

正交试验法优选秦皮香豆素醇提工艺



ZHANG Qi

张琦^{1,2}, 张新申¹, 代勇³

(1. 四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041; 3. 成都恩威集团, 四川 成都 610041)

摘 要: 研究了秦皮主要活性成分秦皮香豆素的最佳醇提工艺, 并采用了毛细管区带电泳(CZE)快速分析了秦皮苷、秦皮甲素、秦皮乙素的含量。以 3 种秦皮香豆素含量作为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 通过考察乙醇体积分数、提取次数、提取时间和料液比 4 个因素对醇提效果的影响, 得到秦皮最佳提取条件为: 以体积分数 65% 的乙醇为提取溶剂, 在料液比 1:9 (g:mL) 的条件下, 回流提取 3 次, 每次 1 h, 秦皮总香豆素的得率为 3.61%。

关键词: 秦皮; 秦皮苷; 秦皮甲素; 秦皮乙素

中图分类号: TQ351.0

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2009)03-0089-04

Study on Optimum Process for Extracting Coumarin from *Cortex fraxini* by Orthogonal Test

ZHANG Qi^{1,2}, ZHANG Xin-shen¹, DAI Yong³

(1. School of Light Industry and Textile and Foodstuff Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

3. Chengdu Enwei Group, Chengdu 610041, China)

Abstract: The optimum process of extracting fraxin, esculin and esculetin as active coumarin from *Cortex fraxini* (Qinpi) bark was studied. A rapid and simple method used to determine fraxin, esculin and esculetin in *C. fraxini* by capillary zone electrophoresis (CZE) was described. The effects of EtOH volume fraction, extracting times, extracting time, and ratio of material to liquor on extraction yield of 3 kinds of coumarin were investigated by orthogonal test. The optimum extracting conditions confirmed by the index of extraction yield of 3 kinds of coumarin were as follows: ratio of material to liquor 1:9 (g:mL), three times of reflux extraction with 65% EtOH, each extraction 1 h. The yield of total coumarin was 3.61%

Key words: *Cortex fraxini*; fraxin; esculin; esculetin

秦皮为中国药典收录的常用中药, 来源于木犀科梣属植物白蜡树 (*Fraxinus chinensis* Roxb.)、苦枥白蜡树 (*F. rhynchophylla* Hance)、尖叶白蜡树 (*F. szaboana* Lingelsh.) 或宿柱白蜡树 (*F. stylosa* Lingelsh.) 的干燥枝皮或干皮, 具有清热燥湿、收涩、明目之功, 用于热痢、泄泻, 赤白带下, 目赤肿痛, 目生翳膜^[1]。现代药理研究表明, 秦皮具有抗病原微生物、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗凝和抗过敏、镇咳祛痰平喘、降低尿酸、保肝等多种药理作用, 其主要有效成分为秦皮苷、秦皮甲素、秦皮乙素等香豆素类化合物^[2]。本研究以秦皮苷(I)、秦皮甲素(II)、秦皮乙素(III)的毛细管区带电泳快速分析方法为检测手段, 利用正交试验研究秦皮醇提工艺, 确定最佳的乙醇体积分数、浸提次数、浸提时间和料液比等工艺参数, 为秦皮综合利用和新药研发提供参考数据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

美国安捷伦 3DCE 毛细管电泳仪, 型号: G1600A (包括二极管阵列检测器及 HP 色谱工作站); 熔融

收稿日期: 2008-05-06

基金项目: 四川省中医药管理局重点课题(2003A36); “十一五” 国家科技支撑计划资助(2006BAI06A18-15)

作者简介: 张琦(1958-), 女, 江苏江都人, 副教授, 博士, 主要研究方向为药物分析和新药开发。

石英毛细管有效长度 45 cm(总长 53.5 cm, i. d. 75 μm); 波达 1004 型超声波清洗器; TGL-16G 台式高速离心机; BP210D 型十万分之一电子分析天平; Milli-Q 超纯水器; 过滤装置及微孔滤膜, 0.45 μm 。

含量测定用秦皮甲素(0740-200104)、秦皮乙素(110741-200506)均购于中国药品生物制品检定所。秦皮苷购于美国 Sigma 公司和芜湖贰尔塔医药科技有限公司(高效液相色谱归一化法含量大于 99.3%)。四硼酸钠、对羟基苯甲酸丙酯、乙醇、甲醇等均为分析纯。秦皮药材购于北京同仁堂成都分店, 经四川大学药学院生药教研室王曙教授鉴定为白蜡树(*F. chinensis* Roxb.) 的干燥枝皮。

1.2 正交试验设计与方法

秦皮香豆素在醇和水中均有一定程度的溶解, 但以水为溶剂提取出的杂质较多, 后续工序还要继续醇沉除杂, 且提取效率不如乙醇, 故直接选择乙醇为溶剂。对影响秦皮香豆素醇提效率的乙醇体积分数、提取次数、提取时间、料液比等 4 个主要因素进行优化, 每因素 3 个水平, 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验(见表 1)。具体操作如下: 取秦皮打成粗粉, 按表 1 相应的因素水平加乙醇回流提取, 合并提取液回收乙醇并调整体积至 1:10(g:mL), 混匀。精密吸取该浓缩液 5 mL 置 50 mL 容量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 混匀, 备用。

1.3 秦皮香豆素的含量测定

1.3.1 毛细管区带电泳(CZE)分析条件 毛细管使用前, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液、水、操作缓冲溶液(50 mmol/L 硼砂水溶液, pH 值 9.2)各冲洗 20 min(55 $^{\circ}\text{C}$)。每次进样间再分别冲洗 1、2 和 3 min, 以保证良好的重现性。检测波长 210 nm; 压力进样 20 kPa \cdot s; 运行电压 18 kV(+)-(-), 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2 对照品溶液制备与线性关系 对照品溶液制备: 精密吸取含秦皮苷(I)、秦皮甲素(II)、秦皮乙素(III)分别为 192.0、224.0、150.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品储备液 5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 再吸取 5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加入对羟基苯甲酸丙酯内标溶液(0.5 mg/mL) 2 mL, 加水稀释至刻度, 混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为对照品溶液, I~III 分别为 48.0、56.0、37.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

线性关系: 精密吸取对照品储备液依次倍量稀释, 各精密吸取 5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加入内标溶液 2 mL, 加水稀释至刻度, 制备成含秦皮苷 6、12、24、48、96 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 秦皮甲素 7、14、28、56、112 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 秦皮乙素 4.7、9.4、18.8、37.6、75.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品混合溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按上述电泳条件进样分析测定, 以对照品的质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标, 相对峰面积值(Y)为纵坐标得回归方程:

$$\text{秦皮苷: } Y = 0.0173X + 0.0027, r = 0.9997;$$

$$\text{秦皮甲素: } Y = 0.020X + 0.005, r = 0.9996;$$

$$\text{秦皮乙素: } Y = 0.0286X - 0.0367, r = 0.9994.$$

1.3.3 样品测定 精密吸取正交试验供试品溶液 5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加入对羟基苯甲酸丙酯内标溶液(0.5 mg/mL) 2 mL, 加水稀释至刻度, 混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 装入仪器样品瓶中上机分析, 结果代入回归方程计算即得供试品溶液的质量浓度, 根据稀释倍数和秦皮药材的称量, 折算成相对于药材的各香豆素成分的含量为得率指标。3 种香豆素之和为总香豆素得率指标。

2 结果与讨论

2.1 含量测定

3 种秦皮香豆素含量测定电泳图谱见图 1。由图可知, 各香豆素成分 10 min 内完全出峰, 各成分之间分离良好。本方法精密度、重复性和加样回收率等均达到定量分析的方法学考察要求, 各样品测定值见表 1。

2.2 正交试验

秦皮醇提工艺正交试验结果见表 1, 总香豆素方差分析见表 2。

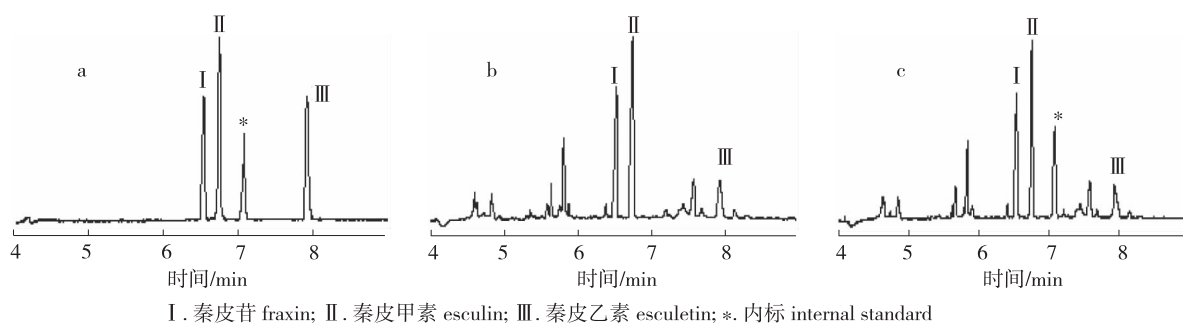


图 1 对照品 (a)、无内标样品 (b) 和样品 (c) 的 CZE 图谱

Fig. 1 CZE chromatograms of reference substances (a) and samples (b, c)

表 1 正交试验结果¹⁾

Table 1 Results of orthogonal test

试验号 test No.	A 乙醇体积分数/% ethanol volume fraction	B 提取次数 extraction times	C 提取时间/h extraction time	D 料液比 (g : mL) material : liquid	秦皮苷 得率/% fraxin yield	秦皮甲素 得率/% esculin yield	秦皮乙素 得率/% esculetin yield	总香豆素 得率/% total coumarin yield
1	50	1	1.0	1 : 6	0.930	1.010	0.175	2.115
2	50	2	2.0	1 : 9	1.230	1.308	0.248	2.786
3	50	3	3.0	1 : 12	1.381	1.439	0.246	3.066
4	65	1	2.0	1 : 12	1.324	1.338	0.230	2.892
5	65	2	3.0	1 : 6	1.383	1.420	0.255	3.059
6	65	3	1.0	1 : 9	1.645	1.686	0.260	3.592
7	80	1	3.0	1 : 9	1.302	1.319	0.231	2.851
8	80	2	1.0	1 : 12	1.494	1.500	0.243	3.238
9	80	3	2.0	1 : 6	1.525	1.616	0.268	3.409
k_1	2.656	2.619	2.982	2.861				
k_2	3.181	3.028	3.029	3.076				$T = 27.008, C = T^2/9 = 81.048$
k_3	3.166	3.356	2.992	3.065				
R	0.525	0.736	0.047	0.215				

1) $k_1 \sim k_3, R$ 是以总香豆素为指标 $k_1 \sim k_3, R$ based on total coumarin yield

表 2 秦皮香豆素含量方差分析表

Table 2 Variance analysis

方差来源 source	离差平方和 SS	自由度 Df	方差 (均方和) MS	$F_{比}$	P
S_A	0.537	2	0.269	134.25	< 0.01
S_B	0.817	2	0.409	204.25	< 0.01
S_C	0.004	2	0.002		
S_D	0.088	2	0.044	22.0	< 0.05

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00, F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

从表 1 极差值 (R) 可以看出, 4 个因素对秦皮香豆素得率的影响程度依次为 $B > A > D > C$, 其中 B 因素 (提取次数) 对秦皮香豆素的提取得率影响最为显著, A 因素 (乙醇浓度) 次之, D 因素 (料液比) 有一定影响, 而 C 因素 (提取时间) 的影响甚微。表 2 的方差分析结果亦显示 A、B、D 因素的影响均具有统计学意义, 其中 A、B 影响极显著, 其最优组合为 $A_2B_3C_2D_2$, 即乙醇体积分数 65%, 提取次数 3 次, 提取时间 2 h, 料液比为 1 : 9 (g : mL)。按照该最佳提取工艺进行 3 份平行验证实验, 结果总香豆素平均得率为 3.61%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.95%。此结果与正交试验 No. 6 结果基本一致, 考虑到工业生产需节能降耗, 降低成本, 同时 C 因素 (提取时间) 影响最小, 可选取任意水平, 即提取时间可以调整为 1 h, 故综合考虑 3 种秦皮香豆素及总香豆素得率, 结合工业生产可行性, 确定秦皮香豆素醇提的最佳工艺组合为: 加入体积分数 65% 的乙醇, 提取 3 次, 每次 1 h, 料液比 1 : 9 (g : mL)。

2.3 讨论

文献报道秦皮中的秦皮甲素与秦皮乙素并非梣属的专属性成分^[3]；前者同时存在于菊科、茜草科、大戟科、茄科等某些植物中；后者同时存在于芸香科、菊科、茄科、萝藦科、豆科等某些植物中，但秦皮中的秦皮苷却是仅存在于木犀科梣属中的专属性成分，且含量较高。中药的疗效是通过一系列相似结构的化合物群(有效成分)的协同作用而体现的，因此，作者采用毛细管区带电泳同时测定上述含量较高的3种秦皮有效成分，可以更全面的反映醇提效果。

《中国药典》2005年版一部中，秦皮药材含量测定采用HPLC法分析秦皮甲素与秦皮乙素，另有文献报道HPLC法同时测定秦皮苷、秦皮素、秦皮甲素、秦皮乙素^[3-4]，但在本实验预试过程中，发现文献[3]的方法中秦皮乙素50 min才出峰，而文献[4]的方法虽然出峰时间短，但85 min内不断有杂质峰流出干扰后续分析。考虑到CZE对香豆素类成分测定的优势，本实验引入了新的秦皮香豆素毛细CZE快速测定方法，该法出峰时间短，缓冲系统简单，分离效果明显优于现有秦皮CZE分析方法^[5-6]，可作为秦皮药材质量评价、综合利用和新药开发的快速检测手段。

3 结论

秦皮香豆素醇提的最佳工艺条件为：使用体积分数65%的乙醇，回流提取3次，每次1h，料液比为1:9(g:mL)。在此实验条件下，秦皮总香豆素的提取得率为3.61%。

参考文献：

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2005年版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 李存红, 徐燕. 秦皮的研究进展[J]. 焦作大学学报, 2004(4): 34-35.
- [3] 刘丽梅, 李曼玲, 冯伟红, 等. HPLC法测定秦皮中香豆素类成分的含量[J]. 中草药, 2004, 35(7): 819-822.
- [4] 蒲旭峰, 凌学青, 庄晓洪. 秦皮药材的质量评价[J]. 华西药学杂志, 2001, 17(2): 4-6.
- [5] ZHANG Hong-yi, LI Qian-feng, SHI Zhi-hong, et al. Analysis of aesculin and aeculotin in *Cortex fraxini* by capillary zone electrophoresis[J]. Talanta, 2000(52): 607-612.
- [6] LI Cun-hong, CHEN An-jia, CHEN Xiao-feng, et al. Non-aqueous capillary electrophoresis for separation and simultaneous determination of fraxin, esculin and esculetin in *Cortex fraxini* and its medicinal preparations[J]. Biomed Chromato, 2005, 19: 696-702.

过刊邮购信息

《生物质化学工程》原名《林产化工通讯》

年份	1988 ~ 1991	1992 ~ 1993	1994 ~ 2005	2006 ~ 2008
价格	10元/年	16元/年	33元/年	42元/年

注: 1) 1988年第1期、1991年第1、2期、1994年第1、2、4期已售完, 其他请以最近出版的期刊公布的为准;

2) 2006年《生物质化学工程》增刊, 100元/本。

《林产化学与工业》

年份	1982 ~ 1988	1989 ~ 1993	1994 ~ 1995	1996 ~ 2001	2002 ~ 2005	2006	2007 ~ 2008
价格	10元/年	15元/年	20元/年	30元/年	40元/年	60元/年	90元/年

注: 1) 1984年第4期, 1987年第1期, 1989年第4期, 1992年第1期, 1994年第3期, 2008年第2期和第3期已售完;

2) 1994年特刊《松香·松节油再加工专辑》, 10元/本; 2004年增刊, 主要为松香、松节油及其深加工研究论文, 20元/本; 2005年增刊, 主要内容为生物质能源、化学品和材料相关的研究论文, 36元/本; 2007年增刊, 主要内容为植物提取物加工与利用, 20元/本。

如有漏订或收藏不全需补购者可直接汇款至编辑部, 汇款人须在汇款单上写清详细地址, 附言栏内注明所购年份、期号及数量。所有价格均含邮费。

编辑部地址: 210042 南京市锁金五村16号 林化所内 《生物质化学工程》编辑部 电话: (025)85482492; 《林产化学与工业》编辑部 电话: (025)85482493。