

川椒方中挥发油的提取及包合物制备与表征

刘亚梅^{1,2}, 杜茂波², 沈硕², 曹晶², 刘淑芝²

1.首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2.中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要:目的 优选川椒方中蛇床子、荆芥、川芎、花椒混合挥发油的最佳提取工艺, 制备混合挥发油与 β -环糊精(β -CD)的包合物并表征其形成。方法 以收油率为指标, 采用单因素试验优选挥发油提取工艺; 以包封率为指标, 采用饱和水溶液法制备包合物, 通过单因素试验和正交试验优选包合工艺参数; 采用显微镜法和红外分光光度法对包合物进行表征评价。结果 挥发油提取工艺为: 加8倍量水, 浸泡2 h, 提取5 h; 包合工艺为: β -CD(g)与水(mL)的比例为1:10, 挥发油(mL)与 β -CD(g)的比例为1:10, 在40℃条件下包合1.5 h。结论 本研究优化筛选的提取包合工艺稳定可行, 可用于川椒方的颗粒剂生产。

关键词: 川椒方; 挥发油; β -环糊精; 提取工艺; 包合工艺

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2019)02-0089-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2019.02.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Extraction of Volatile Oil from *Chuanjiao* Decoction and Preparation Process of Inclusion Compound

LIU Yamei^{1,2}, DU Maobo², SHEN Shuo², CAO Jing², LIU Shuzhi²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of mixed volatile oil of *Cnidii Fructus*, *Schizonepetae Herba*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Zanthoxyli Pericarpium* of *Chuanjiao* Decoction; To prepare and identify the compound essential oil / β -cyclodextrin inclusion complex. **Methods** The extraction process of volatile oil was optimized by single factor experiment with the receiving rate as the index. The inclusion complex was prepared by the saturated aqueous solution method with the encapsulation efficiency as the index, and the inclusion process parameters were optimized by single factor test and orthogonal test. The inclusion complexes were characterized by microscopy and infrared spectrophotometry. **Results** The optimized extraction conditions were adding 8 fold water, soaking for 2 h, and extracting for 5 h. The optimized inclusion conditions were the β -cyclodextrin to water for 1:10 (g/mL), volatile oil and β -cyclodextrin at ratio of 1:10 (mL/g), inclusion temperature 40℃ for 1.5 h. **Conclusion** The optimal extraction and inclusion process are stable and feasible, which can be used for the granule production of *Chuanjiao* Decoction.

Keywords: *Chuanjiao* Decoction; volatile oil; β -cyclodextrin; extraction technology; inclusion technology

川椒方是中国中医科学院眼科医院治疗过敏性结膜炎的临床经验方, 由花椒、蛇床子、川芎、荆芥等组成, 具有疏风清热止痒功效。方中蛇床子具有燥湿祛风、杀虫止痒、温肾壮阳功效^[1], 主要药效成分为香豆素类和挥发油, 药理研究显示, 挥发油是其发挥止痒作用的有效组分之一^[2]。荆芥功在祛风解表、宣毒透疹, 挥发油为其主要药效成分, 具有抗炎、抗过敏作用^[3]。川芎有活血行气、祛风止痛功效, 主要

药效成分为挥发油、川芎嗪、阿魏酸, 挥发油所含成分多为萜本内酯类, 具有镇静、镇痛、解热的作用^[4-5]。花椒的主要活性物质是挥发油类成分, 具有镇痛、平喘、抗菌、抗炎等功效^[6-7]。由于挥发油易挥发、光热不稳定, 为保证其制剂稳定性并最大限度发挥药效, 本试验采用水蒸气蒸馏法提取混合挥发油后用 β -环糊精(β -CD)对其进行包合, 并采用显微鉴定、红外光谱法对包合物进行表征。

1 仪器与试药

ZDHW 电热套(天津市泰斯特仪器有限公司), SHB- 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司), DK99-IIA 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂),

基金项目: 北京市科技计划“十病十药”研发项目(Z161100001816006)

通讯作者: 刘淑芝, E-mail: liushuzhi2004@sina.com

DGG-9620A 型智能鼓风干燥箱 (杭州卓驰仪器有限公司), JJ500 型电子天平 (常熟市双杰测试仪器厂), BSA224S-CW 型分析天平 (德国赛多利斯公司), RW-11B 型搅拌器 (德国 IKA 公司), Nikon Eclipse E200MV-R 型显微镜 (北京瑞科中仪科技有限公司), FTIR Spectrometer 型傅里叶变换红外光谱仪 (Perkins Elmer 公司)。

蛇床子 (产地河北, 批号 160716) \ 川芎 (产地四川, 批号 161016) \ 荆芥 (产地河北, 批号 160916) \ 花椒 (产地四川, 批号 161116、170516), 购自北京燕北饮片厂, 经中国中医科学院中药研究所李曼玲研究员检验, 均符合 2015 年版《中华人民共和国药典》标准; 无水硫酸钠 (分析纯, 批号 20140915, 国药集团化学试剂有限公司), 无水乙醇 (分析纯, 批号 150901, 四川金山制药有限公司), β -CD (批号 20170406, 郁南县永光环状糊精有限公司生产, 北京凤礼精求医药股份有限公司提供), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取工艺研究

按 2015 年版《中华人民共和国药典》(四部) 2204 项下挥发油测定法甲法测定挥发油, 以收油率为指标, 采用单因素试验, 对吸水率、加水量、浸泡时间、提取时间进行考察。

2.1.1 吸水量考察

按处方比例称取药物饮片 66 g, 3 份, 加 10 倍量水, 浸泡至透心, 滤除药液, 测定饮片湿重。吸水倍数 = (饮片湿重 - 饮片干重) \div 饮片干重。取 3 次平均值, 结果吸水量为 2.45 倍, 见表 1。

表 1 吸水量考察结果

试验号	饮片湿重/g	饮片干重/g	吸水量/倍	平均值/倍
1	236.43	66.85	2.54	2.45
2	230.25	66.92	2.44	
3	225.96	67.03	2.37	

2.1.2 浸泡时间考察

称取药物饮片 66 g, 3 份, 加 7 倍量水, 分别浸泡 0、2、4 h, 提取 8 h, 计算收油率, 结果见表 2。浸泡时间选择 2 h。

表 2 浸泡时间考察结果

浸泡时间	出油量/mL	收油率/%
0 h	0.70	1.04
2 h	0.78	1.17
4 h	0.70	1.05

2.1.3 加水量考察

称取药物饮片 66 g, 2 份, 分别加 7、8 倍量水, 浸泡 2 h, 提取 7 h, 计算收油率, 结果出油量分别为 0.70、0.80 mL, 收油率分别为 1.05%、1.17%。故选择加 8 倍量水。

2.1.4 提取时间考察

称取药物饮片 66 g, 加水 8 倍量, 浸泡 2 h, 记录不同时间累积出油量, 并计算累积收油率, 结果见表 3。5 h 以后出油量不再变化, 故选择提取 5 h。

表 3 提取时间考察结果

提取时间	累积出油量/mL	累积收油率/%
1 h	0.44	0.66
2 h	0.60	0.90
3 h	0.69	1.04
4 h	0.72	1.08
5 h	0.78	1.17
6 h	0.78	1.17
7 h	0.78	1.17

2.1.5 提取工艺验证试验

为保证所筛选提油工艺稳定可行, 进行 3 批验证试验。称取药物饮片 210 g, 3 份, 按优选出的最佳提取工艺 (加 8 倍量水, 浸泡 2 h, 提取 5 h) 提取挥发油, 结果收油率分别为 1.09%、1.09%、1.04%, 均值为 1.07%, RSD = 2.69%, 表明所选工艺稳定, 具有一定重复性和可操作性。

2.2 挥发油包合工艺研究

目前常用的包合物制备方法有饱和水溶液法、超声法、胶体磨法等^[8], 其中饱和水溶液法操作简单、对设备要求低, 在实验室制备和工业化生产中均有广泛应用。本试验采用饱和水溶液法制备包合物。影响饱和水溶液法包合率的主要因素为水与 β -CD 的比例、挥发油与 β -CD 的比例、包合时间、包合温度^[9-10]。本试验以包合率为考察指标, 采用单因素试验筛选加水量, 采用正交试验进一步优化包合工艺参数。

2.2.1 包合物制备方法

称取适量 β -CD, 置 200 mL 烧杯中, 加入一定量蒸馏水, 于水浴锅上沸水浴溶解, 晾至所需温度, 搅拌器搅拌下缓缓加入挥发油醇溶液 (1 : 1) 2 mL, 恒温包合至规定时间, 包合物溶液置 4 °C 冰箱冷藏过夜, 取出, 抽滤, 用适量高纯水和少量无水乙醇多次洗涤包合物, 置室温下晾干。

2.2.2 空白回收率测定

精密量取 3 份经无水硫酸钠脱水的挥发油 1 mL, 置 500 mL 圆底烧瓶中, 加蒸馏水 300 mL, 玻璃珠数

个,按 2015 年版《中华人民共和国药典》(四部)2204 项下挥发油测定法甲法测定,得挥发油的回收量分别为 0.89、0.90、0.91 mL,计算平均值,结果空白回收率为 90%。

2.2.3 包封率测定

精密称定所得包合物干燥粉末,置 500 mL 圆底烧瓶中,加蒸馏水 300 mL,玻璃珠数个,按 2015 年版《中华人民共和国药典》(四部)2204 项下挥发油测定法甲法测定,计算包封率。包封率(%) = 包合物中挥发油量(mL) ÷ [挥发油加入量(mL) × 空白回收率(%)]。

2.2.4 加水量筛选

以包封率为指标,采用单因素法筛选加水量。精密量取挥发油 1 mL,3 份,分别加入 β -CD 10 g,为保证水溶液饱和,设置相当于 β -CD 8、10、12 倍的加水量,按“2.2.1”项下方法包合 2 h,测得其包封率分别为 64.44%、71.11%、53.33%,故加水量选择 10 倍。

2.2.5 正交试验优选包合工艺

以挥发油与 β -CD 的比例、包合温度、包合时间为考察因素,每个因素 3 个水平,因素水平见表 4。以包封率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,按“2.2.1”项下方法制备包合物,测定包封率,正交试验结果见表 5。采用 SPSS17.0 软件进行方差分析,结果见表 6。

表 4 正交试验因素水平表

水平	油 β -CD/(g/mL)	包合温度/	包合时间/h
	A	B	C
1	1 8	40	1.0
2	1 10	50	1.5
3	1 12	60	2.0

表 5 包合工艺正交试验安排与结果

试验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	70.00
2	1	2	2	2	77.78
3	1	3	3	3	60.00
4	2	1	2	3	90.00
5	2	2	3	1	78.89
6	2	3	1	2	55.56
7	3	1	3	2	84.44
8	3	2	1	3	85.56
9	3	3	2	1	66.67
K1	207.78	244.44	211.11	215.56	
K2	224.44	242.22	234.44	217.78	
K3	236.67	182.22	223.33	235.56	
R	9.63	20.74	7.78	6.67	

表 6 包合工艺正交试验结果方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
A	140.19	2	70.10	1.75	> 0.05
B	830.73	2	415.36	10.37	> 0.05
C	90.81	2	45.40	1.13	> 0.05
误差 D	80.11	2	40.05	1.00	

由直观分析可知,影响挥发油包封率的主次顺序为 B > A > C,即包合温度 > 挥发油与 β -CD 比例 > 包合时间,其中包合温度为主要影响因素;方差分析显示,A、B、C 三因素对包合工艺均无显著差异,为节约生产成本,确定最佳工艺为 $A_2B_1C_2$,即 β -CD 与挥发油比例为 10 : 1,包合温度 40℃,包合时间 1.5 h。

2.2.6 干燥方法筛选

包合物干燥方法有冷冻干燥、喷雾干燥、自然干燥、鼓风干燥等^[11]。冷冻干燥适用于在干燥过程中易分解变色的药物,所制备包合物易溶于水,多用于制备粉针剂;喷雾干燥既可用于包合物干燥,又可用于包合物的制备,适用于难溶性药物,但损失大,包合物收率低^[8];鼓风干燥设备要求低,操作简单,适合工业化生产。本研究选用鼓风干燥法(40℃)和自然晾干法,以包封率为考察指标,采用单因素试验筛选最佳干燥方法。精密量取挥发油 1 mL,2 份,按最佳包合工艺制备包合物水溶液,抽滤,滤饼分别置于不同条件下干燥,测得包封率为 86.67%。为节省工时,选择 40℃鼓风干燥。

2.2.7 包合工艺验证试验

精密量取挥发油 1 mL,3 份,按最佳包合工艺制备挥发油包合物,测定包封率,结果包封率分别为 88.89%、88.89%、86.67%,平均包封率为 88.15%,RSD = 1.45%,表明此包合工艺稳定可行。

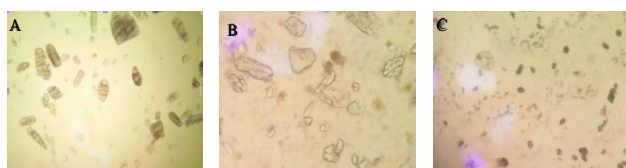
2.3 挥发油包合物表征

包合物形成的表征方法有薄层色谱法、紫外光谱法、红外分光光度法、显微鉴别、热分析法等^[8],薄层色谱法和红外光谱法最常用,且操作简单;显微鉴别可直接通过观察包合物形状判断包合物是否形成,直观明了。考虑实验室设备条件,本试验采用显微镜法和红外分光光度法进行包合物表征。

2.3.1 显微成像分析

通过显微镜观察包合物和混合物的形态、晶型变化,判断包合物是否形成^[10]。取 β -CD、挥发油与 β -CD 物理混合物、包合物适量,过 100 目筛,分别放于载玻片上,滴加少量蒸馏水搅拌分散,盖上盖玻片,于 400 倍显微镜下观察,结果见图 1。可见, β -CD 的显微结构呈板块状结晶;物理混合物与 β -CD 的显微结

构相似,且混有油滴;包合物为黑色不透明的团状物质,晶粒粒度小,无明显油滴。结果表明挥发油被包合在 β -CD中。

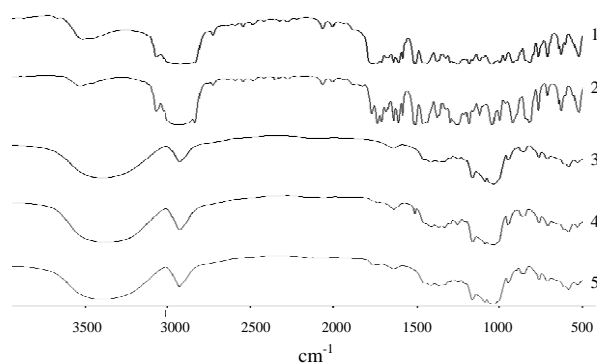


注:A. β -CD;B.物理混合物;C.包合物

图1 挥发油包合物显微图($\times 400$)

2.3.2 红外光谱分析

红外分光光度法可通过比较挥发油包合前后红外外区特征峰的位移变化或吸收峰消失来判断包合物是否形成^[11-12]。取包合前后挥发油、 β -CD、挥发油与 β -CD物理混合物、包合物适量,采用溴化钾压片法测定红外光谱,结果见图2。由光谱数据分析可知,挥发油在 $2900 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1333 \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ 处有明显的吸收峰,其包合前后光谱曲线基本一致,表明在包合过程中挥发油主要成分性质基本没有变化;在包合物和物理混合物中,部分挥发油吸收峰减弱或消失,且包合物呈现与 β -CD相似的光谱曲线,表明挥发油已被 β -CD包合。



注:1.包合前挥发油;2.包合后挥发油;3. β -CD;4.包合物;5.物理混合物

图2 挥发油包合物红外光谱图

3 讨论

本试验优选的挥发油提取工艺确定为:加8倍量水,浸泡2h,提取5h;包合工艺确定为: β -CD(g)与水(mL)比例为1:10,挥发油(mL)与 β -CD(g)比例为1:10,包合温度 40°C ,包合时间1.5h。验证试验表明,提取、包合工艺稳定可行。显微镜法和红外分光光度法对包合物进行表征结果显示,包合物

形成。采用 β -CD包合挥发油,不仅可以掩盖不良气味,同时可以提高药物的稳定性,保证成品药效。

试验中发现,包合温度对包合率的影响最大。随着温度的升高, β -CD在水中的溶解度增大,增加了与挥发油的接触,从而提高包封率,但温度过高则挥发油逸散损失,包合效果减弱。采用饱和水溶液法制备包合物多考察包合温度、包合时间、挥发油与 β -CD比例3个因素,对加水量的筛选研究不多,本试验采用单因素法对加水量进行考察,结果表明,在保证水溶液饱和的前提下,加水量过多会导致包合物在水中溶解,包合物得率降低;加水量过少,则部分 β -CD未溶解,影响包合物得率的准确性,且参与包合的 β -CD减少,降低包封率。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:315.
- [2] 刘明平,吴依娜,韦品清,等.蛇床子止痒有效组分筛选及作用机制研究[J].中医药导报,2009,15(7):66-67.
- [3] 王凤,温桃群,桑文涛,等.荆芥挥发油化学成分及药理作用研究现状[J].中南药学,2017,15(3):312-318.
- [4] 倪健,董竟成.三种中药药效成分抗支气管哮喘变应性炎症的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(4):49-51.
- [5] 杜旌畅,谢晓芳,熊亮,等.川芎挥发油的化学成分与药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(23):4328-4333.
- [6] 梁辉,赵镭,杨静,等.花椒化学成分及药理作用的研究进展[J].华西药学杂志,2014,29(1):91-94.
- [7] 曾晓会,周瑞玲,陈玉兴,等.花椒超临界萃取物治疗哮喘的药效学研究[J].中药材,2005,28(2):132-134.
- [8] 杨欢,詹雪艳,林宏英,等.中药挥发油环糊精包合物研究现状[J].中国中医药信息杂志,2015,22(10):129-133.
- [9] 杜杰峰,叶庆华,刘峻峰,等.4种植物混合挥发油-环糊精包合工艺的优化及稳定性考察[J].中国医药工业杂志,2015,46(7):709-712.
- [10] 王庆玲,倪健,张欣,等.桂芍子喘颗粒中挥发油包合工艺及稳定性研究[J].现代中药研究与实践,2017,31(5):48-51.
- [11] 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[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):352-356.
- [12] 王晓琴,曹礼,安玲,等.当归和党参混合挥发油提取和-环糊精包合工艺研究[J].中国酿造,2017,36(9):153-157.

(收稿日期:2018-06-28)

(修回日期:2018-07-27;编辑:陈静)