

· 制剂工艺 ·

紫锥菊中菊苣酸的提取工艺和含量测定

钟英杰^{*}, 李亮, 徐福亮

(青岛康地恩药业有限公司, 山东 青岛 266111)

[摘要] 目的: 优选紫锥菊药材地上部分的提取工艺, 建立菊苣酸的含量测定方法。方法: 择 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 以有效成分菊苣酸的含量为指标优选工艺参数。结果: 紫锥菊的最佳提取工艺为 12 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次 1.5 h。菊苣酸线性范围在 0.011 ~1.100 mg, $r=0.9998$, 平均回收率 99.51% (RSD = 1.01%, $n=6$)。结论: 工艺稳定、可行, 适合工业化生产; 含量测定方法简便准确, 重复性好, 可用于控制紫锥菊的质量。

[关键词] 紫锥菊; 菊苣酸; 提取工艺; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6, R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0001-04

Studies on extraction process of cichoric acid in *Echinacea purpurea*

ZHONG Ying-jie^{*}, LI Liang, XU Fu-liang

(Qingdao Kangdien Pharmaceutical Co., Ltd, Qingdao 266111, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the optimal extraction technology and to determine the quantity of cichoric acid from *Echinacea purpurea*. **Method:** Nine experiments were carried out through $L_9(3^4)$ orthogonal design. The contents of cichoric acid were determined by HPLC. **Result:** The best extraction condition obtained was 12 times amount 60% alcohol and extracted for 3 times, 1.5 hours each time. Cichoric acid was linear within the range of 0.011 ~1.100 mg, $r=0.9998$. The average recovery is 99.51% (RSD = 1.01%, $n=6$). **Conclusion:** This optimal technology is stable and workable, can be used in industrial production. The determination method is suitable for quality control.

[Key words] *Echinacea purpurea*; cichoric acid; Extraction technology; HPLC

紫锥菊 (*Echinacea purpurea*) 是原产美洲的一类菊科野生花卉, 是目前受到国际普遍重视的一种免疫促进剂和调节剂^[1], 可明显提高机体的免疫调节水平, 主要用于治疗伤风感冒 (上呼吸道感染)、伤寒等多种细菌感染病症。欧美市售紫锥菊制剂大多为紫锥菊地上部分的榨汁或酊剂^[2], 主要用于呼吸道和尿道反复感染的辅助治疗。在美国常用紫锥菊地上部分的粉剂胶囊或酊剂, 每年的销售额达 3 亿美元^[3]。紫锥菊主要含有咖啡酸衍生物如菊苣酸, 还有烷基酰胺类化合物、多糖及糖蛋白等活性成分^[4]。近年来研究表明, 其主要有效成分菊苣酸 (cichoric acid) 具有抗氧化^[5]、调节免疫刺激、抑制

HIV 整合酶^[6]、促进胰岛素释放^[7]等作用。本实验旨在对紫锥菊药材地上部分的有效成分菊苣酸进行提取工艺和含量测定研究, 从而为紫锥菊药材及其有效成分的深入研究提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1313A 自动进样器, G1315B DAD 二极管阵列检测器; UV-2450 紫外-可见分光光度计 (SHIMADZU 公司, 日本); AG285 分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Milli-Q 超纯水仪; DZ-2BC 型真空干燥箱 (天津泰斯特仪器有限公司)。

紫锥菊药材地上部分, 自然干燥, 粉碎, 购自西安锐源生物科技有限公司, 并经青岛市药检所吴爱英教授鉴定为菊科紫锥菊属植物紫锥菊 *Echinacea purpurea* (L.) Moench 的地上部分。菊苣酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号

[收稿日期] 2009-08-18

[通讯作者] * 钟英杰, Tel: (0532) 87901090, Fax: (0532) 87905229; E-mail: zhong761@yahoo.com.cn

为 111752-200601。色谱测定用水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫锥菊中菊苣酸的提取

2.1.1 提取溶剂的选择 分别称取 10 g 紫锥菊药材地上部分 8 份,以 10 倍质量的 0, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 乙醇水溶液加热回流提取 2 h, 所得滤液浓缩后蒸干, 采用 HPLC 测定菊苣酸的含量, 并计算其得率。结果见图 1。可见, 随着乙醇体积分数的增加, 菊苣酸的逐渐升高(得率 = 出膏率 × 干膏中菊苣酸的质量分数), 当乙醇溶液的体积分数为 60% 时, 得率最高。随后, 菊苣酸的得率随乙醇体积分数的增加而降低。因此选择 60% 乙醇作为提取溶剂。

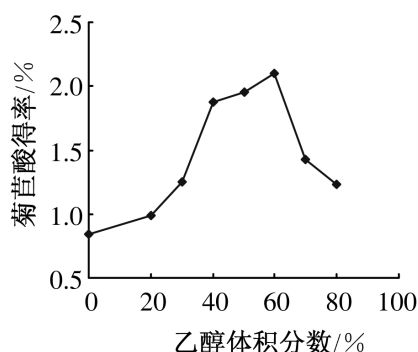


图 1 乙醇体积分数对菊苣酸得率的影响

2.1.2 正交试验设计 在预实验的基础上, 选择溶剂体积(A)、提取时间(B)、提取次数(C)作为 3 因素, 进行 $L_9(3^4)$ 的正交试验。分别称取 10 g 紫锥菊药材, 按 $L_9(3^4)$ 正交表所列条件加入 60% 乙醇回流加热, 滤过, 滤液浓缩后置已干燥至恒重的蒸发皿中水浴蒸干后, 于 70 °C 干燥 12 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速称重并密闭保存。采用出膏率及菊苣酸得率作为提取工艺的评价指标, 用加权综合评分, 按照出膏率和菊苣酸得率的权重比(4:6)计算, 并对实验结果进行分析, 结果见表 1, 2, 3。

表 1 因素水平

水平	A 溶剂体积/倍	B 提取时间/h	C 次数/次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

2.2 结果与分析 从表 2 和表 3 可以看出, 3 因素的影响大小依次为 $A > C > B$, 溶剂体积对出膏率和菊苣酸的得率影响最大。最佳组合条件为 $A_3 B_2 C_3$, 从降低成本、节约能耗考虑, 在保证充分提取的前提下, 综合分析各个因素对出膏率和菊苣酸的转移率

的影响, 确定提取工艺为 12 倍量 60% 乙醇回流加热提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 浓缩后水浴蒸干, 于 70 °C 干燥 12 h, 置干燥器中冷却 30 min, 得干膏。

表 2 正交试验

No.	A	B	C	D	出膏率/%	菊苣酸的得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	6.2	0.440	2.744
2	1	2	2	2	17.9	0.549	8.089
3	1	3	3	3	20.6	1.769	9.301
4	2	1	2	3	16.6	1.494	7.537
5	2	2	3	1	7.6	0.930	3.598
6	2	3	1	2	17.8	1.723	8.154
7	3	1	3	2	12.4	1.226	5.895
8	3	2	1	3	14.4	1.517	6.670
9	3	3	2	1	20.3	2.157	9.414
K_1	5.325	5.856	5.252	6.711			
K_2	6.119	8.347	7.313	6.430			
K_3	8.956	6.198	7.836	7.260			
R	3.631	2.491	2.584	0.830			

出膏率 = 干膏重 / 10 × 100%, 菊苣酸的得率 = 干膏中菊苣酸含量 × 干膏重 / 10 × 100%

加权综合评分 = 出膏率 × 40% + 菊苣酸的得率 × 60%

表 3 方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	21.865	2	20.454	<0.05
B	10.937	2	10.231	
C	11.197	2	10.474	
D	1.07	2		

$F_{0.95(2,2)} = 19.00$

2.3 验证试验 为验证所选条件的合理性, 取紫锥菊药材地上部分共 3 批, 各 100 g, 按确定的提取工艺进行放大试验, 测得出膏率均值为 21.20% (RSD 0.94%), 菊苣酸的得率均值为 1.025% (RSD 1.08%), 说明该工艺条件稳定、可行。

2.4 HPLC 测定菊苣酸的含量

2.4.1 色谱条件 色谱柱 Zorbax SB C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-1.0% 冰醋酸溶液 (25:75); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 328 nm; 进样量 10 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的菊苣酸对照品适量, 加 60% 乙醇制成每 mL 含 0.050 mg 的溶液, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取紫锥菊药材地上部分 10 g, 按确定的提取工艺制备干燥浸膏, 取 0.050

g 置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 乙醇 50 mL, 密塞,精密称定质量,超声(功率 250 W, 频率 35 kHz)提取 10 min, 冷却至室温,称量并以 60% 乙醇补足重量。以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

2.4.4 标准曲线的绘制 精密称取菊苣酸对照品适量,加 60% 乙醇制成 11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 菊苣酸对照品溶液。精密吸取上述溶液 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μL 进样,测定峰面积。以菊苣酸峰面积值为纵坐标,进样量为横坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得线性方程 $Y=7.8808X-60.652$, $r=0.9998$, 线性范围 0.011 ~1.100 mg。

2.4.5 精密度试验 取 2.4.2 项下菊苣酸对照品溶液,分次进样,各 6 次,记录峰面积。计算结果, RSD 0.64% ($n=6$)。

2.4.6 稳定性试验 按 2.4.3 项下制备供试品溶液 6 份,每隔 2 h 进样,分别测定峰面积,结果 RSD 0.71% ($n=6$),说明样品在 12 h 内稳定。

2.4.7 重复性试验 取同一批紫锥菊药材制备 6 份供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件独立测定 6 次,测得菊苣酸质量浓度分别为 92.97, 92.23, 93.04, 92.29, 92.55, 92.86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 0.38%。

2.4.8 回收率试验 精密称取同一批已知含量的紫锥菊药材 6 份,分别精密加入一定量的菊苣酸对照品,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算加样回收率,结果平均回收率 99.51%, RSD 1.01%。

2.5 样品测定 取 3 批紫锥菊药材地上部分,按 2.4.3 项下制备供试品,进样测定峰面积,计算菊苣酸的质量分数,分别为 1.031%, 0.969%, 1.028%。色谱图见图 2。

3 讨论

试验证明,波长在 328 nm 时,菊苣酸检测灵敏度高,故确定检测波长为 328 nm。试验中还还对供试品的制备进行了方法学考察,分别以水、30% 乙醇、60% 乙醇、甲醇超声提取 15 min,结果表明 60% 乙醇提取的菊苣酸含量较高。以 60% 乙醇为提取溶剂,考察了超声 15 min、回流 1 h、室温浸渍 6 h,结果表明超声提取率最高,且超声提取法操作简便、省时。同时对超声时间进行了比较,分别超声提取 5, 10, 15 min,结果 15 min 和 10 min 提取结果基本一致,表明超声 10 min 时基本提取完全。最终以 60% 乙醇超声提取 10 min 为供试品溶液的最佳制备方法。

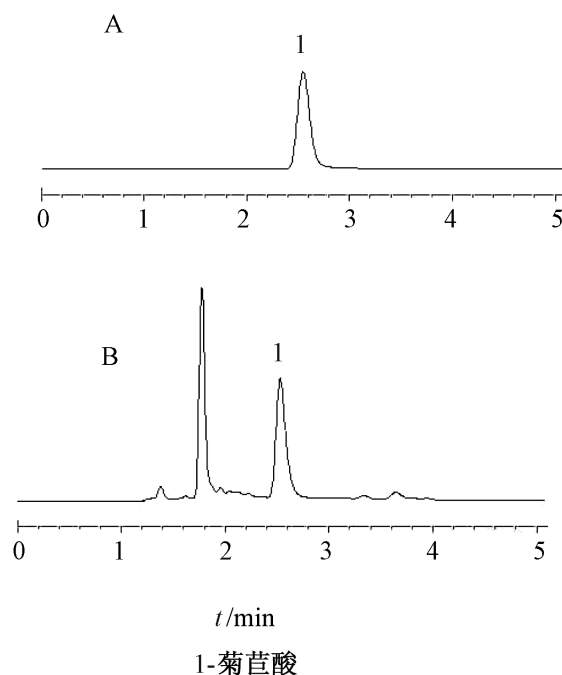


图 2 菊苣酸对照品(A)和紫锥菊(B)的 HPLC 图

试验中进行了流动相的选择,曾比较了乙腈-0.2% 磷酸溶液(25 75)、乙腈-2.0% 冰醋酸溶液(20 80)、乙腈-1.0% 冰醋酸溶液(22 78)等不同比例,结果使用乙腈-1.0% 冰醋酸溶液(25 75)的分离效果最好,峰型、出峰时间适宜。

紫锥菊中菊苣酸的提取一般采用水、甲醇、乙醇和超临界萃取,由于水提取温度高,容易造成菊苣酸的氧化^[8];甲醇提取容易造成有机溶剂残留,降低产品的质量并带来不安全因素,因此不适合工业化;超临界萃取由于成本较高,收率低,尚未完成工业化研究。本试验采用乙醇作为工业化提取溶剂,价格便宜,操作安全。

本试验所采用的紫锥菊药材其菊苣酸质量分数达 1.031%,这与北京地区引种栽培的紫锥菊有效成分菊苣酸含量相当^[9]。实验结果表明,本方法操作简单、方便,成本低,适合工业化生产,为紫锥菊的研究和开发打下了必要的基础。

[参考文献]

- [1] 肖培根. 国际流行的免疫调节剂——紫锥菊及其制剂 [J]. 中草药, 1996, 27(1): 46.
- [2] 刘一兵. 紫锥菊属植物制剂的化学、免疫作用与临床 [J]. 国外医药植物药分册, 2001, 16(2): 47.
- [3] Nadja B Cech, Maqueita S Eleazer, Lawresa T Shoffner, et al. High performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from Echinacea purpurea extracts [J]. J Chrom A, 2006, 1103: 219.