

## 基于“药辅合一”理念的 Pickering 乳技术提升儿科用药羚珠散中石菖蒲挥发油热稳定性的研究

彭磊<sup>1</sup>, 封亮<sup>2</sup>, 杨艳君<sup>2</sup>, 刘芸<sup>1</sup>, 张小飞<sup>1</sup>, 邹俊波<sup>1\*</sup>, 史亚军<sup>1\*</sup>

1. 陕西中医药大学药学院 陕西省中药基础与中新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046

2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

**摘要:** 目的 在“药辅合一”理念下导入 Pickering 乳技术, 提升儿科用药羚珠散中石菖蒲挥发油的稳定性。方法 对羚珠散各饮片粉末进行初步表征, 确定稳定剂。通过成乳量、包油量和乳剂形态筛选出最佳稳定剂质量浓度、油水比和制备方法。并使用近红外光谱 (near infrared spectroscopy, NIRS) 分析石菖蒲油在 Pickering 乳中的包裹状态。比较不同时间下各组别挥发油的保有量、丙二醛和过氧化物的含量。再通过 GC-MS 分析其中成分的变化趋势。结果 筛选出珍珠粉作为 Pickering 乳的稳定剂, 珍珠粉质量浓度为 65 mg/mL, 油水比 9:11 为最优成乳条件, 高压均质法为最优的制备方法, NIRS 分析可知石菖蒲挥发油被珍珠粉包裹, Pickering 乳液中没有形成新的化学键。对比各组在不同时间段下石菖蒲油的保有率和其中丙二醛和过氧化物含量, 可知 40 °C 放置 1、3、8 h 的 Pickering 乳剂相比于石菖蒲挥发油组有更高的保有率和更低的氧化程度。GC-MS 分析结果表明, 相比于石菖蒲挥发油组, Pickering 乳组挥发性成分的稳定性显著提高。结论 在“药辅合一”理念下 Pickering 乳可用于含油固体制剂挥发性成分的稳定性提升。

**关键词:** 儿科用药; 羚珠散; 药辅合一; 石菖蒲油; Pickering 乳技术; 近红外光谱; GC-MS; 珍珠粉; 高压均质法

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)02 - 0544 - 09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.021

## Improvement of thermal stability of *Acorus tatarinowii* volatile oil of pediatric drug Lingzhu Pulvis by Pickering emulsion technology based on concept of “combination of medicine and adjuvant”

PENG Lei<sup>1</sup>, FENG Liang<sup>2</sup>, YANG Yan-jun<sup>2</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-fei<sup>1</sup>, ZOU Jun-bo<sup>1</sup>, SHI Ya-jun<sup>1</sup>

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, College of Pharmacy Shaanxi Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Basic and New Chinese Medicine Research, Xianyang 712046, China

2. China Pharmaceutical University, School of Traditional Chinese Pharmacy, Nanjing 211198, China

**Abstract: Objective** The stability of the calamus oil in the pediatric drug Lingzhu Pulvis (羚珠散) was improved by introducing Pickering emulsion technology under the concept of “combination of medicine and adjuvant”. **Methods** The preliminary characterization of each drinking tablet of Lingzhu Pulvis was performed to determine the stabilizer. The optimal stabilizer concentration, oil-water ratio and preparation method were screened by the amount of emulsion formation, oil inclusion and emulsion morphology. And the encapsulation state of calamus oil in Pickering emulsion was analyzed using NIR. The retention of volatile oils, malondialdehyde and peroxide contents were compared among the groups at different times. The trends of the components were then analyzed by GC-MS. **Results** Pearl powder was screened as the stabilizer of Pickering emulsion, the concentration of pearl powder was 65 mg/mL, the oil-water ratio was 9:11 as the optimal emulsion formation conditions, and the high-pressure homogenization method was the optimal preparation method. The NIR analysis showed that the calamus oil was encapsulated by pearl powder and no new chemical bonds were formed in Pickering emulsion. Comparing the retention rate and the

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 陕西省中医药管理局中药制药工程重点学科 (2017001); 陕西省中药制药重点学科资助项目 (303061107); 陕西中医药大学省级重点实验室开放课题 (KF2203); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL11); 国家自然科学基金资助项目 (82274105)

作者简介: 彭磊, 硕士研究生, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: 15229307516 E-mail: 837819443@qq.com

\*通信作者: 史亚军, 男, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (029)38183689 E-mail: 2051004@sntcm.edu.cn

邹俊波, 男, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (029)38185175 E-mail: 2051078@sntcm.edu.cn

malondialdehyde and peroxide content of calamus oil in each group at different time periods, it was found that Pickering emulsion placed at 40 °C for 1, 3 and 8 h had higher retention rate and lower oxidation compared to the calamus oil group. The results of GC-MS analysis showed that the stability of volatile components in the Pickering emulsion group was significantly higher compared to the calamus oil group. **Conclusion** Pickering emulsions can be used to enhance the stability of volatile components in oil-containing solid formulations under the concept of “combination of medicine and adjuvant”.

**Key words:** pediatric medication; Lingzhu Pulvis; combination of medicine and adjuvant; *Acorus tatarinowii* oil; pickering emulsion; near infrared spectrum; gas chromatography-mass spectrometry; pearl powder; high pressure homogenization method

小儿热性惊厥是儿科常见疾病,其首次发作后再次病发率为 30%~40%<sup>[1]</sup>,主要表现为突发的局部或全身肌群阵挛性、强制性抽搐<sup>[2]</sup>。反复的惊厥再发作除了有导致癫痫的可能,还会引起患儿不可逆的脑损伤、智力低下<sup>[3-4]</sup>。羚珠散是由雷允上药业集团有限公司生产的百年经方,被列入国家非物质文化遗产目录,在治疗小儿热性惊厥、外感风寒上的临床使用率极高<sup>[5-6]</sup>。但药方中的石菖蒲油存在易氧化、挥发、逸散的问题<sup>[7-8]</sup>,其会直接影响羚珠散制剂的稳定性,进而影响制剂疗效。因此,提高挥发油的稳定性是羚珠散质量提升亟需解决的现实问题。Pickering 乳是指用合适表面润湿性的固体粒子替代传统的化学分子乳化剂,能够不可逆地吸附在油/水界面上,在界面上形成稳固的空间壳层,对乳滴油相起到保护作用,进而改良稳定性,因其制备过程简单,易实现产业化等优点在近几年国内外得到飞速发展<sup>[9-10]</sup>。目前已经在牛至、迷迭香和肉桂等诸多含挥发油中药中成功实施<sup>[11-12]</sup>。

“药辅合一”是中药制剂使用辅料的重要原则,也是中药制剂区别于化学药制剂的显著特征,在中药制剂中具有普遍性<sup>[13]</sup>。在该理论假设中,从制剂学角度看,利用处方粉末特殊的粉体学性质,充当稳定剂的角色制备 Pickering 乳挥发油固体微粒乳,辅助制剂的成型与稳定,是“药之为辅”的体现;从治疗学角度看,粉末作为稳定剂发挥辅料作用提高挥发油稳定性,进而有利于保障制剂的临床疗效与制剂稳定性,体现了“辅之为药”的特点<sup>[14]</sup>。

羚珠散处方包含动物药(羚羊角、人工牛黄)、植物药(石菖蒲)、矿物药(朱砂、珍珠粉)、提取物(僵蚕、胆南星提取物)及树脂类(琥珀)等不同类型饮片粉末,基本涵盖 Pickering 乳固体微粒乳制备过程中所使用的蛋白类、纤维素类、矿物类、淀粉类及多糖类等稳定剂种类。因此,本研究基于“药辅合一”思想采用 Pickering 乳技术提升羚珠散中石菖蒲油的稳定性进而改善羚珠散治疗小儿热性惊厥的疗效<sup>[15]</sup>。并为日后散剂中改善挥发油稳定性

的研究提供更多参考。

## 1 材料

MH-3000 型调温型电热套,北京科伟永兴仪器有限公司;DHG-9140A 电热鼓风干燥箱,上海-恒科学仪器有限公司;HG-3 型磁力加热搅拌器,常州国华电器有限公司;JY-3002 型十万分之一分析天平,上海浦春仪器有限公司;IKA T18 digital 数显型高速分散机,上海土森视觉科技有限公司;AH-BASIC 型高压均质机,安拓思纳米技术有限公司;DM3000 型生物显微镜,徕卡显微系统贸易有限公司;TENSOR-27 型傅里叶变换红外光谱仪,德国布鲁克公司;ANTIRIS II 型傅里叶变换近红外光谱仪,美国赛默飞公司;K100C-KRUSS 型全自动表面张力及接触角测定仪,德国 KRUSS 公司;SP-1920 型紫外分光光度仪,上海佑科仪器仪表有限公司。

石菖蒲油、珍珠粉、人工牛黄、琥珀、朱砂、僵蚕胆南星提取物由雷允上药业集团有限公司提供;三氯甲烷,批号 20200203,天津市天力化学试剂有限公司;2-硫代巴比妥酸(TBA),上海科丰实业有限公司,批号 20170921;三氯乙酸、1,1,3,3-四乙氧基丙烷,上海麦克林生化科技有限公司,批号 C10050555,质量分数≥97%;水为蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 稳定剂粉体性质表征、筛选及制备方法

#### 2.1.1 溶解度、粒径、接触角测定

(1) 溶解度:分别称取 0.01 g 的珍珠粉、琥珀、朱砂、人工牛黄、羚羊角、僵蚕胆南星提取物混合物于 100 mL 水中,每隔 5 min 强力振摇 30 s;观察 30 min 内的溶解状态。

(2) 粒径:借助马尔文激光粒度仪的干法测定项测定样品粒子的粒度。设定样品测量时间为 12 s,背景测量时间为 10 s,分散气压为 200 kPa,遮光度范围 0.8%~3.0%,进样速度为 50%,加入适量样品粒子,开始测量并记录各样品粒子粒径分布特征值

$d_{90}$ 。

(3) 接触角: 取 0.2 g 珍珠粉、琥珀、朱砂、人工牛黄、羚羊角、僵蚕胆南星提取物混合物细粉用直径为 10 mm 的红外压片机(设定压力为 6 N)压制成片, 以水为测试溶液, 运用 KRUSS 测定珍珠粉粒子的润湿性能<sup>[5,16]</sup>。

(4) 测定结果: 结果见表 1, 各饮片均为难溶性物质, 成乳时溶解到水里的消耗可以忽略。羚羊角和僵蚕胆南星提取物混合物粒径过大 (>100 μm) 不易于制备 Pickering 乳, 人工牛黄的接触角过小不易于形成 Pickering 乳。初步筛选出珍珠粉、琥珀和朱砂作为 Pickering 乳的稳定剂。

### 2.1.2 乳剂的制备方法优化及类型鉴别

(1) 乳剂的制备: 量取 6 mL 石菖蒲油与水于表 1 各饮片的溶解度、粒径、接触角对比 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Comparison of solubility, particle size and contact angle of each decoction piece ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	溶解度	$d_{90}/\mu\text{m}$	接触角/(°)
珍珠粉	难溶	58.57	73.63±2.58
琥珀	难溶	61.46	87.27±1.33
朱砂	难溶	28.82	74.23±2.33
人工牛黄	难溶	89.01	30.30±1.30
羚羊角	难溶	147.44	88.87±2.66
僵蚕胆南星混合物	难溶	260.33	64.07±0.75

烧杯中, 共 3 份, 分别加入适量珍珠粉、琥珀、朱砂使用高速分散机以 1300 r/min 成乳, 分离乳相, 观察乳层颜色。

(2) 滤纸法: 吸取适量乳液滴至滤纸上, 观察展开现象。

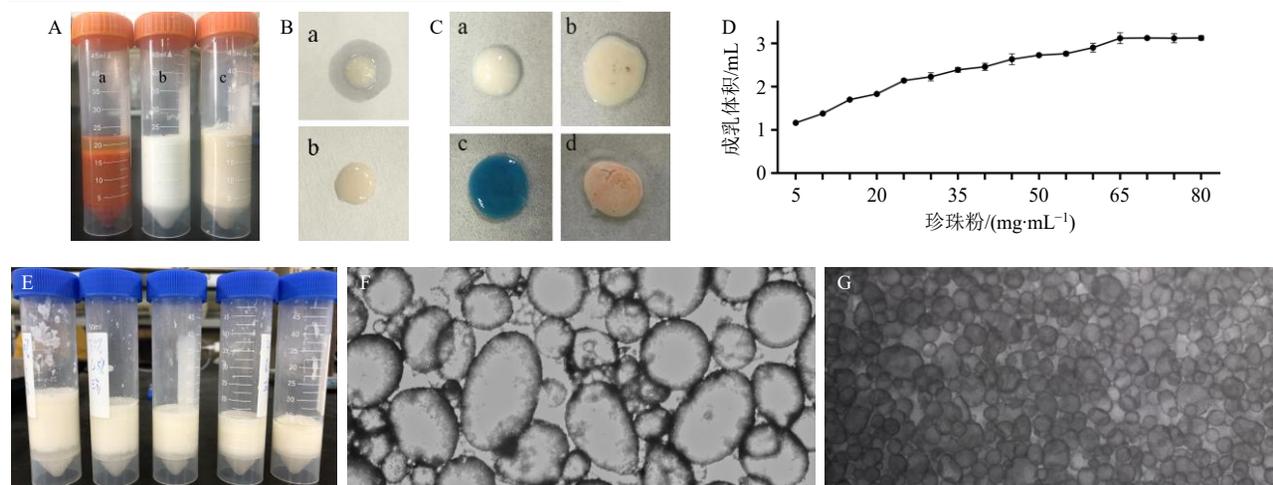
(3) 染色法: 将乳剂样品涂在载玻片上, 用苏丹-III 和亚甲蓝各染色 1 次, 观察染色结果。

(4) 稳定剂用量的优选: 量取 14 mL 水和 6 mL 石菖蒲油, 共 16 份, 再分别加入 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00、1.10、1.20、1.30、1.40、1.50、1.60 g 的珍珠粉, 使用高速分散机制乳, 观察油的包载量和成乳量, 确定最优 Pickering 乳浓度。

(5) 油水比例的优选: 取 5 个 45 mL 离心管, 加入 6.00 mL 石菖蒲油, 再分别加入 14.00、11.14、9.00、7.33、6.00 mL 蒸馏水, 再依次加入 1.30、1.11、0.96、0.87、0.78 g 的珍珠粉, 使用高速分散机制乳, 观察成乳量和包封率包油量, 确定最优油水比例。

(6) 工艺的优化: 取 3 个 45 mL 离心管, 加 6.00 mL 石菖蒲油、14.00 mL 蒸馏水和 1.30 g 珍珠粉, 分别使用磁力搅拌器、高速分散机和高压均质机制备, 使用显微镜观察 Pickering 乳形态, 确定最优制备方法。

(7) 实验结果: 根据图 1-A 可以观察到, 朱砂



A-成乳状态 (a-朱砂 b-珍珠粉 c-琥珀) B-滤纸法鉴别各饮片成乳类型 (a-珍珠粉 b-琥珀) C-染色法鉴别各饮片成乳类型 (染色前: a-珍珠粉 b-琥珀, 染色后: c-珍珠粉 d-琥珀) D-不同质量浓度珍珠粉的成乳体积 E-不同油水比的成乳状态 F-高速分散法制备 ( $\times 100$ ) G-高压均质法制备 ( $\times 100$ )

A-emulsion status (a-cinnabar b-pearl powder c-amber) B-filter paper method was used to identify the emulsion types of each decoction piece (a-pearl powder b-amber) C-staining was used to identify the types of emulsions (before dyeing: a-pearl powder b-amber, after dyeing: c-pearl powder d-amber) D-emulsion volume of different pearl powder concentrations E-emulsion state with different oil/water ratios F-high speed dispersion preparation ( $\times 100$ ) G-high pressure homogenization ( $\times 100$ )

图 1 各饮片成乳类型的鉴别和制备方法

Fig. 1 Identification and preparation method of each decoction piece into emulsion type

存在于水层壁上或沉于底部无法形成 Pickering 乳, 使用滤纸法和染色法可以得出珍珠粉形成的 Pickering 乳为 O/W 型, 琥珀形成的 Pickering 乳为 W/O 型, 如图 1-B、C。最终确定使用珍珠粉作为 Pickering 乳的稳定剂。

随着珍珠粉质量浓度的递增, 形成的乳层也逐步增加, 如图 1-D, 在质量浓度超过 65 mg/mL 后成乳量趋于稳定且形成的乳层随着放置时间的增加出现乳析现象, 可知在不发生乳析的情况下最大成乳量的珍珠粉质量浓度为 65 mg/mL。

观察不同油水比例下的成乳状态, 在油相体积比为 30%、35%、40%、50% 时出现乳层和水层分层乳析现象, 在油相体积比为 45% 时乳层稳定未出现乳析现象, 如图 1-E, 可知在油相体积比为 45% 时为形成 Pickering 乳的最优油水比例。按照上述标准配制适量油相体积比为 45%, 珍珠粉质量浓度为 65 mg/mL 的溶液, 分别使用磁力搅拌器、高速分散机和高压均质机制备, 对比 3 种不同方法制备的成乳状态, 可知磁力搅拌器无法成乳, 再使用显微镜观察高速分散机和高压均质机的成乳, 如图 1-F、G, 可知使用高压均质机 (50.0 MPa, 3 次) 的成乳效果最佳。

**2.1.3 近红外光谱 (near infrared spectroscopy, NIRS) 特征分析** 将适量石菖蒲油、珍珠粉混悬液和 Pickering 乳样品置于 2 mm 的石英比色皿中进行光谱采集, 光谱采集范围为 4000~10 000  $\text{cm}^{-1}$ , 采集温度为室温, 扫描次数为 32, 分辨率为 8  $\text{cm}^{-1}$ 、增益为  $\times 1$ 。

以空气为参比扣除背景采集光谱图, 每个样品重复采集 3 次, 得平均 NIRS。通过观察 NIRS 图谱可以得出在波数 4413、5888、7065  $\text{cm}^{-1}$  处石菖蒲油的特征吸收峰在 Pickering 乳中均被弱化, Pickering 乳的吸收峰和珍珠粉混悬液吸收峰波动幅度基本一致, Pickering 乳中未产生明显的新吸收峰, 结果见图 2, 说明 Pickering 乳没有新的化学键形成。

## 2.2 稳定性实验

**2.2.1 热稳定性实验中挥发油保有率的测定** 将石菖蒲挥发油、油水混合物 (石菖蒲挥发油体积比为 45%, 珍珠粉质量浓度为 65 mg/mL)、Pickering 乳分别置于 100 mL 蒸发皿中, 在 40  $^{\circ}\text{C}$  的烘箱中放置 1、3、8 h, 取出后记录石菖蒲挥发油体积, 将油水混合物和 Pickering 乳使用水蒸气蒸馏法蒸馏 8 h, 分离油相, 平行 3 组实验并记录油相体积。结果可

知, 在 40  $^{\circ}\text{C}$  放置 1、3、8 h 的条件下, Pickering 乳组与石菖蒲挥发油组和油水混合物组相比挥发油保有率均极显著提高 ( $P < 0.001$ ), 结果见表 2。

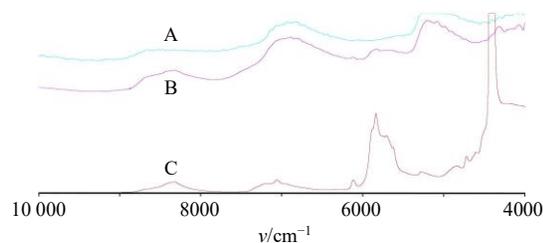


图 2 珍珠粉混悬液 (A)、Pickering 乳 (B) 和石菖蒲油 (C) 的 NIRS 图

Fig. 2 NIRS of pearl powder suspension (A), Pickering emulsion (B), and *A. tatarinowii* oil (C)

表 2 不同时间、组别下石菖蒲油的保有率、丙二醛质量浓度、过氧化物含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Retention rate, malondialdehyde concentration and peroxide content of *A. tatarinowii* oil at different time and groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	石菖蒲油保有率/%		
	1 h	3 h	8 h
原油	76.556 ± 0.002	70.222 ± 0.004	69.556 ± 0.004
油水混合物	93.333 ± 0.017***	70.556 ± 0.010	70.333 ± 0.009
Pickering 乳	99.889 ± 0.002****#	91.333 ± 0.018****#	85.889 ± 0.039****#
组别	丙二醛( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		
	1 h	3 h	8 h
原油	0.550 ± 0.061	0.663 ± 0.015	1.353 ± 0.090
油水混合物	0.463 ± 0.093	0.377 ± 0.040	0.733 ± 0.102*
Pickering 乳	0.256 ± 0.040****#	0.277 ± 0.025*	0.353 ± 0.133*
组别	过氧化物( $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		
	1 h	3 h	8 h
原油	0.653 ± 0.072	0.788 ± 0.018	1.607 ± 0.106
油水混合物	0.550 ± 0.055	0.447 ± 0.048***	0.871 ± 0.121***
Pickering 乳	0.305 ± 0.025****#	0.329 ± 0.030****#	0.424 ± 0.049****#

与原油组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与油水混合物组比较:

## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs crude oil group; ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs oil-water mixture group

### 2.2.2 挥发油中丙二醛物质测定

(1) 标准曲线绘制: 分别精确移取丙二醛标准溶液 (0.315 g 1,1,3,3-四乙氧基丙烷加水溶解稀释至 1000 mL) 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mL 至 10 mL 量瓶中, 蒸馏水定容至 10.00 mL, 即得质量浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的丙二醛标准溶液。分别吸

取上述各标准溶液各 5.00 mL, 加 5 mL 的 TBA 溶液 (0.288 g TBA 加水稀释至 100 mL, 0.02 mol/L), 混匀, 于 90 °C 水浴加热 40 min, 取出, 冷却后加入 5.00 mL 三氯甲烷, 摇匀, 静止 1 h, 取上清液于 532 nm 下测定吸光度值, 以标准系列溶液的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 吸光度为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程  $Y=0.0889X-0.0007$ ,  $r=0.9989$ 。

(2) 样品制备及测定: 分别取上述挥发油样品 500  $\mu$ L, 加入三氯乙酸混合溶液 (37.5 g 三氯乙酸及 0.50 g 乙二胺四乙酸钠, 用水溶解, 稀释至 500 mL), 超声 10 min, 过滤取续滤液 5.00 mL 于锥形瓶中, 加入 5.00 mL 的 TBA 溶液, 于 90 °C 加热 4 h, 取出, 避光冷却 1 h, 加入 5.00 mL 三氯甲烷, 充分振摇, 静置 1 h。取上清液, 在 532 nm 处测定其吸光度并计算丙二醛含量。

(3) 检测结果: 依据标准曲线计算不同样品中丙二醛质量浓度, 可知在 40 °C 放置 1、3、8 h 后, 相较于石菖蒲挥发油组, Pickering 乳组丙二醛含量显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 结果见表 2。

**2.2.3 挥发油中过氧化物值测定** 分别取上述挥发油样品 500  $\mu$ L 于离心管, 取 10 mL 三氯甲烷-冰乙酸混合液 (4:6) 10 mL 洗涤至具塞锥形瓶, 准确加入 1 mL 饱和碘化钾溶液, 密塞, 振摇 0.5 min, 暗处放置 3 min, 取出, 加入 30 mL 水, 加入 1 mL 饱和碘化钾溶液, 密塞, 振摇 0.5 min, 暗处放置 3 min, 取出, 加入 30 mL 水, 加入 1 mL 1% 淀粉指示剂, 用 0.001 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液 (26 g 硫代硫酸钠与 0.20 g 无水碳酸钠共溶于 1000 mL 水中, 缓缓煮沸 10 min, 冷却后稀释所得) 滴定至溶液蓝色消失为终点, 记录消耗硫代硫酸钠标准溶液体积并计算过氧化物值。Pickering 乳组相比于油水混合物组和石菖蒲挥发油组过氧化物含量显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 结果见表 2。

## 2.3 气质联用分析挥发油成分变化

### 2.3.1 GC-MS 测定不同条件干预后的挥发油成分

(1) GC-MS 检测条件: 采用 HP-5MS 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m), 载气为氦气 (纯度为 99.999%), 体积流量 1 mL/min; 进样量 1  $\mu$ L; 分流比 10:1; 进样口温度 230 °C; 升温程序: 50 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 升至 110 °C, 保持 2 min, 继续以 2 °C/min 升至 120 °C, 保持 5 min, 再以 0.5 °C/min 升至 125 °C, 保持 10 min, 继续以 4

°C/min 升至 200 °C, 保持 2 min, 再以 10 °C/min 升至 250 °C, 保持 2 min。

质谱条件: 电离方式 EI, 离子模式 ESI, 电子能量为 70 eV, 四级杆温度 150 °C, 离子源温度 230 °C, 扫描范围  $m/z$  35~500, 溶剂延迟为 3 min。

(2) 样品溶液的配制: 分别取“2.2.1”项样品 100  $\mu$ L 于 10 mL 棕色量瓶中, 加入乙醚至刻度, 加适量无水硫酸钠, 精密称取 2 mL 样品, 过滤膜于液相小瓶中, 使用 GC-MS 测定。

**2.3.2 差异成分的筛选** GC-MS 数据采集完成后, 经安捷伦数据库分析软件 Data Analysis 调用 NIST 14.0 数据库对各组成分进行定性, 汇总 27 组数据并使用 R 语言 Limma 包筛选不同受热时间下的差异成分, 去重后使用差异成分绘制热图、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 图、时间变化图和箱型图<sup>[17]</sup>。

石菖蒲油 GC-MS 分析总离子流图如图 3 所示。由各组火山图 (图 4) 可知, 分别得到 5、11、5 个差异成分, 去重后一共得到 12 个差异成分。分别绘制这 12 个差异成分的热图 (图 5) 和在 1、3、8 h 以及不同组别的 PCA 图 (图 6), 根据聚类信息组别可分为 2 组: ① 3 h-Pickering 乳组、8 h-Pickering 乳组、1 h-石菖蒲挥发油组、1 h-油水混合物组、3 h-石菖蒲挥发油组、1 h-Pickering 乳组、8 h-油水混合物组。② 8 h-石菖蒲挥发油组。变化成分可分为 2 组: ① (1*S*,4*aR*,8*aS*)-4,7-二甲基-1-丙-2-基-1,2,4*a*,5,6,8*a*-六氢萘 (CAS 号 023515-88-0)、(1*R*,4*aR*,8*aS*)-7-甲基-4-亚甲基-1-丙烷-2-基-2,3,4*a*,5,6,8*a*-六氢-1*H*-萘 (CAS 号 030021-74-0)、1-十四烷醇 (CAS 号 000112-72-1)、1-甲基-4-丙基-1-烯-2-基环己烷 (CAS 号 001879-07-8)、(1*R*,2*R*)-1-乙基-1-甲基-4-丙-2-亚基-2-丙基-1-烯-2-基环己烷 (CAS 号 029873-99-2)、(1*R*,5*S*)-1,8-二甲基-4-丙-2-亚基螺[4.5]癸-8-烯 (CAS 号 028400-12-6)、(1*S*,8*aR*)-4,7-二甲基-1-丙-2-基 1,2,3,5,6,8-六氢化萘 (CAS 号 000483-76-1); ② 1-甲基-4-(1-甲基亚乙基)-2-(1-甲基乙基)-1-乙基环己烷 (CAS 号 003242-08-8)、(3*aS*,5*Z*,9*aS*)-2,2,5-三甲基-9-亚甲基-3,3*a*,4,7,8,9*a*-六氢-1*H*-环戊烷[8]环烯 (CAS 号 997220-78-8)、*D*-柠檬烯 (CAS 号 005989-27-5)、 $\gamma$ -枯烯 (CAS 号 997220-96-6)、环十二烷 (CAS 号 000294-62-2)。

依 PCA 图 (图 6) 可知, 相比于石菖蒲挥发油组, Pickering 乳组在各时间段中组内的 3 个点更聚

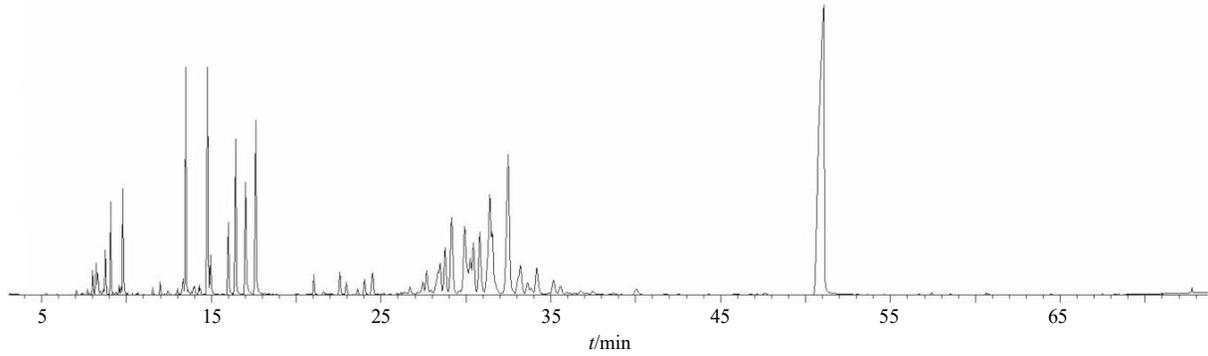
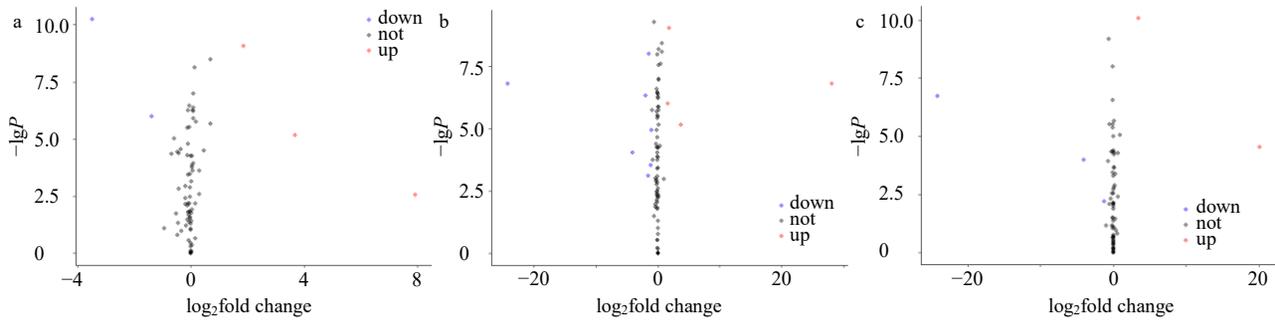


图3 石菖蒲油 GC-MS 分析的总离子流图

Fig. 3 Total ion current map of GC-MS analysis of *A. tatarinowii* oil



a-1 h 与 3 h 的火山图 ( $\log_2$ fold change 的截止值为 1, 含量增加成分数为 3, 含量减少成分数为 2) b-1 h 与 8 h 的火山图 ( $\log_2$ fold change 的截止值为 1, 含量增加成分数为 4, 含量减少成分数为 7) c-3 h 与 8 h 火山图 ( $\log_2$ fold change 的截止值为 1, 含量增加成分数为 2, 含量减少成分数为 3)

a-1 h and 3 h volcanic map (cutoff for  $\log_2$ fold change is 1, the number of up ingredient is 3, the number of down ingredient is 2) b-1 h and 8 h volcanic map (cutoff for  $\log_2$ fold change is 1, the number of up ingredient is 4, the number of down ingredient is 7) c-3 h and 8 h volcanic map (cutoff for  $\log_2$ fold change is 1, the number of up ingredient is 2, the number of down ingredient is 3)

图4 各时间段火山图

Fig. 4 Volcano map of each time period

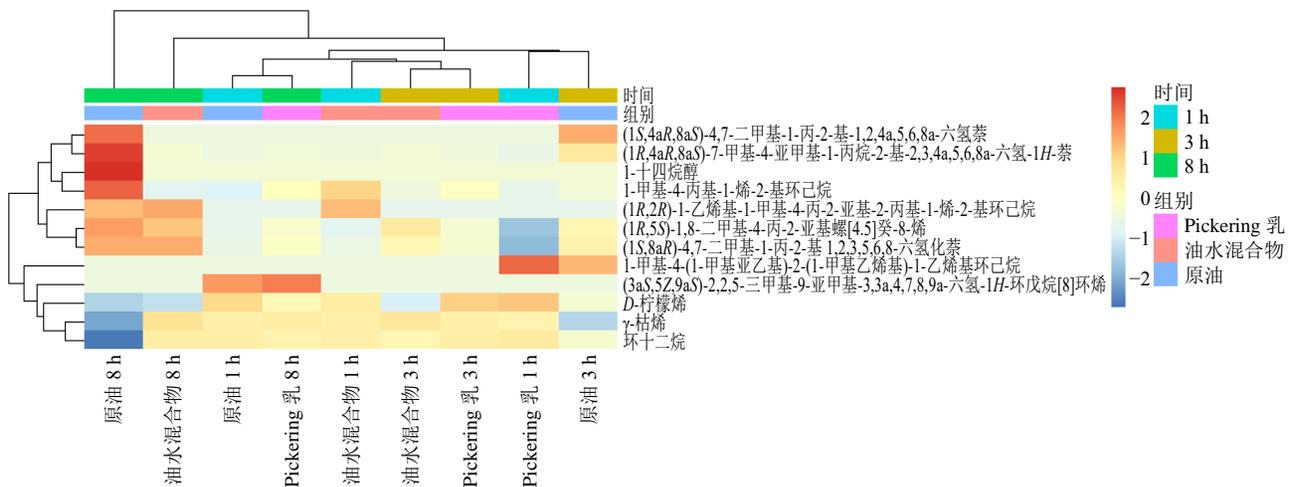


图5 差异成分的热图

Fig. 5 Heat map of different components

集, 所占范围更小, 可知相比于石菖蒲挥发油组, Pickering 乳组的重复性实验结果更好, 在不同时间组下变化小, 其热稳定性要优于石菖蒲挥发油组。对比各组别线形图和箱型图, 得出相比于石菖蒲挥

发油组环十二烷、*D*-柠檬烯、 $\gamma$ -枯烯在 Pickering 乳组中的下降趋势都得到减缓, 1-十四烷醇、(1*S*,8*aR*)-4,7-二甲基-1-丙-2-基 1,2,3,5,6,8-六氢化萘、1-甲基-4-丙基-1-烯-2-基环己烷、(1*S*,4*aR*,8*aS*)-4,7-二甲基-

1-丙-2-基-1,2,4a,5,6,8a-六氢萘、(1*R*,5*S*)-1,8-二甲基-4-丙-2-亚基螺[4.5]癸-8-烯、(1*R*,2*R*)-1-乙烯基-1-甲基-4-丙-2-亚基-2-丙基-1-烯-2-基环己烷、(1*R*,4*aR*,8*aS*)-7-甲基-4-亚甲基-1-丙烷-2-基-2,3,4a,5,6,8a-六氢-1*H*-萘的上升趋势都得到减缓,结果见图7和表3所示。

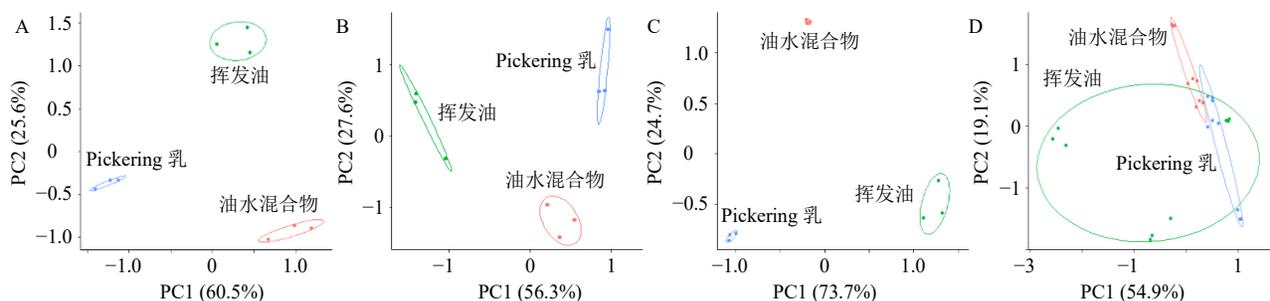
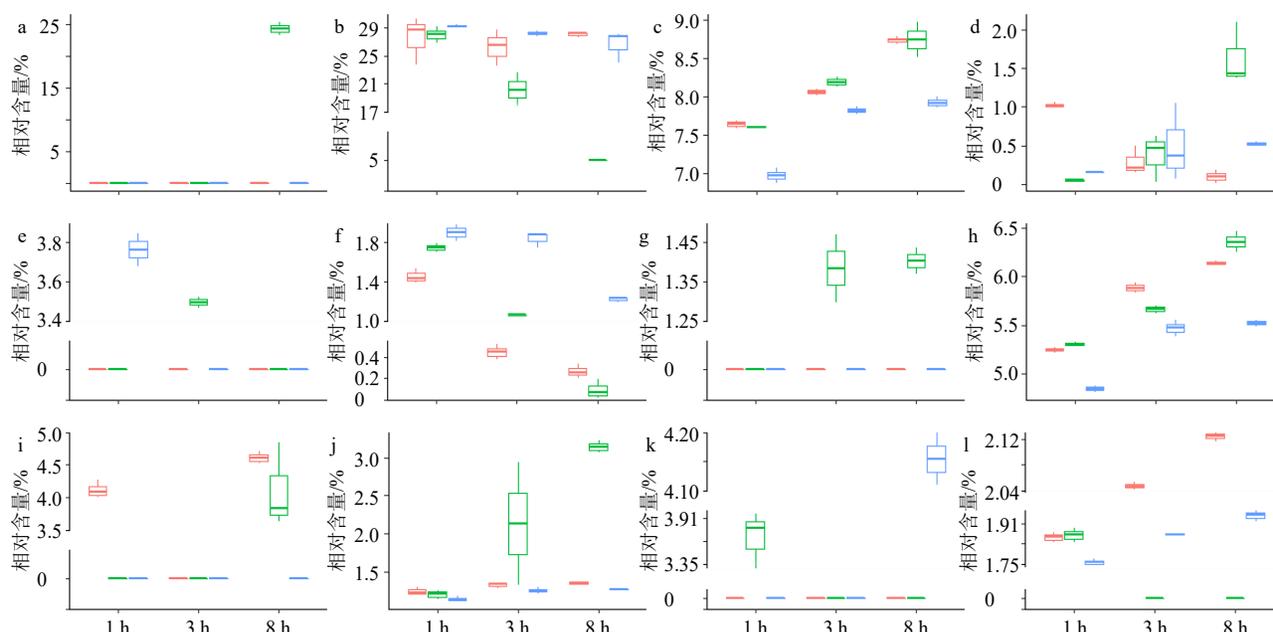


图6 不同时间点 (1 h, A; 3 h, B; 8 h, C) 及所有时间点 (D) 各组别差异成分的 PCA 图

Fig. 6 PCA plot of differential components of each group at different time points (1 h, A; 3 h, B; 8 h, C) and all time points (D)



□ Pickering 乳剂组 □ 石菖蒲油组 □ 油水混合物 a-1-十四烷醇 b-环十二烷 c-(1*S*,8*aR*)-4,7-二甲基-1-丙-2-基-1,2,3,5,6,8-六氢化萘  
d-1-甲基-4-丙基-1-烯-2-基环己烷 e-1-甲基-4-(1-甲基亚乙基)-2-(1-甲基乙烯基)-1-乙烯基环己烷 f-D-柠檬烯 g-(1*S*,4*aR*,8*aS*)-4,7-二甲基-1-丙-2-基-1,2,4a,5,6,8a-六氢萘  
h-(1*R*,5*S*)-1,8-二甲基-4-丙-2-亚基螺[4.5]癸-8-烯 i-(1*R*,2*R*)-1-乙烯基-1-甲基-4-丙-2-亚基-2-丙基-1-烯-2-基环己烷 j-(1*R*,4*aR*,8*aS*)-7-甲基-4-亚甲基-1-丙烷-2-基-2,3,4a,5,6,8a-六氢-1*H*-萘  
k-(3*aS*,5*Z*,9*aS*)-2,2,5-三甲基-9-亚甲基-3,3a,4,7,8,9a-六氢-1*H*-环戊烷[8]环烯 l-γ-枯烯  
□ Pickering emulsion group □ *Acorus tatarinowii* oil group □ oil water mixture a-tetradecan-1-ol b-cyclododecane c-(1*S*,8*aR*)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene  
d-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexane e-1-ethenyl-1-methyl-4-propan-2-ylidene-2-prop-1-en-2-ylcyclohexane f-D-limonene g-(1*S*,4*aR*,8*aS*)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalene  
h-(1*R*,5*S*)-1,8-dimethyl-4-propan-2-ylidenespiro[4.5]dec-8-ene i-(1*R*,2*R*)-1-ethenyl-1-methyl-4-propan-2-ylidene-2-prop-1-en-2-ylcyclohexane j-(1*R*,4*aR*,8*aS*)-7-methyl-4-methylidene-1-propan-2-yl-2,3,4a,5,6,8a-hexahydro-1*H*-naphthalene  
k-(3*aS*,5*Z*,9*aS*)-2,2,5-trimethyl-9-methylidene-3,3a,4,7,8,9a-hexahydro-1*H*-cyclopenta[8]annulene l-γ-curcumene

图7 各组别差异成分箱型图

Fig. 7 Box plot of different components of each group

### 3 讨论

热性惊厥是儿科临床常见的一种急重病,同时也是当代儿科常见急诊疾病和急诊住院最多的病种之一[18]。多发于6个月至3岁的婴幼儿,主要临床

表现为高热、抽搐、神昏[19]。对患儿及其家庭的生活质量造成很大影响[20]。

羚珠散作为治疗小儿热性惊厥常用处方制剂,改良其用药的稳定性一直是该制剂的重中之重[21]。

表3 各组别差异成分相对含量-时间变化规律 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Difference component relative content-time change rule of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	1-甲基-4-(1-甲基亚乙基)-2-(1-甲基乙烯基)-1-乙烯基环己烷/%			$\gamma$ -枯烯/%			(1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i> )-4,7-二甲基-1-丙-2-基-1,2,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -六氢萘/%		
	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h
原油	0	3.495±0.029	0	1.863±0.027	0	0	0	1.384±0.087	1.403±0.033
油水混合物	0	0	0	1.855±0.019	2.047±0.005	2.124±0.008	0	0	0
Pickering 乳	3.765±0.085	0	0	1.756±0.013	1.866±0.003	1.941±0.022	0	0	0
组别	(3 <i>aS</i> ,5 <i>Z</i> ,9 <i>aS</i> )-2,2,5-三甲基-9-亚甲基-3,3 <i>a</i> ,4,7,8,9 <i>a</i> -六氢-1 <i>H</i> -环戊烷[8]环烯/%			环十二烷/%			1-十四烷醇/%		
	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h
原油	3.684±0.341	0	0	28.060±1.170	20.134±2.439	0	0	0	24.220±1.017
油水混合物	0	0	0	27.577±3.472	26.290±2.669	28.043±0.351	0	0	0
Pickering 乳	0	0	4.154±0.045	29.320±0.151	28.245±0.394	26.677±2.244	0	0	0
组别	(1 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i> )-7-甲基-4-亚甲基-1-丙烷-2-基-2,3,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -六氢-1 <i>H</i> -萘/%			<i>D</i> -柠檬烯/%			(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-1,8-二甲基-4-丙-2-亚基螺[4.5]癸-8-烯/%		
	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h
原油	1.196±0.061	2.132±0.813	3.146±0.082	1.745±0.047	1.057±0.017	0.098±0.089	5.311±0.018	5.667±0.040	6.359±0.106
油水混合物	1.239±0.053	1.324±0.037	1.352±0.018	1.452±0.077	0.445±0.071	0.269±0.065	5.249±0.029	5.886±0.047	6.141±0.018
Pickering 乳	1.138±0.036	1.250±0.040	1.268±0.007	1.904±0.085	1.840±0.081	1.221±0.026	4.850±0.032	5.473±0.082	5.524±0.032
组别	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-1-乙烯基-1-甲基-4-丙-2-亚基-2-丙基-1-烯-2-基环己烷/%			(1 <i>S</i> ,8 <i>aR</i> )-4,7-二甲基-1-丙-2-基 1,2,3,5,6,8-六氢化萘/%			1-甲基-4-丙基-1-烯-2-基环己烷/%		
	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h	1 h	3 h	8 h
原油	0	0	4.101±0.654	7.603±0.006	8.189±0.058	8.735±0.230	0.054±0.024	0.379±0.309	1.633±0.399
油水混合物	4.111±0.137	0	4.611±0.097	7.637±0.051	8.060±0.043	8.733±0.045	1.025±0.033	0.287±0.181	0.107±0.084
Pickering 乳	0	0	0	6.971±0.096	7.818±0.050	7.919±0.066	0.160±0.008	0.495±0.497	0.521±0.026

本研究基于“药辅合一”思想导入 Pickering 乳技术来解决羚珠散中石菖蒲油不稳定的缺陷，进而在未来改良羚珠散的稳定性和药效<sup>[22]</sup>。

通过对比粒径、接触角、成乳类型等最终确定使用珍珠粉作为 Pickering 乳的稳定剂。其优选的制备工艺为珍珠粉的质量浓度为 65 mg/mL，油水比 9 : 11，并使用高压均质法制备。本研究所得 Pickering 乳的粒径为微米级，与文献中报道的大多数纳米级 Pickering 乳的粒径有较大差距<sup>[11,23]</sup>，分析其原因可能是由于传统 Pickering 乳使用的稳定剂为纳米级的单体化合物，而本研究所采用的稳定剂为粒径较大的珍珠粉混合物所致。

稳定性研究表明，本研究中制备的 Pickering 乳与原石菖蒲油相比，其挥发油的保有率显著提高，丙二醛和过氧化物的含量均显著降低，并且筛选出的差异成分变化趋势也得以变缓，充分证明了较大

粒径下 Pickering 乳提升石菖蒲挥发油稳定性的技术优势，也进一步对 Pickering 乳体系下稳定剂粒径的考察提供了参考。

在下一步 Pickering 乳回归全方中，按照全方羚珠散的制备工艺在最后喷入 Pickering 乳液并与其他粉末进行物理混合。由于羚珠散处方中石菖蒲挥发油用量极少（占比 10 mL/g），Pickering 乳液制备过程中引入的水分相较于全方亦极少，不会对散剂质量带来影响。同时 Pickering 乳为珍珠粉细粉在油水界面自发包裹于石菖蒲挥发油而形成的固体小颗粒，石菖蒲油被稳定地包裹于其中，与其他粉末混合后，水相会被吸附，含挥发油的固体微粒以类似于固体分散体的状态分散于全方，稳定性强于传统制备方法的简单混合。

可知“药辅合一”理念下 Pickering 乳可用于含油固体制剂挥发性成分的稳定性提升，为其他含挥

发油散剂提升稳定性提供参考依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 张方园, 杨晓丽, 杨燕飞. 左乙拉西坦与地西洋间歇短期预防小儿热性惊厥复发的疗效及安全性 [J]. 医学综述, 2020, 26(19): 3926-3930.
- [2] Symonds J D, Moloney T C, Lang B, *et al.* Neuronal antibody prevalence in children with seizures under 3 years: A prospective national cohort [J]. *Neurology*, 2020, 95(11): e1590-e1598.
- [3] Skotte L, Fadista J, Bybjerg-Grauholm J, *et al.* Genome-wide association study of febrile seizures implicates fever response and neuronal excitability genes [J]. *Brain*, 2022, 145(2): 555-568.
- [4] Watila M M, Balarabe S A, Komolafe M A, *et al.* Epidemiology of epilepsy in Nigeria: A community-based study from 3 sites [J]. *Neurology*, 2021, 97(7): e728-e738.
- [5] 周晓, 封亮, 张小飞, 等. 基于溶剂挥发法的羚珠散粒子设计技术应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(23): 6028-6034.
- [6] 姚楠, 李友宾, 段金殿. 羚羊角在中药复方中药理作用的试验研究 [J]. 中成药, 2009, 31(8): 1292-1293.
- [7] 赵红霞, 汪文来, 白卫国, 等. 石菖蒲挥发油  $\beta$ -环糊精包合工艺优选及气相色谱-质谱联用分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(7): 538-539.
- [8] 吴意, 万娜, 刘阳, 等. 中药挥发油稳定性影响因素、变化机制及保护策略 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6900-6908.
- [9] 刘斌龙, 刘庆旺, 范振中. Pickering 乳状液的研究进展及展望 [J]. 化学工程师, 2022, 36(4): 71-74.
- [10] 史轩, 邢晓凯, 雷依婷, 等. Pickering 乳状液稳定性的研究进展 [J]. 精细石油化工, 2020, 37(1): 65-71.
- [11] 谢锦, 罗怡婧, 刘阳, 等. Pickering 乳化技术及其在中药挥发油中的应用进展 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1343-1349.
- [12] 赖华彰, 陈水燕, 周伟成, 等. 纳米制剂技术改善中药精油稳定性的研究进展与思考 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 641-652.
- [13] 张定堃, 傅超美, 林俊芝, 等. 中药制剂的“药辅合一”及其应用价值 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1921-1929.
- [14] 方栋, 张蕾, 孙娟, 等. “药辅合一”茶多酚-蜂毒肽纳米复合物的制备及抗肿瘤研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3300-3307.
- [15] 姚俊宏, 任略, 董洁, 等. 香附四物汤全方与组方药材挥发油经皮外用“药辅合一”作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(1): 25-31.
- [16] 杨艳君, 邹俊波, 张小飞, 等. 基于粒子设计技术改善中药散剂口感与均一性问题: 以珠黄吹喉散为例 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(23): 6035-6044.
- [17] Ritchie M E, Phipson B, Wu D, *et al.* Limma Powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [18] 吴小慧, 麦坚凝, 杨思渊. 热性惊厥影响患儿行为的研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(7): 548-551.
- [19] 陈慧, 汪受传. 从“热、痰、惊、风”辨治小儿热性惊厥 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(2): 290-293.
- [20] 胡亚靖. 孕母情志变化与小儿癫痫相关性病例对照研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [21] 周晓. 溶剂挥发法-粒子设计技术改善羚珠散质量的应用研究 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2021.
- [22] 邵佳, 邹俊波, 史亚军, 等. GC-MS 分析水蒸气蒸馏法提取石菖蒲挥发油过程中油水分分配规律 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 59-66.
- [23] 刘婉嫒, 王聪, 李宇航, 等. 纤维素纳米材料用于稳定 Pickering 乳液的研究进展 [J]. 中国造纸学报, 2021, 36(4): 100-104.

[责任编辑 郑礼胜]