

川楝子中川楝素的不同提取工艺研究

胡芳, 王慧娟, 李俐, 周英* (贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

摘要: 目的 对川楝子中川楝素进行提取工艺的考察。方法 采用水浴法、索氏提取和超声波细胞粉碎提取后经 HPLC 进行含量测定。结果 利用正交分析, 得到 3 种提取工艺的最优条件为: ①水浴法: 50 ℃, 80%乙醇, 提取 2 h, 料液比为 1:30; ②索氏提取法: 85 ℃, 70%乙醇, 提取 7 h, 料液比为 1:20; ③超声波细胞粉碎提取法: 250 W, 70%乙醇, 提取 45 min, 料液比为 1:30。结论 建立的方法简便、可靠, 重复性好, 可为川楝子的全面研究提供一定数据参数。

关键词: 川楝子; 川楝素; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)11-1102-06

基金项目: 贵州省国际科技合作项目(黔科合外 G 字[2008]700108); 贵阳市科技计划项目(大学生创业类)(2008[筑科技合同字 G15-11 号])

作者简介: 胡芳, 女, 硕士 Tel: 13628512417 E-mail: kalone2007@126.com *通信作者: 周英, 女, 博士, 教授, 硕导 Tel: (0851)3851091 E-mail: yingzhou71@126.com

• 1102 • Chin JMAP, 2010 December, Vol.27 No.12

中国现代应用药学 2010 年 12 月第 27 卷第 12 期

Study on Different Extraction Methods of the Toosendanin from Fructus Toosendan

HU Fang, WANG Huijuan, LI Li, ZHOU Ying* (College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study toosendanin extraction methods in Fructus toosendan. **METHODS** The toosendanin was extracted separately by the water bath extraction, soxhlet extraction and ultrasonic cell crushing extraction. The content of toosendanin was determined by HPLC. **RESULTS** Using orthogonal experiments analysis, the optimal extraction conditions of these three extraction methods were as follows: ①The water bath extraction method: 50 °C, 80% ethanol, extraction time 2 h, ratio of material to solvent 1 : 30; ②The soxhlet extraction method: 85 °C, 70% ethanol, extraction time 7 h, ratio of material to solvent 1 : 20; ③The ultrasonic cell crushing extraction method: 250 W, 70% ethanol, extraction time 45 min, ratio of material to solvent 1 : 30. **CONCLUSION** The established methods are simple, reliable and reproducible, which could provide some data basis in a comprehensive study of Fructus toosendan.

KEY WORDS: Fructus toosendan; toosendanin; extraction process

川楝子 Fructus toosendan 是楝科植物 *Melia toosendan* Sieb.et Zucc.的干燥成熟果实^[1], 广泛分布于四川、湖北、贵州等地, 是我国传统中药材。川楝素是川楝子的有效成分之一^[1-2], 一直以来, 都被作为杀虫剂或驱虫药使用, 后来研究发现川楝素还有抑制呼吸中枢、抗肉毒素、治疗心血管疾病和癌症等效用^[3-8]。

目前对川楝素的提取主要是采用浸提法、连续溶剂萃取法、超声波法、微波法, 但多采用川楝韧皮对川楝素进行提取研究^[9-11]。由于药典中记载的川楝的药用部位是其果实^[1], 且与川楝皮相比, 川楝子更加价廉易得。所以本研究综合几种常用的工艺对川楝子中川楝素进行提取考察, 以期能为川楝子的系统研究提供可参考的资料。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

川楝子(湖北金贵中药饮片有限公司, 批号: 071201)由贵阳中医学院何顺志教授鉴定为 *Melia toosendan* Sieb.et Zucc.的干燥成熟果实。川楝素对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: 090219, 纯度≥98%)。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

JY88-II N 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津, 配备 SPD-20A 紫外检测器); RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 川楝素含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(56 : 44); 检测

波长: 215 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 25°C; 进样量为 20 μL, 理论板数按川楝素峰面积计算不低于 3 000。

2.1.2 川楝素对照品溶液的配制 精密称取 5.2 mg 川楝素对照品, 用流动相将其溶解, 得到 520 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。精密吸取该溶液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用流动相定容即得到浓度为 13, 26, 52, 78, 104, 130 μg·mL⁻¹ 的川楝素对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取 5 g 川楝子粉末(过 40 目筛), 使用 70%乙醇在 70°C 下水浴提取 3 h, 将提取液过滤, 减压浓缩蒸干, 用 10 mL 纯甲醇溶解后取 0.5 mL 定容到 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液备用。

2.1.4 标准曲线的制备 取“2.1.2”项下 6 组对照品溶液进样测定, 记录峰面积。以峰面积 Y (Y 是保留时间为 8.995 min 和 11.053 min 的两个川楝素同分异构体峰面积之和)对浓度 X 进行线性回归, 所得方程为 $Y=10\,022X-3\,066.7$, $r=0.999\,5$ 。川楝素对照品和供试品的色谱图见图 1。

2.1.5 仪器精密度试验 配制浓度为 13, 52, 130 μg·mL⁻¹ 的川楝素对照品溶液, 每个浓度连续测定 3 次, 记录峰面积。结果低、中、高 3 个浓度的峰面积 RSD 分别为 0.41%, 1.73%, 0.97%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样测定, 结果川楝素峰面积 RSD 为 1.03%, 表明供试品在 10 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一样品 5 份, 每份 5.0 g, 按“2.1.3”项下方法处理, 进样测定, 结果川楝素峰面积的 RSD 为 1.74%, 表明重复性良好。

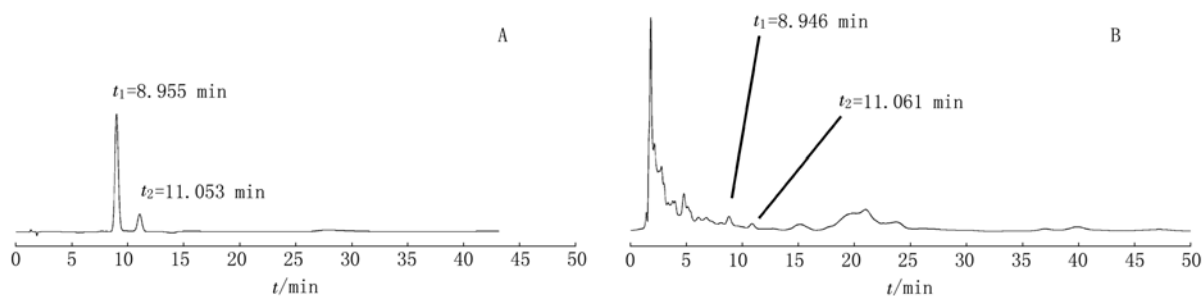


图1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品

Fig 1 HPLC chromatogram

A-control; B-sample

2.1.8 回收率测定 采用加样回收率测定法。按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，川楝素浓度为 $36.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，精密量取该供试液 1.0 mL 9 份，分别加入一定量的川楝素对照品溶液，以外标法定量，计算回收率，结果见表 1。

表1 川楝素回收率测定结果($n=3$)

Tab 1 The results of recovery test of toosendain($n=3$)

已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
36.99	7.8	44.75	99.91		
36.99	7.8	46.24	103.24	101.47	1.65
36.99	7.8	45.36	101.27		
36.99	39.0	79.16	104.17		
36.99	39.0	78.48	103.28	103.82	0.47
36.99	39.0	79.03	104.00		
36.99	78.0	119.30	103.75		
36.99	78.0	118.02	102.64	103.35	0.62
36.99	78.0	119.20	103.66		

2.2 川楝子中川楝素提取工艺研究

将川楝子在 60°C 下干燥 3h，粉碎，过 40 目筛，作为样品待用。

2.2.1 水浴法 称取样品 5 g，在水浴装置下热浸 1 次，将提取液减压浓缩蒸干，用 10 mL 纯甲醇溶解后取 0.5 mL 定容到 5 mL，经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后，测定川楝子中川楝素的含量，结果以提取率($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。在单因素考察的基础上，以浸提温度，乙醇浓度、浸提时间、料液比作为考察因素，以提取率作为评价指标进行正交设计，所得实验结果见表 2 至表 4。

表2 水浴法正交试验因素水平表

Tab 2 Factors and levels of orthogonal experiments of the water bath extraction

因素	温度/ $^\circ\text{C}$	浓度/%	时间/h	料液比/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
水平 1	50	70	1	1 : 20
水平 2	60	80	2	1 : 30
水平 3	70	90	3	1 : 40

表3 水浴法 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Tab 3 The results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiments of the water bath extraction

实验号	温度/ $^\circ\text{C}$	浓度/%	时间/h	料液比/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取率/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	50	70	1	1 : 20	0.842
2	50	80	2	1 : 30	1.036
3	50	90	3	1 : 40	0.776
4	60	70	2	1 : 40	0.710
5	60	80	3	1 : 20	0.803
6	60	90	1	1 : 30	0.744
7	70	70	3	1 : 30	0.739
8	70	80	1	1 : 40	0.814
9	70	90	2	1 : 20	0.772
均值 I	0.885	0.764	0.800	0.806	
均值 II	0.752	0.884	0.839	0.840	
均值 III	0.775	0.764	0.773	0.767	
极差 R	0.133	0.120	0.066	0.073	

表4 水浴法正交试验方差分析表

Tab 4 The orthogonal experiments analysis of variance of the water bath extraction

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F 比
温度	0.030 1	2	0.015 0	4.459 7
浓度	0.029 0	2	0.014 5	4.309 6
料液比	0.008 0	2	0.004 0	1.188 1
时间	0.006 7	2	0.003 4	
总变异	0.073 8	8		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$

由表 3 极差 R 值可知，各因素影响情况为温度>浓度>料液比>时间。通过直观分析在实验条件下，粗提工艺最优组合是 50°C ，80%乙醇，提取 2 h，料液比为 1 : 30。经方差分析得知：川楝素水浴提取法的因素对结果均有一定影响，但差异不显著。

2.2.2 索氏提取法 称取样品 20 g, 提取 1 次, 将提取液减压浓缩蒸干, 用 20 mL 纯甲醇溶解后取 0.5 mL 定容到 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 测定川楝子中川楝素的含量, 结果以提取率 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。在单因素考察的基础上, 以提取温度, 乙醇浓度、提取时间作为考察因素, 以提取率作为评价指标进行正交设计, 所得实验结果见表 5 至表 7。

表 5 索氏提取法正交试验因素水平表

Tab 5 Factors and levels of orthogonal experiments of the soxhlet extraction

因素	时间/h	浓度/%	温度/ $^{\circ}\text{C}$
水平 1	5	70	80
水平 2	6	80	85
水平 3	7	90	90

表 6 索氏提取法 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Tab 6 The results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiments of the soxhlet extraction

实验号	时间/h	浓度/%	温度/ $^{\circ}\text{C}$	提取率/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	5	70	80	0.686
2	5	80	85	0.867
3	5	90	90	0.860
4	6	70	85	0.961
5	6	80	90	0.611
6	6	90	80	0.742
7	7	70	90	1.041
8	7	80	80	0.988
9	7	90	85	0.848
均值 I	0.804	0.896	0.805	
均值 II	0.771	0.822	0.892	
均值 III	0.959	0.817	0.837	
极差 R	0.188	0.079	0.087	

表 7 索氏提取法正交试验方差分析表

Tab 7 The orthogonal experiments analysis of variance of the soxhlet extraction

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F 比
时间	0.060 2	2	0.030 1	0.751 6
浓度	0.011 8	2	0.005 9	0.147 2
温度	0.011 5	2	0.005 8	0.143 8
误差	0.080 1	2	0.040 0	

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$

由表 6 极差 R 值可知, 各因素影响情况为时间>温度>浓度。通过直观分析在实验条件下, 粗提工艺最优组合是 85 $^{\circ}\text{C}$, 70%乙醇, 提取 7 h, 料液比为 1 : 20。经方差分析得知: 川楝素索氏提取

法的因素对结果均有一定影响, 但差异不显著。

2.2.3 超声波细胞粉碎提取法 称取样品 5 g, 超声提取 1 次, 将提取液减压浓缩蒸干, 用 10 mL 纯甲醇溶解后取 0.5 mL 定容到 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 测定川楝子中川楝素的含量, 结果以提取率 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示。在单因素考察的基础上, 以超声时间, 料液比, 超声波功率, 乙醇浓度作为考察因素, 以提取率作为评价指标进行正交设计, 所得实验结果见表 8 至表 10。

表 8 超声波细胞粉碎提取法正交试验因素水平表

Tab 8 Factors and levels of orthogonal experiments of the ultrasonic cell crushing extraction

因素	浓度/%	时间/min	料液比/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	功率/W
水平 1	50	30	1 : 15	200
水平 2	60	45	1 : 20	250
水平 3	70	60	1 : 30	300

表 9 超声波细胞粉碎提取法 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Tab 9 The results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiments of the ultrasonic cell crushing extraction

实验号	浓度/%	时间/min	料液比/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	功率/W	提取率/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	50	30	1 : 15	200	0.504
2	50	45	1 : 20	250	0.626
3	50	60	1 : 30	300	0.655
4	60	30	1 : 20	300	0.668
5	60	45	1 : 30	200	0.853
6	60	60	1 : 15	250	0.806
7	70	30	1 : 30	250	0.799
8	70	45	1 : 15	300	0.831
9	70	60	1 : 20	200	0.838
均值 I	0.595	0.657	0.714	0.732	
均值 II	0.776	0.770	0.711	0.744	
均值 III	0.823	0.766	0.769	0.718	
极差 R	0.228	0.113	0.058	0.026	

表 10 超声波细胞粉碎提取法正交试验方差分析表

Tab 10 The orthogonal experiments analysis of variance of the ultrasonic cell crushing extraction

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F 比	显著性
浓度	0.086 7	2	0.043 3	87.596 1	*
时间	0.024 7	2	0.012 4	24.997 2	*
料液比	0.006 5	2	0.003 2	6.5419 0	
功率	0.001 0	2	0.000 5		
总变异	0.118 9	8			

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$, $F_{0.1}(2, 2)=9.0$

由表 9 极差 R 值可知, 各因素影响情况为浓度>时间>料液比>功率。通过直观分析在实验条件

下,粗提工艺最优组合是 250 W, 70%乙醇, 提取 45 min, 料液比为 1 : 30。经方差分析得知: 利用超声波细胞粉碎提取法来提取川楝素时, 浓度和时间因素对提取有显著性意义。

2.3 最佳工艺条件的验证

以正交实验的最佳工艺参数进行验证试验, 重复做 5 次, 结果见表 11。由表可知应用最佳工艺参数进行粗提试验, 提取结果稳定。

表 11 3 种提取方法正交验证试验

Tab 11 The orthogonal validation test of these three kinds of extraction methods

提取方法	提取率/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$						RSD/ %
	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	平均值	
水浴法	1.050	1.062	1.076	1.063	1.032	1.057	1.6
索氏提取法	1.393	1.345	1.330	1.328	1.349	1.349	1.9
超声波细胞粉碎提取法	0.880	0.877	0.871	0.901	0.861	0.878	1.7

2.4 最优方案提取次数确定

在所得到的最优提取参数条件下, 对水浴法和超声波细胞粉碎提取法进行提取次数的比较, 参照“2.2.1”和“2.2.3”的提取过程, 每种工艺均进行 3 次平行试验。所得提取次数的平均情况见图 2 和图 3。

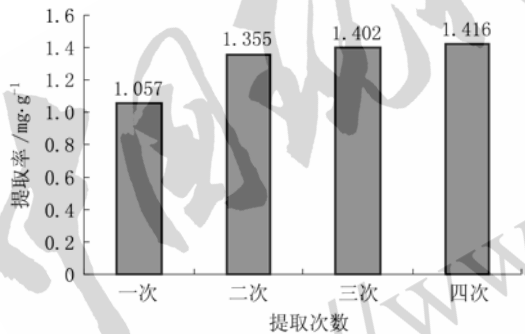


图 2 水浴法最优方案提取次数比较

Fig 2 The comparison of the optimal solution extraction times in the water bath extraction

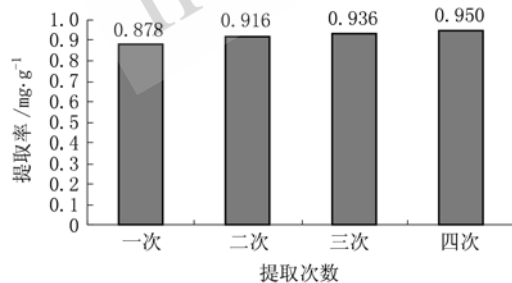


图 3 超声波细胞粉碎法最优方案提取次数比较

Fig 3 The comparison of the optimal solution extraction times in the ultrasonic cell crushing extraction

川楝子的市售价格较便宜, 川楝素的销售价格颇高, 通过上述结果, 建议结合经济成本和较完全的提取样品中的川楝素成分的双重角度选择提取次数。在最优条件下, 水浴法建议提取 2 次即可, 超声波细胞粉碎提取法提取一次为宜。

3 讨论

川楝素作为川楝子的一种有效成分, 一直以来以川楝韧皮的提取研究为多, 本实验首次对川楝子进行川楝素的提取工艺研究, 得到 3 种常用方法的工艺数据, 揭示了川楝子作为提取原料的可行性, 并为川楝子的进一步研究开发提供基础数据, 同时也为提取方案的选择提供相应支持。

水浴法是最能进行工厂化生产的方法, 实验所得工艺参数为 50 $^{\circ}\text{C}$, 80%乙醇, 提取 2 h, 料液比为 1 : 30, 提取 2 次。这样在不需额外附加设施的条件下, 平均 4 h 能从 1 g 的川楝子样品中获得 1.355 mg 川楝素, RSD 为 1.6%。索氏提取耗时较长, 但浸出的有效成分较为完全, 使用此种方法需要综合考虑经济和时间成本。该法所得工艺的最优组合是 85 $^{\circ}\text{C}$, 70%乙醇, 提取 7 h, 料液比为 1 : 20, 川楝素的平均提取率为 1.349 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.9%。超声波细胞粉碎提取法的最优工艺参数为 250 W, 70%乙醇, 提取 45 min, 料液比为 1 : 30, 提取一次, 川楝素的平均提取率为 0.878 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.7%, 该法每克样品的提取率虽较低, 但提取时间最短, 可作为实验室实验的首选方法。

综上所述, 不同的提取工艺有各自的优势, 在今后的研究和生产中可根据具体条件选择合适提取方法进行。通过此研究, 在拓宽川楝素提取来源的同时, 也对川楝子中川楝素提取工艺的空白进行一定补充, 这对于今后川楝子的系统研究有指导作用。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 29.
- [2] LI F. Study on progress of Chinese medicine toosendan [J]. Harbin Med J(哈尔滨医药), 2008, 28(5): 54-55.
- [3] SHI Y L, WANG Z F. Cure of experimental botulism and antitoxin effect of toosendanin [J]. Acta Pharmacol Sin (中国药理学报), 2004, 25(6): 839-848.
- [4] SHI Y L, WANG Z F, WANG W P, et al. Toosendanin applications as antitumor drugs [J]. Sci Technol News(科技开发动态), 2004, (6): 34.

(下转第 1111 页)

(上接第 1106 页)

- [5] LI M, SONG J Z. Toosendan plus combination therapy rescue of botulinum toxin poisoning [J]. Chin J Crit Care Med(中国急救医学), 2003, 23(10): 718.
- [6] GUO X W. Toosendan is good at treatment herpes zoster disease [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med(浙江中医杂志), 2005, 40(2): 49.
- [7] ZHANG X, LI B D. The clinical observation of toosendan capsule treat cancer pain [J]. Chin Health Care(中国保健), 2006, 14(18): 43.
- [8] SUN J, ZHOU H L. Study on clinical application of Chinese medicine toosendan[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2008, 10(1): 27-28.

- [9] TANG Y, GUO H, HU D B, et al. A study of ultrasound-assisted extraction of toosendanin with water from bark of *Melia Toosendan* Sieb. et Zucc. [J]. J Southwest Univ Nationalities: Nat Sci(西南民族大学学报: 自然科学版), 2004, 30(6): 714-717.
- [10] TANG Y, LIU S M, HU W, et al. Study on microwave-assisted extraction of toosendanin with water from the bark of *Melia Toosendan* Sieb. et Zucc. [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci (四川大学学报: 自然科学版), 2005, 45(1): 149-152.
- [11] TANG Y, LIU S M, HU D B, et al. Determination of toosendanin in the bark of *Melia Toosendan* Sieb. et Zucc. by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2005, 17(2): 226-228.

收稿日期: 2010-03-12