

Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai (上海中医药大学学报), 2000, 14 (3): 61-65.

- [4] Masaki A, Aoyagi M, Shibata T, et al. Preparation and chemical evaluation of *Astragalus Radix* produced in Hokkaido [J]. *Nat Med*, 1998, 52 (1): 10-13.
- [5] Yan Q J, Jiang Z Q, Han L J, et al. Extraction technique of *Astragalus polysaccharide* [J]. *Transact Chin Soci Agric Eng* (农业工程学报), 2000, 16 (Suppl): 114-116.
- [6] Li H M, Huang R Q, Wang Y Z. A technological study on enhancing the extraction rate of *Astragalus polysaccharides* [J]. *J Northwest Univ; Nat Sci* (西北大学学报: 自然科学

版), 2000, 30 (6): 509-510.

- [7] Wang L, Liu Z Y, Lu J J, et al. Microwave technique extraction and content determination of polysaccharide of membranous milkvetch root [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2001, 29 (6): 35-36.
- [8] Yang X M, Yang J C. Effect of sugars on the stability of cellulose [J]. *J Tsinghua Univ; Nat Sci* (清华大学学报: 自然科学版), 2000, 40 (2): 51-54.
- [9] Zhang J Q, Wang R M, Guan F M, et al. Analysis of the microstructure of hydrolyzed corn stover [J]. *Cereal Feed Ind* (粮食与饲料工业), 2002 (9): 25-26.

载粉防己碱生物材料的制备与定量测定

崔元璐¹, 戚爱棣², 韩 崑², 李克峰¹, 姚康德¹

(1. 天津大学, 天津 300072; 2. 天津中医学院, 天津 300193)

制备载有药物和细胞因子的生物材料和研究生物材料对药物与细胞因子的控制释放已经成为组织工程的研究热点之一^[1]。传统中药的某些有效成分具有与细胞因子类似的生理活性和广泛的药理作用, 且价格低廉, 理化性质相对稳定, 有作为细胞因子和抗生素替代物应用于组织工程的良好前景。本课题组的研究表明, 低质量浓度的粉防己碱在体外能够促进软骨细胞的增殖, 维持软骨细胞的功能表达, 并具有抗炎、抗变态反应和抗凝血作用。以相分离-溶剂置换-冷冻干燥法制备载有粉防己碱的聚乳酸多孔组织工程支架材料, 通过扫描电镜分析材料形貌; 利用高效液相色谱法测定载药支架材料中的载药量。

1 材料与仪器

左旋聚乳酸 (poly-L-lactic acid, PLLA, M_n 为 1.08×10^5 g/mol, 美国麻省大学化工系), 粉防己碱 (中国药品生物制品检定所), 三氯甲烷、四氢呋喃、甲醇等化学试剂均为市售分析纯, 色谱流动相用甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 二己胺为分析纯。

AE200 精密电子天平 [梅勒-脱利多仪器 (上海) 有限公司], Christ Alpha 2-4 冷冻干燥机, Philips XL30 扫描电子显微镜, Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1322A 脱气机, G1316A 柱温箱, 1314A UV 可变波长检测器, HP Rev. A. 0501 化学工作站。

2 方法与结果

2.1 材料的制备

2.1.1 聚乳酸支架材料的制备^[2]: 精密称取 1.5 g 聚乳酸, 放入 200 mL 磨口三角瓶中, 加入 50 mL 四氢呋喃, 在 60 °C 水浴中不断振摇, 使其完全溶解, 配制成质量浓度为 3% 的溶液。将 4 mL 聚乳酸溶液加入到磨口玻璃称量瓶中, 盖严盖子, 放入 5 °C 的冰箱中 8 h, 使溶液凝胶化。取出称量瓶, 打开盖子, 放入去离子水中置换四氢呋喃。每隔 8 h 换水 1 次, 连续置换 48 h。将凝胶连同玻璃称量瓶一起取出, 置于 -40 °C 低温冰箱中冷冻, 使其冻结。取出玻璃称量瓶, 放入冷冻干燥机中, 使其完全干燥。取出称量瓶中的支架材料, 备用。

2.1.2 含有粉防己碱的聚乳酸支架材料的制备: 精密称取 10 mg 粉防己碱, 溶于 0.5 mL 三氯甲烷中, 备用。精密称取 1.5 g 聚乳酸, 放入 200 mL 磨口三角瓶中, 加入 50 mL 四氢呋喃, 然后用移液器精密量取 150 μ L 粉防己碱三氯甲烷溶液, 加入三角瓶中, 在 60 °C 水浴中不断振摇, 使其完全溶解, 配制成含有粉防己碱的聚乳酸溶液。将 4 mL 聚乳酸溶液加入到磨口玻璃称量瓶中, 按聚乳酸支架材料的制备项下方法操作, 即得。

2.1.3 材料形貌分析: 采用 Philips XL30 扫描电子显微镜观察测试。用不锈钢剃刀片切割材料, 将材料的表面、断面经离子溅射仪喷金镀膜后进行观察, 见图 1。可见两种生物材料都由均匀分布的细小纤维构成, 具有相互贯穿的通孔结构, 两者 (孔隙率、纤

维直径、纤维间孔隙尺寸)没有明显差别。从形貌角度来说,载药生物材料适合作为软骨组织工程支架材料使用。

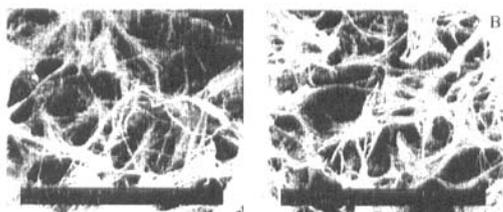


图 1 聚乳酸生物材料(A)和含粉防己碱聚乳酸生物材料(B)的扫描电镜图片

Fig. 1 SEM pictures of PLLA biomaterials (A) and tetrandrine-loaded PLLA biomaterials (B)

2.2 HPLC 法测定粉防己碱

2.2.1 色谱条件:色谱柱(prontosil 120-5-C₁₈-ace-A-APS 5.0 μm);流动相:甲醇-0.3%二己胺(80:20);体积流量:0.8 mL/min;测定波长:282 nm;柱温:25 °C。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取粉防己碱对照品 1.15 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并加至刻度,制成 0.115 mg/mL 的对照品溶液。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为进样溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备:精密称取载粉防己碱生物材料 0.100 1 g,置于 50 mL 磨口三角瓶中,加入 10 mL 甲醇,静置 1 h,超声提取 30 min,抽滤,滤液减压回收甲醇至干。残留物用甲醇溶解,转移至 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 空白试验:取不含粉防己碱的生物材料 0.100 2 g,按供试品溶液的制备方法制得空白试液,进行色谱分析,结果表明在对照品相应位置无干扰(图 2)。

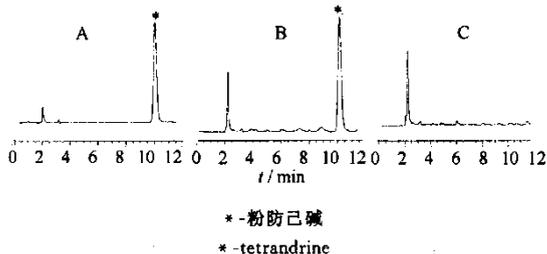


图 2 粉防己碱对照品(A)、生物材料(B)和空白生物材料(C)的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of tetrandrine reference substance (A), tetrandrine-loaded PLLA biomaterials (B), and PLLA biomaterials (C)

2.2.5 标准曲线的绘制:精密吸取粉防己碱对照品

溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15、17.5、20.0 μL,进样测定,记录色谱图。各质量浓度相应的峰面积经统计处理,求得回归方程为 $Y = 1\ 009.593\ 02\ C$, $r = 0.999\ 95$,表明进样量在 0.29~2.30 μg 内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验:精密吸取粉防己碱对照品溶液 10 μL,连续进样 5 次,峰面积 RSD 为 1.52%。

2.2.7 稳定性试验:取供试品溶液,于 0、2、4、6、8、12 h 进样 10 μL,结果 12 h 内粉防己碱峰面积积分值基本稳定,RSD 为 3.58%。

2.2.8 加样回收率试验:精密称取同一批等量载粉防己碱生物材料 5 份,每份含粉防己碱约 120 μg,分别加入粉防己碱对照品 115.0 μg,制备供试品溶液,进样 10 μL,进行色谱分析,计算加样回收率,结果平均回收率为 98.05%,RSD 为 3.46%。

2.2.9 载药量的测定:精密称取载粉防己碱生物材料适量,制备供试品溶液,进行色谱分析,计算载粉防己碱生物材料的载药量。共测定了 2 批样品,每批测定 3 个样本,粉防己碱的质量分数分别为 1.528、1.474 mg/g,载药率分别为 76.4%、73.7%。

3 讨论

生物材料制备中先将聚乳酸溶解在四氢呋喃中,在低温条件下形成聚乳酸的凝胶。因为四氢呋喃与水互溶,以去离子水置换四氢呋喃。聚乳酸不溶于水,四氢呋喃是聚乳酸的良溶剂,利用聚乳酸在良溶剂中溶胀,链段伸展,在不良溶剂中链段收缩的过程,使聚乳酸凝胶破坏,链段收缩,形成纳米尺度的聚乳酸纤维,构建纤维多孔支架材料。

由于含有粉防己碱的聚乳酸支架材料制备过程中用去离子洗脱置换四氢呋喃,致使一部分粉防己碱损失,因此有必要测定支架材料的实际载药量和载药率。HPLC 法是中药制剂有效成分测定和质量控制的常用方法,结果表明采用此法测定载药聚乳酸支架材料中的粉防己碱简便、有效。

由于《中国药典》2000 年版中没有涉及粉防己碱测定色谱条件中流动相的选择,所以本实验比较了文献报道^[3-5]的不同流动相体系:甲醇-乙醚-三己胺(100:1:0.05)、甲醇-水-三乙醇胺(85:15:0.25)、三氯甲烷-甲醇-氨水(30:68.9:1.1)。结果以甲醇-0.3%二己胺(80:20)作为流动相,生物材料中粉防己碱的分离效果最好。

稳定性试验 RSD 值偏大,是因为 0~12 h 时间段内,峰面积数值逐渐增加(从 1 062.4 升高至 1 192.3),即测得的粉防己碱增加。其原因可能是供

试品溶液中仍然有与聚乳糖酸结合的粉防己碱,随着时间的推移,逐渐将防己碱释放出来,导致溶液中粉防己碱的测量值升高。提示在今后研究中,应当在供试溶液稳定后再取样测定,以免产生误差。

粉防己碱对照品在190~400 nm作光谱扫描,最大吸收波长有2个,分别为224 nm和282 nm。由于282 nm处干扰少,故选择282 nm作为粉防己碱的检测波长。

References:

[1] Woodfield T B, Bezemer J M, Pieper J S, et al. Scaffolds for

tissue engineering of cartilage [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2002, 12 (3): 29-36.
 [2] Ma P X, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 46 (1): 60-72.
 [3] Xu Y G, Hu S X, Bu Y S, et al. Content of tetrandrine determined by RP-HPLC [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2004, 7 (3): 186-188.
 [4] Zhen P, Chen R R, Wang H Q. Analysis of tetrandrine and demethyltetrandrine in Chinese medicinal herbs *Stephania tetrandra* S. Moore by high performance liquid chromatography [J]. *J Anal Sci*, 1994, 10 (1): 20-23.
 [5] Wang T Y, Yang W Y. RP-HPLC determination of tetrandrine in three Chinese medicinal herb [J]. *Anal Test Tech Instru (分析测试技术与仪器)*, 1995, 1 (1): 31-34.

漆酶提取黄芪中黄芪皂苷的研究

蒲 军,郭 梅,杜连祥*,路福平

(天津科技大学生物工程学院 工业微生物重点实验室,天津 300222)

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,是最主要的3种木质素降解酶之一,可以催化氧化酚类化合物脱去羟基上的电子或质子,形成自由基,导致酚类及木质素类化合物裂解,有效的降解木质素。近年来,有关漆酶的研究越来越受到国际上的重视,它在保护环境、造纸工业、食品工业及其他领域均有很大的研究价值和潜力。

中药中的杂质大多为淀粉、果胶、蛋白质等,可选用合适的酶予以分解除去。目前,应用较多的是纤维素酶。大部分的中药材的细胞壁是由纤维素构成,植物的有效成分往往包裹在细胞壁内,用纤维素酶酶解破坏植物细胞壁,有利于有效成分的提取。将漆酶等木质素降解酶应用于中药提取的报道较少。本实验将漆酶用于黄芪中有效成分的提取,以期达到提高提取率、缩短提取时间、减少能耗和有效保存中药有效成分生物活性的目的。

1 材料

漆酶生产菌来自杂色云芝 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel,购自中国科学院;黄芪甲苷对照品,购自中国药品生物制品检定所,批号0781-9908;黄芪饮片购自天津中新药业公司,经本校王海宽鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;其他试

剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 漆酶粗酶液的制备:取保藏的杂色云芝斜面进行活化培养,挑取适量菌丝转接于PDA培养基平板上,25℃静置培养6d;用打孔器取直径为8mm琼脂块按一定的接种量接入三角瓶中,25℃振荡培养(150 r/min),定期检测酶活;到第13天下摇床,发酵液经8层纱布滤过后于12 000 r/min离心2 min,取上清液,测定酶活后-70℃保存,使用前再测酶活。

2.2 黄芪饮片的水浸提取及酶解浸提^[1]:将黄芪饮片粉碎后过40目筛,称取1g加入适量水混匀,置于一定温度的水浴锅中,保温水浸提取一定时间后滤过,取滤液。同样取1g黄芪粉加入适量水混匀,用盐酸将pH值调至漆酶反应的最适pH值,温度调至漆酶反应的最适温度,单独加入漆酶粗酶液处理一定时间,然后浸提,滤过,取滤液。

2.3 供试品溶液的制备^[2,3]:取全部滤液用15 mL水饱和正丁醇萃取3次,合并萃取液,用15 mL 40%氨试液洗涤2次,用15 mL正丁醇饱和水洗涤2次,于70℃旋转蒸干正丁醇,用2 mL甲醇溶解残渣,即得。

2.4 标准曲线的制备^[4]:称取5 mg黄芪甲苷对照

收稿日期:2005-02-25

作者简介:蒲 军(1979—),男,四川达州人,硕士研究生,研究方向为微生物与生化制药。Tel: (022) 60270040

E-mail: pj0701@sina.com

* 通讯作者 杜连祥 Tel: (022) 60270037