopy coupled with chemometric methods [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(9): 3518-3525
- [3] YE Bingzhu, WU Yanbin, ZHAI Xin, et al. Beneficial effects of endophytic fungi from the *Anoectochilus* and *Ludisia* species on the growth and secondary metabolism of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *ACS Omega*, 2020, 5: 3487-3497
- [4] CHEN Ying, TAN Chushan, NG Chiewhoong, et al. Development of a HPTLC method with iterative calibration approach for quantitative evaluation of kinsenoside content in different types of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 165: 106076
- [5] GAO Huashan, DING Linlin, LIU Rui, et al. Characterization of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 179: 259-269
- [6] WU Tong, LI Shuailing, HUANG Yuqiu, et al. Structure and pharmacological activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 87: 104815
- [7] DENG Mengyi, LIU Yaping, HUANG Yingying, et al. New bioactive secondary metabolites from the *Anoectochilus roxburghii* endophytic fungus *Aspergillus versicolor* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 143: 104532
- [8] YE Shenyi, SHAO Qingsong, ZHANG Ailian. *Anoectochilus roxburghii*: a review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 209: 184-202
- [9] WEI Mi, CHEN Xuemin, YI Liwen, et al. Detecting kinsenoside from *Anoectochilus roxburghii* by HPLC-ELSD with dual columns of NH₂ and AQ-C₁₈ [J]. *Phytochemical Analysis*, 2020, 31(6): 700-710
- [10] 张超,吴建国,易骏,等.HPLC-ELSD法测定三种植物基原金线莲的金线莲苷含量[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(2): 75-78
- [11] ZHANG Chao, WU Jianguo, YI Jun, et al. HPLC-ELSD method was used to determine the content of kinsenoside in three plants [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(2): 75-78
- [12] QI Changxing, ZHOU Qun, ZHOU Yuan, et al. Kinsenoside: a promising bioactive compound from *Anoectochilus* species [J]. *Current Medical Science*, 2018, 38(1): 11-18
- [13] LEE Yuanchii, SUE Yuhmou, LEE Chingkuo, et al. Synergistic effects of cAMP-dependent protein kinase A and AMP-activated protein kinase on lipolysis in kinsenoside-treated C3H10T1/2 adipocytes [J]. *Phytomedicine*, 2019, 55: 255-263
- [14] ZOU Shupeng, WANG Yafen, ZHOU Qun, et al. Protective effect of kinsenoside on acute alcohol-induced liver injury in mice [J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2019, 29(5): 637-643
- [15] XIANG Ming, LIU Tingting, TIAN Cheng, et al. Kinsenoside attenuates liver fibro-inflammation by suppressing dendritic cells via the PI3K-AKT-FoxO1 pathway [J]. *Pharmacological Research*, 2022, 177: 106092
- [16] NIE Xiaoqi, YU Qianqian, LI Long, et al. Kinsenoside protects against radiation-induced liver fibrosis via downregulating connective tissue growth factor through TGF- β 1 signaling [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 808576
- [17] GAO Limin, CHEN Xingyu, FU Zeyu, et al. Kinsenoside alleviates alcoholic liver injury by reducing oxidative stress, inhibiting endoplasmic reticulum stress, and regulating AMPK-dependent autophagy [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 12: 747325

(下转第 42 页)

