技术方法 文章编号:0253-3626(2009)02-0203-03

改良超声波萃取－高效液相色谱法分离、检测川楝树皮提取物中川楝素

刘小玲,颜伟伟,王 进,张 彦,易 钢,何於娟
(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立改良的快速分离、检测川楝树皮提取物中川楝素(Toosendanin,TSN)的超声波萃取—高效液相色谱法。方法:采用超声波乙醇提取—氯仿萃取制备川楝树皮提取物,高效液相色谱法(High performance liquid chromatography,HPLC)分析提取物中的 TSN 含量,以乙腈－水(45 ∶ 55)为流动相,检测波长 215 nm,流速 1 ml/min,柱温:25℃,色谱柱为 XDB C_{18} 柱(4.6 × 250 mm,5 μm)。结果:TSN 在 4.64 ~ 88.2 μg/ml 浓度范围内有良好的线性关系(r=0.999 6),测定方法平均加标回收率为 100.83%,精密度试验 RSD 为 1.42%,稳定性试验 RSD 为 2.26%。提取物中 TSN 经 HPLC 分离提纯后纯度达 96.32%。结论:本方法简便、快速、准确,所得结果稳定、重复性好,可作为实验室少量制备和鉴定 TSN 纯品的方法。

【关键词】川楝素;超声波萃取;高效液相色谱法
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-27

Separation and determination of toosendanin in the bark of melia toosendan sieb.et zuccc.by improved transonic extraction and HPLC separation

LIU Xiao-ling,et al
(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To establish an improved transonic extraction-high performance liquid chromatography (HPLC) method for separating and detecting toosendanin(TSN) in Melia toosendanin extractive. *Methods*: Transonic alcohol-chloroform extraction method was used to extract TSN from the bark of Melia toosendanin sieb.et zuccc. The content determination of TSN was performed on an Agilent XDB C18 Column(4.6 × 250 mm, 5 μm). Elution was performed using 45% acetonitrile- water solution as the mobile phase at a1flow rate of 1ml/min. Detection was performed at 215 nm wavelength. *Results*: The linear regression equation for peak area-TSN concentration (4.64 ~ 88.2 μg/ml) was: A=7.616 2C-2.567 7, r=0.999 6; mean recovery of standard substance was 100.83%; RSD of precision test was 1.42%; RSD of stability test was 2.26%. *Conclusion*: The method is simple, rapid, stable and roducible, which can be used as a method for preparation and identification TSN of Melia toosendanin extractive in laboratory.

【Key words】 Toosendanin; Transonic extraction; High performance liquid chromatography(HPLC)

川楝素(Toosendanin,TSN,分子式为 $C_{30}H_{38}O_{11}$,分子量 574.60)是从楝属植物的根皮、枝皮和果实中提取出的四环三萜类化合物,为无色针状结晶,易溶于甲醇、乙醇、丙酮、吡啶,微溶于苯及氯仿,几乎不溶于水及石油醚。TSN 具有广泛的药理作用和杀虫活性,其主要药理作用为:驱蛔虫、抑制中枢神经系统、使心脏收缩节律异常、对消化系统有明显的影响及抗肉毒中毒作用等。最近有研究表明[1],TSN 可以引发细胞分化和凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,具有潜在的抗癌作用。

提取 TSN 的传统方法主要是有机溶剂提取法和水提取法,近年来在传统方法的基础上产生了超临界 CO_2 萃取法、微波辅助的有机溶剂提取法和超声波辅助的有机溶剂提取法。文献表明[2,3],每种方法各有优劣,其中超声波辅助的有机溶剂提取法相对更优。本研究对上述方法加以适当改良,采用超声波乙醇提取法对川楝树枝皮中的 TSN 进行粗提,再用氯仿萃取,得到 TSN 样品提取物。TSN 的定量分析方法主要有化学显色法和高效液相色谱法(High performance liquid chromatography,HPLC)法,其中 HPLC 法因兼有既可测定提取物中 TSN 的含量,又可分离提取 TSN 纯品的优势为我们选用。文献采

作者介绍:刘小玲(1978-),女,硕士,
研究方向:中药抗肿瘤的分子机制研究。
通讯作者:何於娟,女,副教授,E-mail:yjhemail@126.com。
基金项目:国家自然科学基金项目(No:30171150)。

用的 HPLC 分析方法多数是甲醇梯度洗脱，而本研究采用乙腈恒度洗脱。最后，方法学评估结果表明经我们改良的超声波萃取-HPLC 法既良好分离了 TSN 纯品，又简化了提取工艺、缩短了提取时间、降低了提取成本，所建立的方法简便、快速、准确、重复性好，可作为一般科研实验室少量制备和鉴定 TSN 纯品的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

仪器 RT-34 粉碎机；KQ-500B 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；R501-5L 旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；XS105DU 型电子天平；美国 Agilent 110 series 高效液相色谱仪，G1314A Agilent 1100 紫外检测器，GBBA ALS 自动进样器，津腾溶剂微孔过滤膜（北京成萌伟业科技有限责任公司），Rev.A.10.02chemstation，GBRa Binpump 二元泵；新加坡 CST 手性高效液相色谱分离柱（CST）。

药品与试药 川楝树枝皮（采摘于重庆市沙坪坝）；TSN 标准品（购于上海卓康生物有限公司，纯度>95%）；乙腈（色谱纯）、甲醇（色谱纯）、其它试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 提取方法 将川楝树枝皮洗净晒干，用粉碎机打成约 40 目粉末，56℃烘干后，置于 2 000 ml 圆底烧瓶中，加入 60%乙醇（料液比 1∶9），超声波（功率 200 W）作用 30 min，水浴温度 40℃，回流提取，过滤，将残渣重复提取 3 次，合并滤液，减压浓缩除去大量乙醇，得水浸膏。于水浸膏中加入蒸馏水，用氯仿萃取 3 次，合并氯仿层，无水硫酸钠干燥 2 h，过滤，浓缩得棕黄色油状物，加入无水乙醇溶解，再加入活性碳，60℃搅拌脱色 30 min，过滤，滤渣用乙醇洗涤，合并滤液、浓缩，得淡黄色粘稠油状物，加入适量甲醇、适量氯仿加热溶解，搅拌下缓慢滴加石油醚至体系恰好变浑浊，冷却静置，隔夜析晶，析出淡黄色固体即为 TSN 样品提取物。

1.2.2 色谱条件 色谱柱：Agilent XDB C_{18} 柱（4.6×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈—水（45∶55）；流速：1 ml/min；检测波长：215 nm；进样量：20 μl；柱温：25℃。

1.2.3 溶液制备

1.2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取 11.6 mg TSN 标准品，用乙醇配成浓度为 464 μg/ml 的溶液。

1.2.3.2 样品溶液的制备 精密称取川楝树提取物 45 mg，用乙醇溶解于 10.00 ml 容量瓶中，即得样品溶液。

2 结 果

2.1 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液适量，用乙醇配成浓度分别为 4.64、13.9、23.2、32.5、41.8、51.0、60.3、69.6、78.9、88.2 μg/ml 的系列标准溶液。在选定的色谱条件下自动进样 20 μl，重复测定 3 次，按外标法以两个峰面积之和计算，回归方程为：A=7.616 2C-2.567 7（r=0.999 6），结果表明，TSN 在 4.64~88.2 μg/ml 范围内，峰面积（A）与质量浓度（C）有良好的线性关系。

2.2 样品测定

取 3 批样品溶液（记为第 1 批、第 2 批、第 3 批），分别用乙醇稀释 15 倍，按上述色谱条件检测，每批样品均重复测定 3 次，结果显示：3 批样品溶液中 TSN 均可以与各干扰组分达到基线分离，TSN 保留时间分别为 5.5 min 和 6.5 min；根据标准曲线可得 3 批川楝树提取物中 TSN 的浓度分别为 45.47、51.74、48.30 μg/ml；提取物中 TSN 的含量为 15.16%~17.54%。色谱图见图 1。

2.3 分离提纯

根据保留时间，收集保留时间为 5~7 min 的流动相，浓缩蒸干后，按上述色谱条件检测分离出的样品，纯度可达 96.32%，见图 2。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取第 2 批样品溶液稀释 15 倍，按上述色谱条件检测，连续进样 6 次，以峰面积进行精密度考察，RSD 为 1.42%。

2.4.2 回收率试验 取稀释 15 倍的第 2 批样品溶液 1.0 ml 2 份，分别加入一定量的 TSN 标准品，均

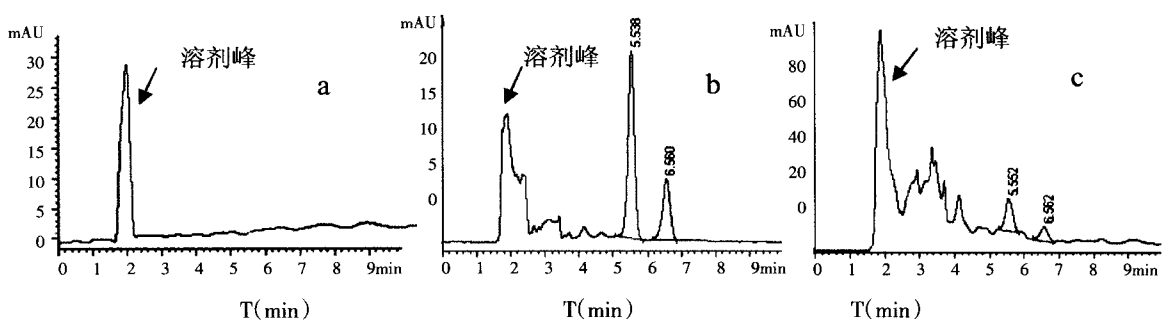


图 1 川楝素标准品和提取物的 HPLC 图谱（第 2 批）

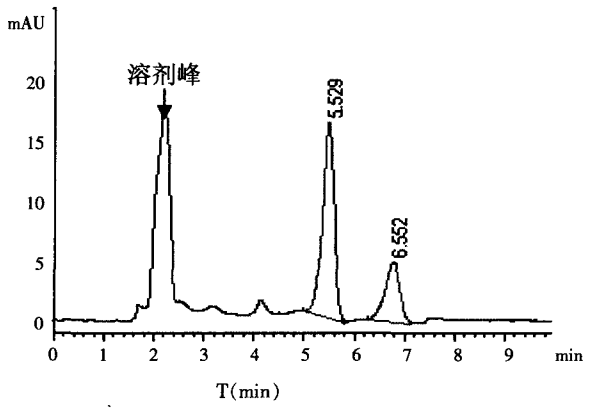


图 2　自制川楝素纯品的 HPLC 图谱

重复测定 3 次，在选定的色谱条件下进行加标回收试验，以外标法定量，并计算回收率，结果列于表 1。

2.4.3　稳定性试验　将第 2 批样品溶液稀释 15 倍，在室温放置 0、2、4、6、8 h 后，按上述色谱条件检测，均重复测定 3 次，计算得 TSN 的峰面积，RSD 为 2.26%，结果表明样品溶液在室温下放置 8 h 稳定性良好。

表 1　加标回收率试验结果（n=3）

本底值 (μg/ml)	加入浓度 (μg/ml)	测定浓度 (μg/ml)	回收浓度 (μg/ml)	回收率 (%)
51.74	8.12	60.22	8.48	104.43
51.74	30.36	81.26	29.52	97.23
平均回收率				100.83

3　讨　论

据文献报道[4]，新鲜川楝内皮中 TSN 的含量最高，为 1.43%，外皮和全皮含量分别为 0.17%、1.05%。本实验以新鲜川楝树全皮为材料，虽然会导致提取物中杂质有所增加，但减少了实验材料预处理步骤，极大地缩短了样品制备的时间。

传统的 TSN 提取方法主要是有机溶剂浸取法和水提取法，前者直接用有机溶剂浸渍川楝韧皮粉，提取时间长；后者采用 80℃的热水首先浸提川楝树韧皮，再用氯仿萃取水提浓缩液中的 TSN，以水为溶剂，虽大大降低了提取成本，但存在浸提时间长、能耗大等缺点[2]。在提取剂的选择上，甲醇的提取率最高，其次是 60%乙醇。但甲醇对人体有毒害作用，而乙醇毒性小，使用安全，价格便宜，可回收反复使用，成本较低。

超声波是频率高于 20 kHz，并且不引起听觉的弹性波。现普遍认为其空化效应、热效应和机械作用是超声技术在植物有效成分提取中的 3 个理论依据。超声作用可以使常温常压不能发生的化学反应在空化作用下发生，甚至使非常坚硬的固体被粉碎。控制一定的超声频率和强度，空化作用产生的极大压力造成生物细胞壁及整个生物体破裂，而且整个破碎过程在瞬间完成，同时超声波产生的振动作用加强了细胞内物质的释放、扩散及溶解。被浸提的物质在被破碎瞬间生物活性保持不变，同时提高破碎速度和提取率。超声波协助提取方法具有方便、快速、简单、安全等优点。因此，本文采用了 60%的乙醇为提取剂，运用超声回流对川楝树枝皮中的 TSN 进行粗提，再用氯仿萃取醇提浓缩液，然后用乙醇、氯仿、石油醚混合溶剂结晶得到 TSN 样品提取物。

采用超声波乙醇提取-氯仿萃取制备川楝树皮提取物后，采用 HPLC 法测定提取物中 TSN 的含量。在预试验中，我们分别采用了甲醇/水、乙醇/水作为流动相，并分别做了梯度洗脱和不同比例的恒速洗脱，均发现出峰时间晚，且梯度洗脱基线严重漂移，因此改为用 45%乙腈水溶液作为流动相，以 1 ml/min 的恒定流速，结果出峰时间提前，比梯度洗脱所用时间短，且基线稳定，不产生梯度洗脱时的基线漂移，可以将 TSN 的两个色谱峰与各干扰组分达到基线分离，TSN 从提取物中快速分离出来。

本实验所建立的提取方法简便、快速，只需要简单的仪器设备；方法学评价表明该检测方法准确度高，精密度好，线性好，重复性好；按此色谱条件可将 TSN 与杂质分离得到纯品。因此，该方法可作为实验室少量、快速制备和检测川楝树提取物中 TSN 的定量方法。

参　考　文　献

[1] Shi Y L, Li M F. Biological effects of toosendanin, a triterpenoid extracted from Chinese traditional medicine[J]. Prog Neurobiol, 2007, 82(1):1-10.

[2] 唐　英，郭　惠，胡德斌，等. 超声波提取川楝素的方法研究[J]. 西南民族大学学报·自然科学版，2004，30(6)：714-717.

[3] 姜　萍，氨鑫南.苦楝素提取方法的比较研究[J]. 林产化学与工业，2005，25(4)：79-82.

[4] 姜　萍，叶汉玲，安鑫南.苦楝提取物的提取及其抑菌活性的研究[J]. 林产化学与工业，2004，24(4)：23-27.

[5] 唐　英，刘思曼，胡德斌，等. 反相高效液相色谱法测定川楝树皮中的川楝素[J]. 化学研究与应用，2005，17(2)：276-278.

（责任编辑：冉明会）