一种分离姜黄素的柱色谱方法(Ⅰ)

王平[1],陈小龙[2],陈斌[2],谢伟[2],章银军[2](1.浙江工业大学药学院,浙江 杭州 310014;2.浙江工业大学生物与环境工程学院,浙江 杭州 310014)

摘要:目的 建立一种提取与分离姜黄素的方法。方法 用醇提法从姜黄中提取姜黄素,用柱色谱法把姜黄素从醇提物中与其它杂质分离。结果 得到了纯度为79.4%的姜黄素样品。结论 醇提法和柱色谱法结合进行姜黄素的提取和分离是可行的。

关键词:姜黄素;柱色谱

中图分类号:R917.799.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)04-0328-03

The separation of curcumin with the column chromatography

WANG Ping[1], CHEN Xiao-long[2], CHEN Bin[2], XIE Wei[2], ZHANG Yin-jun[2] (1. *College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310014, China*; 2. *College of Biology and Environment Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310014, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for separation curcumin from turmeric. **METHOD** Curcumin was extracted from turmeric by ethanol, and separated from others with the column chromatography. **RESULTS** By way of the experiment, the purity curcumin of 79.4% was gained. **CONCLUSION** The method developed is feasible.

KEY WORD: curcumin; column chromatography

姜黄色素通常称为姜黄素[1],主要来源于姜科姜黄属植物姜黄的根茎。姜黄属植物主要包含挥发油和姜黄素类,后者为二苯基庚烃类,有酚性与非酚性之分。其中,姜黄素(curcumin)是中药姜黄的主要成分,有重要的经济价值和广泛的药理作用,如抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抗动脉粥样硬化、抗溃疡、促进微循环、降血脂等。目前,利用姜黄提制姜黄色素的方法有多种。常用的姜黄色素的提取方法主要有三种:有机溶剂提取法[2,3]、水提取法[4]、酶解法[5]。本实验采用有机溶剂提取法提取姜黄素粗提物,然后进行柱色谱,以期得到浓度较高的姜黄素产品。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材 川姜黄:重庆星光药材公司;片姜黄:杭州胡庆余堂大药房。

1.1.2 试剂 乙腈:色谱纯,上海陆都化学试剂厂;冰醋酸:分析纯,浙江兰溪试剂厂;水:纯净水,娃哈哈纯净水;乙醇:分析纯,安徽特酒总厂;二氯甲烷:分析纯,杭州双林化工试剂厂;正己烷:分析纯;硅胶:上海五四化学试剂有限公司;姜黄素标准品:上海医药工业研究所。

1.1.3 仪器 挥发油收集仪:上海玻璃厂;色谱柱:上海玻璃厂;紫外检测仪(SPD—10A):日本岛津(SHIMADZU);流动泵(LC—10AS):日本岛津;控制器(SCL—10A):日本岛津;柱温箱(CTO—10A):日本岛津;数据处理软件:N2000色谱工作站。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素的初提取 称取60g姜黄粉末,以1∶6的比例加入蒸馏水,搭好挥发油收集装置,电炉直接加热3h,先用挥发油收集器收集挥发油(得到挥发油3.3mL,倒人棕色瓶中,放入冰箱中保存,另用)。然后用旋转蒸发仪把烧瓶中水蒸干。再加入300mL的无水乙醇,用回流法热提取姜黄素60min。冷却至室温,用布氏漏斗减压过滤,收集滤液,旋转蒸发仪回收乙醇(50℃,真空度0.09),得到姜黄素浸膏。

1.2.2 姜黄素的粗品的脱油处理[6] 根据姜黄素微溶于水和正己烷的特点,将姜黄素浸膏,先用300mL蒸馏水浸泡6h,以去除那些水溶性的有机物,倒出水溶液,保留固体,再用300mL的正己烷浸泡6h,可以除掉一部分杂质,有利于下一步的分离纯化,回收正己烷。用100mL二氯甲烷与甲醇(97∶3)的混合液溶解剩余的固体,得到红色的溶液,倒入棕色瓶子,放入冰箱中保存,待用。

1.2.3 姜黄素的分离 采用硅胶做为吸附剂,称取10g的

中国现代应用药学 http://www.chinjmap.com

硅胶,装成 20cm x 1.8cm 高的干柱。用移液管加入 2mL的粗品,待溶液被硅胶吸附后,用蠕动泵加入洗脱剂,流速 1mL/min,洗脱,分步收集洗脱液,每管 5mL,共收集 7管。依次编号为 1~7,其中第 1管基本没有颜色,因此液相分析时就没有进样。将 7管溶液放在 50℃的水浴锅里小心蒸干,防止喷出来。再用 5mL的乙醇溶解,用簿膜将试管口扎紧,放入冰箱保存。

1.2.4 液相分析 流动相[7]:乙腈-水(含 9.6%的冰醋酸) 45∶55,色谱柱:CLC—ODS 150L×4.6,温度:30℃;检测波长:254nm;时间:20min,流速:1mL/min,积分方法:面积归一法。

流动相预处理:将乙腈、醋酸分别用 0.45μm的有机膜过滤,纯净水用 0.45μm的水膜过滤,按比例配制好水与醋酸的溶液,再以乙腈-水(45∶55)流动相,将其用超声波脱气,保存好待用。

将样品用 0.45μm的有机膜过滤,进样 20μL,用 N2000色谱工作站采集数据,得到样品的色谱图。

2 结果与讨论

2.1 药材的比较

分别称取 2g的片姜黄和川姜黄,直接用 50mL的无水乙醇热提取,冷却过滤,将滤液直接做液相分析,结果姜黄素的保留时间在 16.4min左右(图 1),比较姜黄和片姜黄的醇提物粗品的液相色谱图(图 2和图 3),可以看出,片姜黄中的杂质含量很高,而姜黄素的含量比较少,不利于下一步的分离纯化;而川姜黄中姜黄素的含量则较多。经过脱油处理的川姜黄的粗品(图 4),可以看出杂质含量较没有经过脱油的少了许多。

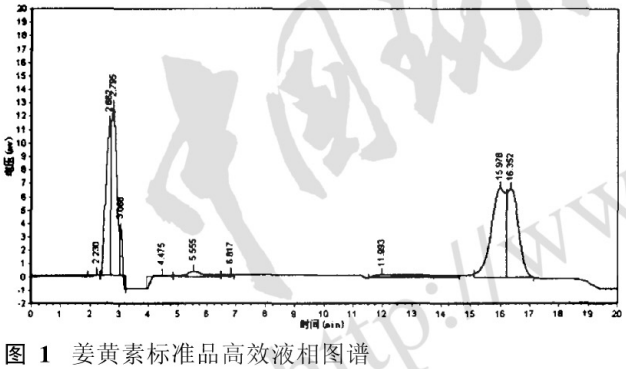

图 1 姜黄素标准品高效液相图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of curcumin standard substance

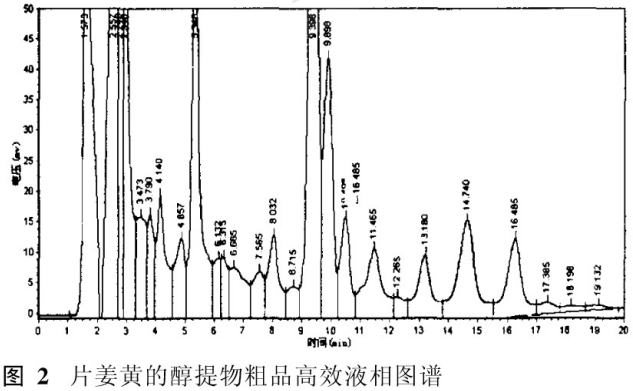

图 2 片姜黄的醇提物粗品高效液相图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of alcohol extract of *C. wenyujin* Y. H. chen etc. 1mg

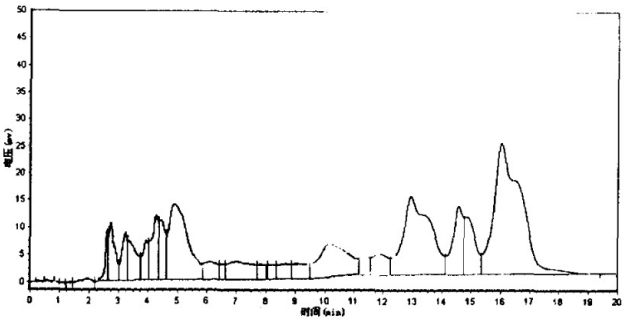

图 3 川姜黄的醇提物粗品高效液相图谱

Fig 3 HPLC spectrogram of alcohol extract of *Curcuma longa* L.

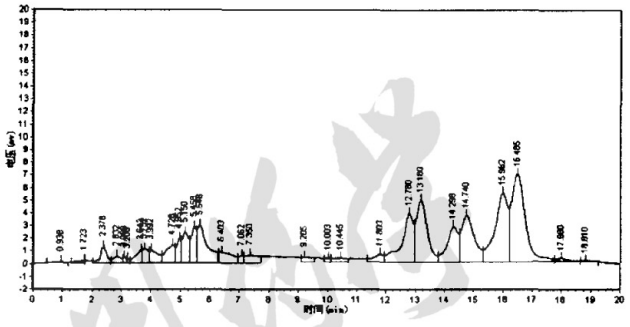

图 4 经过脱油处理的川姜黄粗品高效液相图谱

Fig 4 HPLC chromatogram of alcohol extract of *Curcuma longa* L. by skimming off the grease

2.2 标准曲线的绘制

准确称取姜黄素标准品 0.0104g用乙醇定容至 50mL,浓度为 208μg/mL。用此标准溶液稀释成 104、52、26、13μg/mL浓度的溶液。吸取标准品溶液,进行 HPLC分析,以浓度为横坐标,积分面积为纵坐标,绘制标准曲线。得到标准曲线的方程为 $y=4033.1x$,$R^2=0.9994$,相关系数 r为 0.9994,表明在该浓度范围内线性良好。

2.3 洗脱曲线的绘制

将保存的洗脱液 2~7管和没有层析过的粗品 1mL(先蒸干,再用 5mL的流动相溶解)做液相分析。从色谱图可以看出,姜黄素被分离得比较完全,姜黄素主要集中在第 2管,第 3管中也含有一部分,其他管都很少,不能够绘制洗脱曲线。由标准曲线的回归方程 $y=4033.1x$,可以计算出各管中所含的姜黄素的量,结果见表 1。

表 1 洗脱液各管中所含的姜黄素含量(每管 5mL)

Tab 1 Curcumin content of every eluent tube (every tube 5mL)

管号	峰面积	含量(μg/mL)	回收率(%)
2	1357181	336.51	85.97
3	248580	61.63	15.97
4	28716	7.12	1.8
5	28707	7.12	1.8
6	1604	0.397	0.09
粗品	394702	97.86	100

为此下一步重新做层析,只是收集洗脱液时,每管收集 1mL,作好标记,共收集 15管。将试管放在 50℃的水浴锅里小心蒸干,由于用无水乙醇溶解后,做液相时,会出现一个很高的溶剂峰,给积分带来很大的影响,所以这里采用流动相来做溶剂,这样就不会有一个很高的溶剂峰,减少积分的误差。得到的数据见表 2。

表 2 洗脱液各管中所含的姜黄素含量(每管 1mL)

Tab 2 Curcumin content of every eluent tube(every tube 1mL)

管号	峰面积
1	0
2	0
3	0
4	28153
5	135084
6	284485
7	285319
8	212274
9	130726
10	64834
11	40171
12	25668
13	27778

从表 2可以看出,姜黄素主要集中在 5~9号管中,也就是在第 5~9mL中,尤其是第 6~8管较多,因此下一步的收集 6~8三管,经干燥得到一定纯度姜黄素的样品,并计算其纯度。

2.4 姜黄素纯度的计算

收集第 6~8管的姜黄素,合并共 27 mL,取 0.5mL经在水浴锅里(50℃)干燥,用 2.5mL流动相溶解,测得其浓度为 374.593μg/mL,将洗脱液蒸干,测得其重为 0.0125g。

姜黄素的纯度 = 浓度 ×体积 /重量 ×100%

$= 3.74 \times 10^{-4} \times 26.5 / 0.0125 \times 100\%$

$= 79.4\%$

2.5 讨论

本实验是利用硅胶的极性吸附原理来分离姜黄素,粗品中的物质由弱到强依次被洗脱下来。用一定比例的二氯甲烷与丙酮的混合液(3∶1,9∶1,95∶5)进行实验,发现二氯甲烷-丙酮 =95∶5的洗脱效果较好。

用乙醇热提取姜黄素时,会有很多淀粉被乙醇溶解出来,虽然经过减压过滤,但是过滤之后还有大量的淀粉通过滤纸间隙而进入滤液。用二氯甲烷与甲醇溶解后,瓶壁上还有很多的固体没有溶解,可能就是淀粉。

用乙醇提取物直接做液相时,要用 0.45μm有机膜过滤两次,防止色谱柱被堵住。

色谱柱的制作也可以用湿柱法(石油醚浸泡),因石油醚极易挥发,安全性不好。用干柱法的好处是制作方便、减少有机溶剂消耗,提高安全性。

3 结论

本实验所得的姜黄素样品的纯度为 79.4%,如果再深入做下去,相信可以得到更高纯度的姜黄素,这有待下一步实验来证实。本实验证明用醇提法从姜黄中提取姜黄素,用柱层析法把姜黄素从醇提物中与其它杂质分离,从而达到一定纯度的姜黄素样品,是切实可行的。

参考文献

[1] 唐课文,周丹.从姜黄中提取姜黄素的研究[J].天然产物研究与开发,2004,16(3):231.

[2] 中国发明专利,CO9B61 /100,GK87101355.

[3] 王贤纯.姜黄色素及其提制方法[J].生物学杂志,2000,17(1):36.

[4] 中国发明专利,CO9B61 /100,GK88100041.

[5] 董海丽,纵伟.酶法提取姜黄素的研究[J].纯碱工业,2000,6:55.

[6] 吴伟志,袁翠美.姜黄素的高效液相色谱分析[J].中国野生植物资源,1998,3:56.

[7] 汤球华,胡永狮.姜黄、莪术、郁金中姜黄素的含量[J].海峡药学,1998,3:30.

收稿日期:2003-10-15

中国现代科技网 http://www.cnki.net