

结肠靶向定位滴丸克癌素的提取工艺研究

张晓燕, 胡红伟, 徐增荣, 陈深博, 王建国* (黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 建立结肠靶向滴丸克癌素的提取工艺方法。方法 采用碱溶酸沉法从槐米中提取芦丁, 再进行酸水解得到槲皮素; 采用传统乙醇回流法从姜黄中提取总姜黄素, 以姜黄中的总姜黄素含量为指标, 通过正交表分析确定最佳提取工艺。结果 槲皮素的提取条件为: 碱性 pH 8~9, 酸性 pH 3~5 条件下提取芦丁; 得到精制芦丁加 100 倍量的 2% 硫酸酸水解 90 min。姜黄的最佳提取工艺为: 85% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h; 得浸膏上硅胶柱收集氯仿洗脱部分得总姜黄素。
结论 该工艺可行, 可为结肠靶向滴丸克癌素的生产提供参考。

关键词: 结肠; 靶向; 克癌素; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)03-0215-04

作者简介: 张晓燕, 女, 博士, 助理研究员 Tel: (0451)82196274 E-mail: 12zhangxiaoyan@163.com *通信作者: 王建国, 男, 教授
Tel: (0451)82196274 E-mail: wangjianming@hljucm.net

Study on Extraction Technique of Medicine Cruing Cancer on Colon-Specific Target Dropping Pill

ZHANG Xiaoyan, HU Hongwei, XU Zengrong, CHEN Shenbo, WANG Jianming* (Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To set up a method of extraction technique of medicine cruing cancer on colon-specific target dropping pill. **METHODS** Using alkali-soluble acid ways to extract rutin from flos sophorae immaturus, then using the acid hydrolysis to obtain quercetin. Using traditional ethanol reflux to extract total curcumin from turmeric, using the content of turmeric as the total target, to determine the optimum extraction process through the analysis of orthogonal table. **RESULTS** Quercetin extraction conditions are as follows: alkaline is pH 8~9, acidic conditions is pH 3~5, extracting rutin, then add 100 times volume of 2% sulfuric acid to hydrolyze 90 minutes. The optimum extraction process of turmeric extraction are as follows: using 85% ethanol extract reflux 3 times, each time is 1 hour. Extracting the part-eluting of chloroform on silica gel column to collect total curcumin. **CONCLUSION** The process is feasible and supplying reference for production of medicine cruing cancer on colon-specific target dropping pill.

KEY WORDS: colon; targeting; medicine cruing cancer; extraction process

克癌素是以姜黄中的总姜黄素和槐米中的槲皮素配伍而成的结肠靶向制剂。槲皮素一般通过槐米中的芦丁在酶或酸的作用下水解得到。现代药理研究表明,槲皮素具有降低血压、增强毛细血管抵抗力、调血脂、扩张冠状动脉、增加冠脉血流量等作用^[1]。槲皮素对恶性肿瘤生长和转移的抑制作用是近年来一个十分活跃的研究课题,Leighton等认为槲皮素是已知最强的抗癌剂之一^[2]。姜黄素(curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄中提取的一种黄色酸性酚类物质,是姜黄发挥药理作用的主要活性成分。姜黄素具有广泛的药理活性,如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗突变、抗艾滋病病毒等^[3]。本试验是在证实姜黄素、槲皮素配伍使用对S180肉瘤小鼠有明显的抗肿瘤作用后,通过正交试验法考察醇提法提取总姜黄素及碱溶酸水解法提取槲皮素的最佳提取工艺,最终制成中药靶向制剂,为口服定位释药系统研究方向提供参考。

1 仪器和试剂

Waters 600-2487 型高效液相色谱仪(美国waters公司), Millennium³² 色谱工作站数据处理系统。姜黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110823-200603,供含量测定用),槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100081-200406,供含量测定用);槐米姜黄药材购于哈尔滨市世一堂药材总公司(经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为豆科植物槐 *Sophora japonica* 的干燥花蕾);姜黄药材购于哈尔滨市世一堂药材总公司(经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L.的干燥根茎);甲醇为色谱纯,水为重蒸水,生理盐水,其余试剂均为分析纯。

2 姜黄素的提取

2.1 因素和水平的确定 根据不同提取方法的考察结果,选择提取回流工艺中4个影响总姜黄素提取率的因素:乙醇浓度(A),乙醇用量(B),提取时间(C),提取次数(D)进一步优选姜黄中总姜黄素提取条件。研究方法采用正交设计,每个因素选取3个水平,以L₉(3⁴)正交表安排实验,具体影响因素及试验水平见表1。

表1 正交试验因素水平表

Tab 1 Design for factors and levels of orthogonal test

水平	A	B	C	D
	乙醇浓度/%	乙醇用量/倍	提取时间/h	提取次数
1	65	10	1	1
2	75	15	2	2
3	85	20	3	3

2.2 含量测定方法^[4]

2.2.1 色谱条件 色谱柱 YWG-C₁₈(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(含4%冰醋酸)(48:52); 流速为1.0 mL·min⁻¹; 柱温30 °C; 检测波长为254 nm。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取姜黄素对照品适量,加甲醇溶解制成0.4 mg·mL⁻¹的溶液,稀释成不同浓度,进样相同体积10 μL,在“2.2.1”色谱条件下进样并测定,将测得数据进行线性回归,以峰面积为纵坐标,以进样质量为横坐标,得姜黄素回归方程为 $Y=1\ 760\ 000.8X+138.7(r=0.999\ 3)$,结果表明:姜黄素0.8~4.0 μg之间呈良好线性关系。

2.2.3 供试品的制备 精密称取9份姜黄样品1.0 g,以表1的9种工艺条件组合进行乙醇回流提取,提取液放冷过滤置100 mL量瓶中,加85%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 测定法 分别精密吸取0.4 mg·mL⁻¹对照品溶液5 μL与供试品溶液10 μL, 注入液相色谱仪中, 测定, 即得。色谱图见图1, 试验结果见表2, 表3。

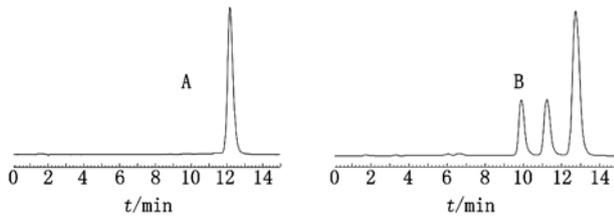


图1 高效液相色谱图

A-姜黄素对照品; B-姜黄素供试品

Fig 1 HPLC chromatogram

A-curcumin standards; B-curcumin sample

表2 试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

列号	A	B	C	D	姜黄素含量/%
1	1	1	1	1	2.32
2	1	2	2	2	2.56
3	1	3	3	3	2.32
4	2	1	2	3	2.94
5	2	2	3	1	2.53
6	2	3	1	2	2.34
7	3	1	3	2	2.69
8	3	2	1	3	3.07
9	3	3	2	1	2.33
K ₁	2.40	2.65	2.58	2.40	
K ₂	2.60	2.72	2.61	2.53	
K ₃	2.70	2.33	2.51	2.77	
R	0.30	0.39	0.10	0.37	

表3 方差分析表

Tab 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	F临界值	P
A	0.136	2	0.068	9.067	9.000	<0.1
B	0.263	2	0.132	17.533	9.000	<0.1
C	0.015	2	0.008	1.000		
D	0.224	2	0.112	14.933	9.000	<0.1
误差	0.01	2				

由表2极差R比较可知, 影响姜黄中总姜黄素提取效率的因素主次顺序为B>D>A>C, 即乙醇用量最重要, 提取次数次之。按K值观察分析, 得出回流提取最佳条件为A3B2C2D3, 方差分析结果表明: C因素离差平方和最小, 将其作为误差项, A、B、D因素对结果有差异, 但均不明显。故将姜黄的提取工艺定为15倍量85%乙醇回流3次, 每次1 h。对优选的提取条件进行3次重复试验验证, 得姜黄素的提取率分别为3.27%, 3.39%, 3.24%, 平均值为3.30%, 试验结果高于预试验和正交设计优化9个试验号, 从而证明了优选提取条件的合理性。

2.3 硅胶层析柱纯化分离

100 °C活化30 min硅胶上柱, 用氯仿洗脱直至层析柱平衡。经“2.2.3”姜黄提取物甲醇溶解与适量硅胶拌匀, 蒸干溶剂, 上样进行洗脱, 流速

5 mL·min⁻¹, 部分收集洗脱液, 进行硅胶G薄层层析(TLC), 合并Rf值相同的洗脱液部分, 氯仿部分减压浓缩至干得黄色絮状物为总姜黄素, 洗脱率为86.6%, 姜黄素的纯度为75.96%。

3 槲皮素的提取

3.1 芦丁的提取

碱溶酸沉法(碱性 pH 8~9, 酸性 pH 3~5)提取芦丁, 得粗芦丁, 粗芦丁按比例 1:200 加蒸馏水重新结晶(煮沸 10 min, 趁热过滤, 滤渣加少量水重新煮沸 10 min, 合并滤液, 充分静置 24 h 后过滤, 将滤渣置于干燥箱中 60 °C 干燥), 得精制芦丁。

3.2 槲皮素的制备

精制芦丁分别加入 100 倍量的 1%, 2%, 4% 硫酸溶液, 分别在 0, 30, 60, 90, 120 min 取少量样品, 水洗至中性, 干燥, 甲醇 1 mL 溶解, 即得。

3.3 芦丁及槲皮素的薄层色谱

采用支持剂: 硅胶 G 薄层板; 展开剂: 正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5)上层(BAW 系统); 对照品: 槲皮素对照品的甲醇溶液, 自制芦丁精制品的甲醇溶液; 显色剂: 1%的氯化铝醇溶液, 将“3.2”的样品依次点样, 结果: 芦丁加 100 倍 2%硫酸溶液 90 min 黄色荧光(芦丁的荧光斑点)基本消失, 黄绿色荧光(槲皮素的荧光斑点)越显清晰, 说明在此条件下芦丁基本水解完全。可将该条件作为芦丁水解槲皮素的条件。

3.4 槲皮素重结晶

75%乙醇回流 30 min, 过滤, 静置, 挥去乙醇, 出现沉淀, 过滤, 干燥, 得槲皮素精品, 纯度 85.04%。

4 讨论

从姜黄中提取姜黄素选用较为方便的超声提取法、回流提取法(甲醇、乙醇回流)和水蒸气蒸馏法去除挥发油后再乙醇回流提取。得出姜黄素的提取率分别为2.00%, 3.56%, 2.58%, 2.29%, 甲醇回流的提取率最高, 但考虑到甲醇的毒性, 最终选择乙醇回流法。从而明确了回流技术在本实验中的优越性。

姜黄中所含姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素, 其结构中8-双酮与烯醇结构构成的共轭体系是其显黄色的主要原因, 且它溶于乙醇后仍显黄色, 在426 nm处有最大吸收峰且无肩峰。本实验同时采用高效液相色谱法测定姜黄中姜黄素的含量, 本法能达到有效分离各组分的目的, 具有灵敏度高、操作简单、分离效果好等优点, 实验结果为优化姜黄中有效成分的提取工艺条件

提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] MENG D S, WANG S L. An titumor effect of quercetin [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2001, 32 (2): 186-188.
- [2] YIN J, GUO L G. Modern Research and Clinical Application of Traditional Chinese Medicine (中药现代研究与临床应用) [M]. Vol 2. Beijing: Traditional Chinese Medicine and Ancient Book Publishing House, 1995: 362-366.
- [3] TANG Q H, HU Y S, WU P. To determine the content of the curcumin in curcuma, *Zedoray Rhizome* and *Turmeric Root Tuber* by the method of the HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 1998, 10(3): 30-31.
- [4] HU J, LI L. Curcumin pharmacology function study in the current situation [J]. Lab Med Clin(检验医学与临床), 2007, 4(12): 1186-1187.

收稿日期: 2009-06-09