

贵州民族药羊耳菊活性成分提取工艺研究

陈祖云, 迟明艳, 兰燕宇*

(贵阳医学院, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 经对不同提取工艺制备的羊耳菊提取物进行比较研究, 确定合理可行的提取工艺。方法: 选用主要药效学试验结合指标成分收率和指纹图谱变化, 对方中羊耳菊的水煎煮提取物、水提醇沉物及树脂分离精制纯化的样品进行比较, 以评价羊耳菊活性成分的提取工艺。结果: 羊耳菊水煮、醇沉、大孔吸附树脂富集纯化各样品的抗炎、解热、抗菌作用无显著性差异, HPLC 图谱显示经大孔吸附树脂富集纯化后样品杂质峰减少, 3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸转移率均达 70% 以上。结论: 大孔树脂纯化羊耳菊活性成分的工艺合理可行, 该工艺可最大限度富集有效成分。

[关键词] 羊耳菊; 活性成分; 大孔吸附树脂

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 08-0007-04

Research on Extraction of Active Components of
Ethno-medicine Yangerju from Guizhou Province

CHEN Zu-yun, CHI Ming-yan, LAN Yan-yu^{*}

(Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the extracts of Yangerju and determine an optimum technique to extract. **Method:** Use pharmacodynamics test combined with the main index components change and fingerprint to evaluate the different extraction of Yangerju. **Result:** The anti-inflammatory, antipyretic, anti-bacterial effect of the boiling, alcohol precipitation, macroporous resin purification was no significant difference , fingerprint suggest that the macroporous resin and purification of sample impurities Peak reduction and the Extraction rate of 3, 4-*O*-dicaffeoyl-quinic acid were more than 60% . **Conclusion:** Macroporous resin purification was an optimum technique to extract.

[Key words] Yangerju; active constituents; extraction

羊耳菊以根或全草入药^[1], 具有疏风散热、解毒消肿之功效, 常用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、风湿疼痛、痈疮疔毒^[2]。羊耳菊为贵州少数民族常用药物, 作者在民间验方的基础上, 以羊耳菊为主药研制开发了治疗复发性口腔溃疡的中药新药珍珠滴丸。本试验旨在对羊耳菊提取精制工艺进行研究, 最大

限度富集有效成分或有效部位, 为开发现代中药珍珠滴丸剂奠定试验基础。

1 材料

1.1 药品 羊耳菊, 为菊科植物羊耳菊(*Inula cappa* (Buch. -Ham. ex D. Don) DC.) 的新鲜或干燥全草。产地: 贵州省黔北、贵州省六盘水, 由贵阳医学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为菊科植物羊耳菊的干燥全草。3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸由贵州省中药民族药物研究开发中心提供, 纯度达 98% 以上。冰矾清毒生肌散, 贵阳德昌祥药业有限公司(批号 20050101)。

1.2 动物 SD 大鼠, 体重 180 ~220 g, 雌雄兼用; 家兔, 体重 2 ~2. 5 kg, 雌雄兼用。以上动物由贵阳医学院实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(黔) 2002-0001。

1.3 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪系列(美

[收稿日期] 20100107(008)

[基金项目] 贵州省科技厅科技计划项目(黔科合计工字[2009] 40001); 贵州省中药现代化(黔科合农字[2005] 5039 号)

[第一作者] 陈祖云, 副教授, 天然药物活性成分及药物新剂型、新技术、新工艺研究, Tel: 13985124316, E-mail: gzuyun@ 126. com

[通讯作者] 兰燕宇, 教授, 天然药物活性成分及药物新剂型、新技术、新工艺研究, Tel: (0851) 6908899, E-mail: lanyanyu@ gmail. com

国安捷伦科技公司), 岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪系列(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 水煎煮提取 羊耳菊药材 400 g, 加水 10 倍量煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 1 mL 含生药 2 g, 备用。

2.1.2 水煎煮、醇沉处理 羊耳菊药材 400 g, 加水 10 倍量煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 1 mL 含生药 1 g, 加入乙醇使含醇量为 60%, 搅拌, 静置 12 h, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至 1 mL 含生药 2 g, 备用。

2.1.3 D101 大孔树脂纯化 羊耳菊药材 400 g, 加水 10 倍量煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 1 mL 含生药 1 g, 加入乙醇使含醇量为 60%, 搅拌, 静置 12 h, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至 1 mL 含生药 0.25 g, 上 D₁₀₁ 大孔吸附树脂柱 400 mL, 用 1 倍树脂体积水洗, 继用 3 倍树脂体积 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 浓缩至 1 mL 含生药 2 g 备用。

2.2 指标成分转移率

2.2.1 指标成分的选择 据报道羊耳菊中的 3, 4-O-二咖啡酰基-奎宁酸具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗纤维化等药理活性^[3-4]。我们以 3, 4-O-二咖啡酰基-奎宁酸的动态变化为指标对羊耳菊药材的提取、分离、纯化工艺进行了研究。

2.2.2 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈(5.0 mm × 200 mm, 5 μm) 大连依利特; 流动相 甲醇-0.1% 磷酸(37:63); 流速 1 mL·min⁻¹; 温度 40℃; 检测波长: 329 nm; 理论塔板数 3 000。结果见表 1。

表 1 3, 4-O-二咖啡酰基-奎宁酸收率考察 %

样品	3, 4-O-二咖啡酰基-奎宁酸收率	总固体物
1(水煎煮)	79.12	14.36
2(水提醇沉)	74.86	9.23
3(树脂纯化)	71.31	4.59

梯度洗脱流动相配比变化程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~60	88 30	12 70

2.3 指纹图谱

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 保护柱 Phenomenex C₁₈(4.0 mm × 3 mm, 5 μm); 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 A, 80% 乙腈为流动相 B, 按下表进行梯度洗脱; 流速为 1 mL·

min⁻¹; 柱温 40℃; 检测波长为 254 nm。

2.3.2 指纹图谱测定 以水煎煮液、醇沉液、大孔吸附树脂富集工艺提取纯化样品, 进行指纹图谱测定。结果见图 1。

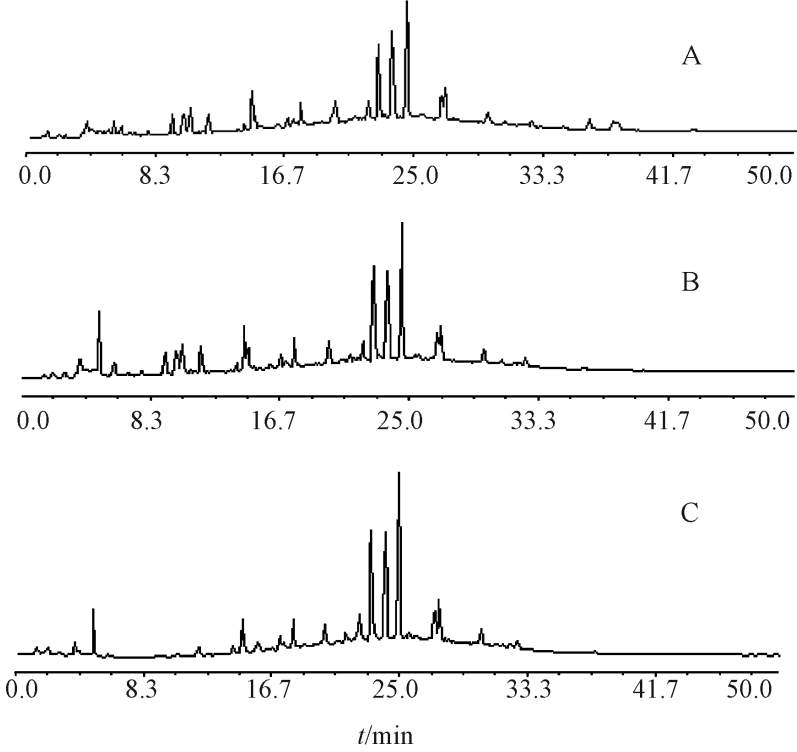


图 1 羊耳菊水煮液(A)、醇沉液(B)及大孔树脂吸附洗脱液(C) HPLC 图谱

2.4 药效学试验

2.4.1 解热作用 取体重 1.8~2.5 kg 健康家兔若干只, 实验室温度控制在 25℃左右。于试验前 3 日, 每日测正常肛温 2 次, 选取体温变动不高于 0.3℃的家兔 25 只, 按基础体温分层随机分为 5 组。给药前测定 3 次肛温(每 30 min 1 次), 以体温平均值为基础体温。给药组按下表剂量灌胃给药, 正常对照组同法给等容积生理盐水, 阳性对照组灌胃给阿司匹林片 0.15 g·kg⁻¹。同时各组动物耳缘静脉注射内毒素 5 EU·kg⁻¹。于内毒素攻击后 1, 2, 3, 4, 5 h 测定家兔肛温, 结果见表 2。

2.4.2 抗菌试验

2.4.2.1 含药培养基的制备 试验药物用灭菌生理盐水稀释成含生药 1 g·mL⁻¹, 经无菌试验合格后, 分别取试药供试液 10 mL 至第一皿, 加 40 mL 已融化并保温于 56℃的相应培养基中, 混匀, 制成含药培养基; 再吸取上述培养液 25 mL 于第二皿, 加 25 mL 培养液, 混匀; 如此等倍稀释, 制成终浓度为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg·mL⁻¹(1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) 的含药液体培养基。同法制备不含药物的菌株对照和阴性对照培养基。

2.4.2.2 菌株的接种与培养 取小试管分别加入上述各浓度药物液体培养基 1 mL, 再加入 10⁻³ 稀释

表 2 羊耳菊不同提取方法对内毒素所致家兔发热的影响(柳±s, n = 5)

组别	剂量 /生药 g·kg ⁻¹	给药前 体温 /	给药后不同时间体温 /					
			0. 5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
正常	—	39. 04 ±0. 26	40. 26 ±0. 53	40. 42 ±0. 42	40. 48 ±0. 50	40. 02 ±0. 48	39. 76 ±0. 29	39. 50 ±0. 27
样品 1	9. 0	38. 98 ±0. 28	40. 16 ±0. 52	40. 16 ±0. 32	39. 80 ±0. 25 ¹⁾	39. 44 ±0. 27 ¹⁾	39. 32 ±0. 28 ¹⁾	39. 40 ±0. 23
样品 2	9. 0	39. 06 ±0. 15	39. 54 ±0. 59	39. 60 ±0. 58 ¹⁾	39. 64 ±0. 55 ¹⁾	39. 32 ±0. 44 ¹⁾	39. 24 ±0. 38 ¹⁾	39. 30 ±0. 42
样品 3	9. 0	39. 08 ±0. 13	39. 74 ±0. 32	39. 88 ±0. 48	39. 52 ±0. 37 ²⁾	39. 44 ±0. 26 ¹⁾	39. 38 ±0. 18 ¹⁾	39. 40 ±0. 12
阿司匹林	0. 1	39. 06 ±0. 30	39. 54 ±0. 46	39. 64 ±0. 31 ²⁾	39. 62 ±0. 22 ²⁾	39. 14 ±0. 33 ²⁾	39. 22 ±0. 24 ²⁾	39. 04 ±0. 34 ¹⁾

注: 与对照组比较¹⁾ *P* < 0. 05, ²⁾ *P* < 0. 01。

的新鲜菌液 0. 1 mL; 同法制备试药对照(不加菌液) 和菌株对照(加不含药物的液体培养基)。表皮葡萄球菌置 37 ℃ 温箱培养 24 h, 乙型溶血性链球菌置 CO₂ 培养箱内 37 ℃ 培养 24 h。观察细菌生长情况, 以不显示混浊, 完全无菌生长的试药浓度为药物对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)。选出 MIC 试验中无菌生长的培养基管, 用接种环取一环分别接种于不含试药的相应培养基上。表皮葡萄球菌置普通温箱内 37 ℃ 培养 24 h 后观察结果, 乙型溶血性链球菌置 CO₂ 培养箱内 37 ℃ 培养 24 h 后, 观察细菌生长情况, 完全无菌生长的试药浓度为药物对该菌株的最低杀菌浓度(MBC)。

3 结果

3. 1 指标转移率 羊耳菊水煮、醇沉、大孔吸附树脂富纯化样品的 3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸转移率均达 70% 以上。

3. 2 解热作用 各试验组均明显抑制内毒素所致家兔体温的升高, 与正常组比较有显著性差异(*P* < 0. 05, *P* < 0. 01), 但各组间比较无显著性差异。

3. 3 抗菌试验 各试验组对表皮葡萄球菌、乙型溶血性链球菌标准株均有不同程度的抑制作用。表皮葡萄球菌 MIC 小于或等于 25 mg·mL⁻¹, MBC 小于或等于 50 mg·mL⁻¹; 乙型溶血性链球菌 MIC 小于或等于 100 mg·mL⁻¹, MBC 小于或等于 200 mg·mL⁻¹。菌株对照试验有菌生长, 试药对照试验无菌生长。

3. 4 指纹图谱测定 各样品 HPLC 图谱中大孔吸附树脂精制纯化样品的杂质峰减少, 主要物质的峰形、峰数与水煎煮液、醇沉液基本相似, 表明大孔树脂精制纯化工艺基本保留了羊耳菊中的主要成分。

4 讨论

根据“中药——药理作用——效应物质基础——质量控制指标”的研究思路, 本研究在药理效应试验基础上, 结合指纹图谱和指标成分对提取工

艺进行评价, 跟踪考察各工艺路线中活性部位或有效成分的转移情况。试验结果表明, 羊耳菊水煮、醇沉、大孔吸附树脂富集纯化各样品的抗炎、解热、抗菌作用无显著性差异, HPLC 图谱显示经大孔吸附树脂富集纯化后样品杂质峰减少, 3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸收率均达 70% 以上, 大孔吸附树脂富集纯化后总固体物与水提物比较下降了 70% 左右, 既可除去大量杂质, 又可使有效成分得到充分富集, 减少服用量。

试验曾采用 D₃₅₂₀, AB-8, D₁₀₁, X-5, DA₂₀₁ 等几种极性不同的大孔吸附树脂对羊耳菊精制纯化工艺进行筛选, 通过静态比吸附量^[5]、解吸附率^[6] 试验, D₁₀₁ 树脂对 3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸的静态吸附较好, 70% 乙醇能有效地将 3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸解吸, 因此选用 D₁₀₁ 树脂进行分离纯化。其工艺参数为: 径高比 1 : 8; 温度室温; 上柱浓度 0. 25 mg·mL⁻¹; 吸附流速 2 BV/h; 吸附泄漏点吸附流出液中 3, 4-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸浓度大于 0. 02 mg·mL⁻¹; 洗脱剂浓度 70% 乙醇; 洗脱液用量 3 BV; 洗脱速度 2 BV/h; 大孔吸附树脂重复使用次数为 15 次。上述工艺在生产过程中合理可行, 可用于工业化大生产。

[参考文献]

[1] 宋立人, 洪恂, 丁绪亮, 等. 现代中药学大辞典[M] (上册). 贵阳: 贵州人民卫生出版社, 2001: 899.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M] (苗药卷). 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 274.

[3] 李祖晟, 朱志安. 二咖啡酰奎宁酸药理实验研究进展[J]. 医学综述, 2004, 10(4) : 249.

[4] Peluso G, De Feo V, De Simone F. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production[J]. J NatProd, 1995, 58(5): 639.

[5] 李坤平, 贲永光, 高崇凯, 等. 大孔吸附树脂对布渣叶总

黄酮的富集纯化特性研究[J]. 广东药学院学报,
2008, 24(6): 539.
[6] 向大雄, 李焕德, 朱叶超, 等. 大孔吸附树脂分离纯化葛

根总黄酮的研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(1): 35.

[责任编辑 仝燕]

第三届中医药现代化国际科技大会学术征文通知

“第三届中医药现代化国际科技大会”将于 2010 年 11 月 25 ~26 日在四川成都召开。现将有关征文等
事项通知如下:

1. 征文内容:

分会一 中医药创新与发展政府论坛

围绕中医药多边国际合作、标准化建设等征文。投稿邮箱: icetcm_1@ 163. com

分会二 中医药学的现代理念与基础理论研究

围绕中医药现代理念、基础理论及作用机理等征文。投稿邮箱: icetcm3rd@ 163. com

分会三 中医药防治慢性疾病与疗效评价研究

围绕慢性疾病中医药诊疗方案、疗效评价等征文。投稿邮箱: icetcm2010clinic@ 126. com

分会四 中医药防治重大传染病的研究

围绕重大传染病中医药诊疗方案、疗效评价等征文。投稿邮箱: hui931222@ sina. com

分会五 中药资源的可持续开发和保护

围绕中药资源保护、中药材规范化种植、质量标准等征文。投稿邮箱: liu_xianwu@ yahoo. com. cn

分会六 中药创新与产业发展

围绕中药新药研究开发、关键共性技术及产业发展等征文。投稿邮箱: tcm028@ 126. com

分会七 民族医药发展与创新

围绕民族医药的保护、传承与发展等征文。投稿邮箱: gujiancd@ 163. com

2. 联系人: 学术委员会办公室(成都中医药大学科技处) 彭腾, 电话: 86-28-61800101, 13880376673, E-
mail: kjchjz@ 163. com

3. 详细征文要求及更多会议信息请关注大会网站, (<http://www.icetcm.org>) 邮编: 611137