

星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油- β -环糊精包合物的制备工艺

李颖, 曾茂贵, 郑笈, 王典瑜, 游鹏程

福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州 350003

摘要: 目的 优化鱼腥草挥发油- β -环糊精(β -CD)包合物的制备工艺。方法 采用搅拌法制备包合物,以挥发油包合率、包合物得率和包合物中甲基正壬酮质量分数的综合评分 OD 值为评价指标,在单因素试验基础上采用 3 因素 5 水平星点设计考察包合时间、包合温度、 β -CD 与鱼腥草挥发油投料比对制备工艺的影响,对结果进行多元线性和二项式拟合,效应面法筛选出最佳包合工艺,进行预测分析和验证试验,并以红外光谱法和顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法(HS-SPME-GC-MS)对包合物进行质量评价。结果 鱼腥草挥发油- β -CD 包合物的最优包合工艺:包合时间 4.8 h、包合温度 62 °C、 β -CD 与鱼腥草挥发油的质量比为 7.79 : 1,挥发油包合率、包合物得率和包合物中甲基正壬酮质量分数预测值与理论值的偏差分别为 1.70%、1.49%、2.22%。结论 星点设计-效应面法适用于鱼腥草挥发油- β -CD 包合物的制备工艺优化,以此方法建立的数学模型具有良好的预测性。

关键词: 鱼腥草挥发油; β -环糊精; 包合工艺; 星点设计; 效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1855-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.009

Optimization of preparation of volatile oil from *Houttuynia Herba*- β -cyclodextrin inclusion complex by central composite design-response surface method

LI Ying, ZENG Mao-gui, ZHENG Ji, WANG Dian-yu, YOU Peng-cheng

The Second People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Abstract: **Objective** To optimize the preparation process of volatile oil prepared from the aerial parts of *Houttuynia cordata* (*Houttuynia Herba*, HH)- β -cyclodextrin (β -CD) inclusion complex by central composite design-response surface method. **Methods** To prepare the inclusion complex by stirring, with the overall desirability (OD) values of inclusion ratio, yield of the inclusion complex, and methyl-*n*-nonyl-ketone content as indexes, the influence of inclusion temperature, inclusion time, and ratio of β -CD-HH volatile-oil to inclusion process was investigated by response surface method, the results were fitted by multi-linear equation and second-order polynomial equation, and the optimal inclusion process was predicted according to formulation. The quality of inclusion complex was evaluated by IR and HS-SPME-GC-MS. **Results** The optimal inclusion technologies of the HH volatile oil- β -CD inclusion complex were as follows: inclusion time 4.8 h, inclusion temperature 62 °C, and ratio of β -CD-HH volatile oil 7.79 : 1. Bias of inclusion ratio, yield of the inclusion complex, and methyl-*n*-nonyl-ketone content between observed and predicted values were 1.70%, 1.49%, and 2.22% respectively. **Conclusion** Using the central composite design-response surface method to optimize the preparation of HH volatile oil- β -CD inclusion complex has a good prediction.

Key words: volatile oil prepared from *Houttuynia Herba*; β -cyclodextrin; inclusion process; central composite design; response surface method

鱼腥草 *Houttuynia Herba* (HH) 为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分^[1],味辛性寒,具清热解毒、清肿排脓、利尿通淋之功效,主要用于肿痛化脓、痰热喘咳、热痢热淋、痈肿疮毒等。挥发油为鱼腥草的主要成

分^[2-3],常见的提取方法有水蒸气蒸馏法^[4]、超临界 CO₂ 萃取法^[5]、顶空固相微萃取法^[6]等。甲基正壬酮是鱼腥草挥发油中量较高且质量稳定的指标性成分,因此以往相关研究多以甲基正壬酮的量为鱼腥草及其制剂的质量控制指标^[7-8]。

收稿日期: 2014-02-26

作者简介: 李颖(1983—),女,硕士,主管中药师,研究方向为中药制剂与质量标准研究。

Tel: 13950483933 E-mail: liying830221@163.com

鱼腥草挥发油直接使用稳定性差,生物利用度低,并具有一定的刺激性,临床应用存在局限。为了增加鱼腥草挥发油的溶解度和溶出速率,提高其制剂的稳定性,减少刺激性,改善不良气味及拓宽剂型,本实验采用超临界 CO₂ 萃取法提取鲜鱼腥草挥发油,制备 β -环糊精(β -CD)包合物,并对包合物的制备工艺进行考察。

近年来国内多采取正交设计或均匀设计法优化中药的制备工艺,这2种方法采用线性数学模型,虽相对简便、试验次数较少,但精度不高。星点设计-效应面法(central composite design-response surface method, CCD-RSM)^[9]作为一种新型的试验设计方法,具有试验次数少、精度高、预测值接近真实值等优点,其应用愈加广泛。因此,本实验运用 CCD 优化鱼腥草挥发油- β -CD 包合物的制备工艺,最后通过红外光谱(IR)法和顶空固相微萃取-气相色谱-质谱(HS-SPME-GC-MS)法评价包合效果,表征包合物。

1 仪器与材料

Thermo Polaris Q 气相色谱-质谱联用仪,美国 Thermo-Finnegan 公司; Agilent 6890N 型气相色谱仪,美国安捷伦公司; HP-5 MS 毛细管色谱柱,30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m, 日本岛津公司; DB-1 毛细管色谱柱,30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m, 大连依利特分析仪器有限公司; HA120—50—06 型超临界萃取装置,江苏南通华安超临界萃取有限公司; SPME 萃取手柄;聚二甲基硅氧烷(PDMS, 100 μ m)萃取头;15 mL 带聚四氟乙烯瓶塞的顶空取样瓶,美国 Supelco 公司; CP225D 型分析天平、BS423S 型分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司; 6202 型高速粉碎机,北京燕山正德机械设备有限公司; 601 数显超级恒温水浴,江苏金坛市华欧实验仪器厂; LR—5 型磁力搅拌器,无锡市佳诺精细化工设备厂; DZF1.0 型真空干燥箱,上海长源实验仪器设备厂。

甲基正壬酮对照品(批号 110834-200502)、正十五烷(供定量测定内标用,批号 111677-200401),购自中国食品药品检定研究院; β -CD, 国药集团化学试剂有限公司;鲜鱼腥草采自福建建阳鱼腥草 GAP 研究及标准化生产示范基地,原植物由福建省药品检验所金铭副主任药师鉴定,为三白草科蕺菜属蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb.; 其他试剂、试药均为分析纯;实验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 鱼腥草挥发油的制备^[10]

取鲜鱼腥草粗粉 120 g(20 目),装入萃取釜内,待制冷装置与萃取釜和 2 个分离釜加热装置正常工作后,打开压缩泵加压至所需压力,调整 CO₂ 流量,循环萃取。萃取压力 20 MPa,萃取温度 45 $^{\circ}$ C;分离釜压力 6 MPa,分离釜 I 温度为 40 $^{\circ}$ C,分离釜 II 温度为 35 $^{\circ}$ C; CO₂ 流体流量 35 L/h,萃取 2 h 后从分离釜出料,得黄绿色浓稠油状萃取物,有特异鱼腥味。

2.2 包合物的制备

将适量 β -CD 粉末溶于水中,加热溶解制成 β -CD 饱和水溶液,置规定温度的恒温水浴中,再用注射器缓慢滴入鱼腥草挥发油,采用电动搅拌器以 1 500 r/min 的转速搅拌至规定时间,取出,放入冰箱中冷藏 24 h,抽滤,用少量无水乙醇洗涤滤饼,置真空干燥箱中 40 $^{\circ}$ C 恒温真空干燥 24 h,即得黄白色鱼腥草挥发油- β -CD 包合物粉末。

2.3 顶空固相微萃取-气相色谱(HS-SPME-GC)法测定包合物中甲基正壬酮^[11]

2.3.1 色谱条件 经实验研究结合以往文献报道,采用下列色谱条件分离效果最佳:色谱柱 DB-1 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m);载气:高纯氮(体积分数 $\geq$ 99.999%);柱温 130 $^{\circ}$ C;不分流进样,进样口温度 200 $^{\circ}$ C;FID 检测器,温度 200 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min。

2.3.2 HS-SPME 条件 待测溶液置 20 mL 带聚四氟乙烯瓶塞的顶空取样瓶中,经超级恒温水浴加热至 55 $^{\circ}$ C,预平衡 40 min,使用聚二甲基硅氧烷(PDMS, 100 μ m)固相微萃取头顶空萃取 40 min(55 $^{\circ}$ C)。

2.4 HS-SPME-GC-MS 法测定条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱 HP-5 MS 毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m);载气为氦气;进样口温度 250 $^{\circ}$ C;升温程序:初始温度 60 $^{\circ}$ C,保持 5 min,以 6 $^{\circ}$ C/min 升温至 240 $^{\circ}$ C;恒流模式,体积流量 0.8 mL/min,不分流。

2.4.2 质谱条件 电子轰击(EI)离子源;电子能量 70 eV;离子阱温度 230 $^{\circ}$ C;质量扫描范围 m/z 30~500。质谱数据运用 NIST98 标准谱库进行检索。

2.4.3 HS-SPME 条件 参照“2.3.2”项。

2.5 考察指标

2.5.1 挥发油包合率(Y_1) 鱼腥草挥发油的包封

效果是包合工艺筛选所需考察的主要指标之一，权重系数定为 0.4。

Y_1 = 包合物中挥发油的质量 / 投入挥发油的质量

2.5.2 包合物得率 (Y_2) 鱼腥草挥发油- β -CD 包合物得率是评价包合效果的另一个重要指标，权重系数设为 0.4。

Y_2 = 干燥包合物的质量 / (β -CD 的质量 + 挥发油的质量)

2.5.3 包合物中甲基正壬酮的量 (Y_3) 甲基正壬酮是鱼腥草的主要有效成分， β -CD 对该成分的包合效果也会直接影响包合物的质量，因此将甲基正壬酮的量纳入评价体系，权重系数设为 0.2。

2.5.4 评价指标 以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 一同作为评价指标，3 个评价指标的权重设定计算公式： $OD = 0.4 \times (Y_1/Y_{1max}) + 0.4 \times (Y_2/Y_{2max}) + 0.2 \times (Y_3/Y_{3max})$

2.5.5 测定法 鱼腥草挥发油- β -CD 包合物中甲基正壬酮按“2.3”项下方法检测；鱼腥草挥发油采用《中国药典》2010 版一部附录 XD 项下挥发油测定法回收并测定。

2.6 包合工艺的优化

2.6.1 单因素试验 影响 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 的主要因素有包合时间、包合温度、主客分子的投料比例和搅拌速度等。通过预试验结果证明，将搅拌速度控制在 1 000~2 000 r/min 时，其大小波动导致考察指标的变化基本保持在 $\pm 5\%$ 以内，且均能成功制得鱼腥草挥发油- β -CD 包合物，因此搅拌速度不纳入本研究包合工艺参数考量范围，仅对包合时间、包合温度、主客分子投料比 3 个因素进行优化即可。采取单因素试验，固定其中 2 个因素，考察第 3 个因素对 OD 值的影响，以确定各因素的取值水平。

(1) 包合时间考察：准确称取鱼腥草挥发油 5 份，按“2.2”项下包合物制备方法操作，设定包合温度 60 $^{\circ}\text{C}$ ，挥发油与 β -CD 的质量比为 1:6，分别考察包合 1、2、3、4、5 h 的 OD 值，各考察指标测定结果见表 1。结果表明，搅拌 4 h 后，随着时间的延长，包合物各指标基本稳定，因此选定包合 4 h 为中心点。

(2) 包合温度考察：准确称取鱼腥草挥发油 5 份，按“2.2”项下包合物制备方法操作，设定包合时间 4 h，挥发油与 β -CD 的质量比为 1:6，分别考察温度 40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 的 OD 值，各考察指标测定结果见表 2。结果显示，包合温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时效果最理想，之后随着温度的升高，虽然包合物的得率有上升，但挥发油包合率和包合物中甲基正

表 1 包合时间对包合效果的影响

Table 1 Effect of inclusion time

包合时间 / h	$Y_1 / \%$	$Y_2 / \%$	$Y_3 / (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	OD / %
1	62.17	50.61	1.17	80.73
2	69.44	53.50	1.21	86.79
3	73.02	59.63	1.34	94.42
4	75.17	62.62	1.28	96.36
5	80.39	56.95	1.26	95.18

表 2 包合温度对包合效果的影响

Table 2 Effect of inclusion temperature

包合温度 / $^{\circ}\text{C}$	$Y_1 / \%$	$Y_2 / \%$	$Y_3 / (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	OD / %
40	72.44	52.26	1.28	84.63
50	77.94	51.05	1.36	87.79
60	81.99	63.03	1.27	95.42
70	73.10	66.84	1.21	92.43
80	68.73	68.61	1.12	90.00

壬酮的量均下降明显，导致 OD 值有所下降，综合考虑各指标，选定 60 $^{\circ}\text{C}$ 为温度的中心点。

(3) 主客分子投料比考察：准确称取鱼腥草挥发油 5 份，按“2.2”项下包合物制备方法操作，设定在温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 下包合 4 h，分别考察挥发油与 β -CD 不同质量比情况下的 OD 值，各考察指标测定结果见表 3。结果表明，挥发油与 β -CD 的投料比 1:7 时包合效果最佳，因此选定挥发油与 β -CD 的投料比 1:7 为中心点。

2.6.2 CCD 优化鱼腥草挥发油- β -CD 包合工艺

(1) 试验设计：以单因素试验结果为依据，进一步采用 CCD 优化包合工艺。设定包合时间 (A)、包合温度 (B) 和主客分子投料比 (C) 3 个因素，各因素根据星点设计原理分别设 5 水平，分别用代码 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 表示 (3 因素星点设计 $\alpha = 1.682$)。试验因素水平见表 4。以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 的 OD 值为考察指标，采用 CCD 优化 β -CD 包合条件，试验安排及结果见表 4。

表 3 主客分子投料比对包合效果的影响

Table 3 Effect of ratio of β -CD-HH volatile oil on inclusion

主客分子投料比	$Y_1 / \%$	$Y_2 / \%$	$Y_3 / (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	OD / %
1:4	59.66	54.08	1.97	81.32
1:5	71.74	56.41	1.60	84.95
1:6	71.12	63.66	1.36	86.43
1:7	77.15	68.63	1.15	90.21
1:8	80.09	68.50	1.00	90.08

表4 鱼腥草挥发油- β -CD 包合工艺星点设计安排与试验结果Table 4 Central composite design and results of preparation technology of HH volatile oil- β -CD inclusion complex

试验号	A / h	B / °C	C	Y_1 / %	Y_2 / %	Y_3 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	OD / %
1	4 (0)	60 (0)	1 : 7 (0)	78.41	61.66	1.27	92.32
2	4 (0)	43.18 (-1.682)	1 : 7 (0)	73.50	58.28	1.33	88.87
3	5.68 (1.682)	60 (0)	1 : 7 (0)	81.06	62.00	1.39	95.51
4	4 (0)	60 (0)	1 : 7 (0)	76.09	66.17	1.21	93.09
5	4 (0)	60 (0)	1 : 7 (0)	79.22	63.69	1.30	94.36
6	3 (-1)	70 (1)	1 : 8 (1)	71.83	51.14	1.16	81.29
7	3 (-1)	70 (1)	1 : 6 (-1)	69.99	45.02	1.12	76.15
8	4 (0)	60 (0)	1 : 5.32 (-1.682)	74.17	55.51	1.20	85.61
9	5 (1)	70 (1)	1 : 8 (1)	85.91	52.33	1.37	91.63
10	3 (-1)	50 (-1)	1 : 6 (-1)	59.43	49.78	1.09	73.68
11	4 (0)	60 (0)	1 : 8.68 (1.682)	80.75	65.06	1.36	96.78
12	3 (-1)	50 (-1)	1 : 8 (1)	64.03	48.49	1.11	75.33
13	4 (0)	76.82 (1.682)	1 : 7 (0)	75.69	53.55	1.04	82.80
14	4 (0)	60 (0)	1 : 7 (0)	78.37	64.85	1.27	94.23
15	5 (1)	50 (-1)	1 : 8 (1)	69.53	62.41	1.15	86.89
16	5 (1)	50 (-1)	1 : 6 (-1)	64.04	51.96	1.22	79.04
17	2.32 (-1.682)	60 (0)	1 : 7 (0)	72.11	56.69	1.19	85.22
18	4 (0)	60 (0)	1 : 7 (0)	77.90	65.22	1.30	94.67
19	4 (0)	60 (0)	1 : 7 (0)	79.38	63.80	1.28	94.21
20	5 (1)	70 (1)	1 : 6 (-1)	73.05	50.57	1.11	80.79

(2) 模型拟合与方差分析: 利用 Design-Expert 8.0.6.1 统计软件对表4数据分别进行多元线性回归和二项式拟合, 并获得 OD 值对自变量 A、B、C 的多元线性回归方程、二项式拟合方程和三项式拟合方程。

多元线性回归拟合方程: $Y_1=22.615+3.098A+0.347B+2.626C$, $P=0.013$, $r=0.694$; $Y_2=40.598+2.326A+0.246B+0.158C$, $P=0.248$, $r=0.471$; $Y_3=0.881+0.052A-2.180\times 10^{-3}B-0.038C$, $P=0.098$, $r=0.563$; $OD=49.263+3.530A+0.027B+3.168C$, $P=0.122$, $r=0.545$ 。

二项式拟合方程: $Y_1=-90.705+2.797A+2.746B+15.820C-0.088AB+1.489AC+0.058BC-1.924A^2-0.026B^2-1.615C^2$, $P=0.015$, $r=0.895$; $Y_2=-306.124+28.031A+5.649B+39.040C-0.117AB+0.923AC-0.016BC-3.143A^2-0.044B^2-2.810C^2$, $P=0.027$, $r=0.917$; $Y_3=0.665+5.769\times 10^{-3}A+0.024B-0.082C+3.750\times 10^{-4}AB+0.016AC+4.375\times 10^{-3}BC-0.011A^2-4.841\times 10^{-4}B^2-0.015C^2$, $P=0.054$, $r=0.936$;

$OD=-201.730+16.420A+4.858B-28.077C-0.012AB+1.613AC+0.094BC-2.934A^2-0.045B^2-2.641C^2$, $P=0.037$, $r=0.930$ 。

三项式拟合方程: $Y_1=78.43+2.66A+0.65B+1.96C+0.88AB+1.49AC+0.58BC-1.92A^2-2.63B^2-1.61C^2+1.27ABC+4.82A^2B+1.14A^2C+0.75AB^2$, $P=0.160$, $r=0.912$; $Y_2=64.45+1.58A-1.41B+2.84C-1.17AB+0.92AC-0.16BC-3.14A^2-4.36B^2-2.81C^2-2.01ABC-0.29A^2B-0.71A^2C+1.28AB^2$, $P=0.193$, $r=0.903$; $Y_3=1.27+0.059A-0.086B+0.048C+3.750\times 10^{-3}AB+0.016AC+0.044BC-0.011A^2-0.048B^2-0.015C^2-0.039ABC+0.11A^2B-0.016A^2C-0.013AB^2$, $P=0.108$, $r=0.926$; $OD=94.08+3.06A-1.81B+3.32C-0.12AB+1.61AC+0.94BC-2.93A^2-4.53B^2-2.64C^2-0.19ABC+3.55A^2B-0.26A^2C+0.80AB^2$, $P=0.250$, $r=0.890$ 。

通过 P 值大小及相关系数 (r) 判定以上回归方程的拟合情况。多元线性回归拟合方程的概率 $P>0.05$, 表明建立的模型不具显著性, r 较低, 表示自

变量与因变量之间的线性相关性较差,多元线性回归拟合度不佳,预测性较差,因此该数学模型不适合。同理,三项式拟合方程也不适合。而以二项式拟合后, $P<0.05$,方程 r 为0.930,表明该模型拟

合效果最好。由二项式拟合方程可知影响OD值的因素主次顺序为主客分子投料比>包含时间>包含温度。采用ANOVA分析效应面的回归参数,方差分析结果见表5。

表5 回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance for regression model

变异来源	平方和	自由度	F值	P值	变异来源	平方和	自由度	F值	P值
模型	778.68	9	3.34	0.037 1*	A ²	124.07	1	4.78	0.053 6
A	170.16	1	6.56	0.028 3*	B ²	296.01	1	11.41	0.007 0**
B	0.99	1	0.038	0.849 0	C ²	100.49	1	3.87	0.077 4
C	137.07	1	5.28	0.044 4*	残差	259.43	10		
AB	0.11	1	4.257×10^{-3}	0.949 3	失拟项	255.32	5	62.10	0.250 1
AC	20.80	1	0.80	0.391 6	纯误差	4.11	5		
BC	6.99	1	0.27	0.614 9	总和	1 038.11	19		

** $P<0.01$ 为极显著; * $P<0.05$ 为显著

** $P<0.01$ is very significant; * $P<0.05$ is significant

方差分析结果显示,该二项式拟合模型 F 值为3.34,概率 $P<0.05$,表明模型具有显著性;确定系数 R_{adj}^2 为0.864 3,说明方程的因变量与全体自变量之间的线性关系是显著的,响应值的变化有86.43%是来源于本实验所选的自变量。模型的变异系数为1.84%,说明该模型的精密度良好。同时,方程的失拟项 F 值为0.250 1,概率 $P>0.05$,表示失拟项不显著,回归方程在整个回归区域内的拟合情况良好,可用该回归模型代替真实试验点对结果进行分析。由表6可知,对响应值作用显著性顺序依次为 $A>C>B$,交互项AB、AC、BC的对指标影响不显著,二次项 A^2 、 C^2 影响不显著,而二次项 B^2 对OD值的影响极显著,从而印证了该挥发油包合模型中各因素对考察指标OD的影响不是简单的线性关系。

(3) 等高线图和效应面图分析:各自变量间的

三维效应曲面图见图1。

根据Design-Expert 8.0.6.1软件对试验结果进行系统分析,得出鱼腥草挥发油- β -CD最佳包合工艺参数:包含时间4.78 h、包含温度61.55℃、 β -CD与鱼腥草挥发油投料比为7.79:1。预测在此工艺下提取所得鱼腥草挥发油- β -CD包合物的挥发油包合率为82.39%,包合物得率为64.22%,包合物中甲基正壬酮的量为1.35 $\mu\text{g/g}$,OD值为96.93%。根据实际生产条件对工艺参数进行修正,得到鱼腥草挥发油- β -CD的最终包合工艺条件为:包含时间4.8 h、包含温度62℃、 β -CD与鱼腥草挥发油投料比为7.79:1。

2.7 工艺验证试验

按照以上优化的条件进行平行3组包合验证试验,结果见表6。表6显示,实际包合试验所得成品的挥发油包合率与预测值相差1.70%,包合物得

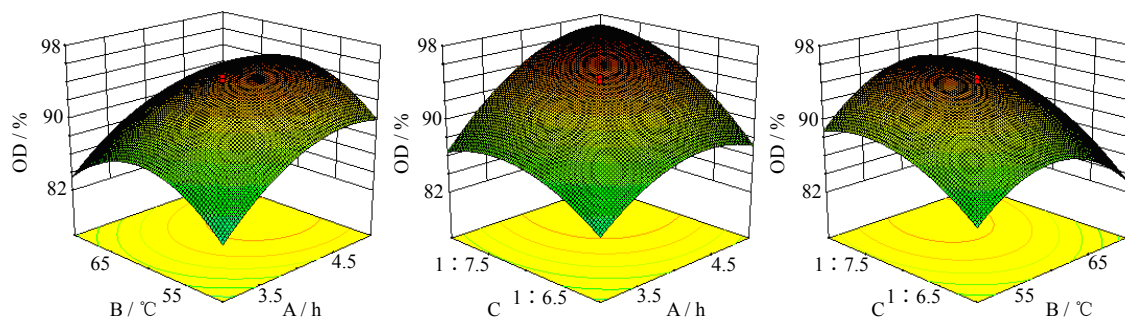


图1 因素A、B、C对OD值的三维效应面及等高线的影响

Fig. 1 Effects of factors A, B, and C on 3D-response surface and contour map of OD values

率与预测值相差 1.49%，包合物中甲基正壬酮量与预测值相差 2.22%。结果表明，基于 CCD 所得的包合工艺参数准确可靠。

表 6 包合验证试验结果

Table 6 Results of inclusion verification test

试验号	$Y_1 / \%$	$Y_2 / \%$	$Y_3 / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
1	80.61	64.03	1.33
2	81.44	62.75	1.30
3	80.97	62.99	1.34
平均值	81.01	63.26	1.32

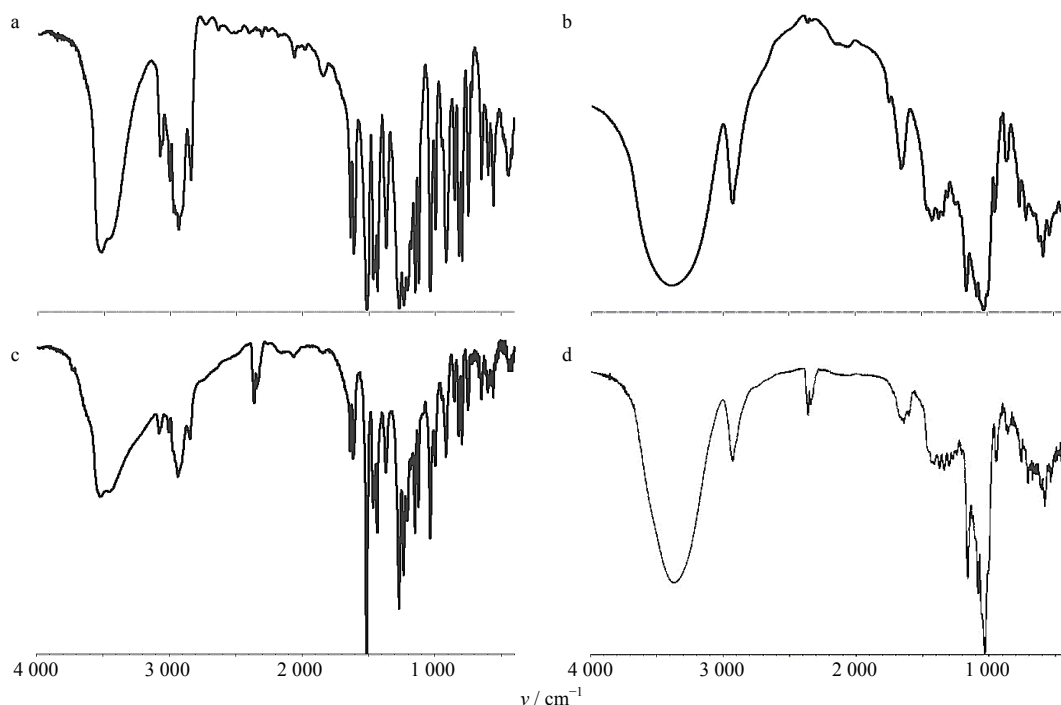


图 2 鱼腥草挥发油 (a)、 β -CD (b)、鱼腥草挥发油与 β -CD 混合物 (c) 和鱼腥草挥发油- β -CD 包合物 (d) 4 种供试品的 IR 图

Fig. 2 IR spectra of different test articles from HH volatile oil (a), β -CD (b), mixture of HH volatile oil and β -CD (c), and HH volatile oil- β -CD inclusion complex (d)

以 β -CD 包合鱼腥草挥发油，若包合物未形成，则基本为两者的混合物 IR 图形，主要呈现两者光谱的叠加，若包合物已形成，则挥发油分子的红外振动受到限制，整个包合物主要应呈现 β -CD 的 IR 图形。利用这种性质，可以判断 β -CD 包合成功与否。由图 2 可见，鱼腥草挥发油在 $1000 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 具特征吸收峰，而在鱼腥草挥发油- β -CD 包合物中这些吸收峰已经消失或明显减弱，较二者的物理混合物的峰数明显减少，表明包合物已经形成。

2.8.2 HS-SPME-GC-MS 法 按“2.4”项提取、分离，采用 HS-SPME-GC-MS 法分别对鱼腥草挥发油和鱼腥草挥发油- β -CD 包合物进行分析，HS-SPME-

2.8 鱼腥草挥发油- β -CD 包合物的质量评价

2.8.1 IR 法 分辨率： 4 cm^{-1} ，扫描速度： $0.6329 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$ ，光圈： $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ，光谱范围： $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ ，速据点间隔： 3.857 cm^{-1} 。

依次取鱼腥草挥发油 0.05 mL 、 β -CD 0.5 g 、鱼腥草挥发油- β -CD 包合物 (0.5 g)、鱼腥草挥发油与 β -CD 的混合物 (含鱼腥草挥发油 0.05 mL ， β -CD 0.5 g) 样品各 1 份，采用 KBr 压片法，按照以上光谱条件分别对 4 种不同样品红外区间吸收峰的变化进行分析，结果见图 2。

GC-MS 总离子流图见图 3。包合前后图谱以中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版 (国家药典委员会) 进行相似度评判，二者相似度为 0.935，表明鱼腥草挥发油经 β -CD 包合前后的 GC-MS 图谱的整体相似度高。

3 讨论

综观国内文献报道的鱼腥草药材相关的 β -CD 包合物工艺研究：魏世超等^[12]直接用鱼腥草素单体同 β -CD 以研磨法制备包合物，并通过测定原料及包合成品的溶解度、溶出速度，比较二者的 X 射线衍射图谱、紫外吸收光谱变化及其在水中溶解稳定性来评价包合效果；徐淑媛等^[13]用水蒸气蒸馏法提

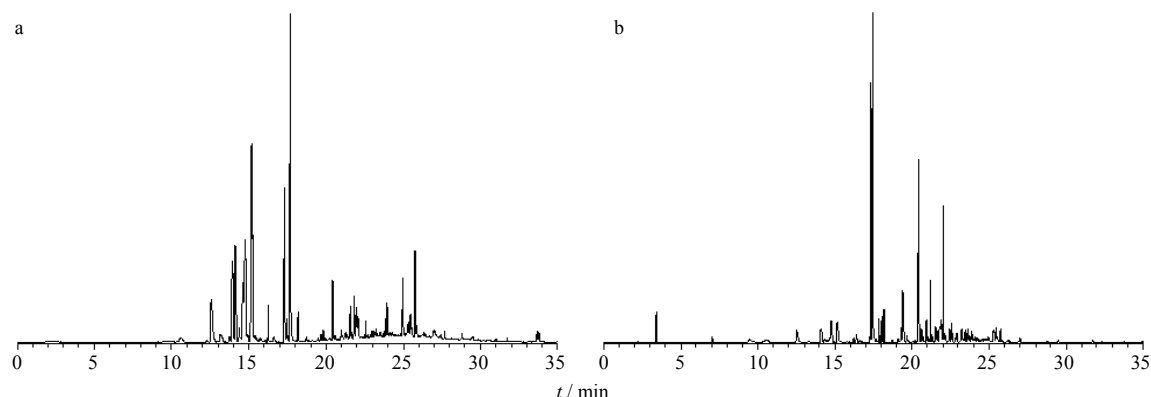


图3 鱼腥草挥发油包合前 (a)、后 (b) HS-SPME-GC-MS 总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatography of HH volatile oil on HS-SPME-GC-MS before (a) and after (b) inclusion

取鲜鱼腥草的挥发油,通过正交设计优化搅拌法的包合工艺参数,设定挥发油包合率为单一考察指标;何茹等^[14]用相同的提取和正交试验方法优化鱼腥草- β -CD 包合工艺,以挥发油的保留率为指标,并通过薄层色谱法验证包合物的形成。以上研究均采用传统方法提取鱼腥草挥发油,操作繁琐,产率较低;以正交设计优化包合工艺,优点是试验次数少,执行较为简便,能够较为全面的考察多个因素水平,最终筛选出影响指标的显著因素并给出最佳因素水平组合,缺点是该方法采用线性模型,只能处理离散的水平值,无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值,与实际情况可能存在偏差^[15]。

CCD 用多项式近似把试验所考察的因素与考察指标的关系函数化,从而在效应面内找到因素和响应值之间的函数表达式即回归方程,最终得到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值^[16],在试验条件寻优过程中,不是只对孤立的试验点进行考察,而是可以对连续的试验水平进行分析,其优点是试验精度高,具有更好的预测性。在实际操作中需要注意的是:首先,效应面分析的前提是预先通过单因素试验来预测所考察因素的最佳试验水平,根据最佳水平来设定试验的中心点,如果中心点选取不当,效应面优化也无法得到精准的结果;其次,星点设计-效应面法需注意水平的选择,一般以设定 2~5 个试验水平较为适宜,若水平数超出此范围将导致试验次数过多,难以执行。

本研究采用超临界 CO_2 萃取法提取鲜鱼腥草挥发油,仪器简单,操作简便;制得的包合物以 HS-SPME-GC-MS 法测定甲基正壬酮的量,操作时将萃取头置供试品上方的蒸气相中萃取、吸附组分,首先,HS-SPME 法能消除静态水层对萃取的影响而使

被测物的分散能力大大提高;第二,避免将水蒸气带入色谱柱,延长柱的使用寿命;第三,能使 SPME 技术应用到组成较为复杂的样本中去,更适于分析气态、液态和固态样品中的挥发性成分。近年来,HS-SPME 在中药分析领域的应用研究渐增,积累了较成熟的实践经验,证明其在中药成分分析领域具有独特的优势和可行性。

本研究引入综合评分的概念,以挥发油包合率、包合物的收得率、包合物中指标成分的量三者一同作为评价指标,在数理统计时根据各指标重要程度给予各自的权重,归一化为综合得分进行比较,使最终的优化结果既能体现包合工艺整体的可行性,又能反映包合物中药效成分的保留效果,同时还能够将不同考察范围的指标转变成一个数值,从而预测出最优工艺条件下各因素的取值。

鱼腥草挥发油包合前后 HS-SPME-GC-MS 图谱中,本实验以出峰时间居中、相对质量分数较大且较稳定的鱼腥草素为参照,将鱼腥草注射液中挥发油 HS-SPME-GC-MS 总离子流图划分为前、后 2 个部分,出峰时间在鱼腥草素之前的成分(包括鱼腥草素)为易挥发及中等挥发性成分,而出峰时间在鱼腥草素之后的成分为挥发性较弱成分。由色谱图可以直观地看出,包合前中强挥发性成分所占比例较大,经 β -CD 包合过程后,出峰时间在 18 min 之后的弱挥发性成分占绝大多数,而中强挥发性成分的含量下降明显。提示包合工艺过程时间较长,温度较高,对鱼腥草挥发油中所含挥发性较强的成分造成了一定程度的破坏。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李 爽,于庆海,金佩河. 鱼腥草的有效成分、药理作

- 用及临床应用的进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(2): 144-147.
- [3] 高 静, 周日宝, 王朝晖. 鱼腥草的现代研究进展 [J]. 湖南中医学院学报, 2005, 12(6): 60-61.
- [4] 韦平原. GC-MS 测定鱼腥草挥发油中的化学成分 [J]. 广西医学, 2012, 34(7): 935-937.
- [5] 曾虹燕, 蒋丽娟, 施风姿. 超临界 CO₂ 萃取鱼腥草的挥发油成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 10-13.
- [6] 李 颖. 鱼腥草和鱼腥草注射液挥发性成分的试验研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2008.
- [7] 胡 馨, 赵华良. 鱼腥草的炮制工艺与质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 150-151.
- [8] 蓝云龙. 不同种源鱼腥草产量和质量评价 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1195-1198.
- [9] 吴 伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. 国外医学: 药学分册, 2000, 27(5): 292-298.
- [10] 南海燕, 张文娟, 章建民, 等. 超临界 CO₂ 萃取鱼腥草挥发油的药理作用研究 [J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 46-48.
- [11] 李 颖, 郑申西, 李 宗. 顶空固相微萃取-气相色谱法测定鱼腥草注射液中甲基正壬酮含量 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(4): 26-28.
- [12] 魏世超, 徐丽君, 曾 勤, 等. 鱼腥草素 β -环糊精包合物的研究 [J]. 中国药学杂志, 1999, 34(3): 167-169.
- [13] 徐淑媛, 王豆豆, 孙静芸, 等. 鱼腥草挥发油环糊精包合工艺的研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(3): 59-61.
- [14] 何 茹, 侯世祥, 郭丹丹. 鱼腥草挥发油 β -环糊精包合物的制备工艺研究 [J]. 中南药学, 2005, 3(6): 331-333.
- [15] 沈 群. 中药研究中的正交设计问题 [J]. 数理医药学杂志, 2011, 2(1): 19-20.
- [16] 邱 颖, 朱 玲, 孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用 [J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 18-20.