

文章编号: 1007-7383(2011)01-0067-04

新疆紫草中萘醌类成分的提取工艺研究

冯文文¹, 李国玉¹, 谭勇¹, 王航宇¹, 王金辉^{1, 2}

(1 石河子大学药学院/教育部省部共建新疆特种植物药资源重点实验室, 石河子 832002;

2 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

摘要: 为了确定新疆紫草中萘醌类成分的最佳提取工艺, 本研究以新疆紫草中主要萘醌类成分的含量为指标, 利用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定其含量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验进行提取工艺全面优选。结果显示, 最佳提取工艺为: 新疆紫草粗粉, 用 12 倍量 95% 乙醇冷浸 8 h。采用冷浸法提取新疆紫草中萘醌类成分, 操作简便, 方法可行, 降低了生产成本, 提高了药材利用率, 使实验结果具有实际应用价值。

关键词: 新疆紫草; 萘醌; 正交设计法; 高效液相色谱

中图分类号: R28 文献标识码: A

Extraction Process of Naphthaquinones in *Radix Arnebiae*

FENG Wenwen¹, LI Guoyu¹, TAN Yong¹, WANG Hangyu¹, WANG Jinhui^{1, 2}

(1 School of Pharmacy, Shihezi University/

Key Laboratory of Phytomedicine Resources & Modernization of TCM, Shihezi 832002, China;

2 School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: To study the best extraction method of naphthaquinones in *Radix Arnebiae*. The extraction process was studied by orthogonal design with the contents of naphthaquinones determined by RP-HPLC as index. The best method of extraction is cold soaking with 12 times 95% alcohol for 8 hours. The extraction method for *Radix Arnebiae* can save energy and be suitable for the modern production.

Key words: *Radix Arnebiae*; Naphthaquinones; Orthogonal design; HPLC

紫草(*Radix Arnebiae*, *Radix Lithospermi*)为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, 紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根, 其味甘、咸, 性寒, 归心、肝经, 有凉血、活血、解毒透疹的功效^[1]。现代药理实验表明紫草具有抗肿瘤^[2-3]、抗炎^[4]、抗氧化^[5]、保肝护肝^[6]等多种药理活性, 萘醌类成分为其主要的活性成分, 故其含量高低必定影响药品质量。紫草萘醌类成分极性较小, 易溶于石油醚、氯仿、乙酸乙酯等有机溶剂和植物油。王阳等^[7]采用麻油作为提取溶剂, 用均匀设计来优

化紫草素的提取工艺, 结果表明 130~135℃提取 13~39 min 为最佳提取工艺。油炸法虽然安全性较高, 但萘醌类化合物在温度大于 80℃时稳定性急剧下降, 容易遭到破坏^[8], 所以萘醌类成分提取时控制温度很重要, 冷浸法、渗漉法^[9]等提取方法的应用可以保证紫草色素的稳定性。

本实验以新疆紫草中 9 种主要萘醌类成分为指标, 比较了不同浓度乙醇和超声法、冷浸法、渗漉法 3 种提取方法对紫草萘醌类成分的提取效果, 并采用正交设计法考察, 建立了冷浸法提取萘醌成分的最佳工艺, 可为新疆紫草的深度开发奠定基础。

收稿日期: 2010-05-26

作者简介: 冯文文(1983), 女, 硕士生, 专业方向为天然药物活性成分的研究。

通讯作者: 王金辉(1972), 男, 教授, 从事天然药物化学研究; e-mail: wjh.1972@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

新疆紫草 2007 年采自新疆天山, 经生药学鉴定为新疆紫草(*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst) 的根, 粉碎后过筛备用。萘醌对照品(1、2、3、4、5、6、7、8、9)均为本实验室自制, 经 UV、HR-MS、NMR 鉴定, HPLC 测定纯度均在 99% 以上。液相用乙腈、甲醇均为色谱纯, 购自 J. T. Baker Co. Ltd (USA), 乙醇为 95% 医用乙醇, 水为重蒸水, 其余试剂为分析纯。

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); SK5200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); AR1140 电子分析天平 Sartorius (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 新疆紫草萘醌类成分含量测定方法的建立

新疆紫草中萘醌类成分在波长 274 nm、517 nm 处均有着较强的紫外吸收, 且无干扰, 在进行提取工艺考察时, 利用 RP-HPLC 法测定新疆紫草提取液中萘醌类成分的含量^[10], 对新疆紫草中萘醌类成分的提取工艺进行评价。

1.2.1.1 干膏量测定

参照 2005 年版《中国药典》附录 XA 浸出物测定法, 精密量取相当于新疆紫草 3 g 的药液, 置于已干燥恒重的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 °C 干燥 3 h, 移于干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定重量, 计算干膏重量。

1.2.1.2 药材中萘醌的含量测定

色谱条件: 色谱柱为 Scienhome Kromasil C18 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 及预柱, 流动相为乙腈(A)-0.3% 磷酸水(B), 梯度洗脱过程(A 梯度) 0~ 10 min 70%, 10~ 30 min 70%~ 75%, 30~ 31 min 75%~ 95%, 31~ 36 min 95%, 36~ 37 min 95%~ 70%, 37~ 50 min 70%。检测波长 274 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min, 理论板数萘醌计不低于 3000。

药材的测定: 取新疆紫草粗粉约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜(0.22 μm) 滤过, 按前述色谱条件进样 10 μL 分析。

1.2.1.3 样品中萘醌的含量测定

将新疆紫草提取液过滤, 定容后精密量取滤液 1 mL 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 微孔滤膜过滤, 取滤液, 按 1.2.1.2 色谱条件, 进样 10 μL, 计算其中九种萘醌总含量、质量分数, 然后按下式计算萘醌的收率。

$$\text{萘醌的收率} = \frac{\text{萘醌含量/g}}{\text{新疆紫草药材萘醌含量/g}} \times 100\%。$$

1.2.2 萘醌类成分提取工艺研究

1.2.2.1 提取溶剂的考察

根据萘醌类成分的理化性质, 结合临床常规应用方法, 本文考察了 95% 乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇对萘醌成分的提取效果。精密称取新疆紫草粗粉 1.0 g, 加入 100 mL 提取溶剂, 超声处理 30 min, 提取液过滤, 取滤液, 按 1.2.1.2 项下色谱条件, 测定提取液中萘醌的含量, 并计算萘醌收率。

1.2.2.2 提取方法的比较

根据萘醌类成分对热不稳定的性质, 本文没有采用回流提取、索式提取等热提取方法, 而是对超声法、冷浸法(室温 20 °C)和渗漉法等冷提方法提取萘醌类成分的效果进行了比较。精密称取 5.0 g 新疆紫草粗粉以 15 倍量 95% 乙醇提取, 比较不同提取方法对萘醌收率的影响, 平行操作 3 份, 计算萘醌平均收率。

1.2.2.3 正交设计法优选萘醌类成分的最佳提取工艺

在萘醌类成分的提取工艺研究过程中, 拟对乙醇浓度、乙醇用量以及提取时间的不同水平进行考察, 以便寻找出最佳提取工艺参数。具体因素水平的设计详见表 1。

精确称量新疆紫草粗粉 5.0 g, 按 $L_9(3^4)$ 设定具体工作安排表进行实验, 测定并计算萘醌收率, 结果用极差法及方差法进行分析。

表 1 正交设计因素水平

水平	乙醇浓度	溶剂倍量/ (mL/g)	提取时间/ h
1	95%	8	8
2	80%	12	16
3	65%	15	24

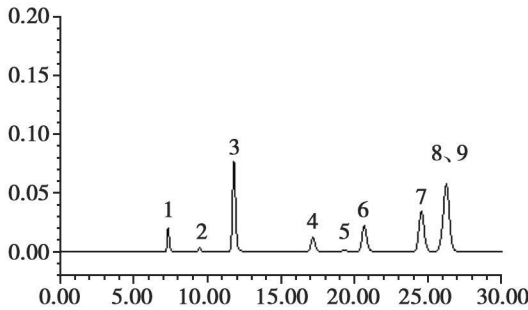
1.2.2.4 验证实验

采用以上确定的最佳条件进行三批验证实验, 即以 10.0 g 新疆紫草药材, 按最佳提取工艺进行提取, 测定并计算萘醌平均收率。

2 结果与分析

2.1 新疆紫草萘醌类成分的含量测定方法

按 1.2.1.2 中色谱条件对新疆紫草进行分析,



1: 阿卡宁; 2: β -羟基异戊酰阿卡宁; 3: 乙酰阿卡宁; 4: β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁; 5: 去氧阿卡宁;
6: 异丁酰阿卡宁; 7: β, β -二甲基丙烯酰阿卡宁; 8: α -甲基-正丁酰阿卡宁; 9: 和异戊酰阿卡宁

图 1 萘醌对照品 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference standards

2.2 萘醌类成分提取工艺研究

2.2.1 提取溶剂的考察

95% 乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇超声提取 30 min, 萘醌收率分别为 99.80%、97.56%、33.09%。由此可知 95% 乙醇对紫草萘醌提取效率最高, 70% 乙醇的提取效率次之, 50% 乙醇对萘醌的提取率急剧下降。

2.2.2 提取方法的比较

各提取方法萘醌类成分收率如表 2 所示: 渗漉法 > 冷浸法 > 超声法。

表 2 不同提取方法提取萘醌类成分效果的比较

Tab. 2 Comparison of results of different extraction methods in naphthaquinones extracting

提取方法	提取时间 / h	萘醌平均收率 / %	RSD / %
超声法	1	92.75	1.2
冷浸法	24	93.17	0.9
渗漉法 4 (浸泡 2h, 渗漉 2h)		95.96	1.8

冷浸法是常用的提取方法之一, 新疆紫草中萘醌类成分对光、热不稳定, 冷浸提取有利于保护萘醌成分的稳定性。

由表 2 结果可知, 本实验采用的 3 种提取方法对萘醌类收率均大于 90%, 且差别不大。超声提取与冷浸提取相比, 虽提取时间短, 但收率略低, 有文献报道超声大于半小时对新疆紫草中萘醌成分会有影响, 且超声提取对设备要求高, 能耗大; 冷浸法收率虽然稍低于渗漉法, 但综合比较来看, 冷浸法作为提取萘醌类成分初始提取方法, 可以节约能源, 而且对设备要求低, 操作简便, 转移率高, 更适用于工业

结果显示新疆紫草药材中 9 种萘醌化合物含量之和为 6.264 mg/100mg。

萘醌对照品 HPLC 色谱图见图 1, 2。

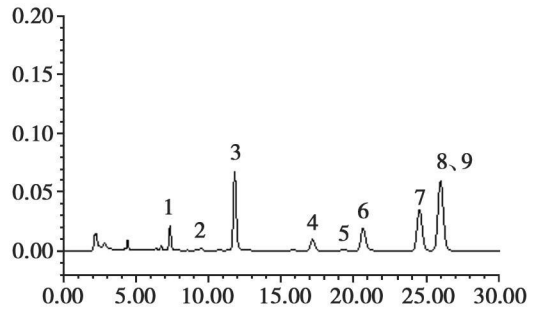


图 2 新疆紫草供试品 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of Radix Arnebiae

化生产。

2.2.3 正交设计法优选萘醌类成分最佳提取工艺

按 $L_9(3^4)$ 设定具体工作安排表进行实验, 考察冷浸法提取紫草萘醌类成分的最佳工艺参数, 具体结果见表 3、表 4。

表 3 正交设计试验安排及直观分析结果

Tab. 3 The design and results of the orthogonal test

实验编号	A 乙醇浓度 / %	B 乙醇用量 /(mL/g)	C 提取时间 /h	D 空白	实验结果*
1	1	1	1	1	0.73
2	1	2	2	2	0.76
3	1	3	3	3	0.73
4	2	1	2	3	0.62
5	2	2	3	1	0.56
6	2	3	1	2	0.58
7	3	1	3	2	0.35
8	3	2	1	3	0.39
9	3	3	2	1	0.39
K_1	0.739	0.567	0.567	0.560	
K_2	0.589	0.569	0.588	0.561	
K_3	0.373	0.565	0.547	0.581	
R	0.366	0.004	0.041	0.021	

注: * 表示萘醌质量分数和萘醌收率的权重系数分别为 0.6 和 0.4。

表 4 正交设计方差分析结果

Tab. 4 Variance analyzed in the orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	F	P
A (乙醇浓度)	0.203	2	200.000	*
B (乙醇用量)	0.000	2	0.000	
C (提取时间)	0.003	2	3.000	
D (误差)	0.000	2		

注: * 表示显著性, $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ 。

根据极差 R 的大小,其影响因素顺序为 $A > C > B$,即乙醇浓度 $>$ 提取时间 $>$ 乙醇用量。由直观分析可知最佳工艺为 $A_1B_2C_2$,即乙醇浓度为 95%、乙醇用量为 12 倍、提取时间 16 h。

根据对方差和极差的综合分析可以发现,乙醇浓度是新疆紫草冷浸工艺的最主要影响因素,故 95% 为最佳冷浸浓度;提取时间为次要影响因素,8 h 与 16 h 提取量相差较小,从节约时间方面考虑,采取冷浸提取 8 h;本实验考察的乙醇用量对萘醌收率的影响最小,通过直观分析,优选 12 倍量乙醇。综上所述,我们筛选的冷浸法最佳工艺为 $A_1B_2C_1$,即:药材粗粉,12 倍量 95% 乙醇溶液,冷浸 8 h 后,过滤并收集冷浸液即得。由于 A 因素已经是 95% 乙醇,大生产上无法使用更高浓度的乙醇,故关于此因素的追加试验舍去。

2.2.4 验证实验

采用以上确定的最佳条件进行三批验证实验,即以 10.0 g 新疆紫草药材,按最佳条件冷浸提取,过滤并收集冷浸液,测定结果见表 5,其中萘醌平均收率为 86.8%,重复试验 RSD 值小于 2%。

实验结果与正交实验中的最佳工艺相比相差较小,故从时间、能源各方面综合考虑,认为 $A_1B_2C_1$ (药材粗粉,12 倍量 95% 乙醇溶液,冷浸 8 h 后,过滤并收集冷浸液) 为紫草萘醌冷浸提取法最佳工艺。

表 5 验证实验

Tab. 5 Verifying test in the cold infuse extraction

实验编号	萘醌质量分数/ (mg/100mg)	萘醌收率/ %
1	5.96	86.7
2	5.89	86.8
3	5.70	87.0
Average	5.85	86.8
$RSD/ \%$	2.3	0.2

3 结论

直观分析和方差分析结果表明各因素对萘醌类

成分冷浸提取的影响大小依次为乙醇浓度 $>$ 提取时间 $>$ 乙醇用量。其中乙醇浓度对萘醌收率有显著影响,其他因素无显著影响。根据缩短生产周期,降低生产成本的原则,得出新疆紫草萘醌成分冷浸法提取的最佳工艺为:药材粗粉,采用 12 倍量 95% 乙醇冷浸 8 h,过滤并收集冷浸液即得。按最佳工艺条件进行 3 次重复验证试验,结果表明该最佳提取工艺具有良好的重现性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2000 年版一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 280.
- [2] 林江, 韩福刚, 王开正. 软紫草素对肿瘤细胞生长抑制作用的研究 [J]. 泸州医学院学报, 2003, 26(2): 102-106.
- [3] Qun Lu, Weijun Liu, Jian Ding, et al. Shikonin Derivatives: Synthesis and Inhibition of Human Telomerase [J]. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, 12: 1375-1378
- [4] 王文杰, 白金叶, 刘大培, 等. 紫草素抗炎对白三烯 B4 生物合成的抑制作用 [J]. 药学学报, 1994, 29(3): 161-165.
- [5] Jie Han, Xinchu Weng, Kaishun Bi. Antioxidants from a Chinese medicinal herb Lithospermum erythrorhizon [J]. Food Chemistry, 2007, 106: 2-10.
- [6] 刘燕. 软紫草提取物对小鼠实验性肝损伤的保护作用 [D]. 新疆医科大学硕士学位论文, 2006.
- [7] 王阳, 朱燕霞, 孙殿甲, 等. 均匀设计研究紫草的提取工艺. 西北药学杂志, 2003, 18(4): 157.
- [8] 李晓瑾, 谭秀芳, 马媛, 等. 软紫草质量稳定性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(11): 1045-1046.
- [9] 陈敏, 覃仁安, 王培民. 用均匀设计法优选紫草素的提取工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(4): 251.
- [10] B. Bozan, K. H. C. Baser, S. Kara. Quantitative determination of naphthaquinones of Arnebia densiflora (Nordm.) Ledeb. By an improved high performance liquid chromatographic method [J]. Chromatogr. A, 1997 (782): 133-136