

藁本内酯的稳定性及 β -环糊精包合工艺的考察

李 慧^{1,2}, 边宝林¹, 孟繁蕴², 王一涛¹

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京师范大学中药资源与资源药物研究所, 北京 100088)

摘要:目的 考察藁本内酯的稳定性, 并采用 β -环糊精包合, 避免藁本内酯的异构化。方法 自然条件或密闭、避光情况下, 含藁本内酯的量下降显著。采用 β -环糊精进行包合, 正交试验优选了包合的最佳工艺, 采用多种方法对包合物的形成进行了验证。结果 DSC 法、红外分光光度分析、GC 分析显示: 按最佳工艺制得的包合物与混合物有明显区别, 藁本内酯被 β -环糊精包合在分子腔中已经形成新的物相。结论 藁本内酯常温下不稳定, β -环糊精包合可以改善它的稳定性。

关键词: 藁本内酯; 稳定性; β -环糊精包合

中图分类号: R283.6; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)10-1483-04

Stability of ligustilide and its β -cyclodextrin inclusion process

LI Hui^{1,2}, BIAN Bao-lin¹, MENG Fan-yun², WANG Yi-tao¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Institute of Natural Medicine and Chinese Medicinal Resource, Beijing Normal University, Beijing 100088, China)

Abstract: **Objective** To study the stability of ligustilide and the inclusion process in β -cyclodextrin to avoid its isomerization. **Methods** The content of ligustilide dropped severely even if it was kept away from layer and air under room temperature. The inclusion process with β -cyclodextrin was carried out on orthogonal design. The optimum conditions were determined and inclusion complex was made sure by many ways. **Results** The validated trials by DCS, IR, and GC could exhibit the obvious difference between mixture and inclusion complex which showed the form of a new phase, because of β -cyclodextrin and drugs in the molecular capsules. **Conclusion** Inclusion process with β -cyclodextrin can improve stability of ligustilide that is unstable in normal situation.

Key words: ligustilide; stability; β -cyclodextrin inclusion process

藁本内酯是当归、川芎挥发油中的主要有效成分, 是评价当归、川芎质量的重要指标, 具有解痉、止咳平喘、调经止痛等多种生物活性。但藁本内酯稳定性问题十分突出, 随着藁本内酯在提取物中量的不断提高, 其异构化速率加快, 室温条件下放置 2~4 d 可下降 50% 以上, 长时间放置还可氧化成多种复杂产物乃至最后消失^[1~3]。本研究针对藁本内酯的不稳定性, 采用 β -环糊精进行包合, $L_9(3^4)$ 正交试验法优选了包合工艺, 结果显示, 包合物中藁本内酯的稳定性大大提高。

1 仪器与材料

SH-3A 双显恒温加热磁力搅拌器(北京金北德工贸易有限公司), ZD79-D 型真空干燥箱(北京兴争仪器设备厂), Hewlett-Packard 1100 全自动液相色谱仪, 98-1-B 型电子调温电热套(天津泰斯特有限公司), 5DX-FTIR 红外分光光度仪(Nicolet

公司), LCT-1 差示热分析仪(日本岛津), 芎归提取物(XGRE); 按处方量将川芎、当归两味药材用超临界 CO_2 流体萃取法萃取, 萃取物经过精制处理, 去除其中的高级脂肪酸等杂质成分, 得到精制芎归提取物, HPLC 法测定藁本内酯的质量分数大于 50%。 β -环糊精(质量分数 95% 以上, 苏州味精厂); 藁本内酯对照品(自制, 归一化法测定, 质量分数 98%), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 藁本内酯的 HPLC 测定^[4,5]

2.1.1 色谱条件 Zorbax RX-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 流动相为甲醇-水 (70:30), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长: 330 nm, 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。色谱图见图 1。

2.1.2 线性范围考察: 精密称取藁本内酯对照品 24.60 mg 于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇充分溶解。分

收稿日期: 2004-12-02

作者简介: 李 慧(1967—), 女, 江西南昌人, 中国中医研究院中药研究所博士, 北京师范大学资源药物与中药资源研究所博士后, 主要从事中药制剂学及其药理学研究。Tel: (010) 62022280 E-mail: lihuiyiren@tom.com

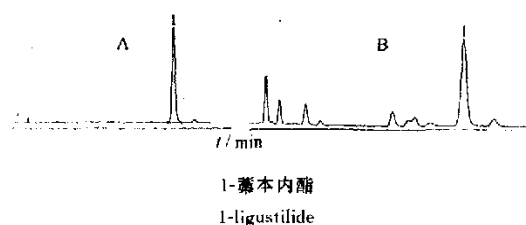


图1 藁本内酯对照品(A)和芎归提取物(B)的HPLC图

Fig.1 HPLC chromatograms of ligustilide reference substance (A) and sample (B)

别自动吸取1、2、4、8、12、20、30 μL 注入液相色谱仪中,依据给定的色谱条件测定藁本内酯峰面积。以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=6.279+400.43 X$, $r=0.9998$,说明藁本内酯在 $0.492\sim 14.76 \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.2 自然状态下藁本内酯的稳定性:取 XGRE 于自然条件下放置,HPLC 法测定藁本内酯变化情况。以 0 d 的质量分数为 100%,放置 2、4、10、15、30 d 的藁本内酯的相对质量分数分别为 59.82%、53.13%、21.61%、2.87%、0.46%。结果显示:藁本内酯的精制提取物在自然条件下十分的不稳定,放置 2~4 d 下降将近一半。HPLC 图谱亦显示,藁本内酯以外的杂峰数量随储存时间延长而增加。

2.3 藁本内酯的异构化途径^[1]:藁本内酯于室温下保存可生成多种异构化产物,其中主要产物有 8 种,占异构化产物的 90.81%,据推测可能的异构产物为邻苯二甲酸酐、环己二烯-1,2-二甲酸酐、正丁烯基苯酐、3, d -环氧藁本内酯等。

2.4 影响藁本内酯稳定性的因素:针对藁本内酯异

构化的主要影响因素——光和氧,设计试验条件,定期称样测定藁本内酯的变化。以 0 d 测定的质量分数为 100%,计算不同条件下藁本内酯的经时变化,结果见表 1。

表1 藁本内酯在不同条件下的变化

Table 1 Content variety of ligustilide under different conditions

条件	相对质量分数/%					
	0 d	2 d	4 d	10 d	15 d	30 d
密闭且避光	100	92.40	87.48	71.01	60.09	33.45
不密闭但避光	100	71.37	36.73	5.78	0.82	—
密闭但不避光	100	91.84	80.18	64.39	14.07	—
不密闭不避光	100	59.82	53.13	21.61	2.87	0.46

结果表明:光和氧加速藁本内酯的异构化,室温条件下即使避光、密闭保存,也不能保证藁本内酯的稳定,有必要采取稳定化措施。

2.5 正交试验优选包合工艺的研究^[6,7]

2.5.1 正交试验设计:为了寻求 β -环糊精包合的最佳工艺条件,在预试验的基础上选定包合时间(A)、包合温度(B)、 β -CD 与 XGRE 的比例(C)的考察因素,每个因素各取 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验,以油的利用率和包合物得率为考察指标,见表 2~4。

表2 因素水平

Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	A/h	B/℃	C
1	1	20	4:1
2	1.5	30	5:1
3	2	40	6:1

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 3 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

列号	A	B	C	D(空白)	油利用率	评分	包合物得率	评分	总分
1	1	1	1	1	12.24	8.22	7.45	15.59	23.81
2	1	2	2	2	25.64	17.22	9.85	20.61	37.84
3	1	3	3	3	35.82	24.05	12.29	25.72	49.78
4	2	1	2	3	57.39	38.54	14.11	29.53	68.07
5	2	2	3	1	81.93	55.02	15.49	32.42	87.44
6	2	3	1	2	50.42	33.86	13.02	27.25	61.11
7	3	1	3	2	86.44	58.05	17	35.58	93.63
8	3	2	1	3	79.99	53.71	15.63	32.71	86.43
9	3	3	2	1	89.35	60	19.11	40	100
I	111.43	185.52	171.35	211.25					
II	216.62	211.71	205.91	192.58					
III	280.06	210.89	230.85	204.28					
R	168.63	26.19	59.50	18.67					

2.5.2 包合物的制备:将一定量的 β -CD 制成饱和水溶液,加入 XGRE,用等量无水乙醇稀释,恒温搅拌至规定时间,放置冰箱中冷藏 24 h,滤过,滤饼用

定量乙醚淋洗,60 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥即得包合物。

2.5.3 包合物中油利用率、包合物得率的测定:精密稳定干燥包合物 1g,置装有沸石的圆底烧瓶中,

表4 方差分析

Table 4 Variance analysis

来源	离均差平方和	自由度	Mean Square	F 值	显著性
A	4 836.39	2	2 418.20	81.43	$P < 0.05$
B	147.83	2	73.92	2.49	
C	595.05	2	297.53	10.02	
D(误差)	59.39	2	29.70		

$$F_{0.05}(2,2)=19.00 \quad F_{0.01}(2,2)=99.00$$

加蒸馏水 500 mL,按《中国药典》2000 版一部附录挥发油测定法项下,连接挥发油测定器,煮沸并保持 5 h,至油量不再增加时停止加热,放置 1 h 至油呈清亮或黄色时,乙醚萃取,挥干溶剂,称定回收油的质量,计算油的利用率、包合物得率。

$$\text{油的利用率} = \frac{\text{包合物中含油量}}{\text{投油量}} \times 100\%$$

$$\text{包合物得率} = \frac{\text{包合物质量}}{(\beta\text{-CD 质量} + \text{投油量})} \times 100\%$$

结果分析:水平优势为 $A_3 > A_2 > A_1$, $B_2 > B_3 > B_1$, $C_3 > C_2 > C_1$,因素主次: $A > C > B$ 。

确定最佳工艺条件:由正交试验选出 β -环糊精包合试验的最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3$,即取 XGRE 加乙醇溶解分散,按 1:6 的比例滴加至 β -CD 饱和溶液中,设定包合温度 30 °C,用磁力搅拌器匀速搅拌 2 h 即得。

2.6 包合物的质量研究

2.6.1 包合物的外观性状考察:分别取 β -CD(I)、 β -CD 空白包合物(制备过程中不加入 XGRE,制备操作同包合物的制备,Ⅰ)、 β -CD 与 XGRE 混合物(Ⅱ)、 β -CD 包合物(Ⅳ)进行性状观察,并与异羟肟酸铁试剂反应,结果见表 5。

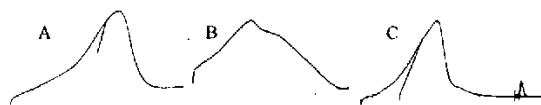
表5 包合物的性状考察

Table 5 Characteristic of inclusion complex

包合物	性状	紫外灯下观察	异羟肟酸铁反应
I	白色,无味,细小颗粒状结晶	—	—
Ⅰ	白色,无味,疏松粉末状团块	—	—
Ⅱ	黄色,强烈芳香气,略具粘性,粉末状	蓝色荧光	呈现紫色
Ⅳ	黄白色,淡香气,疏松粉末状团块	弱蓝色荧光	缓慢显紫色

2.6.2 DSC 法分析:用标准物质校准,剪切基线后,取欲验证的样品适量,精密称重,作差扫描量热曲线。测定条件:扫描温度 15~200 °C;气氛为:氮气;DSC 量程:±10.45 mJ/s,升温速度:10 °C/min。见图 2。I 与 Ⅱ 峰基本类似,而包合物(Ⅳ)与混合物明显不同,说明包合后 β -CD 与 XGRE 包合物已经形成新的物相。

2.6.3 红外分光光度法分析:取 XGRE、 β -CD、包

图2 β -CD(A)、包合物(B)和混合物(C)的 DSC 曲线Fig. 2 DSC curve of β -CD (A), inclusion complex (B), and mixture (C)

合物、混合物适量进行红外光谱分析。结果显示:XGRE 在波数 1 747 cm^{-1} 附近存在强烈的羰基伸缩振动,包合物羰基呈微弱吸收。

2.6.4 包合成分的 GC 分析:取 0.1 g 包合物,加甲醇 2 mL,超声振荡提取 30 min,滤过,挥干溶剂得萃取油,与 XGRE 分别做 GC 分析。结果显示两者的峰强度、峰数目都很接近。表明 XGRE 被 β -CD 包合是通过物理包合作用结合在一起的,无化学反应发生,没有发生成分的改变。

2.7 包合物的稳定性考察:为了考察包合物的稳定性,定期精密称取 β -环糊精包合物 0.1 g,加甲醇 2 mL 超声提取 30 min,测定其中藁本内酯。以 0 d 质量分数为 100%,计算 β -CD 包合物中藁本内酯的经时变化,结果放置 2、4、10、15、30 d 的包合物中藁本内酯的相对质量分数分别为 99.30%、99.42%、96.95%、96.89%、90.61%。

3 讨论

3.1 藁本内酯是当归、川芎挥发油中最大量的成分,具有一定的生理活性。因此,相比药材中的川芎嗪、阿魏酸等有效成分而言,藁本内酯的研究更有必要深入化。

3.2 制备 β -CD 包合物时,曾采用直接混合法,优点是过程简单,不混入溶剂,但由于是非均相反应,需要相当长的时间。加入少量乙醇将精制提取物溶解,制得包合物,测定挥发油含油率时结果均一、稳定,数据变化较小。

3.3 精制提取物中以藁本内酯为代表的非极性脂溶性成分被包合后,减少了受热、湿、光和空气中的氧等不稳定因素的影响,不但稳定性提高,还能将液体药物粉末化,避免了有效成分的直接散失,便于进一步制备合理的制剂。

3.4 藁本内酯异构化产物发生了外观、物态的变化,生理活性是否随之改变,还有待进一步研究。

References:

- [1] Li G S, Ma C J, Li X Y. Studies on the stability of ligustilide and the analysis of its isomerized products by GC-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31 (6): 405-407.
- [2] Zhou C X, Li X H. Studies on the stability of ligustilide with solvent effect [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36

- (10): 793-795.
- [3] Li G S, Ma C J, Liu Z F, *et al.* Extraction of essential oil from *Angelica sinensis* by supercritical- CO_2 fluid in comparison with that by steam distillation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (7): 581-583.
- [4] Zhang J L, Xie F Z, Li N, *et al.* HPLC determination of two main active constituents in plants of genus *Ligusticum* [J]. *Chin Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20 (5): 301-303.
- [5] Chen W, Wang Q F, Zhang Z X, *et al.* Study on the stability of volatile oil in Fengshikang Capsules [J]. *Chin Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (3): 158-160.
- [6] Xu X L, Zhang Z R, He Z X, *et al.* Study on preparation of β -cyclodextrin inclusion complex of volatile oil in Xiongdan Xiaoyan Capsules [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29 (7): 644-646.
- [7] Nagarsenker M S, Mesbham R N, Ramprakash G. Solid dispersion of hydroxypropyl beta-cyclodextrin and ketorolac, enhancement of *in vitro* dissolution rates, improvement in anti-inflammatory activity and reduction in ulcerogenicity in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52 (8): 949-956.

叶黄素酯的生物转化研究

陈龙胜, 忻 旻, 周 斌

(安徽省分析测试中心, 安徽 合肥 230031)

摘要:目的 对叶黄素酯进行微生物降解, 以获得游离态叶黄素。方法 采用青霉菌摇瓶发酵转化法, 并考察了 pH、发酵时间、接种量对转化结果的影响。结果 青霉菌在 pH 值为 6.0, 接种量为 2 菌塞, 发酵 24 h 叶黄素酯转化彻底, 所得叶黄素纯度为 91.6%, 延长转化时间使叶黄素纯度增加, 但是叶黄素质量浓度降低。结论 青霉菌在发酵过程中会产生能转化叶黄素酯为游离态叶黄素的酶, 发现制备叶黄素的一种新方法。

关键词: 叶黄素; 叶黄素酯; 生物转化; 青霉菌

中图分类号: R282.15; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)10-1486-03

Biotransformation of lutein esters

CHEN Long-sheng, XIN Yang, ZHOU Bin

(Anhui Analysis and Test Center, Hefei 230031, China)

Key words: lutein; lutein esters; biotransformation; *Penicillium sp.*

叶黄素是一种优良的抗氧化剂, 在预防年龄相关性视黄斑退化, 降低结肠癌发病率, 预防心血管疾病的发生等方面有着广泛应用^[1]。自然界中叶黄素主要以酯形式存在于金盏菊中。目前都是通过用强碱性甲醇溶液皂化金盏菊提取物中叶黄素酯分离得到游离态叶黄素^[2], 反应产率不高, 同时由于大量使用有毒溶剂, 造成极大的环境污染, 也使得产品难以达到食品标准。生物转化是利用微生物培养过程中释放一此酶体系对外源化学成分进行结构改造, 有底物选择性高, 无环境污染、反应条件温和及成本低廉等优点。叶黄素生产工艺研究也集中在化学转化^[3]。本实验通过青霉菌摇瓶发酵转化法制备叶黄素, 研究了 pH 值、发酵时间和接种量等发酵条件对转化过程的影响。

1 仪器与材料

HPLC 色谱仪: Waters 600E System contro-

ler, Knauer K-2501 紫外可见检测器, Shimadzu C-R6A 色谱数据处理机, 叶黄素对照品 (Sigma 公司), 叶黄素酯由长沙华欣科技有限公司提供, 青霉菌种由中南大学矿物工程学院提供; 去离子水 (自制), 甲醇、乙腈、醋酸乙酯为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

(诱导产酶) 培养基: 2.0 g NH_4NO_3 , 2.0 g K_2HP_4 , 1.0 KH_2PO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 0.14 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g NaCl, 去离子水 1.0 L, 以 triton 100 为分散剂, 叶黄素酯溶于其中, 质量浓度为 26.7 mg/mL。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Knauer Eurospher-100 C_{18} (300 mm $\times$ 3.9 mm, 4.6 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-醋酸乙酯 (45:10:45); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 460 nm; 进样量: 10 μL ; 柱温: 25 $^\circ\text{C}$ 。文献

收稿日期: 2004-12-31

基金项目: 国家星火计划 (2004EA710012)

作者简介: 陈龙胜 (1980—), 男, 安徽省安庆市人, 硕士研究生, 从事天然产物的提取与衍生研究。Tel: (0551) 5145589

E-mail: formatsky@tom.com