

· 工艺与制剂 ·

自微乳浸提串联浊点浓缩分离蛇床子中 香豆素类化合物的工艺优选

岳春华, 郑礼涛, 李坤平*

(广东药学院药科学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**建立利用自微乳浸提串联浊点浓缩分离蛇床子中香豆素类化合物的工艺。**方法:**以蛇床子素溶解量为指标,通过单因素试验筛选油相、乳化剂、助乳化剂,利用伪三元相图优化自微乳处方;以蛇床子素和总香豆素提取量为指标,采用 $U_5(5^4)$ 均匀试验考察浸提温度、时间、液固比和超声功率对提取工艺的影响,通过浊点浓缩分离自微乳提取液中香豆素类成份。**结果:**优选的微乳液处方为[聚乙二醇辛基苯基醚-正丁醇(5:1)]-油酸乙酯-水(2.5:0.5:7);最优工艺参数为液固比20:1,提取温度50℃,超声功率280W,浸提时间60min,蛇床子素和总香豆素的提取率分别达83.2%,91.19%;利用浊点浓缩方法处理自微乳提取液,油层中蛇床子素和总香豆素的回收率分别达90.33%,78.91%。**结论:**该工艺简单易行,适用于蛇床子活性成分的提取和浓缩分离。

[关键词] 蛇床子; 自微乳; 浊点萃取; 均匀设计

[中图分类号] R283.6;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0001-04

[doi] 10.11653/syfy2013170001

Optimization of Separation and Extraction Technology for Coumarins from Cnidii Fructus by Self-Microemulsion Connection Cloud-Point Concentration Method

YUE Chun-hua, ZHENG Li-tao, LI Kun-ping*

(College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a process for separation and extraction coumarins from Cnidii Fructus by cloud-point preconcentration using self-microemulsion as solvent. **Method:** With dissolved amount of osthole as index, single factor tests were adopted to screen oil phase, emulsifier and co-emulsifier, microemulsion formulation was optimized by pseudo-ternary phase diagrams; Taking extraction amount of osthole and total coumarins as index, solid-liquid ratio, ultrasonic power, extraction temperature and time was investigated by $U_5(5^4)$ uniform test. To separate coumarins from self-microemulsion extract by cloud-point preconcentration. **Result:** Proportion of optimized prescription was [octyl polyethylene glycol phenyl ether-butyl alcohol (5:1)] - ethyl oleate-water (2.5:0.5:7); Optimum technology parameters were as follows: extraction temperature of 50℃, extraction time 60 min, solid-liquid ratio of 20:1, ultrasonic power 280 W. Under these conditions, yield of osthole was 83.2%, total coumarins was 91.19%. After self-microemulsion extract treated by cloud-point preconcentration method, recovery of osthole and total coumarins in oil reservoir reached 90.33% and 78.91%, respectively. **Conclusion:** This optimized technology was simple and feasible, it was suitable for extraction and

[收稿日期] 20130324(006)

[基金项目] 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(LYM10092)

[第一作者] 岳春华, 硕士, 讲师, 从事中药制药工程研究, Tel:13302261387, E-mail:yuechunhua2004@126.com

[通讯作者] *李坤平, 博士, 副教授, 从事中药制药工程的教学与研究, Tel:020-39352118, E-mail:Lkpchina@hotmail.com

separation of active ingredients from *Cnidii Fructus*.

[Key words] *Cnidii Fructus*; self-microemulsion; cloud-point extraction; uniform design

蛇床子味辛、苦,性温,具温肾壮阳、燥湿祛风、杀虫止痒之功效^[1-3]。其活性成分为蛇床子素等香豆素类化合物,该类成分提取分离多采用有机溶剂回流提取^[4]、超临界 CO₂ 流体萃取等方法^[5-6],尚未见采用自微乳进行提取分离的报道。自微乳液是一种特殊液液分散体系,分散相处于纳米粒度范围,具有非常巨大的比表面积^[7-8],对中药材具有很好的渗透性,对药材中水溶性和脂溶性成份均具有较好的溶解能力^[9-11]。本实验采用超声强化自微乳浸提串联浊点浓缩法提取分离蛇床子中香豆素类化合物,为该类化合物的提取分离提供新思路。

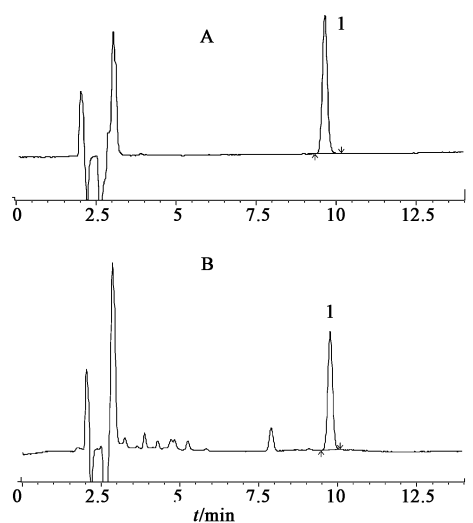
1 材料

LC-10ATVP 型高效液相色谱仪(日本岛津), TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂), AUV 200D 型 1/10 万电子天平(日本岛津), Zetasizer 1000HS 型粒度测定仪(英国马尔文有限公司)。

蛇床子购自广东采芝林药店,经广东药学院生药教研室李钟副教授鉴定为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实,蛇床子素对照品(广州合诚三生物科技有限公司,批号 051101,纯度 ≥98%),聚乙二醇辛基苯基醚(TX-10,江苏强盛化工有限公司),聚氧乙烯蓖麻油(EL-40,上海晶纯试剂有限公司),OP 乳化剂(天津福晨),聚山梨酯 80(Tween80,天津大茂),聚乙二醇 400(PEG400,广东光华),油酸乙酯(天津市光复精细化工研究所),大豆油、花生油(福临门),玉米油(金龙鱼),乙腈为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 蛇床子素含量测定 精密称取蛇床子素对照品 1.0 mg,用甲醇配制成 0.5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。采用 HPLC 测定,流动相乙腈-水(65:35),检测波长 322 nm,精密量取对照品溶液 2, 8, 12, 16, 20, 30 μL 进样,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 3.315 \times 10^6 X + 37.49$ ($r = 0.9999$),线性范围 0.001 ~ 0.015 μg。准确移取待测样品 0.5 mL,用甲醇稀释定容,按上述方法进样分析,根据标准曲线方程计算蛇床子素含量,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 蛇床子素

图 1 蛇床子 HPLC

2.2 总香豆素含量测定 精密称取蛇床子素对照品 1.0 mg,加甲醇制成 0.1 g·L⁻¹ 的溶液,再用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.005, 0.008, 0.010, 0.015, 0.018, 0.020 g·L⁻¹ 的对照品溶液,采用紫外分光光度法,于 322 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度为纵坐标, A 为横坐标,得回归方程 $Y = 65.464X + 0.0203$ ($r = 0.9997$),表明总香豆素质量浓度在 0.005 ~ 0.02 g·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.3 乳化剂、助乳化剂和油相的选择 量取 TX-10, EL-40, OP 乳化剂和 Tween80 各 2 mL,少量多次加入蛇床子素使溶解,直至有不溶物出现,2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液稀释至适当质量浓度,测定,结果蛇床子素溶解量分别为 157.60, 84.28, 116.66, 71.90 g·L⁻¹,故乳化剂选择 TX-10;按同样方法筛选助表面活性剂(乙醇、正丁醇、丙二醇及 PEG400)和油相(油酸乙酯、花生油、大豆油、玉米油),结果助乳化剂选择正丁醇,油相选择油酸乙酯。

2.4 乳化剂和助乳化剂比例考察 分别配制乳化剂和助乳化剂比例为 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 3:2, 4:3 的混合溶液,各取 2 mL,少量多次加入蛇床子素溶解,使溶液处于过饱和状态,离心,取上清液稀释至适当质量浓度,测定 A,结果蛇床子素溶解度分别为 123.91, 123.38, 123.38, 120.3, 123.99, 120.63, 119.87 g·L⁻¹,故确定 TX-10-正丁醇(5:1)。

2.5 自微乳液处方优选 准确称量油酸乙酯 2.0 g

和乳化剂(TX-10-正丁醇)0.2 g放入试管中,用半微量滴定管滴加水,不停摇荡,至刚出现浑浊2 min内不退去,记录水体积;依次累计加入乳化剂0.5,1.0,1.5 g,按上述方法依次用水滴定,记下每次水体积,计算滴入水的质量。准确称量油酸乙酯0.8 g和乳化剂1.0 g放入试管中,按相同方法处理,记下水体积;依次累计加入乳化剂1.5,1.7,2.0,2.5 g,按上述方法依次用水滴定,计算滴入水的质量。利用Origin软件对数据进行处理,绘制自微乳伪三相图,见图2。

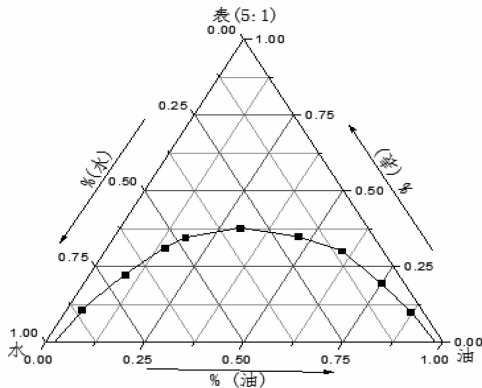


图2 蛇床子自微乳化伪三相

由图2可知,选取比例差别较大的3个点测其浊点。用水浴加热自微乳液,待油水分层时读取温度,发现浊点相差较大。考虑后期浓缩分离的需要,需选取浊点相对较低的自微乳处方(表面活性剂-助表面活性剂5:1)-油-水(2.5:0.5:7),此微乳处方54℃浑浊,70℃油水完全分层,测得自微乳液粒径7~10 nm,符合要求。

2.6 提取工艺优化 用DPS软件设计均匀试验方案,以温度、液固比、时间和功率为考察因素,蛇床子素和总香豆素提取量为指标,优选提取工艺,试验安排及结果见表1。

表1 蛇床子超声强化微乳提取 $U_5(5^4)$ 均匀设计试验安排

No.	X_1 温度/℃	X_2 液固比 /mL·g ⁻¹	X_3 时间 /min	X_4 功率 /W	蛇床子素 提取量 /mg	总香豆素 提取量 /mg
1	50	20	50	280	11.296	21.007
2	45	35	20	240	9.726	18.495
3	40	40	60	320	7.996	15.462
4	35	25	30	360	9.559	17.963
5	30	30	40	200	6.689	12.856

经过软件计算 $Y_{1\max} = -16.853 + 0.306642X_1 + 0.152720X_2 - 0.023327X_3 + 0.121617X_4 + 0.000612X_1^2 + 0.005231X_1^2 + 0.000268X_3^2 - 0.000108X_4^2 - 0.005604X_1X_2 +$

$0.002562X_1X_3 - 0.000828X_1X_4 - 0.002383X_2X_3 - 0.000668X_2X_4 - 0.000123X_3X_4, Y_{2\max} = -26.771845 + 0.080927X_1 + 0.899499X_2 + 0.176259X_3 + 0.212598X_4 + 0.006202X_1^2 + 0.004023X_1^2 - 0.000703X_3^2 - 0.000148X_4^2 - 0.010305X_1X_2 + 0.004373X_1X_3 - 0.001237X_1X_4 - 0.006522X_2X_3 - 0.002014X_2X_4 - 0.000441X_3X_4$ 。按 Y_1 最优指标时各因素组合为温度50℃,液固比20:1,时间60 min,功率304 W; Y_2 最优指标时各因素组合为温度50℃,液固比20:1,时间60 min,功率276 W。结合生产实际考虑,将试验方案优化为液固比20:1,温度50℃,浸提时间60 min,功率280 W,蛇床子素最优目标值12.14 mg,总香豆素最优目标值27.27 mg。该方案相关系数0.9776,表明设计的方案相关性良好。

2.7 验证试验 称取蛇床子3份,每份1 g,按优选的工艺进行提取,结果蛇床子素和总香豆素平均提取量分别为12.33,28.15 mg, RSD分别为0.95%,1.24%,说明优选的工艺稳定可行。用甲醇回流提取蛇床子4 h,结果蛇床子素和总香豆素酶提取量分别为14.81,30.87 mg,自微乳提取的蛇床子素和总香豆素提取率分别达甲醇提取的83.20%,91.19%。

2.8 蛇床子自微乳提取液的浊点萃取 取蛇床子提取液离心后上清液5 mL,水浴加热使其油水分层,油层的总香豆素质量2.5878 mg,水层的总香豆素质量0.6918 mg,油层蛇床子总香豆素的萃取率达78.91%;通过HPLC分析蛇床子素含量,结果油层的蛇床子素质量0.6639 mg,水层的蛇床子素质量0.0711 mg,油层蛇床子素萃取率达90.33%,进一步说明了利用自微乳液“浊点”来调控温度以实现目标成份浓缩分离的可行性。

3 讨论

前期试验发现,自微乳液对蛇床子素的HPLC测定无影响,而对总香豆素的紫外测定有明显影响,原因可能是所用乳化剂和油具有一定A,所以总香豆素的测定需用自微乳液进行空白对照。结果表明以自微乳为桥梁,将提取工艺和浓缩分离工艺耦合到一起具有一定可行性。采用超声强化自微乳浸提串联浊点浓缩分离工艺可以简化工序,且规避了中药难溶性成分常用有毒试剂提取的弊端,符合绿色环保的理念。文献报道微乳剂型可提高药物的体内生物利用度^[12-14],自微乳提取液和油层分离液可不去除所加入辅料直接引入下一步成型,同时从伪三相图中可知,微乳液可被水无限稀释,使含水量 >

参玉口服液澄清工艺优选

孙立霞, 常桂娟, 李秋萌, 张楠楠, 白雪媛*, 赵大庆
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 优选参玉口服液的澄清工艺。方法: 以人参皂苷含量、总多糖含量、澄明度和稳定性为评价指标, 考察 KBT-ZTC 絮凝澄清法、酶解法、微滤法、酶解-微滤法及絮凝澄清-微滤法对参玉口服液质量的影响。结果: 最佳澄清处理方法为絮凝澄清-微滤法, 参玉口服液澄清稳定、有效成分保留率得以提高, 人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、总多糖质量分数分别为 0.331 1, 0.282 8, 0.098 4, 96.33 mg·g⁻¹。结论: KBT-ZTC 絮凝澄清法与微滤法联用能有效除去杂质, 保留有效成分, 且工艺稳定, 可作为参玉口服液的澄清工艺。

[关键词] 参玉口服液; 澄清工艺; 人参皂苷; 多糖; 澄明度; 稳定性

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0004-04

[doi] 10.11653/syfy2013170004

Optimization of Clarification Process of Shenyu Oral Liquid

SUN Li-xia, CHANG Gui-juan, LI Qiu-meng, ZHANG Nan-nan, BAI Xue-yuan*, ZHAO Da-qing

[收稿日期] 20130327(017)

[基金项目] 国家科技重大专项(2011ZX09401-305); 国家科技支撑计划(2012BAI29B05); 吉林省医药产业发展专项(YYZX201134)

[第一作者] 孙立霞, 硕士, 从事中药有效成分开发与研究, Tel: 0431-81660061, E-mail: slxytu@126.com

[通讯作者] *白雪媛, 硕士, 副教授, 从事中药有效成分开发及产品研究, Tel: 0431-81660061, E-mail: baixy1212@163.com

99%, 易红等^[11]对厚朴采用微乳提取时, 含水量 99% 的微乳仍能对厚朴酚有理想的提取率, 对于含水量较高的自微乳液对蛇床子素提取率的影响有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 295.

[2] 连其深. 中药蛇床子的药理作用研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2003, 23(2): 213.

[3] 周则卫, 刘培勋. 蛇床子化学成分及抗肿瘤活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1309.

[4] 李坤平, 高崇凯, 李卫民. UPLC/ESI-TOF-MS/MS 分析蛇床子提取物中香豆素类化合物[J]. 中成药, 2009, 31(4): 98.

[5] 闫志芳, 刘必旺, 赵水平. CO₂ 超临界萃取蛇床子中蛇床子素的工艺研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(1): 20.

[6] 弥宏, 曲莉莉, 任玉林. 超临界萃取蛇床子中香豆素类化合物的工艺优选及成分分离的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(14): 1080.

[7] 何琳, 刘意, 郑冬梅, 等. 盐酸小檗碱自微乳剂的处方设计及体外评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18

(10): 26.

[8] ZHOU J, SUN X L, WANG S W. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2008, 1200(2): 93.

[9] 高进, 易红, 杨华, 等. O/W 型微乳由于提取中药当归[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(6): 503.

[10] 王金玲, 孙进, 何仲贵. 微乳及其在药学中应用[J]. 中国药理学杂志, 2009, 7(4): 356.

[11] 易红, 孙立亚, 高进, 等. O/W 型微乳用于厚朴提取的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 1.

[12] 欧晓霞, 汪证明, 封亮. 熊果酸自微乳的制备及其生物利用度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 36.

[13] 孔繁晟, 严春艳, 贲永光, 等. 鸦胆子油自微乳的体外释放度考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 21.

[14] 游秀华, 王荣昌, 汤文星, 等. 自微乳化系统提高广藿香醇大鼠口服生物利用度[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 694.

[责任编辑 仝燕]