

蛇床子素制备方法的研究

曾春萍¹, 贾曼谱², 王书华², 安芳^{2*}

1. 张家口市药品检验所, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院 药学院, 河北 张家口 075000

摘要: 目的 优选超临界 CO₂ 萃取蛇床子中蛇床子素工艺, 建立制备型高效液相色谱 (PHPLC) 分离纯化萃取物中蛇床子素的方法。方法 以总萃取物得率和萃取物中蛇床子素的量为指标, 选取温度、压力和提取次数 3 个因素, 按 L₉(3⁴) 正交设计优选蛇床子素超临界 CO₂ 萃取工艺。萃取物经甲醇超声溶解后, 采用 PHPLC 法, 色谱柱为: Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×21.2 mm, 7 μm), 流动相为甲醇-水 (70:30), 柱温为 25 ℃, 体积流量为 15 mL/min, 检测波长为 322 nm, 进样量为 5 mL, 收集蛇床子素馏份, 经真空冷冻干燥得蛇床子素单体。结果 最佳萃取工艺为: 温度 50 ℃, 压力 25 MPa, 提取 3 次 (每次 1 h), PHPLC 法制备的蛇床子素用面积归一化法与外标法定量, 质量分数为 98.8%, ¹H-NMR 鉴定结构, 与文献数据一致。结论 超临界 CO₂ 萃取蛇床子中蛇床子素提取效果好, 工艺简单可行, PHPLC 法制备高纯度蛇床子素, 简便快捷, 并适于大规模制备蛇床子素。

关键词: 蛇床子素; 超临界 CO₂ 萃取; 制备型高效液相色谱 (PHPLC); 面积归一化

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)09-1740-03

Preparation of osthol by preparative high performance liquid chromatography

ZENG Chun-ping¹, JIA Man-pu², WANG Shu-hua², AN Fang²

1. Zhangjiakou Institute for Drug Control, Zhangjiakou 075000, China

2. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Key words: osthol; supercritical CO₂ extraction; preparative high performance liquid chromatography (PHPLC); area normalization

蛇床子素又名甲基欧芹酚 (osthol), 是从伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 成熟果实中提取的香豆素。蛇床子素具有抗肿瘤、抗诱变、抗氧化, 抑制阿霉素的肝脏毒性等多种药理活性^[1-6]。蛇床子中蛇床子素的量最高^[7]。有关蛇床子素的提取方法, 主要采用水煎、醇提等, 操作较为繁琐, 有效成分损失较大, 超临界 CO₂ 萃取蛇床子中蛇床子素产率高^[8-9]。目前, 蛇床子素的分离纯化方法主要是重结晶法、大孔树脂纯化法^[10], 操作繁琐, 制备量小。制备型高效液相色谱 (PHPLC) 已成为当今高效分离与纯化中药有效成分的重要手段, 在制备高纯度生物活性物质时, 操作简单, 制备量大^[11]。本实验以总萃取物得率及萃取物中蛇床子素的量为指标, 选取对萃取影响较大的温度、压力和次数 3 个因素, 按 L₉(3⁴) 正交设计优选蛇床子素超

临界 CO₂ 萃取工艺, 建立 PHPLC 分离、纯化超临界 CO₂ 萃取物中蛇床子素的方法, 为蛇床子素纯品的大规模制备提供实验依据。

1 仪器与试剂

Speed SFE 型超临界 CO₂ 萃取仪 (美国应用分离公司); Agilent 1200 PHPLC (美国安捷伦公司); Agilent 1100 HPLC (美国安捷伦公司); Modul Yod-230 型冷冻干燥机 (美国热电公司); ME235S 型微量电子天平 (北京赛多利斯公司); Bruker Avance-400 兆液体谱仪 (德国布鲁克公司); SGW X-4 显微熔点仪 (上海精密科学仪器有限公司); U-3900 紫外分光光度计 (日本日立)。

蛇床子素对照品 (批号 110822-200608, 中国药品生物制品检定所); 蛇床子 (批号 090701, 产地河北, 张中垣药饮片公司) 经河北北方学院药物

收稿日期: 2010-11-20

基金项目: 张家口市科技局资助项目 (0711046D-9)

作者简介: 曾春萍 (1973—), 女, 主管药师, 长期从事药物有效成分提取及检测工作。Tel: 13831398000 E-mail: yjszcp@163.com

*通讯作者 安芳 Tel: (0313)4029558 E-mail: anfang1965@yahoo.com.cn

研究所马淑兰教授鉴定为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 的干燥成熟果实; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 超临界 CO₂ 萃取工艺

称取洁净、干燥蛇床子 65.0 g, 置提取釜中加热加压循环提取 3 次 (每次提取 1 h), 提取完成, 从出口收集萃取物, 计算总萃取物得率。

2.2 正交试验设计优化工艺^[8]

选取对萃取影响较大的萃取温度、萃取压力和萃取次数为考察因素, 按 L₉(3⁴) 正交表设计, 以总萃取物得率和萃取物中蛇床子素的量为指标, 结果表明, 萃取温度 50 °C, 萃取压力 25 MPa, 萃取 3 次 (每次 1 h) 为超临界 CO₂ 萃取蛇床子中蛇床子素最佳工艺, 65.0 g 蛇床子可得萃取物 1.492 6 g, 萃取物中蛇床子素质量分数为 66.70%。

2.3 HPLC 法测定蛇床子素^[12]

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil BDS-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (80:20); 体积流量 1 mL/min, 检测波长 322 nm; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取蛇床子素对照品 6.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 室温超声 15 min, 定容至刻度, 作为蛇床子素对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取各种蛇床子超临界萃取物样品 0.1 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 精密加甲醇 8 mL, 室温超声 15 min, 甲醇定容至刻度, 静置。过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 作为蛇床子超临界 CO₂ 萃取物供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察 取蛇床子素对照品溶液, 甲醇依次稀释得 15.0、10.0、7.50、5.00、3.75 μg/mL 系列对照品溶液, 分别进样 20 μL, 按“2.3.1”色谱条件测定, 以质量浓度对峰面积进行线性回归, 得回归方程为 $Y=96.2501X-5.7805$, $r=0.9998$, 线性范围为 3.75~15.0 μg/mL。

2.3.5 样品测定 取各样品制备供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件测定, 记录色谱图, 外标法计算蛇床子素的量。

2.4 PHPLC 分离纯化蛇床子素

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB C₁₈ 柱 (250 mm×21.2 mm, 7 μm), 流动相为甲醇-水 (70:30), 柱温 25 °C, 体积流量 15 mL/min, 检测波长 322 nm, 进样量 5 mL, 馏份收集基于峰, 最小阈值为

25.6 mAU。

2.4.2 蛇床子素制备 将上述萃取物用甲醇超声溶解 15 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜。按制备色谱条件进样 5 mL, 根据制备色谱图收集馏份, 馏份经减压浓缩, 至有少量晶体析出时, 真空冷冻干燥, 得蛇床子素单体 0.995 0 g。图 1 为蛇床子素的 PHPLC 色谱图。

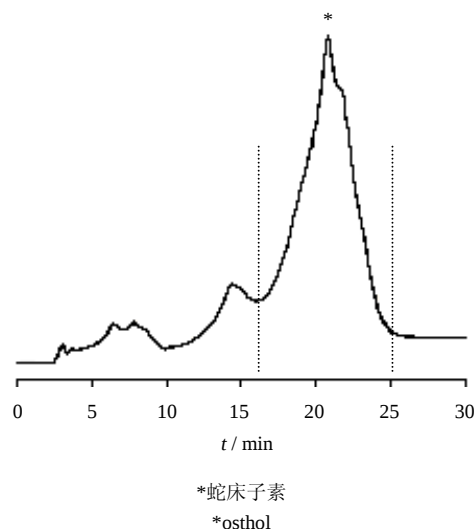


图 1 蛇床子素样品 PHPLC 图

Fig. 1 PHPLC chromatogram of osthol

2.5 蛇床子素质量分数的测定

对照品定性, 见图 2, 将制备所得蛇床子素, 按“2.3.1”色谱条件进行测定, 采用峰面积归一化法, 蛇床子素的质量分数为 99.0%。外标法定量, 测得蛇床子素质量分数为 98.8%。

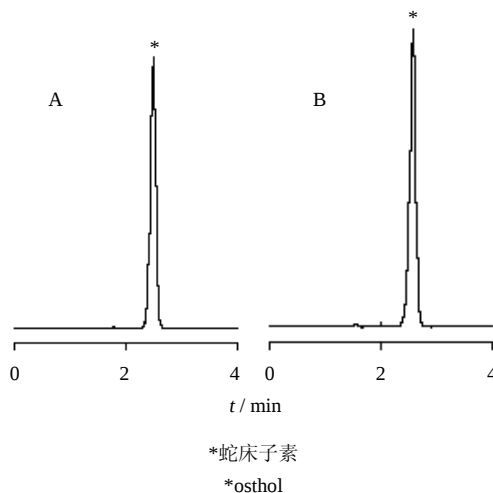


图 2 蛇床子素对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of osthol reference substance (A) and sample (B)

2.6 蛇床子素结构鉴定

所得单体为白色针状晶体 (MeOH), mp 82~83 °C, 与对照品混合熔点不下降。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.67 (3H, s, C'₅-CH₃), 1.84 (3H, s, C'₄-CH₃), 3.53 (2H, d, C'₁-CH₂), 3.92 (3H, s, C₇-OCH₃), 5.22 (H, m, C'₂-H), 6.23 (H, d, *J* = 9.5 Hz, C₃-H), 6.83 (H, d, *J* = 9.5 Hz, C₆-H), 7.28 (H, d, *J* = 9.5 Hz, C₅-H), 7.60 (H, d, *J* = 9.5 Hz, C₄-H), 数据与文献报道一致^[13], 鉴定该晶体为蛇床子素。

3 讨论

本实验考察了乙腈-水-三乙胺、甲醇-水不同流动相, 不同体积流量 (10、15、20 mL/min), 不同进样体积 (3、5、7 mL) 以及流动相甲醇-水按不同比例组成 (80:20, 70:30, 60:40) 对分离效果的影响。结果发现体积流量小时样品保留时间长, 所需流动相的量增加, 体积流量大时分离效果差; 进样量小时分离效果好, 但流动相用量大, 造成浪费, 进样量大时蛇床子素分离度降低, 纯度低; 甲醇-水为 80:20 时, 制备分离效果低, 甲醇-水为 60:40 时, 分离用时长, 造成流动相浪费; 用乙腈-水-三乙胺做流动相不利于试剂的回收且蛇床子素的纯度低。本实验选取甲醇-水 (70:30) 作为流动相时, 体积流量为 15 mL/min, 进样体积为 5 mL, 蛇床子素与其他成分的分离效果好, 有利于溶剂甲醇的回收, 且所收集的样品的质量分数达 98.8%。

周则卫等^[14]报道利用大孔吸附树脂脱色、富集及树脂分离纯化蛇床子素质量分数达 98% 以上。本实验利用 PHPLC 法分离纯化蛇床子素单体, 进样量大, 操作简便、重现性好、省时、样品纯度高, 可用于大规模制取蛇床子素标准品。

参考文献

[1] 龚海英, 张 丽, 李建宇, 等. 蛇床子素对乳腺癌

MCF-7 细胞增殖的影响 [J]. 武警医学院学报, 2008, 17(4): 281-282.

[2] 何 蔚, 连其深, 刘建新. 蛇床子素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 86-89.

[3] 王书华, 安 芳, 张丹参, 等. 蛇床子素抗氧化作用的实验研究 [J]. 中成药, 2005, 27(4): 488-489.

[4] 殷学军, 向仁德, 刘德祥, 等. 中药蛇床子水溶性提取物中化学成分的抗诱变性研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 1999, 11(2): 65-71.

[5] 汤群芳, 孔令军, 顾振纶, 等. 蛇床子素抑制大鼠骨质疏松的实验研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1700-1702.

[6] 张晓丹, 余迎梅, 范春兰, 等. 蛇床子素对阿霉素心脏毒性的影响 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6): 358-360.

[7] 向仁德, 傅晓虹. 蛇床子化学成分的研究 [J]. 中草药, 1984, 15(9): 398.

[8] 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): 20-22.

[9] 宫竹云, 张高勇, 聂永亮, 等. 超临界 CO₂ 萃取工艺对蛇床子素的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1649-1652.

[10] 孙小兵, 叶吉琴. 蛇床子素研究进展 [J]. 大众科技, 2009(2): 132-133.

[11] Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. Preparative Chromatography Technique: Applications in Natural Product Isolation [J]. *Plant Growth Regulation*, 1997, 8(4): 375-376.

[12] 安 芳, 王书华, 张丹参, 等. HPLC 法测定兔血浆中蛇床子素的含量 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 43-44.

[13] 向仁德, 张新勇, 韩 英, 等. 中药蛇床子水提取物活性成分研究 [J]. 中草药, 1999, 30(11): 813-815.

[14] 周则卫, 沈 秀, 刘培勋. 高纯度蛇床子素及其制备方法以及以该化合物为活性成分的药物组合物 [P]. 中国专利: CN1724529, 2006-01-25.