

· 工艺与制剂 ·

O/W 型微乳用于厚朴提取的研究

易红,孙立亚,高进,任彦飞,杨华*

(中国中医科学院 中药研究所,北京 100700)

[摘要] **目的:**探讨以 O/W 型微乳液为溶剂提取厚朴脂溶性成分的可行性。**方法:**采用动态光散射法测定空白微乳液加热过程中粒径的变化,比较加热前后微乳液的物理指标的变化;采用 HPLC 测定不同溶剂中厚朴酚、和厚朴酚的溶解度及以 O/W 型微乳、水、乙醇为溶剂的厚朴提取液中二者的含量;比较不同溶剂、不同微乳配方和不同提取方法对厚朴脂溶性成分提取的影响,并采用薄层色谱法对比不同厚朴提取液薄层图谱的异同。**结果:**以微乳为溶剂可提取厚朴中 90% 以上的厚朴酚和和厚朴酚,其提取率与 60% 乙醇相当,微乳的配方组成和提取方法对厚朴中的脂溶性成分具有显著影响。空白微乳加热前后未见明显变化。**结论:**O/W 型微乳用于厚朴的提取,可在保证脂溶性成分提取效率的前提下,避免有机溶剂的使用,节约能源,减少生产环节,有利于中药可持续发展和低碳经济的发展方向。

[关键词] 微乳;提取;厚朴;厚朴酚;和厚朴酚

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0001-05

Extracting *Magnolia officinalis* by Using O/W Microemulsion

YI Hong, SUN Li-ya, GAO Jin, REN Yan-fei, YANG Hua*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of extracting the fat-soluble compounds from *Magnolia officinalis* with O/W microemulsion. **Method:** To measure the particle size of blank microemulsion by dynamic light scattering when it is being heated and compare with its physical index. To choose O/W microemulsion, water and ethanol as solvents to extract *M. officinalis* and determine the content of magnolol and honokiol in extracts of *M. officinalis* by HPLC. Compared with efficiency of extracting *M. officinalis* by using the different media, different formulations of O/W microemulsion and using different extraction methods and the differences of *M. officinalis*' extracts by TLC. **Result:** The extracting yield of magnolol and honokiol are more than 90% by using microemulsion at mean time, which is similar to 60% ethanol. The formulations of microemulsion and extracting methods have remarkable effect for extracting the fat-soluble compounds from *M. officinalis*. There is no significant difference for blank microemulsion pre and post heated. **Conclusion:** It is feasible to extract *M. officinalis* by using O/W microemulsion as a solvent. It could not only ensure the extracting efficiency of fat-soluble compounds, but also avoid the usage of organic solvents, save energy and reduce the links of manufacture, which are beneficial to the sustained development and low-carbon economy of Chinese Materia Medica.

[Key words] microemulsion; extraction; *M. officinalis*; magnolol; honokiol

[收稿日期] 20110413(007)

[基金项目] 国家“十一五”支撑计划项目(2006BAI09B08);“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301;2009ZX09308);中国中医科学院自主选题项目(Z02094)

[第一作者] 易红,本科,副主任药师,从事中药新剂型研究,Tel:010-84017310,E-mail:yihong1@sina.com

[通讯作者] *杨华,研究员,从事中药新剂型研究,Tel:010-84017310,E-mail:yanghua2796@sina.com

厚朴是一味常用中药,具有燥湿消痰、下气除满的功能。现代药理实验证明厚朴具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、肌肉松弛、降胆固醇和抗衰老等广泛的药理作用。厚朴的化学成分主要有厚朴酚、和厚朴酚等具有联苯型结构的木脂素类成分;其挥发油中含有桉叶醇、聚伞花素等成分;还含有木兰箭毒碱等生物碱^[1]。由于厚朴中的有效成分厚朴酚、和厚朴酚等难溶于水,中药制备中以水提取的效果较差,目前生产上常采用一定体积分数的乙醇进行提取。本课题组前期利用微乳可增溶药物成分的性质,将微乳作为溶剂用于丹参的提取,结果表明用微乳提取可以增加丹参中脂溶性成分丹参酮Ⅱ_A的溶出,同时不影响水溶性成分丹酚酸 B 的溶出,提示微乳可作为一种新型提取溶剂用于中药提取^[2]。本研究尝试将微乳应用于厚朴脂溶性成分提取,同时探讨不同溶剂、不同微乳配方和不同提取方法对厚朴脂溶性成分提取的影响,初步研究微乳作为溶剂加热前后的变化,为微乳用于厚朴提取的可行性与适宜性提供实验依据。

1 材料

厚朴粗粉(饮片购于北京卫仁中药饮片厂,粉碎过 20 目筛),厚朴酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110729-200310),和厚朴酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110730-200609),辛癸酸三甘酯(MCT,浙江建德市千岛精细化工实业有限公司),棕榈酸异丙酯(IPP,昆山市双友日用化工有限公司),肉豆蔻酸异丙酯(IPM,南京化工产品销售中心),油酸乙酯(化学纯,北京长城化学试剂厂),油酸(分析纯,北京化学试剂公司),豆油(注射用,南京化工产品销售中心),聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL-35,巴斯夫公司),聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40,巴斯夫公司),聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(TW-80,药用级,上海申宇医药化工有限公司),聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯(SOLUTOL HS 15,巴斯夫公司),1,2-丙二醇(分析纯,北京化学试剂公司),无水乙醇为分析纯,甘油(药用级,北京第二制药厂),甲醇为优级纯,蒸馏水(自制)。

Waters1515-717 型自动进样液相色谱仪,2487 检测器,Empower2 数据处理系统,98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),LXJ-84-01 型离心机(北京医疗仪器修理厂),MS-1977MT 型 LG 微波炉(LG 电子天津电器有限公司),KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),

JJ200 型精密电子天平(常熟双杰测试仪器厂),AEL-200 型电子天平(日本 Shimadzu 公司),4803-02 型磁力搅拌器(美国 Cole-Parmer 仪器公司),DELTA 320 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),Zetasizer Nano ZS 激光粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司),T6 紫外-可见分光光度计(普析通用),电导率仪(上海精密科学仪器有限公司),平氏黏度计(沈阳市兴亚石油玻璃仪器厂,直径 1 mm),Merck Kieseigl 60 F₂₅₄ 薄层板。

2 方法与结果

2.1 加热对空白微乳液的影响 微乳液作为提取用溶剂,有时需要进行加热提取,因此本实验对微乳液加热过程及加热前后变化进行了初步研究。

2.1.1 微乳液的制备 取适量 MCT, TW-80-无水乙醇(2:1),混合均匀,加水至全量,即得原液。取原液分别加水稀释 5, 15, 30, 60 倍;即得微乳 5, 15, 30, 60 倍稀释液。

2.1.2 加热过程中微乳液粒度的变化 本试验利用马尔文激光粒度仪,测定升温过程中微乳平均粒度的变化,考察微乳加热过程中的变化。

方法:取微乳 30 倍稀释液,置于马尔文激光粒度测试仪中,预先设置升温程序,自动进行粒度测定,记录提取液在不同温度下的平均粒度,结果见图 1。图 1 显示,随着温度的升高,微乳的粒度从 60 ℃ 开始也随着增大。

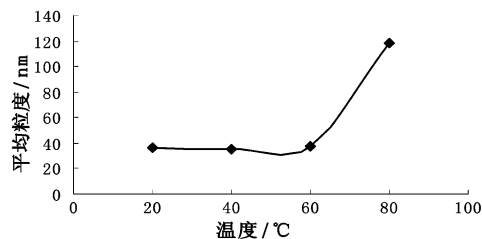


图 1 微乳在不同温度下平均粒度变化趋势

2.1.3 加热对微乳物理指标的影响 加热时,微乳粒度增大,为了进一步研究加热对微乳液的影响,本试验测定了加热前后微乳液的物理指标,来观察微乳液的变化。

方法:取适量微乳 30 倍稀释液,置于圆底烧瓶中加热煮沸 1 h 后,取出放冷。分别测定加热前后微乳 30 倍稀释液的外观性状、平均粒度(动态光散射法)、pH、运动黏度(2005 年版《中国药典》黏度法项下第一法)、透光率(波长 500 nm)等指标,结果见表 1。

表1 加热前后微乳提取液物理指标的变化

样品处理	外观性状	平均粒度	pH	运动黏度	透光率
		/nm		/m ² /s	/%
加热前	透明溶液	41.43	6.20	1.15	93.32
加热放冷后	透明溶液	36.20	6.29	1.15	93.31

微乳液加热煮沸后溶液外观由透明溶液转为乳白色溶液,停止加热,放冷后又恢复原状,表1结果显示其他物理指标加热前后未发生明显变化。

2.2 微乳提取液中厚朴酚与和厚朴酚的 HPLC 测定方法学研究

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(78:22), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 294 nm。理论塔板数按厚朴酚峰计算应不低于3 800。在此条件下,厚朴酚与和厚朴酚与其他成分达到基线分离,且分离度良好。

2.2.2 空白试验 取微乳液,进样,按 2.2.1 色谱条件测定吸收峰面积。结果显示,微乳液对测定没干扰。

2.2.3 线性关系考察 将厚朴酚标准溶液(0.196 g·L⁻¹)精密吸取 0.5, 1, 2, 5, 10, 30 μL 进样;和厚朴酚标准溶液(0.118 g·L⁻¹)精密吸取 0.5, 1, 2, 5, 10, 30, 60 μL 进样;测定峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标画图,即得厚朴酚与和厚朴酚的标准曲线。厚朴酚线性方程为 $Y = 283\ 872 X - 11\ 076$ ($r = 0.999\ 9$),表明厚朴酚在 0.098 ~ 5.88 μg 峰面积呈良好线形关系。和厚朴酚线性方程为 $Y = 181\ 771 X + 1\ 073.2$ ($r = 0.999\ 99$),表明和厚朴酚 0.059 ~ 7.08 μg 呈良好线形关系。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密吸取厚朴微乳提取液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容到刻度,摇匀,滤过,取续滤液即得供试品溶液。

2.2.5 精密度试验 精密吸取厚朴酚与厚朴酚标准品溶液,连续进样,进样量相同,按上述色谱条件测定峰面积,RSD 分别为 0.95%, 0.72%,表明精密度较好。

2.2.6 重复性试验 精密吸取厚朴微乳提取液 5 份,按 2.2.4 项下方法制成供试品溶液,进样,测定峰面积,计算厚朴酚与和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.147%, 0.625%,表明重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,分别在 0, 1, 2, 3, 4, 6, 24 h 进样,按上述色谱条件测定峰面

积,计算厚朴酚与和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.421%, 0.664%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收试验 精密吸取已知含量的样品,分别加入一定量的厚朴酚、和厚朴酚对照品,制成供试品溶液,进样,测定峰面积,计算供试品溶液加厚朴酚回收率在 97.14%, 101.03%, RSD 1.71%;供试品溶液加和厚朴酚的回收率在 103.45% ~ 106.90%, RSD 1.38%。

2.3 厚朴酚与和厚朴酚在不同溶媒中的溶解度

方法:称取厚朴酚、和厚朴酚对照品适量(使溶液过饱和),分置于试管中,分别加入各种溶解介质 4 mL,超声 30 min,摇匀,静置 24 h,过滤,即得各样品溶液,分别加甲醇稀释至适宜浓度,HPLC 测定含量。结果见表 2。

表2 和厚朴酚、厚朴酚在不同溶媒中的溶解度

溶媒分类	溶媒	和厚朴酚 /g·L ⁻¹	厚朴酚 /g·L ⁻¹
油相	MCT	143.842	170.485
	IPP	186.375	85.267
	IPM	206.318	85.083
	油酸乙酯	188.487	84.803
	油酸	76.900	45.181
表面活性剂	大豆油	158.956	68.887
	10% EL-35	19.621	18.836
	10% RH-40	18.535	18.497
	10% TW-80	13.001	10.092
助表面活性剂	10% HS-15	10.8824	16.357
	10% 甘油	0.0089	0.003
	10% 丙二醇	0.022	0.005
	50% 乙醇	31.415	27.224
水相	95% 乙醇	极易溶解	极易溶解
	水	0.022	0.014

本试验测定了厚朴酚、和厚朴酚在与微乳组成有关的油相、表面活性剂、助表面活性剂和水中的溶解度。由表 2 可见,厚朴酚与和厚朴酚在不同溶剂中的溶解度有明显差异:厚朴酚与和厚朴酚在油相溶解度比较大,在 95% 乙醇中的溶解度极大,在表面活性剂和 50% 乙醇中溶解度相对较小,在水和助表面活性剂中溶解度极小。

2.4 微乳提取厚朴的可行性研究

2.4.1 不同溶剂提取厚朴中厚朴酚、和厚朴酚提取率比较 为了探讨以微乳作为溶剂提取厚朴是否可行,以厚朴中厚朴酚、和厚朴酚含量为指标,分别采

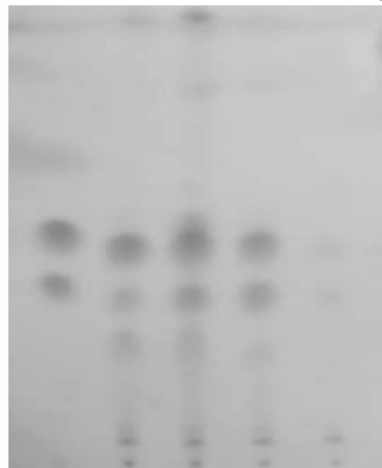
用水、微乳液、60% 乙醇提取厚朴, 比较各提取液中 2 种成分的提取率。

称取适量厚朴粗粉, 分别加入表 3 中的 3 种溶剂, 每种溶剂平行 3 份, 分别加热回流提取 3 次, 每次分别加入 10 倍量的溶剂, 提取 1 h, 合并提取液, 滤过, 取上清液, HPLC 测定其厚朴酚、和厚朴酚含量。表 3 结果显示, 60% 乙醇的提取率与微乳液的提取率相差无几, 远大于水提, 微乳液对于厚朴中脂溶性成分的提取具有可行性。

表 3 不同溶剂提取厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的测定 (n = 3)

No.	溶剂	厚朴酚 + 和厚朴酚 /mg·g ⁻¹	RSD/%	提取率/%
1	水	0.63	0.80	2.38
2	微乳原液	24.26	1.88	92.04
3	60% 乙醇	24.51	0.65	92.98

2.4.2 厚朴各种溶剂提取液的薄层定性比较 分别取微乳提取液、95% 乙醇提取、60% 乙醇渗漉、水提取液适量, 水浴浓缩至 5 mL, 用石油醚 (30 ~ 60 ℃) 振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并石油醚液, 低温蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取厚朴酚、和厚朴酚对照品, 分别加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (2005 年版《中国药典》一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液 6 μL、对照品溶液各 2 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-甲醇 (9:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 在 100 ℃ 加热至斑点显色清晰。由图 2 可以看出, 微乳提取



1 厚朴酚、和厚朴酚对照品; 2. 微乳提取厚朴溶液; 3. 95% 乙醇提取厚朴溶液; 4. 60% 乙醇厚朴渗漉液; 5. 水提取厚朴溶液

图 2 厚朴提取液的 TLC

和 95% 乙醇提取、60% 乙醇渗漉的脂溶性成分基本一致, 而水提的脂溶性成分的斑点很淡, 甚至没有。此结果与提取液含量测定结果一致。

2.5 微乳配方组成对微乳提取厚朴中厚朴酚、和厚朴酚的影响

2.5.1 不同稀释倍数对微乳提取的影响 称取适量厚朴粗粉, 分别加入 2.1 项下微乳液原液及 5, 15, 30, 60 倍稀释液, 按 2.4.1 项下操作进行提取, HPLC 法测定提取液中厚朴酚、和厚朴酚含量。从表 4 可以看出, 随着稀释倍数的增大, 微乳液对厚朴酚与和厚朴酚的提取率逐渐下降, 可见不同稀释倍数微乳对于厚朴中脂溶性成分的提取率影响较大。

表 4 不同稀释倍数微乳提取厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的测定 (n = 3)

No.	稀释倍数	厚朴酚 + 和厚朴酚总 /mg·g ⁻¹	RSD/%	提取率/%
1	原液	24.26	1.88	92.04
2	5	19.76	4.66	74.97
3	15	14.50	3.43	54.99
4	30	14.59	4.36	55.34
5	60	10.20	0.97	38.70

2.5.2 油相的影响 厚朴酚与和厚朴酚在油相中的溶解度较大, 不同油相的微乳配方可能对厚朴酚、和厚朴酚的增溶量不同, 在提取厚朴时的提取效果可能也不同。本试验在其他配方成分和用量不变的情况下分别选用了 3 种油相, 配制成 3 种微乳液, 分别加水稀释 30 倍作为提取液, 用加热回流的方法提取厚朴, 提取液测定厚朴酚、和厚朴酚的含量, 以观察油相的影响。由表 5 可见, 经对 3 组提取液中厚朴酚与和厚朴酚含量的数据进行两两之间独立的 t 检验, 结果以 EO 和 IPM 为油相的微乳提取液含量无明显差异。MCT 和 EO, IPM 相比有显著性差异, 说明微乳配方中油相对厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的提取量有显著影响, 以 EO 和 IPM 为油相的微乳提取量较高。

表 5 不同油相微乳液提取厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的测定 (n = 3)

No.	油相	厚朴酚 + 和厚朴酚 总含量/mg·g ⁻¹	RSD/%	提取率/%
1	MCT	11.19	0.91	42.45
2	EO	11.69	3.06	44.36
3	IPM	11.66	3.57	44.24

2.5.3 不同 O: A 值的影响 厚朴酚与和厚朴酚在表面活性剂和助表面活性剂中的溶解度较低, 但表

面活性剂和助表面活性剂的在微乳配方中的用量较高,为了考察其影响,本实验在油相(O)用量不变的情况下分别选用了表面活性剂和助表面活性剂(两者之和为A)的3种用量,配制成3种微乳液,分别加水稀释30倍作为提取液,用加热回流的方法提取厚朴,提取液测定厚朴酚、和厚朴酚的含量,以观察表面活性剂和助表面活性剂用量对微乳提取厚朴的影响,结果见表6。

表6 不同O/A微乳稀释液对微乳提取厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的影响($n=3$)

No.	O:A	厚朴酚 + 和厚朴酚 /mg·g ⁻¹	RSD/%	提取率/%
4	1:10	14.59	4.36	55.34
5	1:7.5	12.21	3.89	46.33
6	1:5	10.77	3.12	40.85

由表6可见,经对3组提取液中厚朴酚与和厚朴酚含量的数据进行两两之间独立的 t 检验,结果均具有显著性差异。说明微乳中表面活性剂和助表面活性剂的用量对厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的提取量具有显著性影响。表面活性剂和助表面活性剂用量越大,厚朴酚与和厚朴酚的提取率越高。

2.6 不同提取方法对微乳提取厚朴中厚朴酚、和厚朴酚提取量的影响 取2.1项下微乳30倍稀释液作为提取溶剂,采用微波提取、超声提取与加热回流提取方法作比较。

2.6.1 加热回流法 同2.4.1项下提取法操作,测定提取液中含量,结果见表7。

2.6.2 微波提取法 称取厚朴粗粉3份,置微波炉中加热提取3次,每次分别加入10倍量微乳液,提取2min(功率700W),合并提取液,测定提取液中含量,结果见表7。

2.6.3 超声提取法 称取厚朴粗粉3份,分别置平底烧瓶中,置超声波仪中提取3次,每次分别加入10倍量微乳液,超声处理30min(功率250W,频率45kHz),合并提取液,测定提取液中含量,结果见表7。

表7结果显示,经对3组提取率数据进行两两之间独立 t 检验,结果;微波法与;回流法和超声法比较有显著性差异,加热回流法和超声法之间无显著性差异。说明采用微乳作为溶剂提取厚朴时,可根据3种方法的特点酌情采用。

表7 不同提取方法提取厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的测定($n=3$)

No.	提取方法	厚朴酚 + 和厚朴酚 /mg·g ⁻¹	RSD/%	提取率/%
7	微波	11.64	2.68	44.16
8	超声波	14.27	3.04	54.16
9	加热回流	14.59	4.36	55.34

3 结论与讨论

结果表明,以微乳液为溶剂提取厚朴是可行的。当采用微乳为溶剂时,加热回流提取厚朴,可提取药材中92%的厚朴酚与和厚朴酚,30倍微乳稀释液含水量大于99%,其提取成本与乙醇提取相近,也可提取药材中55%的厚朴酚与和厚朴酚。说明利用O/W型微乳的特性,可以增加药材中脂溶性成分的溶出,薄层定性实验也显示同样的结果,从而为微乳用于中药提取提供了更多的实验依据。

微乳的配方组成对厚朴中厚朴酚、和厚朴酚的溶出具有显著影响。微乳的稀释倍数对厚朴酚、和厚朴酚的提取率在观察油相影响时发现,微乳提取量并未与成分油相溶解度成正比,说明油相的品种不是单一的影响因素;表面活性剂和助表面活性剂的用量有明显的影 响,用量越大,厚朴酚与和厚朴酚的提取率越高;提取方法上回流、超声优于微波提取法。

通过研究加热对微乳液的影响,初步表明加热并未对微乳结构产生破坏。实验过程中,高温时微乳液会变浑浊,样品的平均粒度也会增大,放冷后可恢复,同样的胶体液也出现了相似现象,推测这种现象与表面活性剂本身的昙点有关。

中药厚朴的组成复杂,本实验主要针对有效成分厚朴酚、和厚朴酚进行了微乳提取的研究,对于其他成分提取的影响尚待进一步研究。微乳提取液可以不去除所加入辅料直接引入下一步成型,例如制成微乳口服液、微乳固体片,其生物利用度等是下一步研究的内容。

[参考文献]

- [1] 杨云,冯卫生. 中药化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国中医药出版社,1998:238.
- [2] 杨华,邓茂,易红. O/W型微乳用于提取中药丹参的实验研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(22):2617.

[责任编辑 全燕]