

加味苓桂术甘汤中挥发性成分 β -环糊精包合工艺的优化

顾思浩¹, 李宁¹, 李玲^{2*}, 王冰², 张彤^{2*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203)

摘要: 目的 优化加味苓桂术甘汤中挥发性成分 β -环糊精包合工艺。方法 以芳香水与 β -环糊精比例、包合温度、包合时间为影响因素, 桂皮醛包合率、包合物得率为评价指标, 正交试验优化包合工艺。结果 最佳条件为芳香水与 β -环糊精比例 10:1, 包合温度 40℃, 包合时间 1h, 桂皮醛包合率 72.06%, 包合物得率 83.73%。结论 该方法合理可行, 可用于 β -环糊精包合加味苓桂术甘汤中挥发性成分。

关键词: 加味苓桂术甘汤; 挥发性成分; β -环糊精包合工艺; 正交试验

中图分类号: R94

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2039-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.004

Optimization of β -cyclodextrin inclusion process for volatile constituents in Supplemented Lingui Zhugan Decoction

GU Si-hao¹, LI Ning¹, LI Ling^{2*}, WANG Bing², ZHANG Tong^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Experiment Center for Teaching and Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

KEY WORDS: Supplemented Lingui Zhugan Decoction; volatile constituents; β -cyclodextrin inclusion process; orthogonal test

苓桂术甘汤处方源自《金匮要略》, 是温阳利水代表方之一, 能显著减轻非酒精性脂肪肝的症状^[1]。上海中医药大学季光教授在该方基础上加入五味子, 得到加味苓桂术甘汤, 而且五味子有收涩、益气等功效, 可抑制脂肪过氧化, 进而保护肝脏^[2], 共奏全方健脾利水、温阳化饮之功效, 方中温阳药桂枝的有效成分有桂皮醛、肉桂酸、香豆素、原儿茶酸等^[3], 其中桂皮醛有明显抗氧化、抗炎^[4]、抗病毒活性^[5], 以及镇痛、镇静作用, 同时具有不稳定、易挥发的特性^[6-7], 按古方提取工艺煎煮药材后所得药液中其转移率约为 10%, 但现代制剂中均有浓缩与干燥工艺测得浓缩液与浸膏粉中不含该成分。因此, 为了提高桂皮醛的稳定性, 尽可能还原古方提取效果, 保证加味苓桂术甘

汤疗效, 本实验对该方包合工艺进行研究。

采用挥发油收集装置收集挥发油时, 易产生不溶于水和油的白色絮状物, 油水分离困难, 只能收集到芳香水而得不到挥发油。因此, 本实验收集芳香水来代替挥发油, 并优化 β -环糊精包合工艺, 以期加味苓桂术甘汤相关新药上市奠定理论依据, 同时为含有挥发性成分中药的包合方法提供新思路。

1 材料

Agilent 1200 series 高效液相色谱仪 [安捷伦科技(中国)有限公司]; Welchrom C₁₈ 色谱柱 [月旭科技(上海)股份有限公司]; DF 型集热式磁力搅拌器 (上海予申仪器有限公司); JA31002 型电子精密天平 (上海精天电子仪器有限公司);

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 国家科技重大专项 (2017ZX0201010-014-014); 上海市中医药事业发展三年行动计划 ZY (2018-2020) (CCX-2001-04); 上海市科委科研项目 (17401902300)

作者简介: 顾思浩 (1995—), 男, 硕士生, 从事中药新药研究。E-mail: angus_2017@163.com

* 通信作者: 李玲 (1990—), 女, 硕士, 实验师, 从事中药新药研究。Tel: (021) 51322315, E-mail: liling_sh@163.com

张彤 (1972—), 男, 博士, 教授, 从事中药制剂及中药分析技术研究。Tel: (021) 51322318, E-mail: zhangtdmj@163.com

DZF-6050型真空干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); KH-400KDB型台式高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); BS124S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; XS105型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

五味子(批号160426)、桂枝(批号151231、160505)、茯苓(批号160220)、白术(批号160104)、甘草(批号160114)购自上海康桥中药饮片有限公司,经上海中医药大学高级实验师李俊松鉴定为正品。桂皮醛(批号110710-201418)购自中国食品药品检定研究院;β-环糊精(批号20160108)购自国药集团化学试剂有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯,购自安徽时联特种溶剂股份有限公司;其余试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 芳香水提取 称取12倍处方量饮片,8倍量水浸泡30 min后水煎提取5 h,即得,芳香水收集装置收集。

2.2 包合物制备 称取β-环糊精,加入相应量芳香水中,在规定时间内恒温搅拌后溶液冷却至室温,4℃下冷藏24 h后取出,滤过,弃去滤液,滤渣置于在40℃烘箱中干燥4 h,得到白色固体,对其进行研磨,即得,计算包合物得率(芳香水中挥发油量以桂枝中挥发油含有量计),公式为得率 = $[W_{\text{包合物}} / (W_{\beta\text{-环糊精}} + W_{\text{芳香水中挥发油}})] \times 100\%$ 。

2.3 包合率测定 精密量取“2.1”项下芳香水提液0.5 mL,50%甲醇定容至5 mL,微孔滤膜过滤,HPLC法测定桂皮醛含有量;精密称取“2.2”项下包合物0.1 g,置于50 mL锥形瓶中,精密量取25 mL 70%甲醇,加入锥形瓶中,超声(功率250 W、频率40 kHz)30 min,过微孔滤膜,HPLC法测定桂皮醛含有量,计算包合率,公式为包合率 = $(W_{\text{包合物中桂皮醛}} / W_{\text{芳香水中桂皮醛}}) \times 100\%$ 。

2.4 桂皮醛含有量测定

2.4.1 色谱条件^[8] Welchrom C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相0.05%磷酸-乙腈(38:62);检测波长290 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;进样量10 μL。

2.4.2 对照品溶液制备 精密称取桂皮醛对照品452.31 mg,乙腈定容于10 mL量瓶中,即得。

2.4.3 供试品溶液制备 取“2.2”项下包合物0.1 g,70%甲醇超声30 min后定容至25 mL,

即得。

2.4.4 阴性样品溶液制备 按处方称取不含桂枝的药材,按“2.1”项下方法提取,“2.2”项下方法包合,“2.4.3”项下方法制备,即得。

2.4.5 线性关系考察 精密移取对照品溶液,70%甲醇稀释至4.496、83.99、22.48、89.92、224.8 μg/mL,在“2.4.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得方程为 $Y = 104.86X + 36.60$ ($r = 0.9999$),在4.496~224.8 μg范围内呈现良好的线性关系。

2.4.6 专属性考察 吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各10 μL,在“2.4.1”项色谱条件下进样测定,结果见图1,可知阴性无干扰,方法专属性良好。

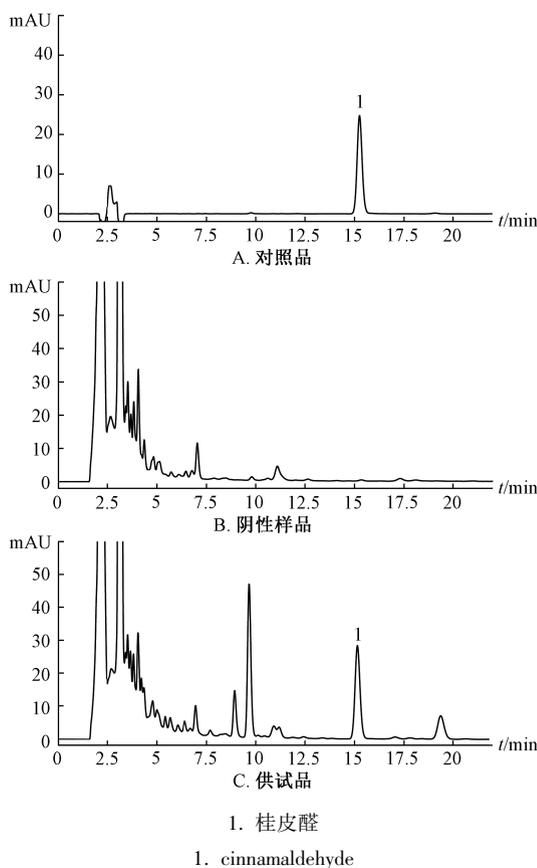


图1 桂皮醛HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of cinnamaldehyde

2.5 正交试验

2.5.1 包合温度筛选 称取β-环糊精适量,80℃水浴溶解,制成饱和溶液,降温至指定温度(30、50、70℃)。精密量取芳香水100 mL,缓慢加到β-环糊精饱和溶液中,在相应温度下恒温800 r/min搅拌1 h,冷却至室温,4℃下冷藏24 h后取出,滤

过, 弃去滤液, 滤渣置于 40 °C 烘箱中干燥 4 h, 得到白色固体, 对其进行研磨, 即得包合物, 分别按“2.2”“2.3”项下方法计算桂皮醛包合率、包合物得率, 结果见表 1。由表可知, 温度越高, 包合率越低, 推测可能是高温下分子运动过于剧烈, 导致部分脱包合现象的发生, 降低包合效果; 温度越低, 包合物得率也有所下降, 推测可能是低温下底物反应与溶解不充分所致^[9-10], 由于包合温度 50 °C 时包合效果最佳, 故选择 40、50、60 °C 进行考察。

表 1 包合温度筛选结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Results of inclusion temperature screening ($\bar{x}\pm s$)

温度/°C	桂皮醛包合率/%	桂皮醛包合物得率/%
30	63.15±0.83	16.01±0.09
50	54.97±0.53	75.20±0.85
70	49.84±0.59	92.59±0.81

2.5.2 芳香水与 β-环糊精比例筛选 按比例 (芳香水: β-环糊精=5:1、10:1、20:1) 称取一定量 β-环糊精, 80 °C 水浴加热溶解, 制成饱和溶液, 缓慢降温至 50 °C。精密量取芳香水 50 mL, 缓慢加入 β-环糊精饱和溶液中, 恒温 800 r/min 搅拌 1 h, 结束后放至室温, 置于 4 °C 冰箱中冷藏 24 h, 取出, 滤过, 弃去滤液, 滤渣置于 40 °C 烘箱中干燥 4 h, 得到白色固体, 对其进行研磨, 即得包合物, 分别按“2.2”“2.3”项下方法计算桂皮醛包合率、包合物得率, 结果见表 2。由表可知, 两者比例为 5:1、10:1 时包合效果差异不大, 而 20:1 时不理想, 故选择 5:1、10:1、15:1 进行考察。

表 2 芳香水与 β-环糊精比例筛选结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Results of aromatic water- (β-cyclodextrin) ratio screening ($\bar{x}\pm s$)

芳香水: β-环糊精	桂皮醛包合率/%	桂皮醛包合物得率/%
5:1	55.60±0.18	88.25±0.96
10:1	55.88±0.16	77.85±0.73
20:1	49.24±0.45	58.21±0.69

2.5.3 包合方法筛选^[11]

方法 1: 称取 β-环糊精 5 g, 80 °C 水浴加热溶解, 制成饱和溶液, 缓慢降温至 50 °C。精密量取芳香水 50 mL, 缓慢加入饱和溶液中, 恒温 800 r/min 搅拌 1 h 后冷却至室温, 置于 4 °C 冰箱中冷藏 24 h, 取出, 滤过, 弃去滤液, 滤渣置于 40 °C 烘箱中干燥 4 h, 得到白色固体, 对其进行研磨, 即得包合物。

方法 2: 称取 β-环糊精 5 g, 加入 50 mL 芳香水中, 50 °C 水浴恒温 800 r/min 搅拌 1 h, 冷却至室温, 置于 4 °C 冰箱中冷藏 24 h, 取出, 滤过, 弃去滤液, 滤渣置于 40 °C 烘箱中干燥 4 h, 得到白色固体, 对其进行研磨, 即得包合物。

分别按“2.2”“2.3”项下方法计算桂皮醛包合率、包合物得率, 结果见表 3。由表可知, 方法 2 所得包合率、包合物得率显著高于方法 1 ($P<0.05$, $P<0.01$), 故选择该方法进行包合。

表 3 包合方法筛选结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Tab. 3 Results of inclusion method screening ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

方法	桂皮醛包合率/%	桂皮醛包合物得率/%
1	55.88±0.02	77.85±1.98
2	75.12±0.54**	85.89±0.38*

注: 与方法 1 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.5.4 工艺优化 在单因素试验基础上, 以芳香水与 β-环糊精比例 (A)、包合温度 (B)、包合时间 (C) 为影响因素, 包合率、包合物得率为评价指标, 选用四因素三水平正交表设计试验。因素水平见表 4, 结果见表 5, 方差分析结果见表 6。

表 4 因素水平

Tab. 4 Factors and levels

水平	因素		
	A 芳香水: 环糊精	B 包合温度/°C	C 包合时间/h
1	5:1	40	1
2	10:1	50	2
3	15:1	60	3

表 5 试验设计及结果

Tab. 5 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D (误差)	指标		
					桂皮醛包合率/%	桂皮醛包合物得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	75.41	93.44	100.00
2	1	2	2	2	68.40	91.88	93.75
3	1	3	3	3	68.39	92.75	94.12
4	2	1	2	3	71.45	83.65	92.66
5	2	2	3	1	71.64	84.45	93.15
6	2	3	1	2	62.92	85.03	86.46
7	3	1	3	2	74.50	75.14	91.44
8	3	2	1	3	73.01	73.58	89.59
9	3	3	2	1	67.70	71.95	84.66
k_1	95.957	94.700	92.017	92.603	—	—	—
k_2	90.757	92.163	90.357	90.550	—	—	—
k_3	88.563	88.413	92.903	92.123	—	—	—
R	7.394	6.287	2.546	2.053	—	—	—

注: 综合评分 = 桂皮醛包合率/最大值 × 0.6 × 100 + 桂皮醛包合物得率/最大值 × 0.4 × 100

表6 方差分析

Tab. 6 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	86.512	2	12.498	19.000	>0.05
B	660.019	2	8.671	19.000	>0.05
C	10.027	2	1.449	19.000	>0.05
D	6.920	2	—	—	—

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$

由表5可知,各因素影响程度依次为 $A > B > C$ 。由表6可知,各因素均无显著影响 ($P > 0.05$),从减少药物服用量角度出发,选择 A_2 ; 根据表5结果,选择 B_1 ; 考虑到节约能源,选择 C_1 。最终确定,最优工艺为 $A_2B_1C_1$,即芳香水与 β -环糊精比例 10 : 1,包合温度 40 $^{\circ}C$,包合时间 1 h。

2.5.5 验证试验 按“2.5.4”项下优化工艺进行包合,平行3批,测得桂皮醛包合率为 72.06% (RSD = 2.13%),包合物得率为 83.73% (RSD = 0.84%),可知工艺稳定,重复性好,具有可行性。

2.6 TLC 检测^[12-15] 为了验证芳香水中挥发性成分是否包合于 β -环糊精内部,采用 TLC 法进行检测。芳香水中加入石油醚搅拌,静置取上清液,得到供试品 a; 称取一定量包合物,加入石油醚振摇,静置后取上清液,得到供试品 b; 称取一定量包合物,70% 甲醇超声进行脱包合,得到供试品 c; 称取一定量 β -环糊精加入石油醚振摇,静置后取上清液,得到阴性供试品 d; 取一定量芳香水、 β -环糊精,搅拌混合均匀后加石油醚振摇,静置后取上清液,得到供试品 e,按照 2015 版《中国药典》薄层色谱法,毛细管吸取上述 5 种供试品溶液各 2 μL ,点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯:石油醚 (60~90 $^{\circ}C$) (3 : 17) 为展开剂,展开,取出,晾干,喷以二硝基苯肼乙醇试液,结果见图 2。由图可知, a、c、e 在相同位置显示黄色斑点,为桂枝挥发性成分; b、d 在相同位置无斑点,表明包合物表面无挥发性成分残留,包合过程中包合物性质未发生变化,而且成分均进入 β -环糊精分子。

3 讨论

研究表明,桂枝可促进脂肪代谢^[1,16],主要有效物质为挥发油,含有量约为 1%,组成复杂,以桂皮醛为主^[17-18]。预实验研究表明,125 g 桂枝提取得到挥发油 0.2 mL,查阅文献发现,桂枝经过水蒸气蒸馏法提取后挥发油得率约为 0.25%,而且操作复杂^[19]; 采用挥发油提取器提取时,挥发油密度与水接近,水油分离效果不佳^[20],同时在



注: a~e 分别为芳香水上清液、包合物上清液、脱包合溶液、环糊精上清液、物理混合物上清液

图2 样品 TLC 色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of samples

提取过程中易产生不溶于水和油的白色絮状物^[21]; 本实验采用芳香水提取器收集芳香水,未发现明显分层,故以其代替挥发油。

芳香水在包合搅拌过程中,应盖上保鲜膜密封以减少挥发油损失,加入环糊精饱和溶液时可再滴加少量有机溶剂,可使挥发油分散更加完全,有利于包合^[22]。本实验比较了芳香水缓慢滴入环糊精饱和溶液搅拌、环糊精加入芳香水搅拌 2 种制备方法,发现后者所得包合物中桂皮醛包合率、包合物得率更高。通过 TLC 法可确定,挥发性成分经 β -环糊精包合后进入包合物内部,可有效地减少其与外界的接触,从而提高制剂稳定性。

包合物得率不能全面代表挥发性成分包合情况,仅对制剂剂量和稳定性有一定影响^[23],该指标过高将导致后续服用量大,会对相关制剂上市和患者顺应性产生影响。本实验发现,芳香水与 β -环糊精比例、包合温度、包合时间均无明显影响,从减少药物服用量角度考虑,未选择评分最高的水平,而是采用第二水平 (芳香水 : 环糊精 = 10 : 1),此时桂皮醛包合率较高,包合物得率较低,能有效减少服用量; 以节约能源为出发点,选择最短的包合时间,更符合相关制剂研发和上市的实际需求。

同时,所优化的加味苓桂术甘汤中挥发性成分 β -环糊精包合工艺有以下优点: (1) 对于油水分离困难、无法收集到挥发油的中药组分,可直接提取芳香水,而无需通过繁复的纯化操作继续提纯挥发油,操作更便捷; (2) 包合工艺易于操作,重

复性高,芳香水无需浓缩,β-环糊精直接加入,耗时更短,包合温度更低,环糊精用量更少;(3)所得包合物中挥发性成分包合率、包合物得率更高;(4)保留了处方中水溶性、挥发性成分,更接近经典方剂临床服用的真实状态。

参考文献:

[1] 柳涛,杨丽丽,张莉,等.不同治法复方防治非酒精性单纯性脂肪肝的效应差异[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(10): 1120-1126.

[2] 颜志婷,肖冬梅,陈杰.南五味子多糖急性毒性及对小鼠肝损伤保护作用机理探讨[J]. 江西医药, 2018, 53(2): 147-149.

[3] 袁鹏飞,高明英,蔡少青.桂枝、肉桂化学成分指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2917-2921.

[4] Song F, Li H, Sun J, et al. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1): 125-130.

[5] 刘蓉,武志强,何敏,等.桂枝挥发油与桂皮醛对病毒性肺炎小鼠细胞因子及T细胞亚群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 139-143.

[6] Yao Y, Huang H Y, Yang Y X, et al. Cinnamic aldehyde treatment alleviates chronic unexpected stress-induced depressive-like behaviors via targeting cyclooxygenase-2 in mid-aged rats [J]. *J ethnopharmacol*, 2015, 162: 97-103.

[7] 马悦颖,李沧海,李兰芳,等.桂皮醛解热镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(12): 1336-1339.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 276.

[9] 王慧竹,朱文静,石琳,等.星点设计-响应面法优化月见草油-β-环糊精包合物的制备工艺[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 211-215; 232.

[10] 库尔班江·巴拉提. 槲皮素环糊精包合物的制备工艺及溶

解性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2426-2434.

[11] 朱晗,周晶,董盼盼,等.正交试验法优选细辛挥发油β-环糊精包合工艺[J]. 数理医药学杂志, 2016, 29(12): 1805-1808.

[12] 刘宇,殷中琼,魏琴,等.油樟叶挥发油β-环糊精包合物的制备工艺研究及稳定性考察[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13): 2105-2108.

[13] 张艳军,王永香,孟瑾,等.连翘、薄荷混合挥发油β-环糊精包合物的制备工艺研究[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2016, 18(3): 532-536.

[14] 相聪坤,张静宜,李佳佳,等.白术、桂枝挥发油β-环糊精包合工艺研究及其包合物评价[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(1): 46-51.

[15] 周晶,李玲,崔冬雪,等.正交试验法优选葛根复方中挥发油的β-环糊精包合工艺[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 105-108.

[16] Zhang Q Y, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.

[17] 徐世军,沈映君,解宇环.桂枝挥发油的抗炎作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 186-189.

[18] 徐锋,王德健,曾南.桂枝挥发油化学成分的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 532-541.

[19] 黄鹤归,叶晓川,田连起,等.超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法提取桂枝-干姜药对的化学成分比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 85-92.

[20] 石婷婷,陈翠微,吴鑫,等.桂枝和肉桂混合挥发油的包合工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(2): 711-713.

[21] 苏锦.不同贮存期的桂枝生品与炮制品的质量研究[J]. 中药材, 2001, 24(4): 260-262.

[22] 张壮丽,王亚飞,荣晓哲,等.鱼腥草挥发油羟丙基-β-环糊精包合物的制备[J]. 中成药, 2017, 39(5): 926-933.

[23] 李陆军,张彦雨,李芊绵,等.正交试验优选通窍明目合剂提取工艺的研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(4): 45-47.