

不同贮藏年限青龙衣中羟基萘醌的比较

辛国松^{1,2}, 曲中原^{1,2}, 邹翔^{1,2}, 李钧^{1,2}, 季宇彬^{1,2}

1. 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

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 建立测定青龙衣中羟基萘醌的方法, 考察不同贮藏年限的青龙衣药材中羟基萘醌的变化。 **方法** 以胡桃醌为对照品, 5%氢氧化钾为显色剂, 在 515 nm 波长下, 采用比色法测定青龙衣中羟基萘醌, 对不同贮藏年限的青龙衣药材中羟基萘醌进行比较。 **结果** 贮藏年限为一年、二年和三年的青龙衣药材中羟基萘醌的量存在明显差异, 即随着贮藏时间的延长, 青龙衣中羟基萘醌的量逐渐下降。 **结论** 青龙衣药材不宜储藏时间过长, 尽量应用当年的药材。

关键词: 青龙衣; 羟基萘醌; 胡桃醌; 贮藏年限; 比色法

中图分类号: R282.4; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)03-0221-03

Comparison of hydroxyl naphthoquinones from Qinglongyi in different storage times

XIN Guo-song^{1,2}, QU Zhong-yuan^{1,2}, ZOU Xiang^{1,2}, LI Jun^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}

1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research Center of Natural Antineoplastic Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To establish a determination method of hydroxyl naphthoquinones for Qinglongyi (fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica*), and to compare hydroxyl naphthoquinones from Qinglongyi in different storage times. **Methods** Juglone was used as standard, 5% KOH solution was used as chromogenic reagent, and wavelength was at 515 nm. Hydroxyl naphthoquinones in Qinglongyi in different storage times were determined by colorimetric method and compared. **Results** There were great differences among hydroxyl naphthoquinones contents of storage period 1, 2 and 3 years of Qinglongyi. The hydroxyl naphthoquinones contents of Qinglongyi gradually decreased with the storage time prolonged. **Conclusion** Qinglongyi should not be kept too long time, and should be used that very year.

Key word: Qinglongyi; hydroxy naphthoquinones; juglone; storage time; colorimetry

青龙衣是胡桃科胡桃树属植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 未成熟果实的干燥果皮, 主产于东北三省, 以黑龙江省资源蕴藏量最大。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]。羟基萘醌类化合物是青龙衣中抗肿瘤作用的有效组分^[2-3]。羟基萘醌类在碱性溶液中发生颜色改变^[4]。基于这一性质, 本实验以胡桃醌为对照品, 以 5%氢氧化钾为显色剂, 采用紫外-可见分光光度法测定不同贮藏年限青龙衣中羟基萘醌, 对评价药材质量具有一定意义。

1 仪器与材料

LIV—2102C 型紫外-可见分光光度计 (尤尼柯仪器有限公司); KQ5200DB 型超声机 (江苏省

昆山市超声仪器有限公司); N—1000 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); BS110S 型电子分析天平 (北京塞多利斯天平有限公司)。

青龙衣药材采于哈尔滨市宾县, 经鉴定为胡桃科植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 未成熟果实。趁新鲜剥取青果皮, 自然干燥。药材贮存在哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心基础实验室。根据储藏时间分为贮藏一年、二年和三年的药材。试剂均为分析纯, 双蒸水, 5%KOH 溶液。胡桃醌对照品购于天津一方科技有限公司, 质量分数为 98%。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精确称取胡桃醌对照品

收稿日期: 2011-04-06

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

作者简介: 辛国松 (1984—), 男, 中药学硕士研究生在读, 研究方向: 抗肿瘤天然药物。Tel: 13766801150 E-mail: pinyuancunxinguosong@126.com

2.5 mg, 放入 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 即得 0.1 mg/mL 对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备^[5-6] 将青龙衣药材粉碎成 30 目的粉末, 精密称取 5 g, 放入烧杯中, 加入 50 mL 醋酸乙酯浸泡 24 h, 超声提取 3 次 (功率 40 kHz, 温度 25 ℃), 每次 30 min, 抽滤, 合并 3 次提取的滤液, 用旋转蒸发器回收溶剂, 得浸膏, 待浸膏干燥至恒质量, 精确称取 5 mg 浸膏放入 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 即得。

2.2 检测波长的选择

分别取胡桃醌对照品溶液和青龙衣供试品溶液各 10 mL, 加入 1 mL 5%KOH 水溶液显色, 在 200~800 nm 波长扫描, 结果在 515 nm 处均具有最大吸收, 所以确定检测波长为 515 nm。

2.3 线性关系考察

精密量取胡桃醌对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加入 1 mL 5%KOH 水溶液显色, 加甲醇至刻度。精密移取 1 mL 5%KOH 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 作为空白溶液。分别在 515 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 胡桃醌质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.1089X+0.1410$, $r=0.9999$ 。结果表明胡桃醌在 2~12 μg/mL 与吸光度的线性关系良好。

2.4 精密度试验

精确移取 0.1 mg/mL 胡桃醌对照品溶液 0.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入 1 mL 5%KOH 水溶液显色, 加甲醇至刻度, 在 515 nm 处重复测定吸光度值 6 次, 计算得其 RSD 为 0.25%。

2.5 重现性试验

取贮藏一年的青龙衣粉末 6 份, 制备供试品溶液。取供试品溶液各 10 mL, 分别加入 1 mL 5%KOH 水溶液显色, 在 515 nm 波长处测定吸光度值, 计算羟基萘醌的质量分数, 结果 RSD 为 0.58%。

2.6 稳定性试验

取贮藏一年的青龙衣粉末 1 份, 制备供试品溶液, 取供试品溶液 10 mL, 加入 1 mL 5%KOH 水溶液显色, 用甲醇定容, 于 0、10、20、30、40、50 min 测定吸光度值, 计算得 RSD 为 0.21%, 表明青龙衣供试品溶液在 50 min 内基本稳定。

2.7 加样回收率试验

精密称取含羟基萘醌 0.014 1% 的青龙衣粉末 6 份, 约 0.77 g, 精密称定, 分别加入 0.1 mg/mL 胡

桃醌对照品溶液 1 mL, 制备供试品溶液, 显色, 测定, 计算加样回收率。结果平均加样回收率为 97.73%, RSD 为 1.14%。

2.8 不同贮藏年限青龙衣中羟基萘醌的测定

取不同贮藏年限的青龙衣样品, 制备供试品溶液, 各取 10 mL, 并分别加入 1 mL 5%KOH 水溶液显色, 在 515 nm 处测定吸光度, 计算羟基萘醌的质量分数, 结果见表 1。

表 1 不同贮藏年限青龙衣中羟基萘醌的测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of hydroxyl naphthoquinones from Qinglongyi in different storage times ($n=3$)

贮藏年限	羟基萘醌/%
一年	0.014 1
二年	0.010 4
三年	0.007 3

3 讨论

萘醌类成分是植物中具有广泛生理活性的一类次生代谢产物。青龙衣中萘醌类成分是抗肿瘤的活性成分之一。高奎滨等^[2]研究表明粗萘醌对多种体内移植性肿瘤有明显的抑制作用, 体外杀伤肿瘤细胞的作用更强, 且毒性较低。青龙衣中羟基萘醌类化合物主要有胡桃醌、2-甲氧基-8-羟基-1,4-萘醌、5,8-二羟基-1,4 萘醌、氢化胡桃醌及其苷类等, 其中胡桃醌的抗肿瘤作用及机制研究较为透彻^[7-9]。本课题组已建立了 HPLC 测定青龙衣中胡桃醌的方法^[5]。《中国药典》2010 年版一部紫草项下建立的羟基萘醌总色素测定方法是以左旋紫草素为对照品, 采用的紫外-可见分光光度法, 以其在可见光下的最大波长 516 nm 处进行测定。本研究同样采用紫外-可见分光光度法, 但不同的是根据羟基萘醌类具有 Borntrager 反应的性质, 对羟基萘醌类成分进行碱显色, 避免了其他成分的干扰, 提高了灵敏度。该方法稳定性好, 回收率高, 简便可靠, 适用于中药及其制剂中羟基萘醌类成分的测定, 也为青龙衣质量标准的制定提供了科学依据。

本研究以胡桃醌为对照品, 考察了青龙衣中羟基萘醌适宜的提取溶剂, 对氯仿、乙醇和醋酸乙酯 3 种溶剂进行筛选, 羟基萘醌的质量分数分别为 0.005 5%、0.009 5%、0.014 1%, 确定醋酸乙酯为最适宜提取溶剂。

对不同贮藏年限的青龙衣中羟基萘醌的比较结果表明, 不同贮藏年限的青龙衣中羟基萘醌的量存在明显差异, 即随着时间的延长, 青龙衣中羟基萘

醌逐渐下降。因为萆醌类成分不稳定，所以推测该结果为随着存放时间的延长其分解所致^[10-11]，因此青龙衣药材不宜储藏过长时间，应该尽量使用当年的药材。

参考文献

[1] 王晓泊, 张 翠, 刘 颖. 青龙衣药用研究现状 [J]. 上海医药, 2007, 28(3): 120-122.

[2] 高奎滨, 刘瑞梅. 青核桃及刺五加抗癌作用的药理研究 [J]. 中草药, 1980, 11(7): 313-314.

[3] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 79.

[4] 周媛媛, 王 栋. 抗肿瘤中药青龙衣化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 11-13.

[5] 曲中原, 邹 翔, 胡国军, 等. 青龙衣中胡桃醌提取工艺研究 [J]. 中医药学报, 2008, 4(36): 30-32.

[6] 曲中原, 邹 翔, 崔 兰, 等. 青龙衣不同萃取部位抗肿瘤活性研究 [J]. 上海中医药杂志, 2009, 43 (1): 87- 90.

[7] 季宇彬, 曲中原, 邹 翔, 等. 青龙衣中胡桃醌对 S180 肉瘤小鼠的抑瘤作用研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(33): 195-199.

[8] Ji Y B, Qu Z Y, Zou X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2011, 63(1/2): 69-78.

[9] 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.

[10] 季宇彬, 陆 婉, 曲中原, 等. 不同干燥方法、贮藏年限及采收时间对青龙衣中胡桃醌的影响 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 110-112.

[11] 冯墨珑, 宋湛谦, 方桂珍. 胡桃楸总黄酮及胡桃醌含量测定 [J]. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 93-95.

经集中程序获得共同体上市授权的新药（2011-03-25 公布）

商品名	活性成分	开发公司	获批时间	适应证
Pumarix	pandemic influenza vaccine (H5N1) (split virion, inactivated, adjuvanted)	GlaxoSmithKline Biologicals s.a.	2011-03-14	预防H5N1型流感大流行
Repso	leflunomide	Teva Pharma B.V.	2011-03-14	风湿性关节炎、牛皮癣
Lamivudine/Zidovudine	lamivudine and zidovudine	TEVA Pharma B.V	2011-02-28	HIV病毒感染
Teva				
Teysono	tegafur, gimeracil and oteracil	Taiho Pharma Europe, Limited	2011-03-14	联合顺铂用于治疗晚期胃癌
Xiapex	collagenase <i>clostridium histolyticum</i>	Pfizer Limited	2011-02-28	治疗成人的可触及条索状物的Dupuytren挛缩
Entacapone Teva	entacapone	Teva Pharma B.V	2011-02-18	帕金森氏病及剂末现象（症状波动）
Xeplion	paliperidone	Janssen-Cilag International NV	2011-03-04	精神分裂症
Esbriet	pirfenidone	InterMune Europe Ltd	2011-02-28	轻中度原发性肺纤维化（IPF）
Ifirmacombi	irbesartan and hydrochlorothiazide	KRKA, d.d., Novo mesto	2011-03-04	原发性高血压
Daliresp/Libertek	roflumilast	Nycomed GmbH	2011-02-28	严重的慢性阻塞性肺病伴有慢性支气管炎患者