

基于多指标综合评分法优选理气活血方挥发油提取包合工艺

柳兰, 李雅*, 易丽娟, 邹苏兰, 彭仕杰(湖南中医药大学中药学重点学科, 长沙 410208)

摘要: 目的 研究 β -环糊精包合理气活血方混合挥发油的最佳工艺。方法 采用饱和水溶液法和研磨法对混合挥发油进行包合, 通过正交试验设计对包合工艺条件进行优选, 通过熵权法确定各指标的权重系数, 采用薄层色谱法、红外光谱法对包合物进行验证。结果 最佳包合方法是饱和水溶液法, 挥发油和 β -环糊精的比例为 1:10, 转速为 50 r·min⁻¹, 温度为 40 ℃。结论 优选的包合工艺操作简便、工艺稳定、挥发油包合率和包合物得率高。

关键词: 挥发油; β -环糊精包合; 正交试验

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)11-1358-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.009

引用本文: 柳兰, 李雅, 易丽娟, 等. 基于多指标综合评分法优选理气活血方挥发油提取包合工艺[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1358-1362.

Optimization Extraction and Inclusion Process of Liqi Huoxue Recipe Volatile Oil Based on Multiple Index Comprehensive Evaluation Method

LIU Lan, LI Ya*, YI Lijuan, ZOU Sulan, PENG Shijie(Key Subjects of Pharmacy in Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the the preparation process of the mixed volatile oil of Liqi Huoxue Recipe wrapped with β -cyclodextrin. **METHODS** Saturated aqueous solution method and grinding method were used to encapsulate the mixed volatile oil. The optimum encapsulation method was selected. The encapsulation conditions were optimized by orthogonal design. The weight coefficients of each index were determined by entropy weight method. Inclusion complexes were verified by TLC and IR. **RESULTS** The best inclusion method was saturated aqueous solution method. The ratio of volatile oil to β -cyclodextrin was 1:10, the rotational speed was 50 r·min⁻¹, and the temperature was 40 ℃. **CONCLUSION** The optimized inclusion process is simple, stable and has high inclusion rate and high yield of volatile oil.

KEYWORDS: volatile oil; β -cyclodextrin inclusion; orthogonal test

理气活血方是一种治疗冠心病的复方颗粒剂, 主要由川芎、郁金、木香、枳壳等药组成。复方中川芎、郁金、枳壳、木香主要有效成分为挥发油, 传统工艺煎煮药材中的挥发油部分容易损失, 4 种挥发油为活血行气的主要药效成分, 但对空气和温度敏感, 易发生氧化, 且制剂及存储过程中易发生挥发。为提高复方挥发油制剂的稳定性, 本实验通过水蒸气蒸馏法^[1]收集挥发油, 以 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)为包合材料, 对川芎、枳壳、郁金和木香挥发油进行包合, 通过正交试验优化挥发油的包合最佳工艺条件^[2], 采用综合评分法评判^[3-4], 优选挥发油包合最佳方法, 采用红外光谱、薄层色谱法验证包合物的形成, 以优化 β -CD 包合理气活血方的工艺, 使挥发油稳定地保留在成药中, 以保证制剂质量及临床疗效。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PSA06R-120 型电子天平(东莞达宏电子有限公司); 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); 101 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司); Tanon-1600 紫外仪(365 nm, 上海天能公司); Transilluminator-2020D 紫外仪(254 nm, 北京天能公司); Nicolet-iS5 红外光谱仪(上海历晶科学仪器有限公司)。

1.2 试药

川芎(批号: 170202; 产地: 安徽)、郁金(批号: 170901; 产地: 四川)、枳壳(批号: 171101; 产地: 湖南)、木香(批号: 170301; 产地: 云南)均购于湖南新汇制药股份有限公司, 经湖南中医

基金项目: 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目; 湖南中医药大学一流学科建设项目(4901-0200002006)

作者简介: 柳兰, 女, 硕士生 Tel: (0731)88458000 E-mail: 372119436@qq.com 通信作者: 李雅, 女, 博士, 副教授, 硕士 Tel: (0731)88458000 E-mail: 350085259@qq.com

药大学药学院中药鉴定生药教研室主任龚力民副教授鉴定为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根, 伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 姜科植物温郁金 *Curcuma zenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根和芸香科植物酸橙枳壳 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取

根据前期实验, 4 种挥发油混合物按照中国药典 2015 年版四部挥发油测定法(乙法)测定^[5], 以处方量比例 27 倍量取药材, 置于 10 000 mL 圆底烧瓶中, 加入 6 倍量的水和数粒玻璃珠, 浸泡 1 h。自测定器上端加水, 直至水满溢入烧瓶为止, 再用移液管加入二甲苯 1 mL, 然后连接冷凝管。将装置置于电热套中, 加热适当时间, 沸腾后, 调小加热程度, 保持微沸 6 h 后, 停止加热, 读取二甲苯的容积, 自油层量减去二甲苯量, 即为挥发油量。

2.2 包合工艺的研究

2.2.1 制备方法考察 β -CD 包合物的常用制备方法主要有饱和水溶液法和研磨法, 分别采用 2 种方法对混合挥发油进行包合, 优选出最佳包合方法。

2.2.2 包合率的测定 将“2.2.1”中所得的干燥 β -CD 包合物置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 按中国药典 2015 年版四部挥发油测定法(乙法)提取^[5], 计算其挥发油包合率和包合物回收率, 并记录, 结果见表 1。

挥发油包合率(%)=(包合物实际含油量/挥发油投入量)×100%

包合物收率(%)=[包合物实际质量/(β -CD 质量+投油量)]×100%

表 1 2 种包合方法的比较($n=3$)

Tab. 1 Comparison of two methods of inclusion ($n=3$)

包合方法	挥发油包合率/%	包合物回收率/%
饱和水溶液法	70.00	75.47
研磨法	60.00	47.13

由表 1 可知, 挥发油包合率和包合物回收率均为饱和水溶液法>研磨法。可以得出: 饱和水溶液法的包合效果较好, 故做正交试验时采用饱和水溶液法制备包合物, 优化 β -CD 包合理气活血方的工艺。

2.3 正交试验优选 β -CD 包合物的制备工艺

2.3.1 权重系数的考察 熵是表征系统无序程度的物理量, 当系统的无序程度越小, 它的值越小。在本研究指标中, 各评价因素的相对重要性各不相同, 根据方案中各指标值的差异程度来确定各指标的权重。当某项指标值相差越大时, 则评价指标能够提供的有效信息就会越大, 那么其熵值也就越小, 权重也就相应变小。

①标准化数据: 针对定量指标数据, 考虑到数量级不同, 因此要对指标进行无量纲化处理。本研究采取的标准化方式如下所示:

$$Y_{ij} = \frac{x_{ij} - \min\{x_{ij}\}}{\max\{x_{ij}\} - \min\{x_{ij}\}}$$

②对标准化数据进行归一化: 即计算第 j 项指标下第 i 项评价项目指标值所占的比重 f_{ij} 。

$$f_{ij} = Y_{ij} / \sum_{i=1}^n Y_{ij}$$

③求各指标的信息熵: 根据信息论中信息熵的定义, 一组数据的信息熵 $E_j = -\ln(m)^{-1} \sum_{i=1}^n f_{ij} \ln(f_{ij})$, 当 $f_{ij}=0$, 考虑到 $\ln(f_{ij})$ 无意义。因此对 f_{ij} 的计算进行修正, 将其定义为 $\lim_{f_{ij} \rightarrow 0} f_{ij} \ln(f_{ij}) = 0$ 。

④确定各指标权重: 根据信息熵的计算公式, 计算出各个指标的信息熵为 $E_1, E_2, \dots, E_m$ 。通过信息熵计算各指标的权重:

$$W_j = \frac{1 - E_j}{m - \sum_{j=1}^m E_j}, (j=1, 2, \dots, m)$$

2.3.2 正交设计试验^[6] 采用饱和水溶液法, 选取 β -CD 与挥发油的配比、温度、转速 3 个因素, 各取 3 个水平进行 $L_9(3^3)$ 正交试验, 因素水平见表 2。取挥发油 1 mL, 用等量的无水乙醇稀释成 50% 的溶液, 共 9 份, 按正交试验表中挥发油和 β -CD 的比例制备包合物, 然后按中国药典 2015 年版四部挥发油测定法(乙法)测定包合物中实际含油量, 计算挥发油包合率。以挥发油包合率、包合物回收率为指标^[7-8], 其中包合率为首要考察对象, 权重系数为 0.555 9, 包合物回收率权重系数为 0.444 1, 按照测量值和各自的权重系数, 对每次实验进行综合评分, 算出最佳工艺方法。

综合评分=挥发油包合率评分+包合物回收率评分

挥发油包合率评分= $\frac{\text{挥发油包合率}}{\text{挥发油包合率最大值}} \times 100 \times 0.5559$

包合物回收率评分= $\frac{\text{包合物回收率}}{\text{包合物回收率最大值}} \times 100 \times 0.4441$

由表 3 可知,采用最优工艺 A₂B₂C₂(挥发油:β-CD 比例为 1:10,转速为 50 r·min⁻¹,温度为 40℃)进行提取综合评分较高。

由表 4 可知,不同的挥发油:β-CD 比例综合评分有显著性、不同的转速综合评分显著性不大、不同的温度综合评分有显著性。

表 2 挥发油包合率因素水平表

Tab. 2 Volatile oil inclusion rate factor level table

水平	因 素		
	A 挥发油:β-CD 比例	B 转速/r·min ⁻¹	C 温度/℃
1	1:8	40	30
2	1:10	50	40
3	1:12	60	50

表 3 挥发油包合正交试验表

Tab. 3 Volatile oil inclusion orthogonal test table

实验号	A	B	C	D (空白)	挥发油包 合率/%	包合物回 收率/%	综合 评分
1	1	1	1	1	62.00	28.99	72.35
2	1	2	2	2	71.23	40.37	88.96
3	1	3	3	3	49.43	33.02	65.86
4	2	1	3	2	61.57	40.21	81.28
5	2	2	1	3	66.54	42.15	86.76
6	2	3	2	1	53.33	53.73	86.01
7	3	1	2	3	59.49	40.52	79.91
8	3	2	3	1	56.35	36.19	73.88
9	3	3	1	2	50.87	35.27	68.84
K ₁	227.17	233.54	227.95	232.24			
K ₂	254.05	249.60	254.88	239.08			
K ₃	222.63	220.71	221.02	232.53			
极差	31.42	28.89	33.86	6.84			

表 4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

变异来源	SS	f	MS	F 值	P 值
A	192.262	2	96.131	19.275	<0.05
B	139.685	2	69.842	14.004	>0.05
C	213.305	2	106.653	21.385	<0.05
误差	9.975	2	4.987		

2.3.3 验证试验 按最佳工艺条件进行 3 次重复性试验。3 次综合得分分别为 87.94, 88.82, 89.02。结果表明,所选工艺条件稳定可行。

2.4 挥发油 β-CD 包合物的薄层层析鉴别^[9]

2.4.1 包合物中木香的薄层鉴别 ①对照药材溶液的制备:取木香对照药材 0.5 g,加甲醇 10 mL,超声提取 30 min,过滤,将滤液蒸干,残渣加甲醇 10 mL 使溶解,作为对照药材溶液,为样品 1。②包合物供试品溶液的制备:取挥发油 β-CD 包合物 0.5 g,用石油醚 2 mL 振摇,取上清液,为样品 2。③挥发油供试品溶液的制备:取挥发油 2 滴,加入石油醚 2 mL 溶解,为样品 3。④包合物挥发油供试品溶液的制备:取包合物经挥发油提取器提取的包合物中的挥发油 2 滴,加入石油醚 2 mL 溶解,为样品 4。

取木香对照药材溶液和样品 2、3、4 点于同一硅胶板上,用环己烷:甲酸己酯:甲酸(15:5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视,对样品 2、3、4 与木香对照药材的色谱进行比较。

2.4.2 包合物中川芎的薄层鉴别 ①对照药材溶液的制备:取川芎对照药材 1 g,加乙醚 10 mL,加热回流 1 h,滤过,取滤液挥干,残渣加乙酸乙酯 2 mL 溶解,作为对照药材溶液,为样品 1。②包合物供试品溶液的制备:取挥发油 β-CD 包合物 0.5 g,用石油醚 2 mL 振摇,取上清液,为样品 2。③挥发油供试品溶液的制备:取挥发油 2 滴,加入石油醚 2 mL 溶解,为样品 3。④包合物挥发油供试品溶液的制备:取包合物经挥发油提取器提取的包合物中的挥发油 2 滴,加入石油醚 2 mL 溶解,为样品 4。

取川芎对照药材溶液和样品 2、3、4 点于同一硅胶 G254 板上,用正己烷:乙酸乙酯(3:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在紫外灯(254 nm)下检视,对样品 2、3、4 与川芎对照药材的色谱进行比较。

2.4.3 包合物中郁金的薄层鉴别 ①对照药材溶液的制备:取郁金对照药材 2 g,加无水乙醇 25 mL,超声提取 30 min,过滤,将滤液蒸干,残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液,为样品 1。②包合物供试品溶液的制备:取挥发油 β-CD 包合物 0.8 g,用无水乙醇 2 mL 振摇后过滤,滤液为样品 2。③挥发油供试品溶液的制备:取挥发油 2 滴,加入无水乙醇 2 mL 混合溶解,为样品 3。④包合物挥发油供试品溶液的制备:取包合物经挥发油提取器提取的包合物中的挥发油 2 滴,

加入无水乙醇 2 mL 混合溶解为样品 4。

取郁金对照药材溶液和样品 2、3、4 点于同一硅胶板上,用正己烷:乙酸乙酯(17:3)为展开剂,展开,取出,晾干,在紫外灯(365 nm)下检视,对样品 2、3、4 与郁金对照药材的色谱进行比较。

2.4.4 包合物中枳壳的鉴别 ①对照药溶液的制备:取枳壳对照药材 0.2 g,加甲醇 10 mL,超声提取 30 min,滤过,将滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,作为对照药材溶液,为样品 1。②包合物供试品溶液的制备:取挥发油 β -CD 包合物 0.8 g,用无水乙醇 2 mL 振摇后,取上清液为样品 2。③挥发油供试品溶液的制备:取挥发油 2 滴,加入无水乙醇 2 mL 混合溶解为样品 3。④包合物挥发油供试品溶液的制备:取包合物经挥发油提取器提取的包合物中的挥发油 2 滴,加入无水乙醇 2 mL 混合溶解为样品 4。

取枳壳对照药材溶液和样品 2、3、4 点于同一硅胶板上,用三氯甲烷:甲醇:水(13:6:2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 3%三氯化铝乙醇溶液,于紫外灯(365 nm)下检视,对样品 2、3、4 与枳壳对照药材的色谱进行比较。

2.4.5 结果 挥发油与包合物提取中的挥发油均在同一位置有斑点,说明包合前后挥发油主要成分无差异,在挥发油的斑点处, β -CD 无斑点,说明挥发油经包合已形成包合物。结果见图 1。

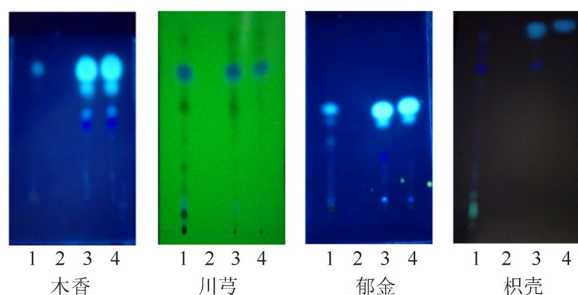


图 1 包合物中各药材的 TLC 图

1—对照药材; 2—挥发油 β -CD 包合物; 3—挥发油; 4—包合物提取的挥发油。

Fig. 1 TLC plots of various herbs in the inclusion complex
1—reference drug; 2—Volatile oil β -CD inclusion complex; 3—volatile oil; 4—volatile oil extracted from inclusion complex.

2.5 挥发油 β -CD 包合物的红外光谱鉴别^[10]

对川芎、郁金、枳壳、木香 4 种药材提取出的挥发油所含化合物进行红外检测。挥发油/ β -CD 混合物与 β -CD 的红外光谱图谱相比,在 1 772.67, 1 436.42, 887.97 cm^{-1} 处新增加了挥发油吸收峰。在包合物的光谱中,挥发油在 2 964.30, 1 771.35,

1 644.38, 1 436.83, 886.93 cm^{-1} 处的吸收峰消失,挥发油在 3 385.30 cm^{-1} 处的吸收峰迁移到了 3 361.24 cm^{-1} 处且强度减弱,在 1 376.44 cm^{-1} 处的吸收峰迁移到了 1 332.72 cm^{-1} 处,且强度增强,在 1 156.02, 1 080.17, 1 031.79, 945.88, 758.04 cm^{-1} 处出现的吸收峰在 β -CD 和挥发油/ β -CD 混合物同时出现,挥发油/ β -CD 混合物 3 400~3 500 cm^{-1} 在 β -CD 和挥发油的图谱中均可找到,证明挥发油被 β -CD 所包合。红外光谱见图 2。

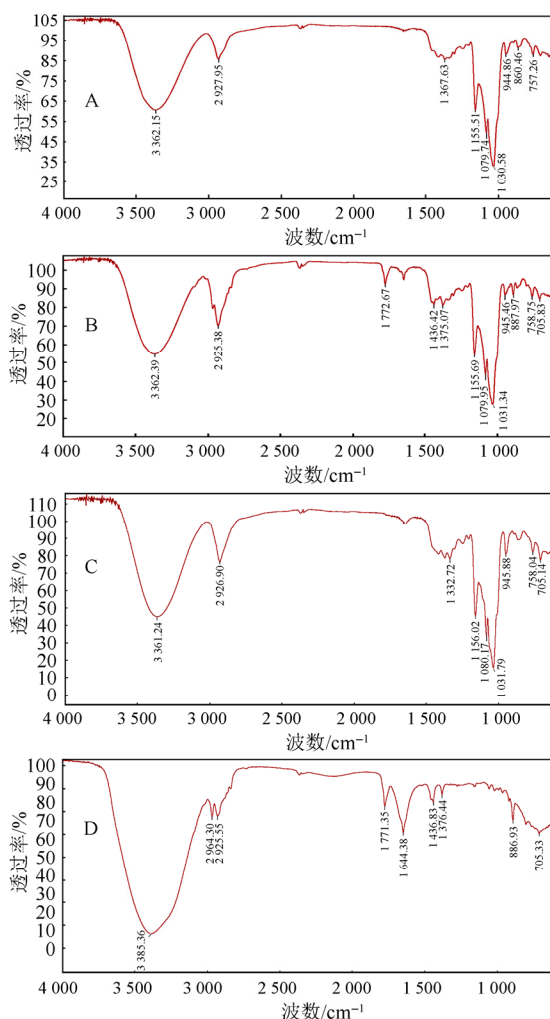


图 2 β -环糊精红外光谱图

A— β -环糊精; B—挥发油/ β -环糊精混合物; C—包合物; D—挥发油。

Fig. 2 IR spectrum of β -cyclodextrin

A— β -cyclodextrin; B—mixture of volatile oil and β -cyclodextrin; C—inclusion complexes; D—volatile oil.

3 讨论

在复方挥发油的包合物中,将挥发油包合物重新水蒸气蒸馏法提取,得到的挥发油量与加入挥发油量进行比较,得到其包合率。环糊精对 4 种挥发油的包合作用可能并不相同,即包封率可

能不一样, 后续实验以 4 种挥发油中有效成分为指标, HPLC 测定其包合率, 能够更加真实、准确地反映有效成分的包合情况, 判断将药材混合提取后再进行包合, 包合物中各挥发油的比例是否还能保证与原处方中的配比一致。

包合技术实际上是主体分子 β -CD 和客体分子挥发油间的结构互补和识别关系。在理气活血方挥发油提取包合工艺多指标决策中, 权重问题的研究占有重要地位, 其合理性直接影响着多指标决策排序的准确性。熵权法^[11-12]是依据指标测评过程中原始数据之间的联系, 采用一定的数学理论方法来计算权重, 该类赋权法的决策准确性和可靠性较强。本实验发现, 基于多指标综合评价法评价包合工艺得出最佳加工工艺如下: 挥发油: β -CD 比例为 1:10, 转速为 $50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 包合温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 挥发油包合率 71.23%, 包合物回收率 40.37%, 综合评分为 88.96, 可能是理气活血方中挥发油的主要成分较易被 β -CD 分子识别, 故易与其分子结构匹配。挥发油能否被 β -CD 包合, 以及包合前后其理化性质是否会发生改变, 这对包合物的研发及质量控制具有重要意义。本实验采用薄层色谱法、红外光谱法对包合物进行验证, 均能直观反映其形成, 而且也表明包合前后理气活血方挥发油成分未发生明显变化。综上所述, 这些方法不仅可鉴定包合物的形成, 同时也能为挥发油与 β -CD 包合物的工艺研究及质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] 杨晓旭, 杨冬萍, 赵芳芳, 等. 搯都而(乳香)挥发油提取工艺研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(9): 2083-2085.

- [2] LI M, SUN Y E, ZHANG L, et al. Studies on extraction and inclusion process for volatile oil in cinnamomi cortex with β -cyclodextrin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(9): 1124-1126.
- [3] YU Z M, WEN C P, YANG H, et al. Optimization of extraction technology of gout cataplasma by multicriteria synthesis assessment [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(10): 1498-1501.
- [4] DING M H, FENG L, SUN Q H, et al. Optimization of extraction process for shenhuang recipe based on multi-index comprehensive evaluation method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1497-1502.
- [5] 中国药典. 四部[S]. 2015: 203.
- [6] 张志, 张大委, 高雪梅. 艾叶挥发油-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及鉴定[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1356-1357.
- [7] 屠寒, 卢金清, 江汉美, 等. 星点设计-效应面法优化- β -环糊精包合薄荷挥发油的工艺[J]. 中药材, 2016, 39(11): 2579-2581.
- [8] WANG M L, NI J, GUO L, et al. Study on ambi-extracting and inclusion process of volatile oil from Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix [J]. Chin J Inf TCM(中国中医药信息杂志), 2018, 25(11): 68-72.
- [9] HE C, WEI T T, WANG T, et al. Optimization and verification of inclusion process of volatile oil in menthae haplocalycis herba by internal homogenate method [J]. Chine J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(17): 20-26.
- [10] WU N, YU J, ZHANG X, et al. Optimization of preparation procedures of tanshinone-II A/ β -cyclodextrin inclusion complex and dissolution study of tanshinone-II A *in vitro* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(23): 4611-4617.
- [11] YIN F, YANG J H, FANG Y C, et al. Optimization of extraction process of main active ingredients in Buyang Huanwu Decoction based on two analytical methods [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2018, 49(21): 135-141.
- [12] TIAN Y F, WAN H T, ZHU Z Y, et al. Multi-objective optimization of purification technology for licorice flavonoids based on entropy-weight method [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2016, 47(7): 1118-1125.

收稿日期: 2018-07-09

(本文责编: 蔡珊珊)