

• 制剂与质量 •

 β -环糊精键合固定相分离纯化银杏叶提取物和银杏黄酮邓利¹, 孙猛¹, 谭天伟¹, 王芳¹, Janson Jan Christer²

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029;

2. Surface Biotechnology Centre, Uppsala University, Sweden)

摘要:目的 考察以 β -环糊精(β -CD)为键合固定相的色谱柱分离纯化银杏叶提取物和银杏黄酮的影响因素。方法 以色谱图中色谱峰的个数和目标物为高度为指标, 采用低压液相色谱技术对银杏叶提取物和银杏黄酮进行分离纯化。同时比较固定相、流动相、缓冲液、pH值、洗脱速度和上样体积对分离结果的影响。结果 氯代环氧丙烷偶联 β -CD-Superose 12 pg键合相能够较好地分离银杏叶提取物和银杏黄酮, 优于葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20。结论 β -环糊精键合固定相适用于银杏叶提取物和银杏黄酮的分离与纯化。

关键词: β -环糊精键合固定相; 银杏叶提取物; 银杏黄酮; 分离纯化

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)10-1105-05

Purification of *Ginkgo biloba* leaf extract and flavone on β -cyclodextrin-Superose 12 pgDENG Li¹, SUN Meng¹, TAN Tian-wei¹, WANG Fang¹, JANSON Jan Christer²

(1. Beijing Bioprocess Key Laboratory, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029, China; 2. Surface Biotechnology Centre, Uppsala University, Sweden)

Abstract: **Object** Study on the effect factors of chromatographic column bonded by β -cyclodextrin(β -CD)-Superose 12 pg for separation and purification of *Ginkgo biloba* leaf extract (GBLE) and *Ginkgo biloba* flavone (GBF). **Methods** Number of chromatographic peaks and resolution of desired peak as indexes, low pressure column chromatography was carried out to separate and purify GBLE and GBF. The separation conditions including stationary phase, mobile phase, buffer, pH value, elutotropic rate, and loading capacity were analyzed. **Results** Column bonded by β -CD-Superose 12 pg has better efficiency than Sephadex LH-20 to separate and purify GBLE and GBF. **Conclusion** The new chromatographic stationary phase is suitable to isolation and purification of GBLE and GBF.

Key words: β -cyclodextrin (β -CD)-Superose 12 pg; *Ginkgo biloba* leaf extract (GBLE); *Ginkgo biloba* flavone (GBF)

银杏为我国特有的珍稀植物, 银杏叶制剂在临床上广泛用于治疗心脑血管疾病。目前认为银杏的活性部位为黄酮类化合物和内酯类化合物。黄酮类化合物传统的分离纯化方法包括各种吸附色谱或分配色谱、葡聚糖凝胶分子筛、梯度pH萃取, 但这些方法分离过程复杂、效率低。 β -环糊精(β -CD)具有特殊分子结构, 锥形的环状空穴, 锥体外侧边框连有大量羟基而呈亲水性, 内部空腔处于 CH_2 基团的屏蔽下而呈疏水性^[1]。当客体分子进入 β -CD的空穴, 就形成具有特效亲和作用的包合配合物。 β -CD的硅胶键合固定相已经应用于HPLC分析中, 特别是分离对映异构体方面^[2,3]。琼脂糖凝胶具有大孔性、羟基

多、刚性好、特异性吸附少、理化性质稳定等特点, 广泛应用于亲和色谱介质的合成。本实验采用交联琼脂糖凝胶为基体, β -CD为配基, 合成新型 β -环糊精键合相, 采用低压液相色谱技术, 以银杏叶提取物为对象, 分离纯化银杏叶黄酮和黄酮苷元, 并对黄酮苷元的最佳分离条件进行了考察。

1 仪器与材料

LP-20C恒流泵(北京卫星制造厂), 8823A紫外检测器(北京新技术应用研究所), 3057记录仪(四川仪表四厂), 七通进样器(瑞典法玛西亚惠赠), 自动馏份收集器(LKB), 数据工作站(自编), 岛津10Avp高效液相色谱仪。

收稿日期: 2004-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29976004); 北京自然科学基金博士点基金资助项目(2032013); 教育部优秀青年教学科技奖励基金资助; 霍英东奖励基金资助

作者简介: 邓利(1971—), 男, 湖北黄石人, 博士, 副教授, 2002年10月—2003年6月在丹麦技术大学作访问学者, 主要从事生物分离和生物催化方向的研究, 在国内外核心期刊发表论文近20篇, SCI和EI收录6篇。

E-mail: dengli@mail.buct.edu.cn Tel: (010) 64433396 Fax: (010) 64451572

β -CD 键合固定相由瑞典 Uppsala 大学 Janson 教授合成提供。合成方法如下:第一步为凝胶的活化,先用蒸馏水洗涤 Superose 12 pg,然后将蒸馏水、Superose 12 pg 和 50% NaOH 溶液加入反应瓶中,控温搅拌反应,然后向反应瓶中缓慢流加环氧氯丙烷,并加入醋酸调节 pH,最后用蒸馏水洗涤凝胶,得到环氧氯丙烷活化的 Superose 12 pg。第二步为偶联 β -CD,将蒸馏水、活化的凝胶和 50% NaOH、 NaBH_4 加入到反应瓶中均匀搅拌,控温进行偶联反应,并用醋酸调节 pH。反应结束后,用少量蒸馏水洗涤不溶反应物。

色谱填充柱:①号柱(10 cm $\times$ 1.6 cm,自己填充),用氯代环氧丙烷偶联 β -CD 的 Superose 12 pg (16 mg/mL);②号柱(10 cm $\times$ 1.6 cm,自己填充),用双环氧化物偶联 β -CD 的 Superose 12 pg (6.6 mg/mL);③号柱(10 cm $\times$ 1.6 cm,自己填充), β -CD 偶联到环氧活化的 Sepharose 6B (17 mg/mL);④号柱 Sephadex LH-20 (90 cm $\times$ 1.6 cm,自己填充柱);⑤号柱 Superose FPLC (25 cm $\times$ 1.0 cm,商品分析柱)。试剂均为分析纯,银杏叶提取物由中国蓝田集团提供,槲皮素对照品由中国药品生物制品检定所提供。

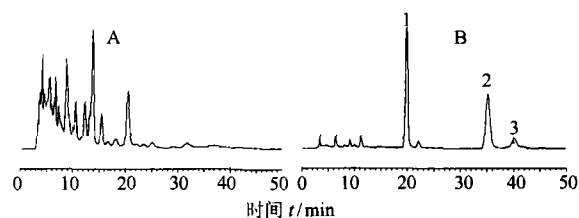
2 方法与结果

2.1 溶液的制备:取银杏叶提取物适量溶于 20% 乙醇溶液,作为样品 A。精密称取银杏叶提取物 50 mg,加甲醇-25% 盐酸(4:1)溶液 25 mL,水浴加热回流 30 min,迅速冷却至室温,移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为样品 B。

2.2 定性定量分析方法的确立:样品 A 主要成分是银杏黄酮醇类化合物,是 3 种苷元(槲皮素、山柰酚、异鼠李素)为基本骨架的没食子酰基糖苷,其成分十分复杂,无法定性所得的峰,实验中主要观察各个分离谱图中峰的个数的多少;样品 B 的主要成分为槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 种苷元^[4],成分较为简单,可以通过分步收集各个峰进行定性定量。见图 1。

2.2.1 黄酮苷元的分离:采用 2 mL 全充环管进样,常温下甲醇-0.4% 磷酸水溶液(1:1) 1 mL/min 洗脱,检测波长为 254 nm,观察出峰情况,分步收集各目标物。

2.2.2 分析色谱条件:ODS 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,北京北分厂提供);流动相:甲醇-0.4% 磷酸(1:1);检测波长:254 nm;体积流量:0.8 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$ 。

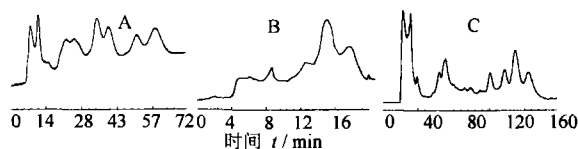


1-槲皮素 2-山柰酚 3-异鼠李素
1-quercetin 2-kaempferol 3-isorhamnetin

图 1 银杏叶提取物(A)和银杏黄酮(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of GBLE(A) and GBF (B)

2.3 不同固定相对银杏黄酮的分离:银杏叶提取物中的主要成分是糖苷和双黄酮类化合物,实验中以分离谱图峰的个数评价介质分离效果。①号柱进样 1 mg,柱压 0 MPa,20% 乙醇 1 mL/min 洗脱;④号柱进样 5 mg,柱压 0 MPa,甲醇 1 mL/min 洗脱;⑤号柱进样 1 mg,柱压 1 MPa,20% 乙醇 0.4 mL/min 洗脱。见图 2。可见①、④、⑤号柱能较好地分离银杏黄酮,其中①号柱分离效果最高。④号柱(Sephadex LH-20 固定相)分离机制主要是分子筛作用,①号柱(环糊精键合琼脂糖凝胶固定相)分离机制除了分子筛效应外,还具有环糊精的空腔包合作用。因此 10 cm 的环糊精凝胶固定相(①号柱)的分离效果比 90 cm 的 Sephadex LH-20 固定相(④号柱)分离效果要好的多。Sephadex 6B 为基体的环糊精键合固定相(③号柱)的分离效果明显差于 Superose 12 pg 为基体的环糊精固定相(①号柱),可能与 Sephadex 6B 与 Superose 12 pg 空间结构有关。①号柱比②号柱的分离效果好,可能是①号柱上环糊精的键合量多。

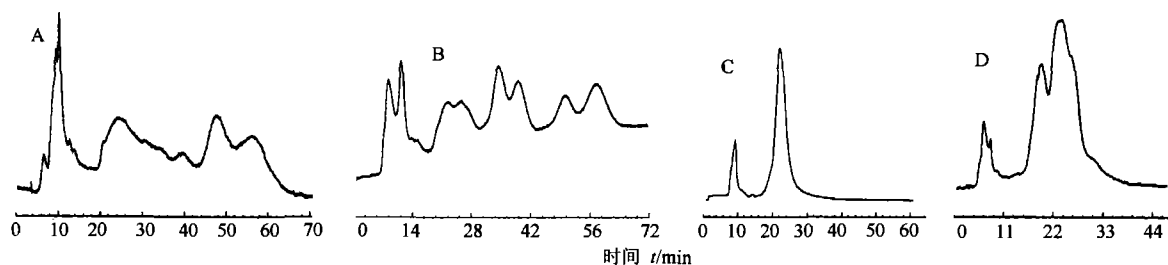


A-①号柱 B-④号柱 C-⑤号柱
A-column No. 1 B-column No. 4 C-column No. 5

图 2 不同固定相对银杏黄酮分离的影响

Fig. 2 Separation of GBF on various columns

2.4 不同流动相对银杏黄酮的分离纯化:选用亲水性较强的乙醇和甲醇为流动相对①号柱分离银杏叶提取物中银杏黄酮的条件进行了优化。进样 1 mg,柱压 0 MPa 时,考察 10%、20%、50% 乙醇和 20%、50%、80% 甲醇的洗脱效果,见图 3。结果表明,极性较弱的乙醇比甲醇的分离效果要好,20% 乙醇分离效果最好。除溶剂极性强弱差别外,另一个原因可能是,对于环糊精空腔结构来说,乙醇比甲醇具有更强的置换洗脱能力。



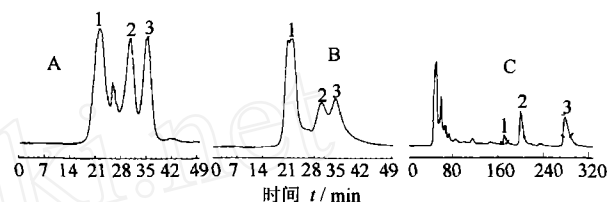
A-10%乙醇 B-20%乙醇 C-50%乙醇 D-50%甲醇
A-10% ethanol B-20% ethanol C-50% methanol D-50% methanol

图 3 不同流动相对银杏黄酮的分离

Fig. 3 Effect of mobile phase on separation of GBF

2.5 不同固定相对银杏黄酮苷元的分离:考察了 5 种固定相填充柱对样品 B 的分离,其中①、②号柱进样 1 mg,柱压 0 MPa,80%甲醇 1 mL/min 洗脱;⑤号柱柱压 1 MPa,甲醇-0.1 mol/L NaAc (4:1) 0.4 mL/min 洗脱。见图 4。结果表明①、②号柱能将 3 种物质分离,其中①号柱分离效果最佳。这 3 种黄酮苷元的相对分子质量差别很小,主要的差异在于酚羟基和羟甲基的个数不同。因此黄酮苷元的分离主要取决于它们与分离介质和流动相之间的吸附能力和氢键强弱等亲和作用。从分离结果看,环糊精固定相的特殊结构对于分离该体系是特别有效的,①号柱比②号柱有更多的环糊精键含量,因此①号柱有更好的分离效果。Superose 12 pg 比 Sepharose 6B 的刚性好,而且是琼脂糖的二次交联后的产物更有利于与环糊精交联,交联后的固定相具有更好的空间结构,因此具有相同交联度的 Superose 12 pg 固定相(①号柱)比 Sepharose 6B 固定相(③号柱)分离效果更好。

环糊精的空腔内只有氢原子和糖苷氧原子,是非极性的,具有疏水性。3 种苷元进入环糊精非极性空腔后,酚羟基越多,吸附越弱。预测的出峰顺序为



1-槲皮素 2-山奈酚 3-异鼠李素
1-quercetin 2-kaempferol 3-isorhamnetin
A-①号柱 B-②号柱 C-⑤号柱
A-column No. 1 B-column No. 2 C-column No. 5

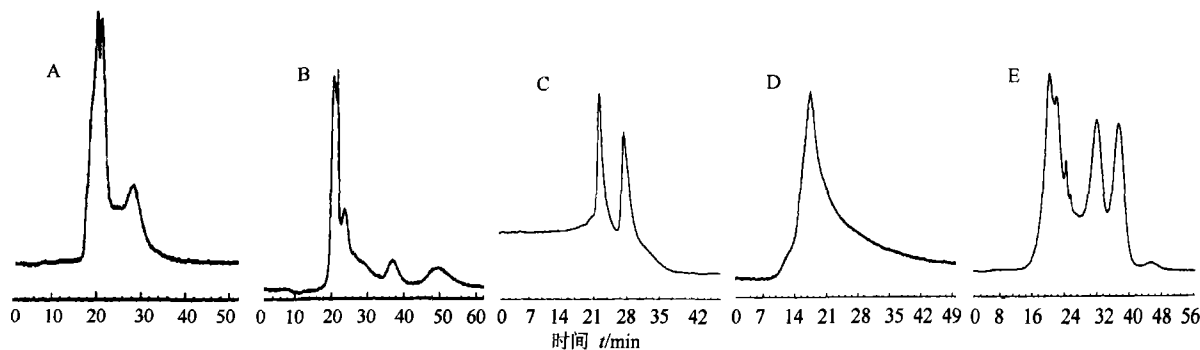
图 4 不同固定相对银杏黄酮苷元分离的影响

Fig. 4 Effect of various stationary phases on separation of GBF

槲皮素、山奈酚和异鼠李素。分步收集 3 个主峰,采用 HPLC 法定性分析,各物质的出峰顺序与预测顺序吻合。对分步收集的样品进行定量分析,结果表明,面积归一化计算的山奈酚纯度为 90%,异鼠李素纯度为 92%,外标法计算槲皮素纯度为 98%。

2.6 不同流动相对银杏黄酮苷元分离的影响:①号柱进样 1 mg,柱压 0 MPa,使用乙醇、甲醇、乙腈、丙酮以及它们的水溶液进行分离,发现只有甲醇-水体系能够较好地将 3 种苷元分离,见图 5。

2.7 缓冲液对银杏黄酮苷元分离的影响:实验中发

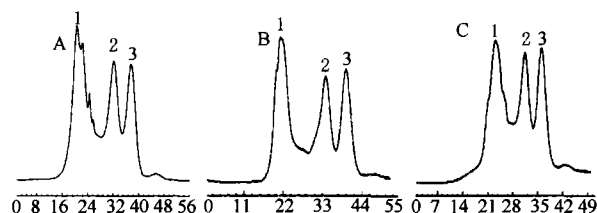


A-乙醇-水(1:1) B-甲醇-水(1:1) C-乙腈 D-丙酮 E-甲醇-水(4:1)
A-ethanol-water (1:1) B-methanol-water (1:1) C-acetonitrile D-acetone E-methanol-water (4:1)

图 5 不同流动相对银杏黄酮苷元的影响

Fig. 5 Effect of various mobile phases on separation of GBF

现甲醇-水系统加入缓冲盐使流动相的 pH 值得以控制,可以抑制溶质的离子化,同时对缔合作用的影响也较大,从而减少谱带拖尾,改善峰型,能够大大改善分离结果。结果见图 6。可见,甲醇-0.01 mol/mL 醋酸钠缓冲液(4:1)体系是最佳流动相。



1-槲皮素 2-山奈酚 3-异鼠李素
1-quercetin 2-kaempferol 3-isorhamnetin
A-甲醇-水(4:1) B-甲醇-0.1 mol/L 醋酸钠(4:1)
C-甲醇-0.05 mol/L NH_4NO_3 (4:1)
A-methanol-water (4:1) B-methanol-0.1 mol/L NaAc
(4:1) C-methanol-0.05 mol/L NH_4NO_3 (4:1)

图 6 缓冲液对银杏黄酮苷元分离的影响

Fig. 6 Effect of buffers on separation of GBF

2.8 pH 值对银杏黄酮苷元分离的影响:①号柱进样 1 mg,柱压 0 MPa,使用 0.1 mol/L HAc 作为缓冲液,甲醇-HAc(4:1)为流动相,用稀 NaOH 调节 pH,结果见表 1。可知 pH=6 是最佳的。

2.9 洗脱速度的影响:考察了在①号柱上进样 1 mg,柱压 0 MPa,不同洗脱速度对槲皮素和山奈酚分离效果的影响,结果见表 2。可见 1.0 mL/min 是

表 1 不同 pH 对银杏黄酮苷元分离效能的影响

Table 1 Effect of pH value on resolution of GBF

pH	α_1	R_1	α_2	R_2
4	1.641	1.573	1.227	1.0
5	1.655	1.557	1.217	0.98
5.5	1.721	1.445	1.213	0.885
6	1.939	1.7	1.210	0.848
7	1.895	1.68	1.215	0.859

α_1 、 R_1 分别表示槲皮素与山奈酚的保留因子和分离度, α_2 、 R_2 分别表示槲皮素与异鼠李素的保留因子和分离度。表 2 同

α_1 and R_1 are retention factor and resolution between quercetin and kaempferol, and α_2 , R_2 are those between quercetin and isorhamnetin respectively. Table 2 is in same

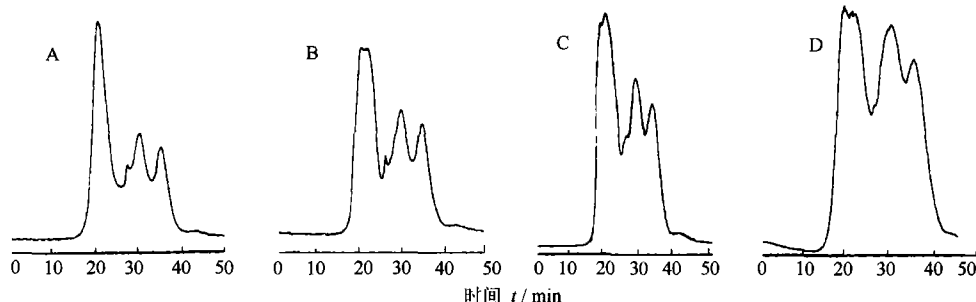
表 2 洗脱速度对分离效能的影响

Table 2 Effect of elution rate on resolution

洗脱速度/(mL · min ⁻¹)	α_1	α_2
0.5	1.820	1.62
0.8	1.905	1.71
1.0	1.939	1.70
1.2	1.921	1.58
1.5	1.850	1.50

最佳的洗脱速度。

2.10 上样量对分离的影响:使用①号柱、以甲醇-0.1 mol/mL NaAc (4:1)洗脱不同上样量的银杏黄酮苷元,分离结果见图 7。可见上样量增大,分离度不断减小,当上样量达到 6.7 mg (0.335 mg 样品 B/mL 固定相)时,槲皮素仍然能得到较好的分离,收率达 95%以上,纯度在 95%以上。



A-0.7 mg B-1.4 mg C-4 mg D-6.7 mg

图 7 负载量对分离的影响

Fig. 7 Effect of loading capacity on separation

2.11 色谱柱的寿命和再生:当累计上样量达到 30 mg 时,色谱柱上端发黄,分离能力下降,需要再生。实验中使用丙酮、乙腈、甲醇-水、乙醇-水、NaOH 溶液洗脱。结果表明,分离银杏黄酮苷元时,需用乙醇-水体系洗脱①号柱,分离银杏黄酮时,需用 0.35 mol/L NaOH 溶液洗脱①号色谱柱。到目前为止,①号色谱柱的累计上样量已超过 500 mg 银杏黄酮 (25 mg 样品/mL 固定相)。

3 讨论

分离银杏黄酮的最佳流动相为 20%乙醇,分离银杏黄酮苷元的最佳流动相为 80%甲醇,这与目的产物的分离机制有关。银杏黄酮的分离主要依靠分子筛效应和环糊精的空腔包合作用,待分离组份间具有较大的相对分子质量差异,弱极性的乙醇对它们的分离更加有效。银杏黄酮苷元的分离主要依靠环糊精空腔对目的产物的吸附机制,较强极性的甲醇对于环糊精空腔内作用力具有更好的置换作用。

使用自 β -环糊精键合固定相对银杏黄酮(黄酮

苷和苷元)进行分离,10 cm 色谱柱能较好地达到分离效果。乙醇-水体系(20%乙醇)适用于银杏黄酮的分离纯化,甲醇体系(甲醇-NaAc, pH 6.0)适用于银杏黄酮苷元的分离。槲皮素和山柰酚的最佳分离度为1.7,山柰酚和异鼠李黄素的最佳分离度为1.0,苷元分离的负荷量可以达到6.7 mg。槲皮素的收率可达到95%以上,纯度在95%以上;山柰酚和异鼠李素的纯度均可达到90%以上。色谱柱通过反复再生其寿命在25 mg/mL 固定相以上。表明该固

定相具有一定应用潜力。

References:

- [1] Ma H Y, Xue Y Y. Advances of the applications in pharmacology and pharmaceutical analysis of cyclodextrin [J]. *J Yan'an Univ* (延安大学学报), 1998, 17(2): 48-53.
- [2] Haginaka J, Wakai J. β -Cyclodextrin condensed silica for direct injection analysis of drug enantiomers in serum by liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1990, 62: 997-1000.
- [3] Seville B, Guillaume M, Vidal-Madjar C, et al. Retention and enantioselectivity properties of β -cyclodextrin polymers and derivatives on porous silica for reverse-phase liquid chromatographic separation of enantiomers [J]. *Chromatographia*, 1997, 45: 383-389.

免疫磁性捕获 ELISA 法检测甘草中甘草蛋白的研究

曹 宇,曹学琳,田 旺,杨文博,白 钢*

(南开大学生命科学学院,天津 300071)

摘 要:目的 制备甘草蛋白免疫磁性微球,并建立快速、精确的免疫磁性捕获 ELISA 法检测甘草蛋白。方法 采用种子聚合法合成聚苯乙烯磁性微球,并以抗甘草蛋白 IgG 抗体致敏,制备特异性捕获甘草特征蛋白的免疫磁性微球。以生物素标记抗体为示踪抗体,结合辣根过氧化物酶标亲和素建立 ELISA 检测系统,用于甘草药材和含甘草中成药中甘草蛋白的分析。结果 利用该方法对甘草药材和中成药中甘草蛋白抗原检测,检测灵敏度达到 10 ng/mL。结论 免疫磁性捕获 ELISA 检测技术方便、快速、准确,为生药的品种鉴定及中成药的质量控制提供一种新方法。

关键词:甘草;甘草蛋白;免疫磁性微球;免疫磁性捕获 ELISA 技术

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2004)10-1109-04

Immunomagnetic separation ELISA for identification of protein in *Radix Glycyrrhizae*

CAO Yu, CAO Xue-lin, TIAN Wang, YANG Wen-Bo, BAI Gang*

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin, 300071, China)

Abstract: **Object** To provide a quick and precise immunomagnetic separation enzyme-linked immuosorbent assay (IMS-ELISA) for protein detecting of *Radix Glycyrrhizae* by immunomagnetic microspheres (IMMS). **Methods** Using dispersion polymerization, polystyrene magnetic microspheres as carriers were prepared. IMMS coating with rabbit anti-*Radix Glycyrrhizae* protein (RGP) IgG can specifically capture RGP. Taking biotinylated anti-RGP rabbit IgG as a tracer antibody, together with horseradish peroxidase (HRP) labeled avidin, an ELISA on IMMS was developed. **Results** The method was specific to RGP antigen and could identify 10 ng/mL RGP antigen. **Conclusion** IMS-ELISA shows a new practicality of the unequivocal identification of effective constituent for its speedness, convenience, and accuracy.

Key words: *Radix Glycyrrhizae*; *Radix Glycyrrhizae* protein (RGP); immunomagnetic microspheres; immunomagnetic separation enzyme linked immuosorbent assay (IMS-ELISA)

免疫磁性微球 (immunomagnetic microspheres, IMMS) 是近年来兴起的一类新型磁性活性材料,是连有抗体或抗原的磁性微球,通过表面的

抗体或抗原特异性地与靶物质结合,从而赋予其磁性响应性,在特定磁场的作用下,这些结合了 IMMS 的细胞和分子可以发生定向移动,从而实现其免疫

收稿日期:2004-01-05

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(003805311);教育部回国留学人员启动基金[(2000)479号]

作者简介:曹 宇(1977—),男,辽宁铁岭人,硕士研究生,主要从事免疫磁性微球的研究。

* 通讯作者 Tel: (022) 23508318 E-mail: gangbai@eyou.com