

实验研究

正交试验法优选青龙衣中胡桃醌的提取工艺

季宇彬^{1,2}, 严琴琴^{1,2}, 曲中原^{1,2}, 邹翔^{1,2}, 陆婉^{1,2}

(1. 教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨不同溶剂对青龙衣中胡桃醌提取率的影响, 进一步通过正交试验优选青龙衣中胡桃醌最佳提取工艺。方法 以胡桃醌的量为评价指标, 以乙醇、氯仿、石油醚、醋酸乙酯为溶剂分别进行超声提取, 用 HPLC 法测定提取物中的胡桃醌, 确定出最佳提取溶剂。以溶剂用量(倍)、提取时间(min)、提取次数(次)为考察因素, 采用正交试验法 $L_9(3^4)$ 确定提取青龙衣中胡桃醌的最佳工艺。结果 最佳提取溶剂为醋酸乙酯, 最佳提取工艺条件为 $A_3B_3C_2$, 即 10 倍量的醋酸乙酯, 超声 2 次, 每次 40 min。结论 用正交试验法优选所得胡桃醌的提取工艺科学合理, 适于工业生产。

关键词: 青龙衣; 胡桃醌; 提取; 测定; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)03-0151-04

Optimization of extraction technology for juglone in *Exocarpium Juglandis Immaturum* by Orthogonal Test

JI Yu-bin^{1,2}, YAN Qin-qin^{1,2}, QU Zhong-yuan^{1,2}, ZOU Xiang^{1,2}, Lu Wan^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Natural Antineoplastic Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China;

2. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences,

Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of different extraction solvents on the yield of juglone in *Exocarpium Juglandis Immaturum* and further optimize the extraction technology by orthogonal test. **Methods** The content of juglone was determined by HPLC and used as the assessment index. Ethanol, benzene, chloroform, and ethyl acetate were selected as the extraction solvents, and extracted by ultrasound wave, respectively, then the optimal extraction conditions were defined by orthogonal design. **Results** The optimum conditions were: extraction solvent — ethyl acetate (tenfold volumn $\times$ twice for 40 min per time). **Conclusion** Using the orthogonal test, the optimization of extraction technology for juglone is scientific, rational and can be used in industrial production.

Key words: *Exocarpium Juglandis Immaturum*, juglone, extraction technology, content determination, orthogonal test

青龙衣是胡桃科胡桃属植物核桃 *Juglans mandshurica* Maxim. 和胡桃楸 *J. regia* L. 未成熟果实的干燥果皮, 主产于东北、山东、河北等地。青

龙衣始载于《开宝本草》, 称为胡桃青龙; 《救急方》中称为青胡桃皮; 自《山东中草药手册》称为“青龙衣”后, 现多沿用此名称^[1]。青龙衣辛、苦、涩、平, 有清

基金项目 国家自然科学基金项目(30600816); 高等学校博士点学科点专项科研基金(20060240001)

作者简介 季宇彬(1956—), 男, 医学博士, 博士后, 教授, 博士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物研究。

E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn, Tel: (0451) 84800922

热解毒、祛风疗痹、止痛止痢的功效^[2]。青龙衣具有广泛的药用价值,特别是其抗癌活性,越来越受到重视。胡桃醌是青龙衣中具有抗肿瘤作用的有效成分,其抗肿瘤作用机制国内外均有报道^[3-5]。本实验以胡桃醌的量为评价指标,首先确定最佳提取溶剂,进一步运用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验,优选青龙衣中胡桃醌的提取工艺条件。

1 材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(717 Plus Autosampler, 600 Controller, 2996 Photodiode Array Detector Empower 色谱工作站); KQ5200DB 型超声机(江苏省昆山市超声仪器有限公司); BS110S 型电子分析天平(北京塞多利斯天平有限公司); N-1000 旋转蒸发仪(EYELA 上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试剂及试剂

青龙衣药材采于黑龙江省伊春市,经笔者鉴定为胡桃科胡桃树属植物胡桃树 *Juglans mandshurica* Maxim. 未成熟果实的干燥肉质果皮; 胡桃醌对照品(购于天津一方科技有限公司,质量分数98%); 乙醇、石油醚、氯仿、醋酸乙酯均为分析纯,甲醇为色谱纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 胡桃醌的 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水(55:45, 用磷酸调 pH 值约为 3.5), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C^[6]。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取胡桃醌对照品 0.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解定容, 摇匀, 即得 50 μ g/mL 胡桃醌对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

精密称取青龙衣粉末 10 g, 加相应溶剂超声提取, 减压回收溶剂得浸膏。分别将各浓缩浸膏用甲醇溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察

按上述色谱条件分别取对照品溶液, 进样 0.5、1、2、4、8、16 μ L, 以峰面积积分值(Y)为纵坐标, 胡

桃醌质量(X)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=69.87 X-0.616 3(r=0.999 9)$ 。结果表明, 胡桃醌在 0.025~0.8 μ g 与峰面积线性关系良好。

2.1.5 精密度试验

以醋酸乙酯为提取溶剂, 制备供试品溶液。精密吸取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定胡桃醌的峰面积, RSD 为 0.29%。

2.1.6 稳定性试验

精密吸取“2.1.5”项下供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10 h 进样, 按上述色谱条件测定胡桃醌的峰面积, RSD 为 1.03%, 表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.1.7 重现性试验

按“2.1.5”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按上述色谱条件分别测定胡桃醌的质量分数, RSD 为 0.27%。

2.1.8 回收率试验

取已知胡桃醌量(0.005%)的青龙衣粉末 10 g, 准确称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别准确加入胡桃醌对照品 0.5 mg, 加醋酸乙酯超声提取, 提取液浓缩后用甲醇溶解, 并移至 100 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度后用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 进样, 测定, 计算回收率。结果胡桃醌回收率为 98.70%, RSD 为 2.09% ($n=6$)。

2.2 提取溶剂的选择

取青龙衣药材, 粉碎, 过 30 目筛。准确称取青龙衣粉末 4 份, 每份 10 g。分别加入 10 倍量乙醇、氯仿、石油醚、醋酸乙酯, 密封, 超声 40 min(功率 40 kHz, 温度 25 $^{\circ}$ C), 滤过, 滤液浓缩, 减压回收溶剂, 得浸膏。浸膏用甲醇溶解, 并移至 10 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度后用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, HPLC 法测定各提取物中胡桃醌。如表 1 和图 1 所示, 醋酸乙酯对胡桃醌的提取率最高。

表 1 4 种溶剂提取胡桃醌的提取率($n=3$)

溶剂	提取率/%
石油醚	0.000 84
乙醇	0.001 53
氯仿	0.003 28
醋酸乙酯	0.005 11

2.3 单因素试验考察

2.3.1 溶剂用量对胡桃醌提取率的影响

取青龙衣药材, 粉碎, 过 30 目筛。准确称取青龙衣粉末 5 份, 每份 10 g。分别以 4、6、8、10、12 倍

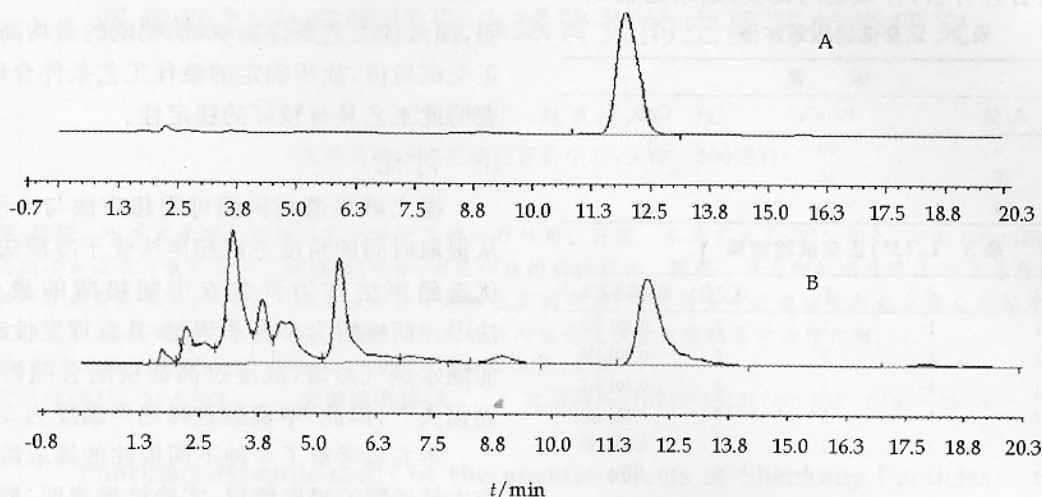


图1 胡桃醌对照品(A)和青龙衣醋酸乙酯提取物(B)的HPLC图

量醋酸乙酯浸泡,密封,超声40 min(功率40 kHz,温度25℃),滤过,滤液浓缩,减压回收溶剂,得浸膏。按“2.2”项下方法测定胡桃醌提取率。结果表明,提取溶剂最佳用量为6~10倍量。见图2。

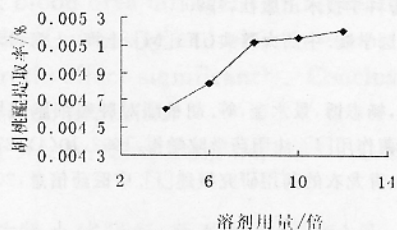


图2 溶剂用量对胡桃醌提取率的影响

2.3.2 提取时间对胡桃醌提取率的影响

取青龙衣药材,粉碎,过30目筛。准确称取青龙衣粉末5份,每份10 g。分别用10倍量醋酸乙酯浸泡,密封,冷浸1 h后,超声20、30、40、50、60 min(功率40 kHz,温度25℃),滤过,滤液浓缩,减压回收溶剂,得浸膏。按“2.2”项下方法测定胡桃醌提取率。结果表明,超声提取最佳时间范围为20~40 min。见图3。

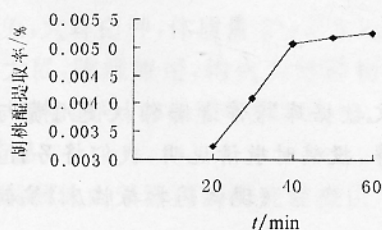


图3 提取时间对胡桃醌提取率的影响

2.3.3 提取次数对胡桃醌提取率的影响

取青龙衣药材,粉碎,过30目筛。准确称取青龙衣粉末5份,每份10 g。分别用10倍量醋酸乙酯浸泡,密封,冷浸1 h后,超声40 min(功率40 kHz,温度25℃),滤过,分别提取1、2、3、4、5次,滤液浓缩,减压回收溶剂,得浸膏。按“2.2”项下方法测定胡桃醌提取率。试验结果表明,最佳提取次数为1~3次。见图4。

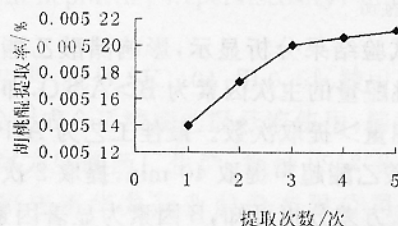


图4 提取次数对胡桃醌提取率的影响

2.4 正交试验优选青龙衣中胡桃醌的提取工艺

2.4.1 正交试验设计

根据单因素考察结果确定以溶剂用量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为影响因素,各取3个水平,考察指标为胡桃醌的量。因素水平表见表2。准确称取青龙衣粉末9份,每份10 g,加醋酸乙酯超声提取,分别按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,滤液浓缩,减压回收溶剂,得浸膏。按“2.2”项下方法测定胡桃醌提取率。

2.4.2 正交试验结果及分析

根据 $L_9(3^4)$ 正交表,按各因素、水平进行试验,测定提取液中胡桃醌的量,考察各因素对胡桃醌提取率的影响,结果见表3。运用SPSS15.0软件对实

验数据进行方差分析,并做组间比较,结果见表4。

表2 正交试验因素水平

水平	因素		
	A/倍	B/min	C/次
1	6	20	1
2	8	30	2
3	10	40	3

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	A	B	C	D(空白)	胡桃醌提取率/%
1	1	1	1	1	0.001 869
2	1	2	2	2	0.003 378
3	1	3	3	3	0.004 876
4	2	1	2	3	0.002 561
5	2	2	3	1	0.003 265
6	2	3	1	2	0.005 087
7	3	1	3	2	0.003 235
8	3	2	1	3	0.004 094
9	3	3	2	1	0.005 156
I	0.010 123	0.007 665	0.010 290	0.011 050	
II	0.010 913	0.010 737	0.011 700	0.011 799	
III	0.012 485	0.015 119	0.011 531	0.010 672	
R	0.002 362	0.007 454	0.001 410	0.001 127	

表4 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	$9.638\ 14 \times 10^{-7}$	2	$4.819\ 07 \times 10^{-7}$	4.394 26	$P < 0.05$
B	$9.355\ 69 \times 10^{-6}$	2	$4.677\ 85 \times 10^{-6}$	42.654 83	
C	$3.951\ 94 \times 10^{-7}$	2	$1.975\ 97 \times 10^{-7}$	1.801 78	
误差	$1.093\ 4 \times 10^{-5}$	8			

$$F_{0.05(2,2)} = 19.00$$

正交试验结果分析显示,影响醋酸乙酯提取青龙衣中胡桃醌量的主次因素为 $B > A > C$,即提取时间 $>$ 溶剂用量 $>$ 提取次数。最佳工艺为 $A_3B_3C_2$,即10倍量醋酸乙酯超声提取40 min,提取2次为最佳提取工艺。方差分析可知,B因素为显著因素,A和C因素均为不显著因素,即超声提取时间对青龙衣中胡桃醌的提取率有显著影响。

2.4.3 提取工艺的验证

精密称取胡桃醌药材3份各10 g,按最佳工艺条件平行操作,测得每份中胡桃醌的提取率分别为

0.005 160%、0.005 162%、0.005 157%。结果表明,用最佳工艺条件提取,胡桃醌的量均高于其他各正交试验值,故所确定的最佳工艺条件合理,同时也表明此工艺具有较好的稳定性。

3 讨论

据文献报道胡桃醌可用超声法与冷浸法提取。从提取时间的角度考虑超声法优于冷浸法。本实验优选超声法作为青龙衣中胡桃醌的最佳提取方法^[7]。胡桃醌为小分子萜醌,具有挥发性和升华性,能随水蒸气蒸馏,温度过高胡桃醌会随溶剂的挥发而损失^[8],因此,本实验选择超声温度为25℃。

本实验考察了4种不同极性的提取溶剂对青龙衣中胡桃醌的提取情况,实验结果表明,醋酸乙酯提取率显著高于乙醇、氯仿和石油醚,为最佳提取溶剂。

实验过程中发现溶剂量、提取时间、提取次数对青龙衣中胡桃醌的提取率都有一定的影响,而且超声提取时间对胡桃醌提取率有显著影响。

参考文献

- [1] 吴征镒,周太炎,肖培根,等.新中华本草纲目(第三册)[M].上海:上海科学技术出版社,1990.
- [2] 江苏新医学院.中药大辞典(下)[M].上海:上海科学技术出版社,1986.
- [3] 张野平,杨志博,景永奎,等.胡桃醌对肿瘤细胞的增殖抑制作用和抗菌作用[J].沈阳药学院学报,1993,10(4):271-274.
- [4] 徐巍.青龙衣的药用研究概述[J].中医药信息,2002,19(6):13-14.
- [5] 汲晨锋,肖凤,季宇彬.青龙衣多糖对 S_{180} 小鼠红细胞 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP酶活性及 $[Ca^{2+}]$ 的影响[J].中草药,2008,39(12):1842-1844.
- [6] 索绪斌,高奎滨,张云凌,等.高效液相色谱法测定青龙衣中胡桃醌含量[J].中药材,2003,26(11):793.
- [7] 胡国军,曲中原,崔兰,等.不同提取方法对青龙衣中胡桃醌测定的影响[J].中草药,2007,38(增刊):114-116.
- [8] 崔兰,曲中原,胡国军,等.中药醌类化合物的抗肿瘤作用研究进展[J].中草药,2007,38(增刊):284-286.

(收稿日期 2008-12-11)

本刊启事

本刊入编“中国核心期刊(遴选)数据库”和“CNKI中国期刊全文数据库”,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另行发放。作者如不同意将文章入编上述数据库,投稿时敬请说明,我们将另行处理。

《现代药物与临床》编辑部