

# 鸡骨草叶中*N*-反式对香豆酰酪氨酸的纯化工工艺优化<sup>Δ</sup>

门丽娇\*,刘亚迪,邱雨,袁旭江\*(广东药科大学新药研发中心,广州 510006)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1352-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.12

**摘要** 目的:建立鸡骨草叶中*N*-反式对香豆酰酪氨酸的含量测定方法,并优化其纯化工工艺。方法:采用高效液相色谱法测定鸡骨草叶中*N*-反式对香豆酰酪氨酸的含量,色谱柱为Hypersil BDS C<sub>18</sub>,流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B)(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,检测波长为300 nm,进样量为10 μL。以聚酰胺树脂为材料,以*N*-反式对香豆酰酪氨酸得率为指标,采用单因素试验优化*N*-反式对香豆酰酪氨酸纯化的样品溶液质量浓度、上样量、静置吸附时间等条件。结果:*N*-反式对香豆酰酪氨酸检测进样量线性范围为2.575~51.50 μg( $r=0.9999$ );定量限为0.000 618 μg,检测限为0.000 129 μg;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率为97.04%~102.43%(RSD=2.06%, $n=6$ )。最优纯化工工艺为样品溶液质量浓度为0.04 g/mL(以鸡骨草叶药材计),上样量为50 mL,上样流速为1.0 mL/min,静置吸附时间为20 min,以水(含0.1%乙酸)、20%乙醇(含0.1%乙酸)、氨水(pH 10)为洗脱溶剂依次洗脱。此纯化工工艺条件下,制得的*N*-反式对香豆酰酪氨酸的平均得率为98.94%,平均干膏含量为61.17 mg/g,平均干膏纯度为19.73%。结论:所建含量测定方法简便、准确、稳定性较好;优化所得工艺稳定、可行。

**关键词** 鸡骨草;叶;*N*-反式对香豆酰酪氨酸;高效液相色谱法;纯化工工艺;柱层析法

## Optimization of Purification Technology of *N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine in Leaves of *Abrus cantoniensis*

MEN Lijiao, LIU Yadi, QIU Yu, YUAN Xujiang (Center for New Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for content determination of *N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine in leaves of *Abrus cantoniensis*, and to optimize its purification technology. METHODS: HPLC method was adopted for the content determination of *N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine in *A. cantoniensis*. The determination was performed on Hypersil BDS C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid water (A)-methanol (B) (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 25 °C. The detection wavelength was set at 300 nm, and sample size was 10 μL. Using polyamide resin as material, the yield of *N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine as indicators, single factor test was used to optimize the purification technology of *N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine, such as concentration, sample size, stationary adsorption time. RESULTS: The linear range was 2.575-51.50 μg ( $r=0.9999$ ) for *N*-(*E*)-*p*-coumaroyl-tyrosine. The limit of quantification was 0.000 618 μg, and the detection limit was 0.000 129 μg. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The recoveries were 97.04% -102.43% (RSD=2.06%,  $n=6$ ). The optimal purification technology was as follows: the concentration of the sample solution was 0.04 g/mL (by the leaves of *A. cantoniensis*); sample capacity 50 mL; the sample flow rate was 1.0 mL/min; the stationary adsorption time was 20 min; the eluting solvents were ammonia containing water (containing 0.1% acetic acid), 20% ethanol (containing 0.1% acetic acid) and ammonia (pH 10). Average yield was 98.94%, average dry paste content was 61.17 mg/g, and average dry paste purity was 19.73% by optimal purification technology. CONCLUSIONS: Established method is simple, accurate and stable. The optimized technology is stable and feasible.

**KEYWORDS** *Abrus cantoniensis*; Leaves; *N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine; HPLC; Purification technology; Column chromatography

*N*-反式对香豆酰酪氨酸[*N*-(*E*)-*p*-coumaroyltyrosine]为酚类氨基酸衍生物,最早被发现于非洲黑木树皮中<sup>[1]</sup>。随着研究的不断深入,至今发现含有该成分的植物还有可可<sup>[2]</sup>、山茱萸根<sup>[3]</sup>、阔叶野韭菜花和茎<sup>[4]</sup>、常春藤新鲜叶子<sup>[5]</sup>等。在生物活性方面,Osakabe N<sup>[6]</sup>通过实验动物模型研究了含有*N*-反式对香豆酰酪氨酸的可可

提取液中粗多酚的生物活性,结果表明其对乙醇诱导的胃溃疡具有一定的保护作用,可抑制维生素E缺乏大鼠的氧化应激,降低高胆固醇血症模型兔的氧化敏感性,抑制小鼠皮肤的癌变,同时还可抑制杂环胺的致突变作用。Mokhtar M等<sup>[7]</sup>研究发现,辣椒多酚提取物具有抗菌和抗氧化活性,可降低癌细胞的活力,而*N*-反式对香豆酰酪氨酸是该提取物可能发挥生物活性的成分之一。抑制一氧化氮(NO)合酶介导的NO过表达可能是治疗包括神经炎性疾病在内的炎症性疾病的药物靶点。Hu XL等<sup>[8]</sup>利用酶活性和对接试验显示,*N*-反式对香豆酰酪氨酸对诱导型靶标产生的NO合酶有抑制作用。由此可见,*N*-反式对香豆酰酪氨酸具有多种生物活

Δ 基金项目:广东省科技创新战略专项资金立项项目(No.2018A-030313312);广东省科技发展专项资金项目(No.2016A030310302);广东省科学技术厅-广东省中医药科学院联合科研项目(No.2014A020221105)

\* 硕士研究生。研究方向:中药质量分析与评价。电话:020-39352540。E-mail:976799165@qq.com

# 通信作者:副研究员,博士。研究方向:中药开发利用及质量分析。电话:020-39352540。E-mail:xjyuan.xj@163.com

性,但其在植物纯化富集和分析方面的研究较少。笔者在前期研究中发现,鸡骨草叶中含有 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸,且含量较高<sup>[9-10]</sup>。为此,本研究在建立测定鸡骨草叶中 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸含量高效液相色谱法(HPLC)的基础上,采用单因素试验优化 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸的纯化工艺,旨在为其开发利用和质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括二极管阵列检测器、真空脱气机、四元泵、自动进样器和柱温箱(美国Agilent公司);BP211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);JJ1000型千分之一电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);BHS-4型数显恒温水浴锅(江阴市保利科研器械有限公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

$N$ -反式对香豆酰酪氨酸对照品(广东药科大学新药研发中心自制,批号:20180601,纯度: $>99\%$ );聚酰胺树脂(100~200目,台州市路桥四甲生化塑料厂);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

### 1.3 药材

24批鸡骨草叶药材(编号:S1~S24)经广东药科大学新药研发中心袁旭江副研究员鉴定分别为豆科(*Leguminosae*)植物相思子属(*Abrus Adans.*)的广州相思子(*Abrus cantoniensis* Hance)或毛相思子(*Abrus mollis* Hance)的干燥叶。药材样品来源见表1。

## 2 方法与结果

### 2.1 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱1:Hypersil BDS C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~20 min, 33%B→51%B);流速:1.0 mL/min;柱温:25℃;检测波长:300 nm;进样量:10 μL。在该色谱条件下, $N$ -反式对香豆酰酪氨酸色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于1.5,理论板数大于5 000,阴性对照对测定无干扰,详见图1。

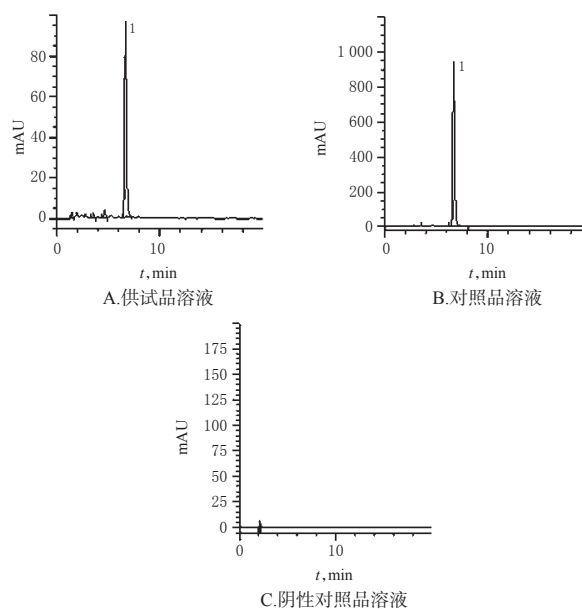
2.1.2 对照品溶液的制备 取 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸对照品适量,精密称定,置于50 mL量瓶中,加50%乙醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为5.15 mg/mL的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取药材样品2.0 g,精密称定,置于锥形瓶中,按照1:30的比例(g/mL)加入20%乙醇,于95℃加热回流3次,每次1 h,滤过,合并3次滤液,减压回收至无醇味,浓缩液加水定容至50 mL。取全部样品上聚酰胺柱(100~200目,5.0 g,湿法上柱,直径2.5

表1 药材样品来源

Tab 1 Source of medicinal sample

编号	采收时间	来源	品种
S1	2013年07月01日	广东惠州	鸡骨草(广州相思子)
S2	2013年08月01日	广东梅州	鸡骨草(广州相思子)
S3	2015年11月10日	广东肇庆	鸡骨草(广州相思子)
S4	2016年09月10日	广州家种	毛鸡骨草(毛相思子)
S5	2017年11月01日	广州家种	鸡骨草(广州相思子)
S6	2017年10月20日	广东英德	鸡骨草(广州相思子)
S7	2015年10月20日	广东云浮	鸡骨草(广州相思子)
S8	2017年04月15日	广州萝岗岭头村	毛鸡骨草(毛相思子)
S9	2013年12月21日	广东河源	鸡骨草(广州相思子)
S10	2014年05月03日	广东清远	鸡骨草(广州相思子)
S11	2015年01月03日	广西钦州	鸡骨草(广州相思子)
S12	2017年07月18日	广东河源	鸡骨草(广州相思子)
S13	2017年07月18日	广东河源	鸡骨草(广州相思子)
S14	2012年02月01日	广西玉林	鸡骨草(广州相思子)
S15	2012年02月01日	广西桂林	鸡骨草(广州相思子)
S16	2016年07月12日	广东揭阳	鸡骨草(广州相思子)
S17	2017年09月12日	广东汕头	鸡骨草(广州相思子)
S18	2012年01月29日	广西南宁	鸡骨草(广州相思子)
S19	2016年09月15日	广东广州	鸡骨草(广州相思子)
S20	2016年09月10日	广东广州	毛鸡骨草(毛相思子)
S21	2016年12月09日	广东广州	毛鸡骨草(毛相思子)
S22	2015年12月01日	广西玉林	鸡骨草(广州相思子)
S23	2016年07月10日	福建龙岩	鸡骨草(广州相思子)
S24	2010年11月29日	广西桂林	鸡骨草(广州相思子)



注:1.  $N$ -反式对香豆酰酪氨酸

Note: 1.  $N$ -( $E$ )- $p$ -coumaroyltyrosine

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

cm,长40 cm),上样流速1.0 mL/min,依次用水(含0.1%乙酸)、20%乙醇(含0.1%乙酸)洗脱至流出液无色后,再用氨水(pH 10)洗脱至无色,收集氨水洗脱液,减压浓缩至干,残渣置于50 mL量瓶中,加50%乙醇溶解并定容。取适量经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 取50%乙醇适量,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得阴性对照溶液。

2.1.5 线性关系及不同色谱柱适用性考察 取“2.1.2”项下对照品溶液0.5、1、2、5、8、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加50%乙醇定容,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸回归方程为 $y=441.34x-8.2594$  ( $r=0.9999$ ) (色谱柱1);  $y=447.20x-64.3090$  ( $r=0.9999$ ) [色谱柱2: Hypersil BDS  $C_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)],表明 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸检测进样量的线性范围为2.575~51.50 μg,详见表2。

表2 不同色谱柱的线性关系及适用性考察结果

Tab 2 Linear range of different chromatogram column and suitability

进样量, μg	峰面积(色谱柱1)	峰面积(色谱柱2)	RSD, %
2.575	1 106.2	1 127.9	1.37
5.15	2 255.3	2 250.7	0.14
10.30	4 518.7	4 519.8	0.01
25.75	11 436.0	11 403.7	0.20
41.20	18 196.6	18 320.2	0.48
51.50	22 668.5	23 023.5	1.20

2.1.6 定量限与检测限考察 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果, $N$ -反式对香豆酰酪氨酸的定量限为0.000 618 μg、检测限为0.000 129 μg。

2.1.7 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S15)10 μL,按“2.1.1”项下色谱条件于同日内连续进样测定6次,记录峰面积。结果, $N$ -反式对香豆酰酪氨酸峰面积的RSD为1.15% ( $n=6$ ),表明本方法日内精密度良好。精密量取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S15)10 μL,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定3 d,记录峰面积。结果, $N$ -反式对香豆酰酪氨酸峰面积的RSD为1.14% ( $n=3$ ),表明本方法日间精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S15)适量,分别于室温放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $N$ -反式对香豆酰酪氨酸峰面积的RSD为0.30% ( $n=7$ ),表明供试品溶液于室温下放置24 h内基本稳定。

2.1.9 重复性试验 取药材样品(编号:S15)适量,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按回归方程计算样品含量。结果, $N$ -反式对香豆酰酪氨酸的平均含量为11.81 mg/g, RSD为2.43% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 取已知含量的药材样品(编

号:S15)1.0 g,精密称定,共6份,分别加入一定量的 $N$ -反式对香豆酰酪氨酸对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 3 Results of recovery tests( $n=6$ )

样品称量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1.0019	11.84	11.50	23.03	97.30		
1.0025	11.85	11.50	23.63	102.43		
1.0010	11.83	11.50	23.40	100.61	99.41	2.06
1.0011	11.83	11.50	23.27	99.48		
1.0015	11.84	11.50	23.29	99.57		
1.0011	11.83	11.50	22.99	97.04		

2.1.11 样品含量测定 取24批样品,每批2.0 g,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,平行操作3次,记录峰面积并按回归方程计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 4 Results of content determination of samples ( $n=3$ )

编号	样品含量, mg/g	干膏含量, mg/g	干膏纯度, %
S1	9.94	61.43	16.18
S2	25.70	69.83	36.80
S3	8.12	62.35	13.03
S4	7.95	34.99	22.71
S5	17.07	49.01	34.82
S6	11.03	49.68	22.21
S7	24.56	55.83	43.99
S8	31.85	74.50	42.75
S9	17.94	55.64	32.25
S10	25.40	52.46	48.43
S11	16.83	56.33	29.87
S12	5.74	46.56	12.32
S13	14.92	54.41	27.43
S14	3.18	64.24	4.95
S15	11.81	61.16	19.32
S16	13.49	79.13	17.08
S17	17.03	51.92	32.80
S18	13.06	65.49	19.94
S19	18.52	74.66	24.81
S20	29.30	55.78	52.53
S21	25.07	40.44	61.99
S22	7.36	80.33	9.16
S23	12.46	64.85	19.22
S24	5.96	75.36	7.90

2.1.12 干膏含量及干膏纯度测定 供试品溶液用氨水洗脱后,定容至50 mL,取40 mL,按2015年版《中国药典》(三部)通则干燥失重法干燥后得样品干膏<sup>[1]</sup>,并计算干膏含量及干膏纯度。干膏含量(mg/g)=(减失的质量 $\times$ 5/4)/样品质量;干膏纯度(%)= $N$ -反式对香豆酰酪氨酸在样品中的含量/干膏含量 $\times$ 100%,结果见表4;干膏含量与干膏纯度的相关性散点图见图2。由图2可知,干膏含量与干膏纯度存在线性关系( $R^2=0.8341$ )。

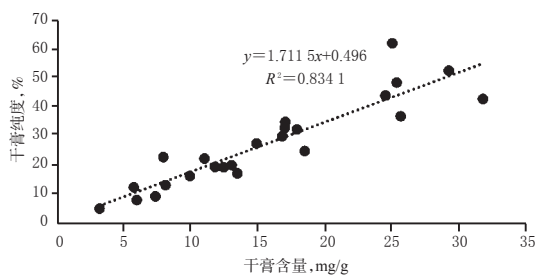


图2 相关性散点图

Fig 2 Scattered plot of correlation

## 2.2 N-反式对香豆酰酪氨酸纯化工艺优化

2.2.1 纯化前样品溶液制备 取药材样品 40.0 g, 置于圆底烧瓶中, 按照 1:30 的比例(g/mL)加入 20% 乙醇, 于 95 °C 加热回流 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并 3 次滤液, 减压回收至无醇味, 浓缩液加水定容至 1 000 mL, 即得。

2.2.2 洗脱溶剂考察 称取聚酰胺树脂 5.0 g, 共 2 份, 每份分为 2 柱, 分别湿法上柱, 取“2.2.1”项下样品溶液 50 mL, 上样流速 1.0 mL/min, 静置吸附时间 20 min, 样品溶液质量浓度 0.04 g/mL (以鸡骨草叶药材计, 下同), 每柱依次用水(含 0.1% 乙酸)、20% 乙醇(含 0.1% 乙酸)、氨水(pH 10)洗脱至流出液无色, 分别收集水洗脱液、乙醇洗脱液和氨水洗脱液, 减压浓缩至干, 残渣加 50% 乙醇定容至 25 mL, 每个样品平行 2 份, 取适量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果, 水洗脱液、乙醇洗脱液中 N-反式对香豆酰酪氨酸得率均为 0, 但水溶性杂质和黄酮类成分被洗脱, 氨水洗脱液中 N-反式对香豆酰酪氨酸得率分别为 96.27%、100.03%, 提示 N-反式对香豆酰酪氨酸被富集在氨水洗脱液中, 故选择用水(含 0.1% 乙酸)、20% 乙醇(含 0.1% 乙酸)、氨水(pH 10)为洗脱溶剂依次洗脱, 并收集氨水洗脱液进行含量测定(氨水洗脱液中 N-反式对香豆酰酪氨酸的质量/样品溶液中 N-反式对香豆酰酪氨酸的质量×100%)。

2.2.3 静置吸附时间考察 称取聚酰胺树脂 5.0 g, 共 6 份, 分为 3 组(每组 2 柱), 分别湿法上柱, 取“2.2.1”项下样品溶液 50 mL, 上样流速 1.0 mL/min, 样品溶液质量浓度 0.04 g/mL, 每组分别静置吸附 5、10、20 min, 每柱依次用水(含 0.1% 乙酸)、20% 乙醇(含 0.1% 乙酸)、氨水(pH 10)洗脱至流出液无色, 弃去水洗脱液、乙醇洗脱液, 分别收集每柱的氨水洗脱液, 减压浓缩至干, 残渣加 50% 乙醇定容至 25 mL, 每个样品平行 2 份, 取适量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果, N-反式对香豆酰酪氨酸得率分别为 94.34%、98.65%、99.65%。这提示静置吸附时间越长, N-反式对香豆酰酪氨酸吸附得越紧密, 在前期经水、乙醇洗脱时越不易随杂质洗脱, 综合考虑, 最终选择静置吸附时间为 20 min。

2.2.4 上样量考察 称取聚酰胺树脂 5.0 g, 共 6 份, 分为 3 组(每组 2 柱), 分别湿法上柱, 取“2.2.1”项下样品溶液 30、50、70 mL, 上样流速 1.0 mL/min, 静置吸附时间 20 min, 样品溶液质量浓度 0.04 g/mL, 每柱依次用水(含 0.1% 乙酸)、20% 乙醇(含 0.1% 乙酸)、氨水(pH 10)洗脱至流出液无色, 弃去水洗脱液、乙醇洗脱液, 分别收集每柱的氨水洗脱液, 减压浓缩至干, 残渣加 50% 乙醇定容至 25 mL, 每个样品平行 2 份, 取适量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果, N-反式对香豆酰酪氨酸得率分别为 100.11%、100.02%、97.05%。这提示当上样量为 70 mL 时, N-反式对香豆酰酪氨酸不能被聚酰胺树脂完全吸附, 综合考虑, 最终选择上样量为 50 mL。

2.2.5 样品溶液质量浓度考察 称取聚酰胺树脂 5.0 g, 共 6 份, 分为 3 组(每组 2 柱), 分别湿法上柱, 取“2.2.1”项下样品溶液 50 mL, 分别制成质量浓度为 0.02、0.04、0.06 g/mL 的上样液, 上样流速 1.0 mL/min, 静置吸附时间 20 min, 每柱依次用水(含 0.1% 乙酸)、20% 乙醇(含 0.1% 乙酸)、氨水(pH 10)洗脱至流出液无色, 弃去水洗脱液、乙醇洗脱液, 分别收集每柱的氨水洗脱液, 减压浓缩至干, 残渣加 50% 乙醇定容至 25 mL, 每个样品平行 2 份, 取适量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果, N-反式对香豆酰酪氨酸得率分别为 101.32%、100.22%、100.42%。这提示当样品溶液质量浓度为 0.02~0.06 g/mL 时, N-反式对香豆酰酪氨酸均可被全部洗脱下来, 考虑到实际操作, 最终选择样品溶液质量浓度为 0.04 g/mL。

2.2.6 酸性洗脱溶剂含酸量考察 称取聚酰胺树脂 5.0 g, 共 6 份, 分为 3 组(每组 2 柱), 分别湿法上柱, 取“2.2.1”项下样品溶液 50 mL, 上样流速 1.0 mL/min, 静置吸附时间 20 min, 样品溶液质量浓度 0.04 g/mL, 每柱依次用不含乙酸、含 0.1% 乙酸、含 0.2% 乙酸的水和不含乙酸、含 0.1% 乙酸、含 0.2% 乙酸的 20% 乙醇、氨水(pH 10)洗脱至流出液无色, 弃去水洗脱液、乙醇洗脱液, 分别收集每柱的氨水洗脱液, 减压浓缩至干, 残渣加 50% 乙醇定容至 25 mL, 每个样品平行 2 份, 取适量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果, N-反式对香豆酰酪氨酸得率分别为 0、100.20%、101.12%。这提示在洗脱溶剂中增加适量的乙酸可使 N-反式对香豆酰酪氨酸在聚酰胺树脂上的吸附力加大, 提高得率, 考虑到经济成本, 最终选择酸性洗脱溶剂为水(含 0.1% 乙酸)。

2.2.7 验证试验 按上述考察结果得到最优纯化工艺为 0.04 g/mL 样品溶液 50 mL、上样流速 1.0 mL/min、静

置吸附时间 20 min,以水(含 0.1%乙酸)、20%乙醇(含 0.1%乙酸)、氨水(pH 10)为洗脱溶剂依次洗脱,在此纯化工艺条件下制备 *N*-反式对香豆酰酪氨酸,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,平行操作 3 次,结果见表 5。

表 5 验证试验结果( $n=3$ )

Tab 5 Results of verification test( $n=3$ )

试验号	样品含量,mg/g	干膏含量,mg/g	干膏纯度,%	<i>N</i> -反式对香豆酰酪氨酸得率,%
1	12.07	61.17	19.73	98.97
2	12.03	61.11	19.69	98.65
3	12.10	61.22	19.76	99.20
平均值	12.07	61.17	19.73	98.94
RSD,%	0.29	0.09	0.18	0.28

### 3 讨论

鸡骨草叶总提取液工艺可将 *N*-反式对香豆酰酪氨酸完全提取。笔者在富集纯化时通过比较发现,使用聚酰胺树脂比硅胶、大孔树脂吸附效果更好,且提取液中加入少量乙酸可较好地促进目标成分的吸附,去除黄酮类等杂质。故选择洗脱溶剂、静置吸附时间、上样量、样品溶液质量浓度和酸性洗脱剂含酸量为考察因素,进一步探讨这些因素对 *N*-反式对香豆酰酪氨酸纯化富集的影响,以筛选出最佳工艺参数,为后期高纯度单体制备提供依据。

本研究采用 HPLC 法进行含量测定时,得到了较为单一的 *N*-反式对香豆酰酪氨酸峰,这为 *N*-反式对香豆酰酪氨酸的分析和质量评价提供了有利的分析条件。通过不同色谱柱适用性和方法学考察,发现该方法专属性较强,且色谱柱的长短对该成分的分析无显著影响。为实现快速分析,本试验最终采用短柱进行含量测定。

笔者通过对不同来源鸡骨草叶进行含量测定时发现,广州相思子和毛相思子的样品含量范围分别为 3.18~25.70、7.95~31.85 mg/g;相对于广东,广西产鸡骨草叶中 *N*-反式对香豆酰酪氨酸含量相对较低,提示产地不同可导致成分含量存在一定的差异;另外,采收期的不同也可使样品含量存在一定的差异<sup>[12]</sup>,但是否具有规律性有待后续研究进一步探讨。不同来源鸡骨草叶中 *N*-反式对香豆酰酪氨酸干膏纯度为 4.95%~61.99%,经相关性分析结果显示,干膏纯度与干膏含量存在线性关系,这为后期 *N*-反式对香豆酰酪氨酸的进一步纯化及单体制备的选材奠定了基础。

综上所述,所建含量测定方法简便、准确、稳定性较好;优化所得工艺稳定、可行。

### 参考文献

[1] HEERDEN FRV, BRANDT EV, ROUX DG. Isolation and

synthesis of trans-and cis-(-)-clovamides and their deoxy analogues from the bark of *Dalbergia melanoxylon*[J]. *Phytochemistry*, 1980, 19(10):2125-2129.

[2] SANBONGI C, OSAKABE N, NATSUME M, et al. Antioxidative polyphenols isolated from theobroma cacao[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(2):454-457.

[3] SENDKER J, BÖKER I, LENGERS I, et al. Phytochemical characterization of low molecular weight constituents from marshmallow roots (*althaea officinalis*) and inhibiting effects of the aqueous extract on human hyaluronidase-1[J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(2):290-297.

[4] ZOLFAGHARI B, BARILE E, CAPASSO R, et al. The saponin atroviolacegenin and its diglycoside atroviolaceoside from *Allium atroviolaceum*[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(2):191-195.

[5] HENSEL A, DETERS AM, MÜLLER G, et al. Occurrence of *N*-phenylpropenoyl-L-amino acid amides in different herbal drugs and their influence on human keratinocytes, on human liver cells and on adhesion of *Helicobacter pylori* to the human stomach[J]. *Planta Med*, 2007, 73(2):142-150.

[6] OSAKABE N. Antioxidative polyphenolic substances in cacao liquor[J]. *Acs Symposium*, 2000. DOI: 10.1021/bk-2000-0754.ch011.

[7] MOKHTAR M, SOUKUP J, DONATO P, et al. Determination of the polyphenolic content of a *Capsicum annum* L. extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity[J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(2):171-178.

[8] HU XL, LIN J, LV XY, et al. Synthesis and biological evaluation of clovamide analogues as potent antineuroinflammatory agents in vitro and in vivo[J]. *Eur J Med Chem*, 2018. DOI:10.1016/j.ejmech.2018.03.081.

[9] 袁旭江,张平,李春阳,等.毛鸡骨草叶中一个新的吐昔酰胺类成分[J].*药学学报*, 2016, 51(10):1595-1599.

[10] 马琼.木棉花化学成分研究及活性部位的抗糖尿病作用[D].呼和浩特:内蒙古大学,2016.

[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:831.

[12] 袁旭江,李春阳,张平.不同品种鸡骨草叶中鸡骨草甲素含量比较[J].*现代中药研究与实践*, 2014, 28(4):19-22.

(收稿日期:2018-11-23 修回日期:2019-02-28)

(编辑:陈宏)