

星点设计-响应面法优化石菖蒲 挥发油羟丙基- β -环糊精的包合工艺

王月亮^{1,2}, 陈凯^{1,2}, 李慧^{2*}, 张晓莉², 刘宇灵², 王佳奇¹, 刘文丛¹

(1. 吉林农业大学 中药材学院, 长春 130118; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选石菖蒲挥发油羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)包合物的制备工艺, 为该部位的有效利用提供参考。方法: 以挥发油包合率、包合物得率和包合物中 α -细辛醚质量分数的综合评分为评价指标, 采用星点设计-效应面法考察包合时间、包合温度、主客体配比对石菖蒲挥发油 HP- β -CD 包合工艺的影响, 以红外光谱法(IR)和气相色谱-质谱法(GC-MS)对该包合物进行质量评价。结果: 石菖蒲挥发油 HP- β -CD 包合物的最佳包合工艺为包合时间 3.85 h, 包合温度 30.06 °C, HP- β -CD 与石菖蒲挥发油投料比 8.69:1。挥发油包合率 79.74%, 包合物得率 87.47%, 包合物中 α -细辛醚质量分数 2.266 mg·g⁻¹。石菖蒲挥发油包合前后 GC-MS 图谱的整体相似度高。结论: IR 和 GC-MS 分析包合物结果证明包合物制备成功, 石菖蒲挥发油在包合前后成分变化不大。星点设计-效应面法适用于石菖蒲挥发油 HP- β -CD 包合物的工艺优化。

[关键词] 石菖蒲; 挥发油; 羟丙基- β -环糊精; α -细辛醚; 红外光谱法; 气相色谱-质谱

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0020-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110020

Optimization of Inclusion Process of Volatile Oil from *Acori Tatarinowii* Rhizoma and Hydroxypropyl- β -cyclodextrin by Central Composite Design-response Surface Methodology

WANG Yue-liang^{1,2}, CHEN Kai^{1,2}, LI Hui^{2*}, ZHANG Xiao-li²,
LIU Yu-ling², WANG Jia-qi¹, LIU Wen-cong¹

(1. College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the preparation process of inclusion complex of volatile oil from *Acori Tatarinowii* Rhizoma and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD). **Method:** Taking composite score of inclusion rate of volatile oil, yield of inclusion complex and the content of α -asarone as index, central composite design-response surface methodology was adopted to optimize inclusion process with inclusion temperature, reaction time, ratio of HP- β -CD and volatile-oil as factors. The quality of inclusion complex was evaluated by infrared spectroscopy (IR) and GC-MS. **Result:** The best process was as follows, inclusion time was 3.85 h, inclusion temperature was 30.06 °C, ratio of HP- β -CD and volatile-oil was 8.69:1. Under these conditions, inclusion rate of volatile oil was 79.74%, yield of inclusion complex was 87.47%, the content of α -asarone in inclusion complex was 2.266 mg·g⁻¹. After inclusion, similarities of GC-MS spectra of volatile oil was high. **Conclusion:** The characterization results of IR and GC-MS proved the generation of inclusion complex. Central composite design-response surface methodology is suitable for optimizing inclusion process of inclusion complex of volatile oil from *Acori Tatarinowii* Rhizoma and HP- β -CD.

[Key words] *Acori Tatarinowii* Rhizoma; volatile oil; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; α -asarone; infrared spectroscopy; gas chromatography-mass spectrometry

[收稿日期] 20151114(005)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题(Z02063);北京市共建项目专项

[第一作者] 王月亮,在读硕士,从事新工艺研究与新药研发,Tel:15911125524,E-mail:376099674@qq.com

[通讯作者] *李慧,博士,研究员,从事中药新剂型、新工艺研究与新药研发,Tel:010-64014411-2957,E-mail:lihuiyiren@163.com

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲的干燥根茎^[1], 主要活性成分为挥发油, 具有较好的益智、脑保护效果, 还能平喘、增强肠管蠕动、抑制吗啡戒断症状等作用^[2-6]。星点设计-效应面法具有实验次数少、精度高、预测值接近真实值等优点^[7-8]。挥发油存在着易挥发、易受外界环境影响的缺点, 在一般制剂中性质不稳定, 水溶性小, 进而会影响药效。环糊精从水中结晶时其空腔充满了水分子, 一部分包裹于环糊精的空腔中, 其余部分则形成完整晶体结构的一部分(即结晶水)。环糊精包合物是包埋的水分子被相应的客分子取代所形成的物质, 可增加药物溶解度, 掩盖挥发油的异味, 提高其生物利用度和患者顺应性^[9-10]。本实验运用星点设计-效应面法优化石菖蒲挥发油羟丙基- β -环糊精包合物的制备工艺, 通过红外光谱法(IR)和气相色谱-质谱法(GC-MS)评价包合物的质量及包合前后挥发油的变化, 为包合工艺用于含挥发性成分的固体制剂生产提供参考。

1 材料

QP2010 型气相色谱-质谱联用仪和 LC20-AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒仪器有限公司), RH basic 型控温型磁力搅拌器(德国 IKA 集团), VERTEX 70 型红外光谱仪(德国 Bruker 公司)。石菖蒲药材于 2015 年 2 月购于安国市昌达中药材饮片有限公司, 经中国中医科学院中药资源中心陈敏研究员鉴定为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* 干燥根茎; α -细辛醚对照品(美国 Sigma 公司, 批号 S18779V), 羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD, 西安德立生物化学有限公司), 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 石菖蒲挥发油的提取 称取石菖蒲药材 1.50 kg, 加 14 倍量水浸泡 30 min, 按 2015 年版《中国药典》挥发油测定法(通则 2204)项下的乙法提取挥发油, 利用水蒸气蒸馏法提取 8 h, 得黄色浓稠油状物(25.5 \pm 1.5) mL, 计算挥发油出油率(1.70 \pm 0.1)%。

2.2 包合物的制备^[11] 将石菖蒲挥发油缓慢加入已饱和的 HP- β -CD 水溶液中, 以 800 r \cdot min⁻¹ 搅拌至包合物表面无挥发油漂浮, 冷藏 24 h, 加无水乙醇洗涤, 40 $^{\circ}$ C 恒温真空干燥 6 h, 得黄白色石菖蒲挥发油的 HP- β -CD 包合物粉末。

2.3 包合物中 α -细辛醚的含量测定^[12]

2.3.1 色谱条件 Kormasil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6

mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-水(56:44), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 257 nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 α -细辛醚对照品适量, 加无水乙醇制成 137.4 mg \cdot L⁻¹ 的溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取包合物适量, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入无水乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 补足失重, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.4 挥发油包合率的测定 精密称取干燥包合物, 置圆底烧瓶中, 加入 20 倍量水, 提取挥发油约 6 h, 至刻度管中挥发油不再增加, 停止加热, 冷却, 读数, 计算。

2.4 包合物中挥发油成分的 GC-MS 分析

2.4.1 检测条件 气相色谱条件为程序升温(初始温度 60 $^{\circ}$ C, 以 3 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 的升温速率升至 140 $^{\circ}$ C, 保持 1 min; 以 2 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 的升温速率升至 190 $^{\circ}$ C, 保持 1 min; 以 40 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 的升温速率升至 230 $^{\circ}$ C, 保持 3 min), 汽化室温度 260 $^{\circ}$ C, 检测器温度 250 $^{\circ}$ C, 进样口温度 230 $^{\circ}$ C, 载气为高纯氦气, 体积流量 1.0 mL \cdot min⁻¹; 质谱条件为电离方式电轰击电离(EI), 电子能量 70 eV, 扫描范围 m/z 35 ~ 500。

2.4.2 包合物供试品溶液的制备 精密量取 2.3.3 项下的滤液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加正己烷定容至刻度, 即得。

2.4.3 未饱和挥发油供试品溶液的制备 精密称取石菖蒲挥发油 0.1 g, 用 20 mL 正己烷萃 3 次, 取正己烷层, 置 100 mL 量瓶中, 加正己烷稀释至刻度, 即得。

2.5 包合工艺的优化 在单因素试验基础上, 设定包合时间、包合温度和 HP- β -CD 与石菖蒲挥发油投料比为自变量, 以挥发油包合率(W_1 , W_1 = 包合物中挥发油的质量/挥发油的投入量), 包合物得率(W_2 , W_2 = 干燥包合物的质量/(HP- β -CD 的质量 + 挥发油的质量)) 和包合物中 α -细辛醚质量分数的总评“归一值”(overall desirability, OD) 为因变量, 权重系数分别为 0.4, 0.3, 0.3。称取石菖蒲挥发油 1.0 g, 共 20 份, 采用星点设计-效应面法优化其 HP- β -CD 包合工艺条件, 试验安排及结果见表 1。

利用 Design-Expert 8.0.6.1 统计软件对表 1 中 OD 进行多元线性回归、二项式拟合和三项式拟合, 获得对自变量 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分别为 OD = 0.80 + 0.054A + 0.038B + 0.017C (P = 0.364 1, 失拟项 P = 0.000 1, R^2 = 0.021 1), OD = 0.94 + 0.054A +

表 1 石菖蒲挥发油 HP-β-CD 包合工艺星点试验分析

Table 1 Central composite test analysis for inclusion process of volatile oil from Acori Tatarinowii Rhizoma and HP-β-CD

No.	A 包合时间 /h	B 包合温度 /°C	C 投料比 /g·g ⁻¹	挥发油包合率 (W ₁)/%	包合物得率 (W ₂)/%	α-细辛醚质量分数 /mg·g ⁻¹	OD /%
1	3	13.18	8:1	53.27	81.81	1.381	71.60
2	4	20	9:1	50.97	81.69	1.108	67.07
3	3	46.82	8:1	79.05	86.08	1.497	87.51
4	3	30	6.32:1	50.85	82.17	1.960	77.54
5	3	30	8:1	74.55	84.90	2.450	96.42
6	2	40	9:1	69.02	86.24	1.731	85.33
7	3	30	9.68:1	65.73	88.15	1.896	86.33
8	2	20	9:1	45.68	76.37	0.955	60.72
9	1.32	30	8:1	34.75	71.17	0.790	51.42
10	4	40	9:1	61.71	83.23	2.007	83.97
11	4	20	7:1	63.18	82.94	1.605	79.72
12	3	30	8:1	72.72	84.83	2.436	95.30
13	3	30	8:1	72.76	85.12	2.390	94.86
14	3	30	8:1	67.34	85.75	2.243	90.54
15	2	40	7:1	52.76	77.45	1.330	69.24
16	3	30	8:1	72.06	84.84	2.466	95.34
17	4.68	30	8:1	41.67	73.51	1.444	63.67
18	3	30	8:1	71.72	85.40	2.385	94.37
19	4	40	7:1	68.10	80.53	1.272	77.34
20	2	20	7:1	53.43	70.90	0.893	62.03

0.038B + 0.017C - 0.022AB + 0.046AC - 0.026BC - 0.050A² - 0.13B² - 0.041C² (P < 0.000 1, 失拟项 P = 0.543 3, R² = 0.978 8), OD = 0.94 + 0.047A + 0.036B + 0.026C - 0.022AB + 0.046AC - 0.026BC - 0.050A² - 0.13B² - 0.041C² + 2.337 × 10⁻³ ABC + 2.038 × 10⁻³ A²B - 0.015 A²C + 0.011 AB² (P < 0.000 1, 失拟项 P = 0.245 3, R² = 0.975 5)。二项式模型拟合最佳, 采用 ANOVA 分析效应面的最佳回归参数, 方差分析见表 2。

方差分析结果显示该二项式拟合模型具有极显著性; 方程的因变量与各自变量之间的线性关系具有显著性, 失拟项不显著, 说明回归方程在整个回归区域内的拟合情况良好。根据 Design-Expert 8.0.6.1 软件对试验结果进行系统分析, 各自变量间等高线图和三维效应曲面图见图 1, 得石菖蒲挥发油 HP-β-CD 最佳包合工艺参数为包合时间 3.85 h, 包合温度 30.06 °C, HP-β-CD 与石菖蒲挥发油投料比 8.69:1。该条件下, OD 预测值 97.30%。

表 2 回归模型方差分析

Table 2 Analysis of variance for regression model

变异来源	SS	f	F	P
模型	0.35	9	98.62	<0.000 1
A	0.039	1	98.65	<0.000 1
B	0.019	1	48.81	<0.000 1
C	4.06 × 10 ⁻³	1	10.23	0.009 5
AB	3.75 × 10 ⁻³	1	9.45	0.011 8
AC	0.017	1	42.39	<0.000 1
BC	5.42 × 10 ⁻³	1	13.68	0.004 1
A ²	0.036	1	89.65	<0.000 1
B ²	0.23	1	590.52	<0.000 1
C ²	0.025	1	61.79	<0.000 1
残差	3.97 × 10 ⁻³	10		
失拟项	1.88 × 10 ⁻³	5	0.90	0.543 3
纯误差	2.08 × 10 ⁻³	5		
总和	0.36	19		

2.6 验证试验 取石菖蒲挥发油 0.5 g, 精密称定,

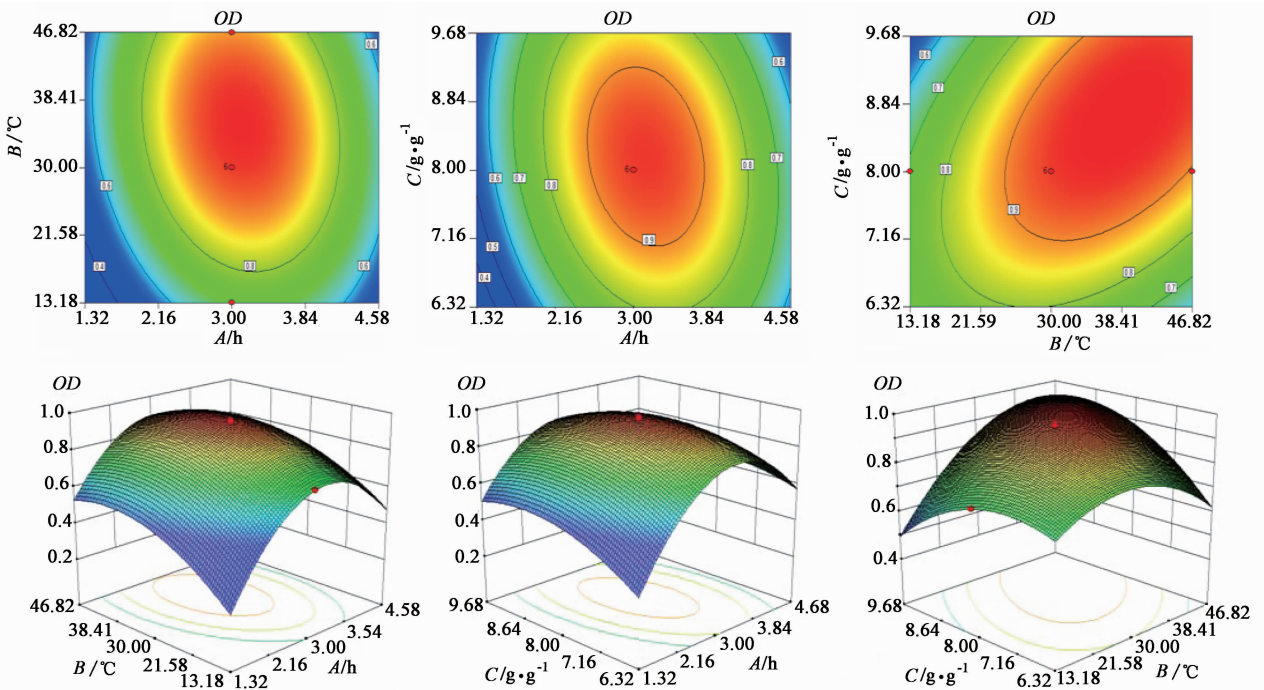


图 1 包合时间、包合温度和投料比对石菖蒲挥发油 HP-β-CD 包合工艺影响的等高线和响应面

Fig.1 Contour lines and response surfaces of effects of inclusion time, inclusion temperature and ratio on inclusion process of volatile oil from *Acori Tatarinowii Rhizoma* and HP-β-CD

按优选的工艺条件进行包合,平行 3 组,结果 W_1 分别为 80.25%, 79.06%, 79.91%, W_2 依次为 89.07%, 85.89%, 87.45%, 包合物中 α -细辛醚质量分数分别为 2.209, 2.356, 2.234 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 表明优选的包合工艺稳定可行。

2.7 挥发油包合物的质量评价

2.7.1 IR 分析^[9-11] 采用 KBr 压片法。分别对石菖蒲挥发油, HP-β-CD, 石菖蒲挥发油包合物样品红外区吸收峰的变化进行分析, 见图 2。结果显示石菖蒲挥发油特征吸收峰在 1 000 ~ 1 800 cm^{-1} 处, 而在石菖蒲挥发油 HP-β-CD 包合物中这些吸收峰已经消失或明显减弱, 表明包合物已经形成。

2.7.2 GC-MS 检测 取 2.3.3 和 2.4.2 项下样品, 按 2.4 项下方法检测, 见图 3。以“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版) 进行相似度评判, 结果二者相似度 0.963, 表明包合前后的 GC-MS 图谱的整体相似度高, 说明石菖蒲挥发性成分在包合前后变化不大。挥发油包合后 α -细辛醚, β -细辛醚, γ -细辛醚, 菖蒲酮和甲基丁香酚等高沸点且含量高的主要成分均存在, 而 20 min 之前的 α -派烯, 菝烯, β -派烯, 柠檬烯, 桉油醇等低沸点且含量较少的成分有所损失。

3 讨论

挥发油在石菖蒲药材中起到主要药效作用。目

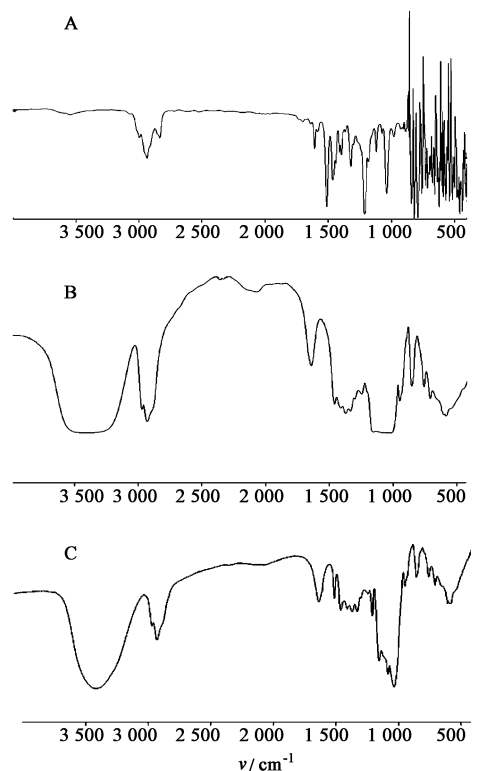


图 2 石菖蒲挥发油 (A), HP-β-CD (B) 和石菖蒲挥发油 HP-β-CD 包合物 (C) 的 IR

Fig.2 IR spectra of volatile oil from *Acori Tatarinowii Rhizoma* (A), HP-β-CD (B) and inclusion complex (C)

前, 石菖蒲挥发油的包合技术多以挥发油包合率为

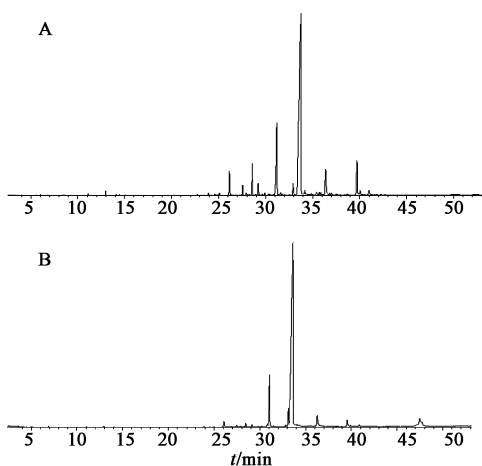


图 3 石菖蒲挥发油包合前(A)和包合后(B)的 GC-MS 总离子流
Fig. 3 Total ion chromatograms of volatile oil from Acori Tatarinowii Rhizoma before (A) and after (B) inclusion

指标进行正交试验或单因素试验筛选包合工艺^[13-17],本文采用星点设计-效应面法优选,虽然实验次数较多,但其优选的数学模型具有良好预测性,能更精确地找出整个区域上因素的最佳组合和响应值。本文采用 IR 证明挥发油与 HP- β -CD 形成包合物,GC-MS 分析包合前后挥发性成分的变化,通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对包合效果进行评价,结果发现包合前后挥发油成分变化不大。

本文以挥发油包合率、包合物得率、包合物中 α -细辛醚质量分数的综合评分为指标,根据各指标的重要程度给予权重评分,采用加权处理,得到综合评分数据,使最终优化结果既能体现包合工艺的整体性,又能分别反映包合物中各评价指标的优劣。在实验过程中应注意挥发油具有易挥发的特点,所以包合挥发油操作时尽量使系统达到密封,包合物干燥时温度不易过高、时间不宜过长。此包合工艺将石菖蒲中挥发油成分制成包合物,可使不稳定的液体粉末化,原挥发油药物的稳定性得到改善,可掩盖挥发油在制剂中的异味,增加其在水中的溶解性。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:91-92.
[2] Liang S, Ying S S, Wu H H, et al. A novel sesquiterpene and three new phenolic compounds from the rhizomes of *Acorus tatarinowii* Schott[J]. Bioorg Med Chem, 2015, 25(19):4214-4218.
[3] Zhu M, Zhu H, Tan N, et al. The effects of *Acorus tatarinowii* Schott on 5-HT concentrations, TPH2

and 5-HT1B expression in the dorsal raphe of exercised rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, doi: 10.1016/j.jep.2014.10.026.

[4] Dong H, Gao Z, Rong H, et al. β -asarone reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior and promotes hippocampal neurogenesis in rats[J]. Molecules, 2014, 19(5):5634-5649.
[5] Yang Y X, Chen Y T, Zhou X J, et al. Beta-asarone, a major component of *Acorus tatarinowii* Schott, attenuates focal cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2013. doi:10.1186/1472-6882-13-236.
[6] 滕坤,阮洪生,武子敬,等.星点设计-响应面法优选藤梨根中总黄酮的提取工艺研究[J].中国现代应用药学,2012,29(7):610.
[7] 郑德俊,潘娅.马钱子碱羟丙基- β -环糊精包合前后对佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀度的作用比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(1):174-177.
[8] 吴波,任静,杨妍,等.薄荷油-羟丙基- β -环糊精包合物的制备与验证[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):25-27.
[9] 魏刚,方永奇,刘东辉,等.GC-MS 建立石菖蒲挥发油特征指纹图谱方法学研究[J].中国中医药杂志,2004,29(8):764-767.
[10] 詹国平,都丽.艾叶挥发油-羟丙基- β -环糊精包合物的制备[J].合成化学,2010,18(4):493-496.
[11] 朱纓,俞迪佳.蛇床子挥发油羟丙基- β -环糊精包合工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(17):28-31.
[12] 柳梦婷,方婧,吴宏伟,等.高效液相色谱法同时检测石菖蒲中 β -细辛醚、 α -细辛醚的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):75-78.
[13] 王晓丽,黄海涛,蔡德富,等.石菖蒲挥发油 β -环糊精包合物的制备[J].齐齐哈尔医学院学报,2011,32(2):169-172.
[14] 杨小催,柯雪红,陈锦富,等.石菖蒲挥发油包合工艺及包合物稳定性研究[J].中药新药与临床药理,2010,21(2):202-205.
[15] 柯瑜,倪健,姚珏成.石菖蒲挥发油提取及包合工艺的优选[J].中成药,2006,28(9):1271-1274.
[16] 蒋丽君,夏新华.石菖蒲挥发油与 β -环糊精包合物的制备工艺研究[J].中国中药杂志,2001,26(2):109-111.
[17] 周明哲,王嗣岑,陈湘,等.石菖蒲水蒸气蒸馏提取物和超临界提取物的 GC-MS 分析[J].药物分析杂志,2010,30(2):185-189.

[责任编辑 刘德文]