

孙宝胜,徐存宽,薛云才,等.穿心莲内酯高压液相色谱纯化技术研究[J].江苏农业科学,2017,45(21):202-205.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.057

穿心莲内酯高压液相色谱纯化技术研究

孙宝胜¹,徐存宽¹,薛云才¹,吴本刚²

(1.江苏省泰州市粮油质量监测所,江苏泰州 225300; 2.江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

摘要:以穿心莲提取物为试验原料,采用动态轴向压缩制备色谱技术进行分离纯化,以制备高纯度穿心莲内酯。制备柱装填纯化材料:硅胶基质 C₁₈ 10 μm,装填质量 300 g,实测柱床规格 50 mm×250 mm。以甲醇水为流动相进行纯化工艺优化,结果表明,甲醇水体系下水相添加 0.05 mol/L 乙酸铵能促进穿心莲内酯的溶解,该体系下穿心莲内酯最佳纯化工艺条件:流动相 55% 甲醇水+45% 0.05 mol/L 乙酸铵缓冲液,流速 60.0 mL/min;检测波长 254 nm,温度为室温。

关键词:穿心莲内酯;分离纯化;制备色谱;工艺优化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0202-03

穿心莲[*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees.] 为爵床科(Acanthaceae)穿心莲属(*Andrographis* Wall. ex Nees.)植物,别称一见喜、苦草、四方草、印度草等^[1],在中国、印度、马来西亚等国具有悠久的民间药用史,在国内主要分布在广东省、广西壮族自治区、福建省、四川省等省(区),以广西壮族自治区种植面积最大^[2]。

穿心莲植株所含穿心莲内酯是目前穿心莲制剂的主要活性成分^[3],其分子式为 C₂₀H₃₀O₅,在穿心莲叶中含量高达 1.84%。现代药理研究表明,穿心莲内酯具有抗炎抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、治疗心脑血管疾病、保肝利胆、抗肿瘤等作用,具有毒性小、价格低的特点。穿心莲具有清热解毒、凉血、消肿等功效,在临床上用于治疗呼吸道感染、急性菌痢、肠胃炎等疾病^[4-5],还具有防治心血管疾病、抗肿瘤、保肝利胆、免疫调节等多重功效^[6-7],在我国已作为穿虎宁、穿心莲注射液等解热镇痛药的原料大量生产^[8-9]。

穿心莲内酯提取主要采用乙醇直接提取法、水提法、超声波辅助提取法、酶解辅助提取法等方法,在此基础上进一步采用大孔树脂吸附和结晶等方法进一步纯化^[10]。范云鸽等采用 ADS-7 树脂对传统的乙醇回流提取液进行纯化,分离干燥后得到的浸膏中穿心莲内酯含量达 25.3%^[11]。本试验原料为穿心莲经乙醇水提取、大孔树脂纯化后粗品,在此基础上采用反相高压液相色谱对其进一步纯化,优化工艺条件以获得高纯度的产品,旨在为穿心莲内酯的精制提供工艺参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

收稿日期:2016-05-25

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(编号:20150500);江苏大学高层次人才科研启动基金(编号:15JDC070)。

作者简介:孙宝胜(1983—),男,山东菏泽人,硕士,助理工程师,主要从事药食同源植物活性成分提取分离技术以及功能活性评价研究。Tel:(0523)86086656;E-mail:s_baosheng@163.com。

通信作者:吴本刚,博士研究生,讲师,主要从事食品功能成分提取及其活性评价研究。Tel:(0511)88795305;E-mail:wubg@ujs.edu.cn。

甲醇(AR),国药集团化学试剂有限公司生产;娃哈哈牌饮用纯净水,自制去离子水;乙酸铵(AR),国药集团化学试剂有限公司生产;99.58%穿心莲内酯对照品,46%穿心莲内酯乙醇水粗提物。

1.2 仪器及设备

Waters 2695—2998 高效液相色谱仪;Waters Sunfire C₁₈ 5 μm 4.6 mm×250 mm 色谱柱,柱恒温箱;创新牌制备型 50DAC 液相色谱仪;装填普通 C₁₈ 填料色谱柱 300 g,实测柱床高度 250 mm,柱床直径 50 mm;万分之一分析天平(赛多利斯公司);超声波清洗机。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线建立 标准曲线测试液相方法:Waters 2695—2998 高效液相色谱仪,Sunfire C₁₈ 4.6 mm×250 mm 柱,流动相甲醇:水=55:45,水相中含有 0.1% 乙酸,进样体积 5 μL,柱温度 25℃,流速 1 mL/min,以质量浓度为横坐标和峰面积为纵坐标作标准曲线。

准确称取 0.010 0 g 纯度 99.58% 对照品,用甲醇定容至 50 mL,超声混匀,配制 0.20 mg/mL 标准液,依次稀释得到 0.20、0.10、0.06、0.04、0.02 mg/mL 梯度标准溶液,进 Waters 液相测试,鉴于该物质溶解度较低,故采取增大进样体积方式增大进样量,分别进样 10 μL 和 15 μL 作为 0.4 mg/mL 和 0.6 mg/mL 浓度标准曲线点。

1.3.2 甲醇水流动相体系下保留时间优化 为考察穿心莲内酯在该 C₁₈ 柱甲醇水体系下的保留性能,用穿心莲对照品做试验样品考察合适该物质的甲醇比例。试验初始条件:流速 60.0 mL/min,定量环进样 300 μL,波长 254 nm,温度为室温。

穿心莲内酯溶解较差,相对其他有机试剂,其在甲醇、乙醇中溶解性相对较好。从可行性和经济方面考虑,本试验有机相优先考虑甲醇。因该部分试验主要考察穿心莲内酯保留时间,故试验样品采用对照品,可以有效节约色谱系统净化时间和保护色谱系统。

根据文献资料和该物质理化性质,选用 70%、60%、52%、50% 甲醇水流动相比例进行试验。考察穿心莲内酯在试验条件下的保留时间参数,得出在该纯化填料下较为合理的保留时间。

1.3.3 穿心莲内酯溶解量优化 由前期试验可知,制备时甲醇比例 50% ~ 60% 为宜,该条件下穿心莲内酯保留时间在 12 ~ 28 min。色谱纯化过程工艺中,样品的溶解性决定制备效率,因而有必要对穿心莲内酯的溶解性进一步优化。本试验中,样品采用 50% 甲醇水溶解,在水相中加入 0.05 mol/L 乙酸铵改变溶液理化性质,以期增大其溶解度。

配制 50% 甲醇、50% 乙酸铵水溶液,取 7 支规格 50 mL 离心管,标号 0、1、2、3、4、5、6,0 号加入 20 mL 50% 甲醇水和 400 mg 原料药,1 ~ 6 号分别加入 50% 乙酸铵水混合溶液 20 mL,依次加入 46% 粗品原料 100、200、300、400、600、1 200 mg,充分摇匀并超声促溶 3 min,取出密闭静置过夜。次日以 8 400 r/min 离心 10 min,取上清液,过 0.22 μm 有机滤膜,分别上 Waters 液相测试,每组做 3 个平行,根据标准曲线计算溶解度。

1.3.4 制备优化试验 以纯度 46% 穿心莲为原料,以甲醇 + 乙酸铵水溶液 (0.05 mol/L) 为流动相,根据杂质分离情况对流动相甲醇比例进行适当再优化。

46% 粗品溶解液:根据“1.3.3”节试验结果,采用最大溶解方式溶解,过 0.45 μm 滤膜过滤备用。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

以穿心莲内酯质量浓度为横坐标,以对应浓度条件下色

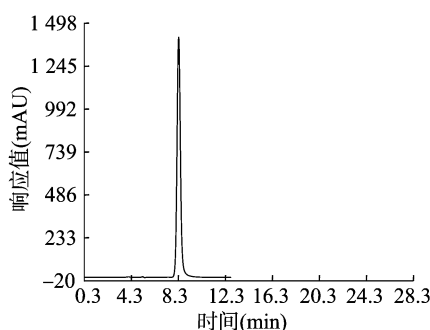


图2 70%甲醇水条件下色谱图

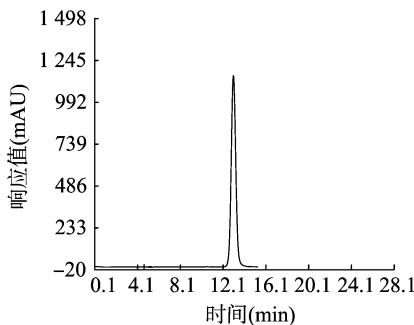


图3 60%甲醇水条件下色谱图

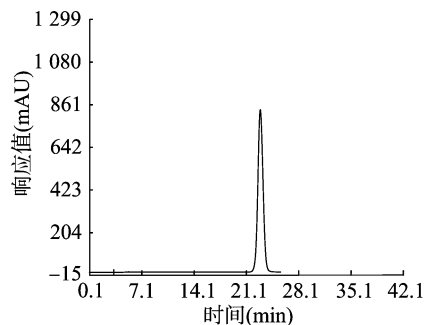


图4 52%甲醇水条件下色谱图

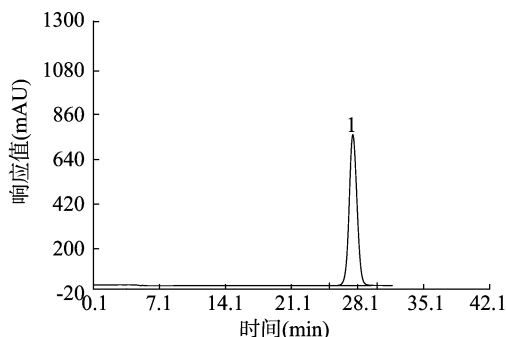


图5 50%甲醇水条件下色谱图

分析色谱图(图3至图6)可知,60%、52%、50% 甲醇流动相条件下,穿心莲内酯的保留时间分别为 13.03、23.00、27.60 min。由此可知,甲醇比例在 50% ~ 60% 时,穿心莲内酯保留时间为 12 ~ 28 min,保留时间适中。该甲醇比例条件下,制备周期较短且有可能获得较好的分离度。综合分析各条件下穿心莲内酯保留时间,暂将 52% 甲醇水流动相作为进

谱峰面积为纵坐标作标准曲线。由图1可知,穿心莲内酯在 0.02 ~ 0.60 mg/mL 浓度范围内线性关系良好,相关系数 r^2 为 0.999 9。

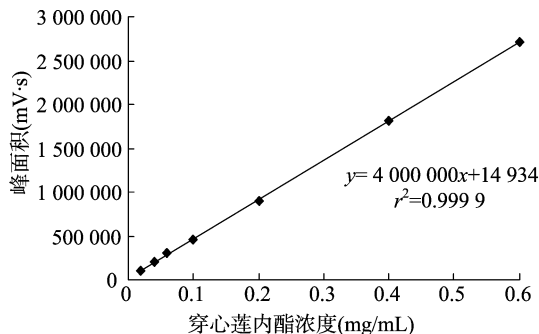


图1 穿心莲内酯标准曲线

2.2 流动相中有机相甲醇比例优化

根据已知文献以及穿心莲内酯在 C_{18} 柱上的保留性质,在优化流动相时,优先使用 70% 甲醇水流动相作为洗脱条件。由图2可知,70% 甲醇水条件下保留时间为 8.3 min,保留时间较短,若作为粗品的纯化方法则易出现目标物与杂质分离度小的情况,故有必要进一步降低甲醇比例,增大保留时间。60%、52%、50% 甲醇流动相条件下的色谱分别如图3、图4、图5所示。

一步优化的基础条件,并在此基础上进行后续试验。

2.3 穿心莲内酯溶解量试验

根据“1.3.3”节溶解量试验方案,得出各物料比条件下穿心莲内酯的浓度。由表1可知,20 mL 混合溶液加入 600 mg 原料药时,穿心莲内酯溶解度达 4.16 mg/mL。

表1 不同条件下穿心莲内酯浓度

序号	浓度 (mg/mL)
0	2.05
1	1.42
2	1.76
3	2.16
4	2.75
5	4.16
6	5.30

以 50% 甲醇、50% 乙酸铵水溶液为溶剂,加入 1.200 g 46% 的原料药和 20 mL 溶剂,常温下得到 5.30 mg/mL 穿心莲内酯溶液。乙酸铵、甲醇水溶液溶解样品后得到澄清色液

体,甲醇水溶液条件下得到的溶液浑浊,呈现青黄色且透光度较差,说明在甲醇水溶液基础上,加入乙酸铵能有效提高物质的溶解性。

2.4 制备条件下甲醇乙酸铵水优化试验

根据“2.2”节试验,初步确立 52% 甲醇水基础流动相;由“2.3”节试验结果可知,在甲醇水乙酸铵体系下,穿心莲内酯粗溶解浓度较好。以该溶液作为色谱制备工艺进样原料,在此流动相和溶解量基础上进一步对工艺进行优化。

“2.2”节试验已经研究了甲醇比例对穿心莲内酯溶解度的影响,因而本次试验只在原来基础上进行细微优化。首先考察 52% 甲醇水乙酸铵体系下穿心莲内酯粗品分析图谱,进样体积和检测波长等参数不变。

由图 6 分析可知,穿心莲内酯保留时间 22.50 min,但目标峰后存在一明显杂质峰且分离度较差,不利于制备分离纯化。

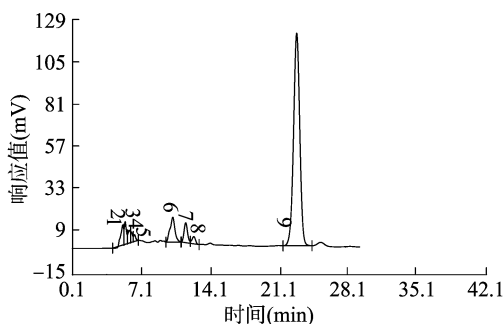


图6 52%甲醇乙酸铵缓冲液色谱图

前期试验结果表明,提高流动相中甲醇的比例,穿心莲内酯保留时间变短。由图 6 可知,目标物质峰和前杂质峰分离度较好,因此将流动相中甲醇比例提高到 55%,乙酸铵水溶液比例为 45%,其他条件不变,进样分析。

由图 7 可知,该制备条件下主峰与杂质峰分离效果较好,杂质峰 4 和峰 6 与目标物质分离度大,且目标峰保留时间为 17.5 min,故该流动相条件下目标物质有效分离且缩短了制备时间。

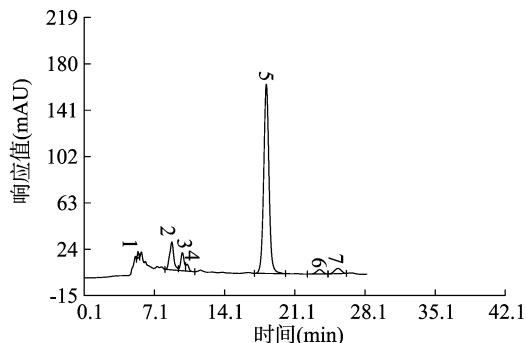


图7 55%甲醇乙酸铵缓冲液条件下色谱图

2.5 制备工艺放大试验

使用“2.3”节中 6 号溶解液,穿心莲内酯含量约为 5.30 mg/mL;流动相:55% 甲醇、45% 0.05 mol/L 乙酸铵缓冲液;模拟制备色谱柱:某公司 C_{18} 10 μ m 4.6 mm \times 250 mm。穿心莲内酯溶解量不高,故放大试验采取增大上样体积的方式。进样 12.0 mL,得制备色谱如图 8 所示。

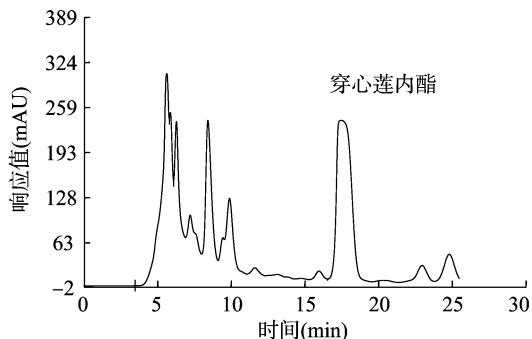


图8 进样 12.0 mL 条件下制备图谱

收集穿心莲整峰,进样测定,按峰面积归一化法计算,穿心莲内酯含量 99.90%,因收集整个主峰,故而回收率接近 100%。

当进样 12.0 mL 时,制备回收率和目标物质纯度均较高,为提高制备效率,需进一步增大上样体积,以提高上样量。其他参数不变条件下进样 120.0 mL,得图 9 所示色谱图。

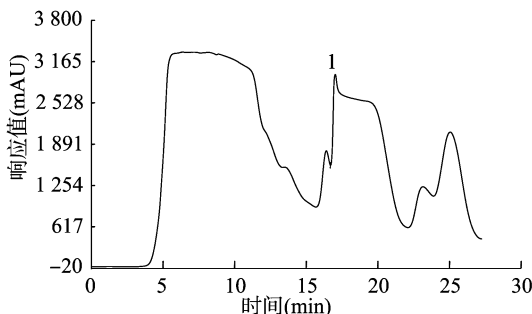


图9 进样 120.0 mL 制备色谱图

如图 9 所示,制备时按下述方法收集:收集峰 1 峰起至后峰肩馏分并标号为 F_1 ;收集峰 1 后峰肩至峰尾馏分并标号为 F_2 。按峰面积归一化法计,馏分 F_1 穿心莲内酯含量为 99.27%,有效回收率占 86.00% (图 10)。 F_2 馏分内酯含量为 89.00%,后杂质含量为 10.84%,根据峰面积粗略计算,该段馏分中穿心莲内酯占总内酯的 2%。

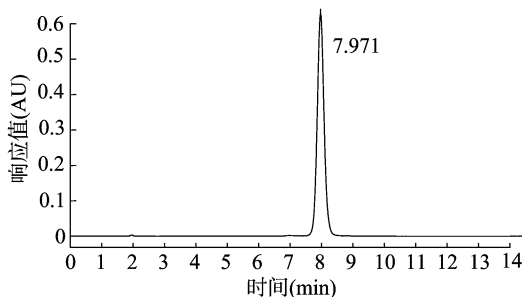


图10 馏分 F_1 纯度测定色谱图

3 结论

穿心莲内酯在 0.02 ~ 0.60 mg/mL 浓度范围内线性关系良好,相关系数为 0.999,可用于穿心莲内酯定量分析。

经甲醇乙酸铵水体系优化,穿心莲内酯溶解度有效提高,溶解量达到 5.30 mg/mL。

常温制备条件下,纯穿心莲内酯上样体积 120.0 mL,上样量为 636.0 mg,上样量占柱填料质量百分比约为 0.2%。馏分中穿心莲内酯纯度 99.27%,回收率为 86.00%。

张毅,钮福祥,孙健,等. 不同地区紫薯的花青素含量与体外抗氧化活性比较[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):205-207.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.058

不同地区紫薯的花青素含量与体外抗氧化活性比较

张毅,钮福祥,孙健,徐飞,朱红,岳瑞雪

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所,江苏徐州 221131)

摘要:为研究不同生长环境对紫薯花青素含量和体外抗氧化活性的影响,分别选取同时在我国两大甘薯主产区山东省和湖北省种植的 8 个紫薯品种(系),测定其干物率、花青素含量和体外抗氧化能力,通过多重比较分析品种(系)和地区之间的差异。结果表明,2 地区内参试样品间的干物率、花青素含量、总抗氧化能力和清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,简称 DPPH)自由基能力的差异均较大;山东地区种植的紫薯品种(系),除龙紫薯 4 号外,干物率极显著低于湖北地区种植的紫薯品种(系)($P < 0.01$);山东地区种植的紫薯品种(系),除漯紫薯 1 号外,花青素含量显著或极显著高于湖北地区种植的紫薯品种(系);总抗氧化能力和清除 DPPH 自由基能力与花青素含量呈极显著正相关关系($P < 0.01$)。

关键词:紫薯;花青素;抗氧化活性;干物率;多重比较

中图分类号:S531.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)21-0205-03

紫薯(*Ipomoea batatas* L.)属于旋花科一年生草本植物,富含的花青素具有着色、营养和保健等多重功能,是农业产业转型升级、结构调整的优势作物^[1]。紫薯的块根和茎叶中均含有花青素,尤其在块根中的含量非常高,是提取花青素的主要原料。国内一直在开展富含花青素紫薯品种的筛选培育工作,笔者所在研究所目前已经筛选出包括徐紫薯 3 号、徐紫薯 6 号和徐紫薯 8 号等数十个适合紫薯花青素加工的优良品种^[2-3]。

收稿日期:2017-01-16

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-10-B20);江苏徐淮地区徐州农业科学研究所科研基金(编号:2015001)。

作者简介:张毅(1987—),男,江苏徐州人,助理研究员,从事紫薯产后加工研究。E-mail:zhangyisnu@163.com。

通信作者:钮福祥,研究员,主要从事甘薯深加工研究。Tel:(0516)82028150;E-mail:niufuxiang@sina.com。

通过呼吸进入人体内的氧,少部分没有燃尽会转变为活性氧,活性氧可与体内的不成对电子结合形成自由基。人体内的自由基既可以帮助传递维持生命的能量,也可被用来杀灭病菌和寄生虫,还能参与毒素排出,一定范围内的自由基含量对人体是有益的。但当自由基在体内超过一定量时,会造成脂类代谢紊乱,引起蛋白质变性和酶失活,致使基因突变和细胞衰老,诱发多种慢性疾病。

花青素,以 C6-C3-C6 作为基本骨架,具有 2-苯基-苯并吡喃阳离子的典型结构,属类黄酮化合物。紫薯花青素具有抗氧化活性、抗炎活性、抗肿瘤活性及抑制肥胖等生物学作用^[4],特别是对自由基及机体抗氧化防御系统有明显的生理效应。目前关于环境对紫薯花青素含量与体外抗氧化活性影响的研究较少,本研究以 8 个紫薯品种(系)为材料,分别在山东泗水和湖北红安 2 地种植收获后,测定样品的干物率、花青素含量、总抗氧化能力和清除 DPPH 自由基能力,分析比较地区内样品本身的差异和地区间的差异,以期紫薯的育种、加工及综合利用提供理论依据。

参考文献:

- [1]靳鑫,时圣明,张东方,等. 穿心莲化学成分的研究[J]. 中草药,2012,43(1):47-50.
- [2]邵艳华. 穿心莲种质资源及其质量评价研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [3]李志亨,路新华,龙晓英,等. 穿心莲内酯的研究进展[J]. 时珍国医国药,2012(11):2854-2857.
- [4]管晨,李敏,任庆杰,等. 穿心莲内酯通过抗炎和调节免疫提高 EV71 感染小鼠的生存率[J]. 免疫学杂志,2013,29(9):737-744.
- [5]程慧娟,刘江,张庚. 穿心莲内酯抗铜绿假单胞菌生物被膜及与阿奇霉素协同抗菌作用[J]. 中国微生态学杂志,2012,24(2):120-123.
- [6]Sheeja K, Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic activity of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide [J]. International Immunopharmacology, 2007, 7(2):211-221.
- [7]Chao W W, Kuo Y H, Lin B F. Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF- κ B transactivation inhibition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(4):2505-2512.
- [8]李曙光,叶再元. 穿心莲内酯的药理活性作用[J]. 中华中医药学刊,2008,26(5):984-986.
- [9]王艳辉,王伽伯,郝庆秀,等. 不同产地穿心莲的含量测定,化学指纹图谱及抑菌活性评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):77-82.
- [10]徐靓. 穿心莲内酯的提取及纯化工艺研究[D]. 成都:成都理工大学,2007.
- [11]范云鸽,张秀莉,史作清,等. 大孔吸附树脂提取穿心莲总内酯的研究[J]. 离子交换与吸附,2002,18(1):30-35.