

物催化活性。利用修饰后纤维素酶催化薯蓣原料酸水解转化薯蓣皂苷元具有很好的应用价值,提取率可以达到 98.2%,产品质量分数和熔点分别为 96.03%和 201~203 ℃。

References:

- [1] Huang Y X. Research progress of the production processes of diosgenin [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2004, 38(4): 56-58.
- [2] Zhang Y Q, Wang D Q, Li B X, et al. Extraction of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* through stepwise biocatalysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(5): 688-691.
- [3] Liu G J, Luo N, Chen J Y, et al. Study on several enzyme methods of extracting diosgenin [J]. *J Zhengzhou Univ: Eng Sci* (郑州大学学报:工学版), 2005, 26(4): 48-50.
- [4] Tong L, Zhang S K, Li J, et al. Extracting sapogenins from *dioscorea zingiberensis* through enzymatic hydrolysis [J]. *J Shaanxi Norm Univ: Nat Sci* (陕西师范大学学报:自然科学版), 2003, 31(2): 81-83.
- [5] Ying G Q, Yi Y, Shi L E, et al. Preparation and properties of earthworm fibrinolytic enzyme modified with mPEG [J]. *J Chem Eng Chin Univ* (高校化学工程学报), 2005, 19(8): 527-531.
- [6] Jin W P, Kwinam P, Hocheol S, et al. Saccharification and adsorption characteristics of modified cellulases with hydrophilic/hydrophobic copolymers [J]. *J Biotechnol*, 2002, 93:203-208.
- [7] Butler P J G, Harris J I, Hartley B S, et al. The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains [J]. *Biochem J*, 1969, 112: 679-689.
- [8] Kwi N P, Jin W P. Modification of cellulase by synthesized copolymer with polyethylene oxide and maleic acid anhydride [J]. *J Appl Polym Sci*, 2000, 77: 368-373.
- [9] Liu M L, Wang J. The influence factors in the measurement of the activity of the cellulase [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2006, 26(6): 37-39.
- [10] Park J W, Takahata Y, Kajiuchi T, et al. Effects of non-ionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39(1): 117-120.

聚酰胺对紫锥菊提取物中菊苣酸的分离纯化研究

刘铁琛^{1,2}, 曾建国^{1,2}, 陈波^{1*}, 姚守拙¹

(1. 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 湖南师范大学, 湖南长沙 410081;

2. 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南长沙 410331)

摘要:目的 采用聚酰胺柱色谱分离纯化紫锥菊提取物中菊苣酸。方法 采用 50%乙醇溶液洗脱, HPLC 法对产物中菊苣酸进行检测分析。结果 该法能把紫锥菊提取物中菊苣酸的质量分数(4.9%)提高 10 倍左右, 回收率达到 98%以上。结论 该法操作简单, 可用于紫锥菊提取物中菊苣酸的分离纯化。

关键词:紫锥菊提取物; 菊苣酸; 聚酰胺柱色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2007)04-0530-04

Isolation and purification of cichoric acid from extracts of *Echinacea purpurea* by polyamide column chromatography

LIU Yi-chen^{1,2}, ZENG Jian-guo^{1,2}, CHEN Bo¹, YAO Shou-zhuo¹

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education,

Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Hunan Engineering Research Center

of Botanical Extract, Changsha 410331, China)

Key words: the extracts of *Echinacea purpurea* Moench; cichoric acid; polyamide column chromatography; HPLC

紫锥菊为菊科松果菊属多年生草本植物,原产于北美洲的中西部地区,有 9 个品种,主要药用种是狭叶松果菊 *Echinacea angustifolia* DC.、紫花松果菊 *E. purpurea* (L.) Moench 和淡紫松果菊

E. pallida (Nutt.) Nutt.。紫锥菊是目前国际上受到普遍重视的一种免疫促进剂和免疫调节剂^[1],也是极少数具有免疫力增强和抗炎双重作用的植物药之一^[2,3]。菊苣酸为咖啡酸衍生物,是紫锥菊中重要

收稿日期: 2006-12-11

基金项目: “973”项目(2006CB504701); 湖南省重点科技项目(05SK2006)

作者简介: 刘铁琛(1980—),男,湖南新化人,在读硕士,主要从事中草药与保健食品的研究与开发。 E-mail: lyc6666666@163.com

* 通讯作者 陈波 Tel: (0731) 8865515 E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com

的免疫活性成分之一。目前国内外关于菊苣酸研究主要限于药材和制剂中菊苣酸成分的测定,紫锥菊中菊苣酸的初提,采用制备高效液相色谱制备菊苣酸对照品,采用大孔吸附树脂分离纯化紫锥菊提取物中的菊苣酸等方面^[4~7]。分析方法主要是高效液相色谱法^[8~10]。本实验采用聚酰胺柱色谱进行了菊苣酸分离纯化研究。

1 仪器与试剂

Waters 1525 Binary HPLC 泵; Waters 2996 Photodiode Array 检测器; Waters 717 plus Autosampler (美国 Waters); 玻璃色谱柱(70 cm×4.5 cm、40 cm×3.2 cm); 聚酰胺(60~100 目,台州市路桥四甲生化塑料厂); BST 25-6 超声波清洗器(张家港市百思特超声电气有限公司); 水为二次蒸馏水,乙腈(色谱纯),甲醇、甲酸、磷酸(分析纯); 绿原酸对照品(美国 Sigma 公司,质量分数为 99.5%); 紫锥菊提取物(含菊苣酸 4.9%,湖南九汇现代中药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 菊苣酸的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: C_{18} 分析色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)(大连江申); 流动相: 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 0~13 min, B 从 10% 线性变化到 22%, 13~14 min, B 从 22% 线性变化到 40%, 14~18 min, B 维持在 40%, 18~21 min, B 从 40% 线性变化到 10%, 21~26 min, B 维持在 10%; 体积流量: 1.0 mL/min; UV 检测波长: 330 nm; 进样量: 5 μ L; 柱温: 35 $^{\circ}$ C。

2.1.2 菊苣酸的 HPLC 法测定^[11]: 采用外标法定量,以绿原酸为对照品,换算系数 f 为 0.695。

2.2 聚酰胺的预处理和再生: 新购聚酰胺含有少量的醇可溶性物质,因此用乙醇煮沸 3 次,每次 30 min,取出离心甩干,除去聚酰胺中的醇溶性部分,然后用蒸馏水洗涤至流出液无醇味,备用。实验结束后将填料全部倒出,用 3%~5% 氢氧化钠溶液浸泡,清洗,即可使聚酰胺再生。

2.3 聚酰胺的静态吸附动力学: 预处理好的聚酰胺 9.989 0 g,加入 100 mL 含菊苣酸 2.567 mg/mL 的紫锥菊提取物溶液(pH 6),静置吸附,于不同的时间测定菊苣酸的质量浓度,直至吸附平衡,计算不同时间的吸附量,得吸附量-时间变化曲线,见图 1。可见,聚酰胺有较快的吸附速度,在 150 min 左右达到吸附平衡。

2.4 聚酰胺的吸附等温线: 预处理好的聚酰胺,精

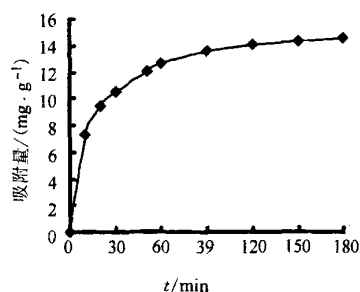


图 1 菊苣酸在聚酰胺树脂柱上的静态吸附动力学

Fig. 1 Absorption dynamics of cichoric acid on polyamide column

密称取 3 g, 8 份, 放于磨口的锥形瓶中, 加入不同质量浓度的紫锥菊提取物水溶液(pH 6) 40 mL。于 20 $^{\circ}$ C 静置吸附 6 h, 采用 HPLC 法测定吸附前后菊苣酸的质量浓度, 计算不同平衡质量浓度下聚酰胺的吸附量。以吸附量(Q)对吸附平衡后的溶液质量浓度(C)做图, 得吸附等温线, 见图 2。可见, 聚酰胺的吸附等温线为 L 型, 这是一条标准的 Langmuir 吸附等温线, 说明溶剂吸附少, 溶质为线性吸附, 菊苣酸分子在聚酰胺上以单分子形态呈单层吸附, 随着溶液平衡质量浓度的增大, 聚酰胺的吸附量增大, 逐渐趋于最大值。

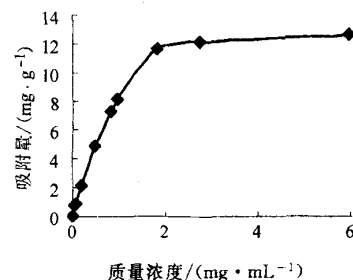


图 2 菊苣酸在聚酰胺树脂柱上的吸附等温线(20 $^{\circ}$ C)

Fig. 2 Adsorption isotherms of cichoric acid on polyamide column (20 $^{\circ}$ C)

2.5 上样液 pH 值的确定: 含菊苣酸 3.14 mg/mL 的紫锥菊提取物水溶液(pH 6) 400 mL, 分成 10 份, 用甲酸和 10% NaOH 分别调 pH 值为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 分别加入 3 g 已预处理的聚酰胺。HPLC 法测定吸附前后菊苣酸的质量浓度, 计算聚酰胺的吸附量, 得到吸附量随 pH 的变化关系曲线, 见图 3。可以看出, 当紫锥菊提取物水溶液 pH $\leq$ 3 时, 聚酰胺的吸附量比较大; pH 为 3 时, 吸附量最大。在 pH $\leq$ 3 时, 菊苣酸呈游离态, 有利于聚酰胺的吸附。所以, 紫锥菊提取物水溶液在上柱前调 pH 为 3 左右。

2.6 洗脱液的选择: 实验考察了 40%、50%、60% 乙醇水溶液对紫锥菊提取物溶液等度洗脱的情况,

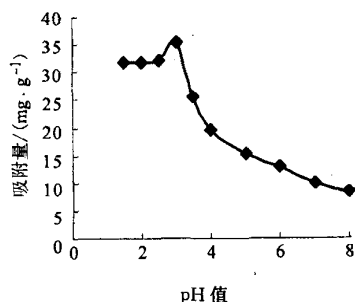


图 3 紫锥菊提取物水溶液的不同 pH 值对吸附量的影响

Fig. 3 Effects of various pH values in water solution of *E. purpurea* extracts on adsorbing capacity 并对洗脱液和产品进行 HPLC 法测定, 结果见表 1。可见最佳洗脱液为 50% 乙醇水溶液。

表 1 洗脱液对紫锥菊提取物溶液中菊苣酸的洗脱比较
Table 1 Comparison of eluting cichoric acid with three eluents of *E. purpurea* extracts

乙醇体积分数/%	产品中菊苣酸/(mg·g ⁻¹)	收率/%
40	463.2	73.2
50	512.5	98.1
60	391.7	89.9

2.7 上样溶液的制备: 取 17 g 紫锥菊提取物, 加水 100 mL, 加甲酸调节 pH 值到 3.0, 超声提取 30 min, 抽滤, 再加 100 mL 水, 加甲酸调节 pH 值到 3.0, 超声 30 min, 抽滤, 弃去滤渣, 将两次提取液合并混匀即得上样液。取上样液进样测定, 计算, 得紫锥菊提取物中菊苣酸的质量分数为 49 mg/g。

2.8 吸附和洗脱试验: 将处理好的聚酰胺湿法装入玻璃色谱柱(40 cm×3.2 cm)中, 柱床约 25 cm, 静置 45 min 后, 以 6 mL/min 上样, 上样后, 让聚酰胺柱静置吸附平衡 6 h 左右。用 20% 乙醇 400 mL 冲洗柱子中未被吸附的成分和水溶性杂质, 再用 50% 乙醇水溶液 7 BV(1 400 mL) 以约 6 mL/min 进行洗脱, 洗脱液每 100 mL 收集一份, 采用 HPLC 法对洗脱液中菊苣酸进行测定, 绘制洗脱曲线, 见图 5。可见最佳的收集段为 2~7 BV。

合并洗脱液, 洗脱液在 100 ℃ 恒温水浴上蒸干得到产品。采用 HPLC 法对产品中的菊苣酸进行测定, 结果菊苣酸的质量分数为 483.2~537.3 mg/g。与原料比较可以看出, 聚酰胺柱色谱能够有效去除提取物中的水溶性杂质, 大大提高了菊苣酸的质量分数, 与大孔吸附树脂所得产品中的菊苣酸质量分数为 200~300 mg/g 相比^[6,7], 聚酰胺洗脱纯化效果更佳。

2.9 色谱柱分离条件的放大: 以玻璃色谱柱(50

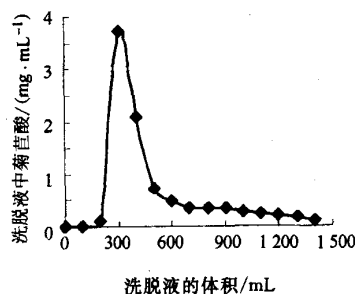


图 5 菊苣酸的洗脱曲线

Fig. 5 Eluting curves of cichoric acid

cm×3.2 cm) 进行条件摸索, 提取物的上样量与聚酰胺的柱体积之比为 1:12, 按柱体积放大。从实验结果看, 紫锥菊提取物纯化产品中菊苣酸的平均质量分数为 512.5 mg/g, RSD 为 3.17% (n=5)。可见实验放大后, 不影响菊苣酸的分离效果。

3 讨论

在 50% 乙醇洗脱前, 实验考察了 20% 乙醇洗脱未被聚酰胺吸附的成分和水溶性杂质对产品中菊苣酸质量分数的影响。结果表明, 2 BV 20% 乙醇不能够把菊苣酸洗脱下来, 但能够把水溶性杂质除去, 提高菊苣酸的质量分数。

定性定量方法主要参考《美国药典》的方法, 以绿原酸为对照, 根据换算系数和相对保留时间进行定性和定量的, 而不是以菊苣酸为对照品。因为菊苣酸不稳定, 定量反而不准确。

实验采用聚酰胺能成功地应用于紫锥菊提取物中菊苣酸的分离纯化, 所建立的方法易于操作, 重现性好, 聚酰胺活化后能够重新使用, 消耗少, 是一种纯化菊苣酸的好方法。

References:

- [1] Hobbs C. *Echinacea* [M]. California: Botanica Publication, 1995.
- [2] Wei F G, Ryuji H, Kazo S. S-linalyl, 2-phenylethyl, and benzyl disaccharide glycosides isolated as aroma precursors from *Oolong tea* leaves bioschi [J]. *Biotech Biochem*, 1994, 58 (80): 1532.
- [3] Toshio M, Akira U, Nobuo T. Studies on the glycosides of *Epimedium gradiflorum* [J]. *Chem Chem Bull*, 1987, 35 (3): 1109.
- [4] Luo X B, Chen B, Zhu X L, et al. Determination of cichoric acid in *Echinacea purpurea* and its preparation by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (10): 890-891.
- [5] Chen B, Pan Z Q, Fan Y C, et al. Study of preparation on cichoric acid standard by preparative high performance liquid chromatography [J]. *Prac Prev Med* (实用预防医学), 2001, 8 (1): 15-17.
- [6] Wu Q L, Yuan Q P, Chen Y W. Preparation of cichoric acid by adsorption separation of macroporous resin [J]. *J Beijing Univ Chem Technol* (北京化工大学学报), 2004, 31 (5): 45-

- 48.
- [7] Zeng D, Chen B, Luo X B, *et al.* Study on adsorption and purification of cichoric acid in extracts of *Echinacea purpurea* with macroporous adsorption resin [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16 (2): 160-162.
- [8] Per M, Søren J, Peter C, *et al.* HPLC Method validated for the simultaneous analysis of cichoric acid and alkamides in *Echinacea purpurea* plants and products [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 6922-6933.
- [9] Luo X B, Chen B, Yao S Z. Simultaneous analyses of caffeic acid derivatives and alkamides in roots and extracts of *Echinacea purpurea* by high performance liquid chromatography-photodiode array and electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 986 (1-2): 73-81.
- [10] Nadja B C, Maqueita S E, Lawresia T S. High performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1103: 219-228.
- [11] USP (美国药典) [S]. 29-NF24. 2006.

葛根素衍生物 4ac 聚乳酸纳米粒体外释药规律的考察

郭东艳^{1,2}, 陈士林², 杨大坚²

(1. 陕西中医学院 药学系, 陕西 咸阳 712046; 2. 香港理工大学, 香港 九龙)

摘要:目的 考察葛根素衍生物 4ac 聚乳酸纳米粒的体外释药规律。方法 采用动态膜透析法考察其体外释药规律,并用 6 种数学模型对其释药规律进行拟合。结果 以 Weibull 数学模型拟合较好,体外释放包括两个过程,起初为快释阶段,然后转为慢释阶段。结论 Weibull 数学模型能较好地描述葛根素衍生物 4ac 聚乳酸纳米粒中 4ac 的释药规律。

关键词:葛根素衍生物 4ac; 纳米粒; 体外释放

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2007)04-0533-03

In vitro releasing rule of Pur-derivatives-4ac PLA nanoparticles

GUO Dong-yan^{1,2}, CHEN Shi-lin², YANG Da-jian²

(1. Department of Pharmacy, Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, China)

Key words: Pur-derivatives-4ac; nanoparticles; *in vitro* release

为了提高葛根素衍生物 4ac(葛根素经乙酰化反应生成的衍生物,简称 4ac)的生物利用度,降低其不良反应,本实验室制备了 4ac 聚乳酸纳米粒(4ac-PLA-NP)。为了预测 4ac-PLA-NP 在体内的释药情况,阐明其载药机制,以验证 4ac-PLA-NP 的处方设计和制备工艺是否合理、可行,进而控制药品质量,以利于临床用药的安全,本实验对其体外释放规律进行了考察。测定纳米粒中药物在体外释放的方法较多^[1~4],但动态膜透析法能更好模拟药物在体内的释放情况,故本实验采用动态膜透析法考察 4ac-PLA-NP 的体外释药规律。

1 仪器与试剂

Lamber 35 型紫外分光光度仪(Perkinelmer USA), SW22 型恒温水浴摇床(德国),透析袋(Sigma 公司)。甲醇、乙腈为 HPLC 级,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素衍生物 4ac 聚乳酸纳米粒(4ac-PLA-NP)的制备:称取聚乳酸 100 mg,4ac 30 mg,卵磷脂 0.2 mL(预先用二氯甲烷配成 25% 的溶液),加入 1 mL 二氯甲烷中溶解,作为有机相;另取普流罗尼克 68(F-68) 300 mg 溶于蒸馏水中,作为连续相;将有机相加入连续相中,搅拌除去有机溶剂,即得。

2.2 测定方法的建立

2.2.1 最大吸收波长的考察:精密称取 4ac 适量,加 DMSO 溶解,制成 0.116 mg/mL 的溶液,作为备用液。吸取该备用液 1.2 mL,4 份,置 10 mL 量瓶中,每份加入蒸馏水、人工胃液、等渗磷酸盐缓冲液、生理盐水稀释至刻度,在 190~400 nm 波长进行扫描。结果在不同的分散介质中,样品均在 250 nm 波长处有最大吸收。

2.2.2 标准曲线的绘制:精密称取 4ac 适量,加