

祛毒清热颗粒中挥发油 β -环糊精包合物的制备工艺研究

白雪^{1,2}, 刘素香², 周晶^{1*}

1. 天津医科大学药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 优选祛毒清热颗粒中挥发油的提取方法, 确定其 β -环糊精的包合工艺。方法 按《中国药典》2010 年版挥发油提取方法提取挥发油, 以提取率为指标, 对影响挥发油提取的因素(加水量、药材粉碎程度、挥发油提取时间)进行考察; 以包合物的收率和油转化率的综合评分为指标, 应用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行包合条件的优化。结果 挥发油最佳提取工艺为药材粉碎过 20 目筛, 加 7 倍量水, 提取 4 h。 β -环糊精的最佳包合工艺为 β -环糊精与油的质量比为 8:1, 包合温度 40℃, 包合时间为 2 h, 无水乙醇与挥发油的体积比为 1:3。结论 该优选提取和包合工艺合理可行, 可作为祛毒清热颗粒中挥发油 β -环糊精包合物的制备。

关键词: 祛毒清热颗粒; 挥发油; 制备工艺; 正交试验; β -环糊精

中图分类号: R283.6; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0714-04

Study on preparation technology of β -cyclodextrin inclusion complex of volatile oil in Qudu Qingre Granule

BAI Xue^{1,2}, LIU Su-xiang², ZHOU Jing¹

1. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: Qudu Qingre Granule; volatile oil; preparation technology; orthogonal test; β -cyclodextrin

祛毒清热颗粒由连翘、板蓝根、柴胡等 8 味中药组成, 具有祛风清热、解毒利咽等功效, 适用于急性上呼吸道感染、风热感冒等。其处方中连翘、柴胡含有挥发油, 也是其重要的活性组分。因挥发油不稳定易挥发, 在制备成药过程中极易损失, 影响药物的疗效。因此, 在祛毒清热颗粒的制备工艺研究时, 首先对 2 种药材挥发油的提取及其 β -环糊精的包合工艺进行了研究, 力求挥发油最大限度地提取完全, 本实验将挥发油制备成 β -环糊精包合物后可使液体药物固体化, 不仅减少挥发油的挥散, 同时使其在储存过程中避免氧化、变质, 以期提高其制剂稳定性与保证药物临床效果。

1 仪器与材料

Shimadzu Libror AEL—40SM 分析天平, 磁力搅拌器 (Cole-Parmer Instrument Company), R501B 星海旋转蒸发器 (无锡市星海王生化设备有限公

司)。 β -环糊精 (广东省郁南县永光味精实业有限公司), 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。方中各味药材, 均购自河北安国市药材批发市场, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定均符合《中国药典》2010 年版各药味项下规定。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取条件的筛选

按照《中国药典》2010 年版附录挥发油测定法甲法测定挥发油, 并通过加水量及挥发油提取时间的考察, 确定挥发油最佳提取工艺。

2.1.1 加水量的考察 按处方量称取柴胡、连翘各 200 g, 加不同水量浸泡 3 h, 加热回流提取挥发油 6 h。结果加 3、5、7、9 倍量水时挥发油的提取率分别为 1.0%、1.5%、2.0%、2.0%, 结果表明加 7 倍量水提取, 其挥发油提取率最高, 故确定加水量为 7 倍量。

收稿日期: 2011-11-24

作者简介: 白雪 (1981—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药制剂及其质量控制和天然药物化学。Tel: (022)23006840 E-mail: baix@tjipr.com

*通讯作者 周晶 Tel: 13920680193 E-mail: zhoujing@tjmu.edu.cn

2.1.2 药材粉碎程度的考察 按处方量称取柴胡、连翘各 200 g, 分别进行不粉碎, 过 20、40、60 目筛处理, 各加 7 倍量水浸泡 3 h, 提取挥发油 6 h, 结果未粉碎, 粉碎过 20、40、60 目筛药材的提取率分别为 2.0%、2.2%、2.2%、2.4%。结果表明虽然药材粉碎过 60 目筛后挥发油的提取率最高, 但在厂家生产过程中不易粉碎, 药材粉碎过 20 目筛后挥发油的提取率与药材粉碎过 40 目筛的挥发油提取率一致, 故确定药材粉碎过 20 目筛。

2.1.3 提取时间的考察 按处方量称取柴胡、连翘各 200 g, 加 7 倍量水浸泡 3 h, 提取挥发油, 记录不同提取时间的挥发油提取量, 计算其提取率。结果 1、2、3、4、5、6 h 时的提取率分别为 1.0%、1.5%、1.9%、2.0%、2.0%、2.0%。结果表明提取 4 h 挥发油基本不再增加, 故确定挥发油的提取时间为 4 h。

2.1.4 最佳提取条件确定 综合上述实验结果, 确定的最佳挥发油提取条件为加 7 倍量水, 药材粉碎过 20 目筛, 提取 4 h。据此条件验证 3 批, 3 批挥发油的提取率均为 2.0%, 说明提取工艺稳定可行。

2.2 挥发油 β -环糊精包合工艺优化

2.2.1 包合物的制备^[1] 称取 β -环糊精适量, 置于烧瓶中, 加入相应量的蒸馏水, 加热溶解, 制成环糊精饱和溶液。精密量取挥发油 1 mL, 按相应比例用无水乙醇稀释, 缓慢滴入保持一定温度的饱和 β -环糊精溶液中, 边加边搅拌, 并继续恒温搅拌至规定时间, 自然冷却至室温, 放入 4 °C 冰箱中冷藏

24 h, 抽滤, 水洗涤后再用醋酸乙酯洗涤 4 次, 每次 10 mL, 得沉淀物, 40 °C 减压干燥 4 h 至恒定质量, 即得包合物。

2.2.2 空白回收率的测定 按《中国药典》2010 年版附录挥发油测定法, 用 1 mL 挥发油加 6 g β -环糊精替代包合物, 于圆底烧瓶中, 放数粒沸石, 加蒸馏水 150 mL, 连接挥发油提取器, 加热至沸, 并保持微沸 5 h。本实验挥发油的空白回收率为 93.18%。

空白回收率 = 空白回收油的质量 / 空白加入油的质量

2.2.3 包合物的收率、油转化率的测定 按《中国药典》2010 年版附录挥发油测定法进行。将所得的干燥包合物精密称量, 于圆底烧瓶中, 放数粒沸石, 加蒸馏水 150 mL, 连接挥发油提取器, 加热至沸, 并保持微沸 5 h。计算包合物的收率、挥发油转化率。

油转化率 = 回收油的质量 / 加入油的质量

包合物收率 = 包合物质量 / (β -环糊精质量 + 挥发油质量)

评分时将包合物收率和油转化率的权重系数分别设为 0.4 和 0.6, 以综合评分值进行统计分析。

综合评分 = 包合物收率 $\times$ 0.4 + 挥发油转化率 $\times$ 0.6

2.2.4 正交试验优化包合工艺^[2] 为确定挥发油的最佳包合条件, 确定以 β -环糊精与油的质量比 (A)、包合温度 (B)、包合时间 (C) 和无水乙醇与挥发油的体积比 (D) 为 4 个因素, 以包合物收率、挥发油转化率的综合评分为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行包合条件的优化, 试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B / °C	C / h	D	包合物收率 / %	油转化率 / %	综合评分
1	6 : 1 (1)	40 (1)	1 (1)	1 : 1 (1)	86.02	41.27	59.17
2	6 : 1 (1)	50 (2)	2 (2)	2 : 1 (2)	86.70	42.32	60.07
3	6 : 1 (1)	60 (3)	3 (3)	3 : 1 (3)	84.24	41.26	58.45
4	8 : 1 (2)	40 (1)	2 (2)	3 : 1 (3)	91.01	84.82	87.30
5	8 : 1 (2)	50 (2)	3 (3)	1 : 1 (1)	89.74	68.28	76.86
6	8 : 1 (2)	60 (3)	1 (1)	2 : 1 (2)	82.01	62.82	70.50
7	10 : 1 (3)	40 (1)	3 (3)	2 : 1 (2)	86.93	68.15	75.66
8	10 : 1 (3)	50 (2)	1 (1)	3 : 1 (3)	89.32	71.80	78.81
9	10 : 1 (3)	60 (3)	2 (2)	1 : 1 (1)	80.97	69.85	74.30
K_1	59.230	74.043	69.493	70.110			
K_2	78.220	71.913	73.890	68.743			
K_3	76.257	67.750	70.323	74.853			
R	18.990	6.293	4.397	6.110			

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	654.382	2	19.987	$P < 0.05$
B	61.476	2	1.878	
D	61.699	2	1.884	
C (误差)	32.741	2		

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

由直观分析可知, 各因素对综合评分的影响顺序依次为 $A > B > D > C$, β -环糊精与油的质量比是影响包合物的主要因素。方差分析还表明, β -环糊精与油的质量比对实验结果有显著影响 ($P < 0.05$)。直观分析 K 值得出, 最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$, 即 β -环糊精与油的质量比为 8 : 1, 包合温度 40 °C, 包合时间 2 h, 无水乙醇与挥发油的体积比为 3 : 1。

2.2.5 验证试验 取挥发油 3 批, 按最佳包合工艺进行验证试验, 3 批挥发油包合物的收率分别为 89.96%、91.28%、91.37%, 油转化率分别为 84.63%、83.89%、84.38%。3 批挥发油的平均包合物收率为 90.87%, 油转化率为 84.30%。

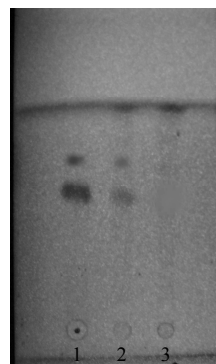
2.3 包合物结构表征

2.3.1 包合物的薄层色谱验证 将所得的干燥包合物 1 g 于圆底烧瓶中, 放数粒沸石, 加蒸馏水 150 mL, 连接挥发油提取器, 得回收挥发油, 加乙醚 10 mL 溶解; 取包合物 1 g, 加乙醚 10 mL 搅拌, 浸泡 1 h 后滤过, 滤液备用; 另取柴胡、连翘挥发油 0.1 mL, 加乙醚 10 mL 溶解, 吸取上述 3 种溶液各 10 μ L, 点于硅胶 GF₂₅₄ 板上, 以石油醚-醋酸乙酯 (17 : 2) 为展开剂展开, 取出晾干, 置紫外光 (254 nm) 灯下检视, 结果见图 1。包合物溶液无斑点, 而回收挥发油和柴胡、连翘挥发油溶液均有相应斑点, 表明挥发油已与 β -环糊精形成包合物。

2.3.2 包合物的 X 射线衍射验证 取包合物、挥发油以及回收挥发油进行 X 射线衍射验证试验, 图谱见图 2。挥发油和回收挥发油的 X 射线衍射图谱一致, 而包合物 X 射线衍射图谱不同, 表明挥发油已与 β -环糊精形成包合物。

2.4 包合物的稳定性考察

2.4.1 光照试验 分别称取 β -环糊精包合物和挥发油与 β -环糊精按比例混匀所得的混合物各 3 份, 密封于玻璃瓶中, 照射 10 d (强度为 4 000 lx), 于第 0、5、10 天时取样, 按《中国药典》2010 年版附录挥发油测定法提取挥发油, 计算挥发油相对质量分



1-柴胡、连翘挥发油 2-包合物回收挥发油 3-包合物
1-volatile oil from *Bupleuri Radix* and *Forsythiae Fructus* 2-volatile oil recycled from inclusion complex 3-inclusion complex

图 1 挥发油薄层色谱图

Fig. 1 TLC of volatile oil

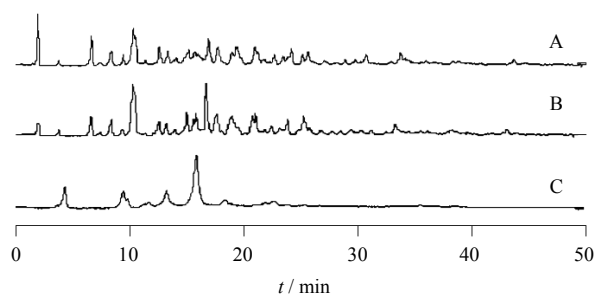


图 2 挥发油 (A)、回收挥发油 (B) 和包合物 (C) 的 X 射线衍射图谱

Fig. 2 X ray diffraction spectra of volatile oil (A), recycled volatile oil (B), and inclusion complex (C)

数, 结果包合物挥发油相对质量分数分别为 100%、91.7%、84.6%, 混合物挥发油相对质量分数分别为 100%、73.2%、56.4%, 表明包合物挥发油相对质量分数明显优于混合物。

挥发油相对质量分数 = 回收油的质量 / 第 0 天回收油的质量

2.4.2 恒温试验 分别称取 β -环糊精包合物和挥发油与 β -环糊精按比例混匀所得的混合物各 3 份, 密封于玻璃瓶中, 分别于 40、60、80 °C 恒温于干燥箱内放置 10 d, 于第 0、5、10 天时取样, 按《中国药典》2010 年版附录挥发油测定法提取挥发油, 计算挥发油相对质量分数, 结果见表 3。表明经恒温处理的包合物挥发油相对质量分数明显优于混合物。

3 讨论

连翘中含有丰富的挥发油, 在连翘心中其量在 4% 以上, 平均可达 3.8%^[3]。其挥发油的主要成分是 α -蒎烯、 β -蒎烯等^[4]。文献报道连翘用水蒸气蒸馏法

表 3 挥发油包合物的稳定性
Table 3 Stability of volatile oil inclusion complex

种 类	温度 / °C	挥发油相对质量分数 / %		
		第 0 天	第 5 天	第 10 天
包合物	40	100	81.6	73.1
	60	100	70.6	62.3
	80	100	64.5	55.1
混合物	40	100	10.2	1.3
	60	100	4.6	0
	80	100	0	0

提取的挥发油对流感病毒感染小鼠具有保护作用。在鸡胚内能抑制流感病毒亚甲型、副流感仙台株的增殖。 β -蒎烯具有抑菌、抗感染、抗氧化作用等， α -蒎烯具有抗真菌作用^[5-6]。柴胡挥发油具有解热、抗炎、抗肝损伤等作用^[7-8]。本实验通过对药材加水量考察、粉碎度考察及提取时间考察，确定挥发油最佳提取工艺。

挥发油经 β -环糊精包合处理后性质更稳定，也便于生产、运输和贮存。本实验采用饱和水溶液法制备挥发油包合物，并以包合物的收率和挥发油转化率两个主要指标综合评分为评价指标确定包合工艺，通过薄层色谱法及 X 射线衍射进行验证，结果该挥发油与回收挥发油相同，而与包合物不同，表明形成了包合物。该方法操作简便，对仪器设备要求不高，便于制药企业生产。

对包合物进行了稳定性考察，挥发油被 β -环糊精包合后大大增加了其对光、热的稳定性，降低了其挥发性，可见 β -环糊精可有效地防止挥发油的挥发，提高其稳定性，为该成药的质量稳定奠定了基础。

参考文献

- [1] 郑秀玉, 李 宁, 陈 贇. 小青龙颗粒中挥发油的 β -环糊精包合物制备的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1048-1049.
- [2] 张海英, 李 伟. 正交法优化异株百里香挥发油提取及 β -环糊精包合工艺研究 [J]. 中药材, 2010, 33(12): 1942-1947.
- [3] 肖会敏, 王四旺, 王剑波, 等. 连翘挥发油的成分分析及其药理作用的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 2047-2048.
- [4] 孙 杰, 姚 健, 达文燕, 等. 连翘挥发油化学成分的研究 [J]. 西北师范大学学报, 2001, 37(3): 77-81.
- [5] 夏忠弟, 毛学政, 罗映辉. α -蒎烯抗真菌机制的研究 [J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(6): 507-509.
- [6] 夏忠弟, 余俊龙. α -蒎烯对白色念珠菌生物合成的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(1): 44-46.
- [7] 李秀琴, 孙秀燕, 何仲贵, 等. 柴胡挥发油提取方法的研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(2): 103-105.
- [8] 孙 蓉, 杨 倩. 柴胡挥发油对大鼠肝能量代谢的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(3): 310-313.