

正交试验法优选葛根复方中挥发油的 β -环糊精包合工艺

周晶¹ 李玲¹ 崔冬雪¹ 王冰^{1*} 张彤¹ 袁秀荣¹ 刘素嫒²

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361003)

摘要:目的 优选葛根复方挥发油的包合工艺, 提高制剂的稳定性。方法 采用饱和水溶液法制备包合物, 以挥发油中藁本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚包合率及包合物得率为综合评价指标, 采用正交试验法考察挥发油与 β -环糊精的比例、包合时间、包合温度对包合工艺的影响, 优化得到葛根复方中挥发油的最优包合工艺。结果 葛根复方中挥发油的最佳包合工艺条件为挥发油与 β -环糊精比例为 1: 8, 包合温度为 30℃, 包合时间为 1h, 验证试验中, 藁本内酯、桂皮醛及甲基丁香酚的包合率分别为 86.58% ± 0.009%, 73.34% ± 0.001%, 68.89% ± 0.020%, 包合物得率为 67.98% ± 0.047%。结论 所确定的包合工艺挥发油的包合率高、工艺稳定可行。

关键词: 葛根复方; 挥发油; β -环糊精; 正交试验

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.01.036

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2017)01-0105-03

Optimization of β -Cyclodextrin Inclusion Technology of Volatile Oil from Pueraria Compound by Orthogonal Design

ZHOU Jing¹, LI Ling¹, CUI Dong-xue¹, WANG Bing^{1*}, ZHANG Tong¹, YUAN Xiu-rong¹, LIU Su-huan²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203, China; 2. First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

Abstract: Objective To obtain the optimized technology of volatile oil from Pueraria Compound with β -Cyclodextrin (β -CD). **Methods** The inclusion compound was prepared by saturated peroxide solution method. In order to optimize inclusion technology, orthogonal design was performed, with the content of multi-target ingredient, such as ligustilide, cinnamic aldehyde, methyleugenol and the yield of inclusion as comprehensive evaluation indexes. Three factor was performed, the ratio of volatile oil (mL) to β -CD (g), the inclusion temperature and the inclusion time. **Results** The optimum conditions for inclusion process were as follow: the ratio of volatile oil (mL) to β -CD (g) was 1:8, the inclusion temperature was 30℃ and the inclusion time was 1h. With the optimum inclusion condition, the content of ligustilide, cinnamic aldehyde and methyleugenol and the yield of inclusion were 86.58% ± 0.009%, 73.34% ± 0.001%, 68.89% ± 0.020%, and 67.98% ± 0.047%, respectively.

Conclusion The optimum inclusion condition was stable and reproducible with a high inclusion yield.

Key words: Pueraria compound; Volatile oil; β -Cyclodextrin; Orthogonal design

葛根复方主要治疗糖尿病引起的周围神经病变,由葛根、当归、桂枝、细辛组成,其中当归、桂枝、细辛含有较多挥发油,且均为有效成分。挥发油为镇痛抗炎的主要药效成分,但对空气和温度敏感,易发生氧化,且制剂及存储过程中易发生挥发^[1]。因此水蒸气蒸馏提取挥发油后,为提高复方挥发油的制剂稳定性^[2],利用 β -环糊精(β -Cyclodextrin, β -CD)的空腔结构包合挥发油^[3],使得液态挥发油固体粉末化。传统方法中,挥发油收得率作为包合物包合率的评价标准,缺乏对挥发油中有效成分的控制。当归挥发油、桂枝挥发油及细辛挥发油主要成分分别为藁本内酯、桂皮醛和甲基丁香酚,均具有镇痛、抗炎的作用^[4-6];桂枝挥发油中主要成分为桂皮醛,具有镇痛作用;因此,包合物中对藁本内酯、桂皮醛

和甲基丁香酚进行含量测定,考察其包合率。采用正交实验法优选包合工艺,并采用红外光谱法对包合物进行表征分析。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 葛根、当归、桂枝、细辛(购自上海康桥中药饮片有限公司,批号分别为 141202, 141117, 141204, 141129)经上海中医药大学教学实验中心高级实验师李俊松鉴定,符合 2015 版《中国药典》一部规定。桂皮醛、甲基丁香酚(购于中国食品药品鉴定研究院,批号分别为 110710-201418、111642-200301);藁本内酯(购于上海源叶生物科技有限公司,批号为 Z03D5B1);甲醇(色谱纯,安徽时联特种溶剂股份有限公司);乙腈(色谱纯,安徽时联特种溶剂股份有限公司);实验用水为纯净水(杭州娃哈哈百立食品有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器 Agilent 1200 series 高效液相色谱仪, VWD 检测器, 四元恒流泵, 在线脱气机, 自动进样器, 柱温箱(美国安捷伦公司); DF101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海予华仪器有限公司); BS-124S 电子天平(德国赛多利斯公司); DZF 6050 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); TGL-20B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); XS105DU 电子天平(梅特勒-托利多中国)。

收稿日期: 2016-06-13; 修订日期: 2016-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81270901);

上海市教委基金(No. 15exy21)

作者简介: 周晶(1991-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 上海中医药大学在读硕士研究生, 主要从事中药新药研究工作。

* 通讯作者简介: 王冰(1974-), 女(汉族), 山东平度人, 上海中医药大学副教授, 博士学位, 主要从事中药纳米给药系统研究工作。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取 称取 3 倍处方量饮片,置于挥发油提取装置中,浸泡 30min,水蒸气蒸馏提取 5h,收集挥发油,备用。

2.2 包合物的制备^[7] 称取一定量的 β-CD,加水适量,80℃水浴加热溶解,制成 β-CD 饱和溶液,缓慢降温至相应温度。精密量取挥发油 500μl,按 1:1 比例用无水乙醇溶解,将挥发油乙醇溶液缓慢加入 β-CD 饱和溶液中,保温搅拌规定时间,搅拌结束后放至室温,再至 4℃冰箱冷藏 24h,过滤后,滤液弃去,滤得物置烘箱中 40℃干燥 4h,得到白色粉末状包合物,并称定质量。按如下公式计算包合物收得率。

包合物收得率(%) = 包合物的质量 / (β-CD 投入质量 + 投入挥发油质量) × 100%

2.3 挥发油包合率的测定 称取包合物 0.1g 于锥形瓶中,加入 60ml 的 70% 甲醇,超声 30min,过 0.22μm 微孔滤膜,注入 HPLC,分别测定桂皮醛、甲基丁香酚和藁本内酯含量^[8]。包合率按如下公式计算:

桂皮醛包合率(%) = 包合物中桂皮醛含量 / 挥发油中桂皮醛含量 × 100%

甲基丁香酚包合率(%) = 包合物中甲基丁香酚含量 / 挥发油中甲基丁香酚含量 × 100%

藁本内酯包合率(%) = 包合物中藁本内酯含量 / 挥发油中藁本内酯含量 × 100%

2.4 HPLC 测定挥发油中桂皮醛的含量

2.4.1 色谱条件^[9] 色谱柱为 Diamonsil™ Plus C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相为乙腈-水(28:72);体积流量为 1.0 ml · min⁻¹;检测波长为 290 nm;柱温为 30℃;理论塔板数按桂皮醛计算理论塔板数不低于 3 000。

2.4.2 对照品储备液的制备 精密称定桂皮醛对照品适量,加甲醇制成每毫升含 1.0253 mg 的溶液,摇匀,即得桂皮醛对照品储备液。

2.4.3 供试品溶液的制备 按“2.3”项下方法制备,即得供试品溶液。

2.4.4 线性关系考察 以“2.4.2”项下桂皮醛对照品储备液为母液,制备质量浓度分别为 205.06,102.35,51.265,20.506,10.253,5.1265 μg · ml⁻¹ 的对照品溶液。吸取上述 6 种浓度的对照品溶液各 10 μl 注入 HPLC,并绘制标准曲线 Y = 148.93X - 255.08 r = 0.999 7 桂皮醛在 5.1265 ~ 205.06 μg 线性关系良好。

2.5 HPLC 测定挥发油中甲基丁香酚的含量

2.5.1 色谱条件^[10] 色谱柱为 Diamonsil™ Plus C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相为乙腈-0.085% 磷酸水溶液(37:63);

体积流量为 1.0 ml · min⁻¹;检测波长为 280 nm;柱温为 30℃;理论塔板数按甲基丁香酚计算理论塔板数不低于 3 000。

2.5.2 对照品储备液的制备 精密称定甲基丁香酚对照品适量,加甲醇制成每毫升含 1.0346 mg 的溶液,即得甲基丁香酚储备液。

2.5.3 供试品溶液的制备 按“2.3”项下方法制备,即得供试品溶液。

2.5.4 线性关系考察 以“2.5.2”项下甲基丁香酚对照品储备液为母液,制备质量浓度分别为 517.30,206.92,103.46,51.730,20.692,10.346,5.1730 μg · ml⁻¹ 的对照品溶液。吸取上述 7 种对照品溶液各 10 μl 注入 HPLC,绘制标准曲线 Y = 12.377X - 11.648 r = 0.999 9 甲基丁香酚在 5.1730 ~ 517.30 μg 线性关系良好。

2.6 HPLC 测定挥发油中藁本内酯的含量

2.6.1 色谱条件^[11] 色谱柱为 Diamonsil™ Plus C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相为甲醇-水(70:30),体积流量为 1.0 ml · min⁻¹;检测波长为 330 nm;柱温为 35℃;理论塔板数按藁本内酯计算理论塔板数不低于 5000。

2.6.2 对照品储备液的制备 精密称定藁本内酯对照品适量,加甲醇制成每 ml 含 0.738 mg 的溶液,摇匀,即得藁本内酯对照品储备液。

2.6.3 供试品溶液的制备 按“2.3”项下方法制备,即得供试品溶液。

2.6.4 线性关系考察 以“2.6.2”项下藁本内酯对照品储备液为母液,制备质量浓度分别为 369.0,147.6,73.80,29.52,14.76,7.380 μg · ml⁻¹ 的对照品溶液。吸取上述 6 种浓度的对照品溶液各 10 μl 注入 HPLC,并绘制标准曲线 Y = 12.377X - 11.648 r = 0.999 藁本内酯在 7.380 ~ 369.0 μg 线性关系良好。

2.7 正交试验设计

2.7.1 挥发油包合正交试验 拟以 A 挥发油:环糊精(ml:g)、B 包合温度(℃)、C 包合时间(h)为主要考察因素,选用 L₉(3⁴) 正交表设计试验,各因素水平设计见表 1,实验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 包合工艺因素和水平

水平	A	B	C
	挥发油:环糊精/ml:g	包合温度/℃	包合时间/h
1	1:4	30	1
2	1:6	40	2
3	1:8	50	3

表 2 L₉(3⁴) 正交设计及实验结果

试验号	A	B	C	D	实验结果				
	挥发油:环糊精/ml:g	包合温度/℃	包合时间/h	误差项	藁本内酯包合率/%	桂皮醛包合率/%	甲基丁香酚包合率/%	包合物得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	60.33	72.72	75.01	81.29	89.69
2	1	2	2	2	48.44	58.97	61.27	80.89	79.86
3	1	3	3	3	41.59	58.86	55.85	73.55	73.24
4	2	1	2	3	63.06	76.75	67.32	83.77	90.63
5	2	2	3	1	59.14	72.00	56.56	79.81	83.99
6	2	3	1	2	58.23	74.69	63.60	76.29	84.43
7	3	1	3	2	77.43	85.99	81.64	77.97	97.23
8	3	2	1	3	75.18	80.18	72.08	65.07	86.80
9	3	3	2	1	68.46	82.01	65.18	70.82	86.54
k ₁	80.93	92.517	86.973	86.74					
k ₂	86.35	83.55	85.677	87.173					
k ₃	90.19	81.403	84.82	83.557					
R	9.26	11.114	2.153	3.616					

藁本内酯包合率的权重系数为 0.2 桂皮醛包合率的权重系数为 0.2 甲基丁香酚包合率的权重系数为 0.2 包合物得率的权重系数为 0.4 综合评分(M) = (藁本内酯包合率 ÷ 最高藁本内酯包合率) × 0.2 × 100 + (桂皮醛包合率 ÷ 最高桂皮醛包合率) × 0.2 × 100 + (甲基丁香酚包合率 ÷ 最高甲基丁香酚包合率) × 0.2 × 100 + (包合物

得率 ÷ 最高包合物得率) × 0.4 × 100

表 3 包合试验方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
挥发油: 环糊精/ml: g	129.87	2	8.529	6.94	$P < 0.05$
包合温度/°C	208.515	2	13.694	6.94	$P < 0.05$
包合时间/h	7.052	2	0.463	6.94	$P > 0.05$
误差	30.45	4			

直观分析结果显示三因素的主次关系 $B > A > C$,最佳的工艺搭配为 $A_3B_1C_1$ 。由于因素 C 的离均差平方和小于误差项因素 D 故将其并入误差项计算。综合评价方差分析结果,提取过程中,挥发油: 环糊精(A)和包合温度(B)为显著性因素,选择 A_3B_1 ,包合时间(C),无显著性影响,从节约能源角度考虑,选择 C_1 。因此最佳包合工艺为 $A_3B_1C_1$,即挥发油与环糊精之比为 1: 8, 30°C 下包合 1h。

2.7.2 验证性试验 将挥发油按最佳工艺进行包合,藁本内酯、桂皮醛及甲基丁香酚的包合率分别为 $86.58\% \pm 0.009\%$, $73.34\% \pm 0.001\%$, $68.89\% \pm 0.020\%$,包合物得率为 $67.98\% \pm 0.047\%$ $n=3$ 。该条件下包合率和包合物得率较稳定,表明该工艺合理、可行。

2.8 包合物检测

2.8.1 红外光谱分析 分别取 β -CD 和包合物进行红外光谱扫描,见图 1。 β -环糊精在 3278 cm^{-1} 处有宽峰, 1021 cm^{-1} 处有尖峰;包合物的红外光谱中移至 3260 cm^{-1} 峰变窄, 1024 cm^{-1} 处尖峰更窄,说明挥发油和环糊精之间产生作用^[12]。

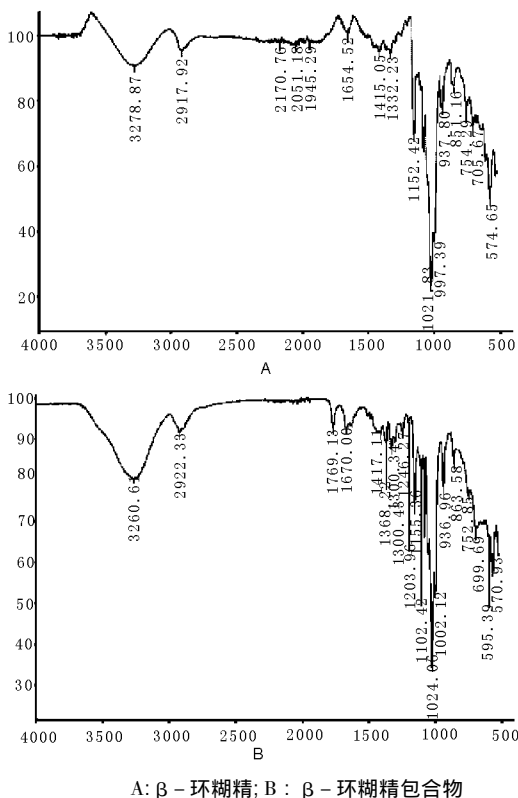
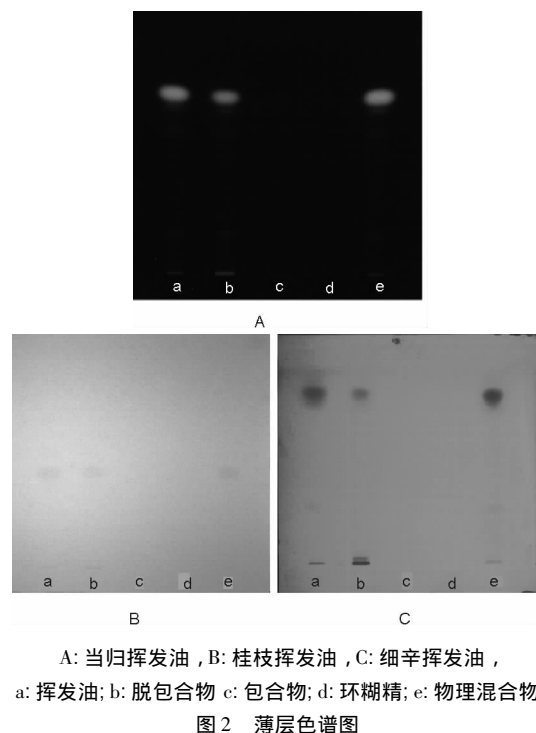


图 1 红外图谱

2.8.2 薄层色谱 为验证挥发油是否包合在 β -CD 内部,采用如下薄层色谱法。取挥发油加石油醚溶解,作为供试品 a;取包合物加 70% 甲醇超声,脱包合,作为供试品 b;取包合物加石油醚,振荡后静置,作为供试品 c;取 β -CD 加石油醚,振荡后静置,作为供试品 d;取挥发油和 β -CD 物理混合,混合均匀后加石油

醚,作为供试品 e^[13,14]。按照 2015 版《中国药典》一部薄层色谱法,取以上 5 种供试品溶液(a: 挥发油; b: 脱包合物; c: 包合物; d: 环糊精; e: 物理混合物)各 $3\ \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(4: 1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯 365 nm 下检视^[9],如图 2-A,供试品 a、b、e 在相同位置显示蓝色荧光的当归挥发油斑点,而 c、d 无相应斑点;取以上 5 种供试品溶液各 $2\ \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90°C)-乙酸乙酯(17: 3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以二硝基苯胍乙醇试液^[9],如图 2-B,供试品 a、b、e 在相同位置显示黄色的桂枝挥发油斑点,而 c、d 无相应斑点;取以上 5 种供试品溶液各 $2\ \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(2: 1)为展开剂^[15],展开,取出,晾干,置紫外灯 254 nm 下检视,如图 2-C,供试品 a、b、e 在相同位置显示绿色荧光的细辛挥发油斑点,而 c、d 无相应斑点。结果表明,包合过程中包合物性质无变化,且当归挥发油、桂枝挥发油、细辛挥发油均进入 β -CD 分子,形成 β -CD 包合物,非表面吸附结合等方式^[16]。



A: 当归挥发油, B: 桂枝挥发油, C: 细辛挥发油, a: 挥发油; b: 脱包合物; c: 包合物; d: 环糊精; e: 物理混合物

图 2 薄层色谱图

3 讨论

在复方挥发油的包合中,传统的评价方法,将挥发油包合物重新水蒸气蒸馏法提取,得到的挥发油量与加入挥发油量进行比较,得到其包合率^[17],缺乏对中药挥发油有效成分的考察。本文以当归挥发油中藁本内酯、桂枝挥发油中桂皮醛和细辛挥发油中甲基丁香酚为指标, HPLC 测定其包合率,能够更加真实、准确的反映有效成分的包合情况^[18]。

挥发油的包合效果主要由挥发油的包合率及包合物的得率反映,因此,综合评分中权重分配为:藁本内酯、桂皮醛及甲基丁香酚的包合率分别为 0.2,即包合率的总权重为 0.6,包合物得率的权重为 0.4。综合包合率及包合物得率评价包合工艺,多方面多指标评价包合工艺。由于各个指标成分在综合评分中权重不同,最佳工艺与正交试验中的各指标成分得率有所差异。

通过红外光谱法和薄层色谱法,可确定挥发油包合进入 β -

CD 腔体内部 形成包合物,而非单纯的吸附结合作用。葛根复方中挥发油成分为主要药效成分,β-CD 包合后,提高了稳定性并掩盖其不良气味,为后续的药效评价和制剂工艺研究提供了质量可控的葛根复方挥发油的包合工艺。

参考文献:

[1] 郝晶晶,李海亮,龚慕辛. 挥发油环糊精包合技术的研究进展及存在问题分析[J]. 中国实验方剂学杂志 2013,19(2):352.
 [2] 徐佳,黄一平,王丽,等. 石丹颗粒中挥发油包合工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志 2015,21(1):32.
 [3] 郭丽蓉,周莉玲. 冰片 β-环糊精、羟丙基-β-环糊精包合物的制备及稳定性[J]. 中国实验方剂学杂志 2011,17(8):7.
 [4] 马悦颖,李沧海,李兰芳,等. 桂皮醛解热镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学 2006,11(12):1336.
 [5] 林乔,赵爱国,陈建南,等. 藁本内酯的镇痛抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志 2011,17(11):165.
 [6] 潘磊,郑柳,牛卉,等. 细辛挥发油成分提取与甲基丁香酚含量测定的研究进展[J]. 时珍国医国药 2015,26(4):967.
 [7] 杜帆,夏新华,赵碧清,等. β-环糊精包合桂枝、当归混合挥发油的工艺研究[J]. 中成药 2012,34(8):1604.
 [8] 恽菲,徐晓琰,狄留庆,等. 蛇床子素不同环糊精包合物的制备及其生物利用度比较研究[J]. 中草药 2014,45(3):341.

[9] 国家药典委员会. 中国药典,一部[S]. 北京:化学工业出版社,2015:276.
 [10] 吴振刚,王庆伟,刘雪英,等. 反相高效液相色谱法测定细辛挥发油中甲基丁香酚及黄樟醚含量[J]. 第四军医大学学报,2008,29(13):1175.
 [11] 李曦,张丽宏,吕光华,等. 不同产地“当归类”药材中藁本内酯含量比较[J]. 中国中药杂志 2013,38(17):2838.
 [12] 朱冉,郭玫,魏舒畅,等. 当归挥发油 β-环糊精包合物的制备工艺及定性分析[J]. 中药材 2012,35(8):1322.
 [13] 张丽珍,詹晓如,胡奕勤,等. 正交实验法优选四味清口含片中挥发油的 β-环糊精包合工艺[J]. 时珍国医国药 2014,25(4):858.
 [14] 张艳军,王永香,孟瑾,等. 连翘、薄荷混合挥发油 β-环糊精包合物的制备工艺研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化 2016,18(3):532.
 [15] 莫明秀,张筱英,梁惠明,等. 复方鼻宝片中主要成分薄层色谱鉴别与总挥发油含量测定[J]. 医药导报 2012,31(10):1344.
 [16] 李允江,顾正卫,毕云生,等. 选奇颗粒挥发油成分的 β-环糊精包合工艺研究[J]. 实用医药杂志 2016,33(3):249.
 [17] 陈娟,陈文豪,王瑞,等. 中药复方愈溃胶囊中挥发油的 β-环糊精包合工艺[J]. 中国实验方剂学杂志 2011,17(14):19.
 [18] 唐灿,王利国,张彦燕,等. 综合评价砂仁挥发油-β-环糊精包合物的质量[J]. 中国实验方剂学杂志 2010,16(9):5.

柴胡 5 种不同炮制品中挥发性成分的气相色谱-质谱联用分析

庞雪¹ 廖念¹ 周逸群^{1,3} 罗怀浩^{1,3} 邱云² 石继连^{1,3*}

(1. 湖南中医药大学药学院,湖南长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006; 3. 湖南中医药大学国家中医药管理局中药炮制传承基地,湖南长沙 410208)

摘要:目的 研究柴胡不同炮制方法(净制、醋炙、酒炙、麸炒、鳖血炙)对其挥发性成分的影响,为阐明其炮制机理提供科学依据。方法 采用气-质联用色谱法比较分析柴胡不同炮制品中挥发性成分的变化。结果 不同柴胡炮制品之间挥发性成分的数量和含量均有变化。结论 柴胡的不同炮制方法对柴胡挥发性成分的数量和含量均有一定影响。

关键词:柴胡; 炮制; 挥发性成分; 气相色谱-质谱

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.01.037

中图分类号: R283.1; R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2017)01-0108-03

Research on Volatile Components from Five Kinds of Processed Radix Bupleuri by GC-MS

PANG Xue¹ LIAO Nian¹ ZHOU Yi-qun^{1,3} LUO Huai-hao^{1,3} QIU Yun² SHI Ji-lian^{1,3*}

(1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medical Sciences, Changsha 410006, China; 3. Heritage Base of TCM Processing Technology of SATCM, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: Objective To study the influence on the volatile components exist in Radix Bupleuri of different processing methods (crude radix bupleuri, vinegar-baking Radix Bupleuri, wine-baking Radix Bupleuri, bran-stirring Radix Bupleuri, turtle

收稿日期: 2016-04-27; 修订日期: 2016-08-31

基金项目: 国家中医药管理局中药炮制学重点学科(No. 国中医药人教发[2012]32号);

湖南省“十二五”重点学科中药学专业(No. 湘教发[2011]76号);

湖南省中医药研究院院级课题(No. 201312); 湖南省教育厅一般项目(No. 15C1039)

作者简介: 庞雪(1992-),女(汉族),内蒙古扎赉特旗人,湖南中医药大学药学院在读硕士研究生,学士学位,主要从事中药炮制机理及规范化研究工作。

* 通讯作者简介: 石继连(1973-),男(汉族),湖南会同人,湖南中医药大学药学院副教授,硕士研究生导师,博士学位,主要从事中药炮制及制剂研究工作。