

化橘红、连翘、当归混合挥发油提取及包合工艺研究

王文平 倪健 杨春静 张欣 王庆玲 董晓旭 冷新 尹兴斌 冯淬灵

【摘要】 目的 优选芪蛭益肺颗粒中化橘红、连翘、当归混合挥发油提取及包合的工艺条件。**方法** 以混合挥发油的得率为指标,单因素试验考察混合油的提取工艺;采用饱和水溶液法,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,优选挥发油的包合工艺。并采用显微呈像分析,X射线衍射法对包合物进行表征。**结果** 挥发油最优提取工艺为:不浸泡,加12倍量水,提取10小时;最佳包合工艺为:油(mL): β -CD(g):水(mL)比例为1:10:100,包合温度为40℃,包合时间为3小时。显微镜法、X射线衍射法表明包合物形成,包合状态良好。**结论** 本实验优化的挥发油提取及包合工艺稳定可行,可为制剂生产提供支撑性数据。

【关键词】 化橘红; 连翘; 当归; 混合挥发油; 提取包合

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.12.009

Study on extraction and inclusion process of mixed volatile oil from pummelo peel, forsythia and angelica WANG Wenping, NI Jian, YANG Chunjing, et al. College of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: YIN Xingbin, E-mail: yxbtcm@163.com; FENG Cuiling, E-mail: fengcuiling@sina.com

【Abstract】 Objective To optimize the process of extraction of mixed volatile oil from pummelo peel, forsythia, angelica and inclusion of β -cyclodextrin (β -CD) of Qizhi Yifei granule. **Method** Yield ratio of volatile oil was regarded as evaluation index, single factor experiments were used to study the extraction process of volatile oil. Saturated aqueous solution was used to the $L_9(3^4)$ orthogonal experiments to reach the best inclusion process optimization. And the microscopic imaging analysis, X-ray scattering technology was adopted to character the inclusion compound. **Results** The optimum extraction process of volatile oil was adding 12-folds water, 10 hours for each time and without soaking. The optimum conditions of inclusion process were as follows: mixed volatile oil(mL): β -CD(g):water(mL) ratio was 1:10:100; inclusion temperature was 40℃; the inclusion time were 3 hours. Microscopic imaging analysis and X-ray scattering technology proved the inclusion compound had been formed. **Conclusion** Optimal extraction and inclusion process of the study was feasible and stable, which can provide certain supporting data for preparation.

【Key words】 Pummelo peel; Forsythia; Angelica; Mixed volatile oil; Extraction and inclusion process

基金项目:北京中医药大学协同创新建设计划(2013-XTCX-03);北京市科技计划“十病十药”研发项目(Z020071620099)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院[王文平(硕士研究生)、倪健、杨春静(博士研究生)、张欣(硕士研究生)、王庆玲(硕士研究生)、董晓旭(博士研究生)、冷新(硕士研究生)、尹兴斌];北京大学人民医院中医科(冯淬灵)

作者简介:王文平(1992-),女,2015级在读硕士研究生。研究方向:中药制药新技术与新剂型。E-mail: wangwenp6@163.com

通信作者:尹兴斌(1985-),博士,副教授。研究方向:中药制剂新技术与体内过程。E-mail: yxbtcm@163.com;冯淬灵(1969-),女,博士,教授,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治肺系疾病。E-mail: fengcuiling@sina.com

化橘红为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* ‘Tomentosa’ 或柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮,前者习称“毛橘红”,后者习称“光七爪”“光五爪”^[1],味辛、苦,性温,归肺、脾经,其功能是理气宽中、燥湿化痰。药理研究表明^[2]化橘红挥发油有明显的镇咳、化痰作用。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia supensa* (Thunb.) vahl 的干燥果实,味苦,性微寒,具有清热解毒,消肿散结,疏散风热的作用。文献研究表明^[3],连翘挥发油具有抗炎作用,抗炎机理与抑制炎症介质 PGE2 和组胺、五羟色胺的释放有关。当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥块根,具有补血活血,补气调经等功效^[4]。当归挥发油中的藁本内酯具有较强的解痉平喘作用^[5],可松弛支气管平滑肌,对抗组织胺、乙酰胆碱引起的支气管哮喘。

慢阻肺 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 与肺部的异常炎症有关^[6-7],主要症状为气短、慢性咳嗽、咳痰、喘息和胸闷。芪蛭益肺颗粒是北京中医药大学东直门医院治疗 COPD 的临床经验方,方中化橘红、当归、连翘三味药的挥发油对 COPD 症状有明显治疗作用,故本实验对以上三味药采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,以挥发油的得率为指标,优化挥发油的提取工艺;为减少挥发油成分在制剂生产及储藏过程损失,同时为了更好地将挥发油成分与水提浸膏混合,本实验对混合挥发油进行包合,并以挥发油的得率为指标,优化挥发油的包合工艺^[8],并利用显微成像分析和 X 射线衍射法对包合物进行表征。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ZNCL-S-10D 多点智能磁力搅拌器 (河南爱博特科技发展有限公司),ZDHW 型调温电热套 (北京市中兴伟业仪器有限公司),BT125D 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司),DZ-28BC 型真空干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司),XD-3X 射线衍射仪 (北京普析通用仪器有限公司),Olympus 显微系统和 DP71 图像采集系统。

1.2 试药

药材购自北京同仁堂 (亳州) 饮片公司,经北京中医药大学刘春生教授鉴定:化橘红 (生产批号:501002809) 为芸香科植物柚 *Citrus grandis*

‘Tomentosa’ 的干燥外层果皮,连翘 (生产批号:500003182) 为木犀科植物连翘 *Forsythia supensa* (Thunb.) vahl 的干燥果实,当归 (生产批号:501002827) 为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥块根。 β -环糊精 (分析纯,天津市光复精细化工研究所,批号 20151030),无水乙醇 (北京化工厂,批号:20160606) 实验用水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 混合挥发油的提取

称取化橘红、连翘、当归饮片,按照 2015 年版《中华人民共和国药典》(四部)附录 2204 挥发油测定法 (甲法) 提取,收集挥发油。化橘红、连翘、当归混合油为黄色透明液体,用封口膜密闭,置于 4℃ 冷藏备用。

2.1.1 单因素考察 以挥发油的得率为指标,采用单因素实验考察浸泡与否、加水倍量、提取时间对化橘红、当归、连翘混合挥发油得率的影响。将当归破碎成 2 cm 左右小块,化橘红、连翘不粉碎进行挥发油提取。放大药量至三味药各加 200 g,共 600 g,进行混合油最佳提取工艺的筛选。

2.1.2 浸泡与否的考察 称取化橘红、当归、连翘各 200 g,共 600 g,加入 12 倍量的水,分别浸泡 0、2 小时后提取。挥发油的提取量分别为 2.88 mL、2.89 mL,由此得出结论:浸泡与否对于挥发油的得率没有显著影响,故选择不浸泡提取挥发油,减少了工序,节省了时间和成本。

2.1.3 挥发油提取工艺的考察 称取化橘红、当归、连翘药材各 200 g,共 600 g,分别加入 10、12、14 倍量的水,提取挥发油,记录不同时间挥发油的提取量,为保持实验结果的准确性,选择同一电热套、同一挥发油提取器,并且在提取过程中控制相同的温度,本实验控制加热条件,即调至 360 V 至沸腾,之后降至 250 V 保持微沸。实验结果如表 1 所示。实验结果表明 12 倍量水提取所得挥发油量最大,挥发油得率为 0.48%,并且提取 10 小时后挥发油提取量已达总量的 90%,综合中试加工时间限制及提取成本因素,选择最佳提取工艺为 12 倍量水提取 10 小时。

2.1.4 验证实验 按照优选出来的挥发油的提取工艺,即化橘红、连翘、当归每味药加入 200 g,不浸泡,加入 12 倍量水,提取 10 小时,平行进行 3 次验证实验,实验结果如表 2 所示。实验结果表明该挥发油提取工艺稳定可行。

表 1 挥发油提取工艺结果

加水倍量	挥发油提取量										
	时间(h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10		0.41	0.63	0.96	1.24	1.52	1.61	1.80	2.04	2.15	2.33
12		0.50	0.94	1.25	1.54	1.74	1.95	2.23	2.42	2.61	2.88
14		0.43	0.72	1.03	1.38	1.57	1.76	1.90	2.12	2.33	2.54

表 2 挥发油提取验证实验

编号	10 小时出油量(mL)	挥发油得率(%)
1	2.85	0.475
2	2.80	0.467
3	2.94	0.490
平均值	2.86	0.477

2.2 包合工艺的考察

2.2.1 空白回收率 实验取 1 mL 挥发油于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 200 mL 水,测得挥发油的空白回收率为 80%。

2.2.2 正交实验 设计通过查阅文献^[9-10]及综合考虑挥发油包合物制备方法,选择饱和水溶液法对挥发油进行包合。正交实验采用 L₉(3⁴) 正交设计表,以挥发油的包合率为指标,考察影响包合物生成的三因素包合温度、包合时间、油(mL):β-CD(g):水(mL)比例对包合物生成的影响,每个因素下三个水平。因素水平见表 3。

表 3 包合工艺正交试验因素水平表

水平	包合温度(℃)A	包合时间(h)B	油(mL):β-CD(g):水(mL)C
1	30	1.0	1:6:60
2	40	2.0	1:8:80
3	50	3.0	1:10:100

2.2.3 包合物的制备 按照正交表 4,称取规定重量的 β-CD 于锥形瓶中,分别加入蒸馏水 60 mL、80 mL、100 mL 于设定好温度的水浴锅上加热溶解,制成 β-CD 饱和溶液,置于磁力搅拌器上恒温。挥发油 1 mL 加无水乙醇制成 50% (v/v) 的无水乙醇溶液,超声使油与无水乙醇混合均匀,之后缓慢加入到环糊精溶液中,加塞,搅拌至规定时间,冷却至室温,放入冰箱,冷藏 24 小时,抽滤,包合物用适量的水洗涤,再用 10 mL 无水乙醇洗涤,滤层和滤纸一同取出,置于真空干燥箱中,40℃ 下干燥 4 小时,即得。

2.2.4 包合率的测定 分别取 9 组干燥好的包合物,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 200 mL 水,连接挥发油提取装置,提取挥发油,保持微沸 5 小时,至

油量不再增加,计算挥发油的包合率,结果见表 4,方差分析结果见表 5。结果分析:由方差分析结果显示,A、B、C 三因素的 P 值均小于 0.05,说明 A、B、C 三因素均具有显著性差异,通过 k 值比较,最终确定最佳提取工艺为 A₂B₃C₃,即 40℃,油(mL):β-CD(g):比例为 1:10:100,提取 3 小时。

表 4 混合挥发油 β-CD 包合工艺正交实验结果

列号	包合温度(℃)A	包合时间(h)B	油:β-CD:水 C	空白 列 D	包合率 (%)
1	1	1	1	1	43.75
2	1	2	2	2	75.00
3	1	3	3	3	87.50
4	2	1	2	3	56.25
5	2	2	3	1	93.75
6	2	3	1	2	81.25
7	3	1	3	1	65.00
8	3	2	1	3	75.00
9	3	3	2	1	86.25
K1	206.25	165.00	200.00	223.75	
K2	231.25	243.75	217.50	221.25	
K3	226.25	255.00	246.25	218.75	
R	25.00	90.00	46.25	5.00	

表 5 混合挥发油 β-CD 包合工艺的方差分析

来源	自由度	离差平方和	方差	P
A	2	116.67	58.33	<0.05
B	2	1603.13	801.56	<0.05
C	2	363.54	181.77	<0.05
D	2	4.17	2.08	

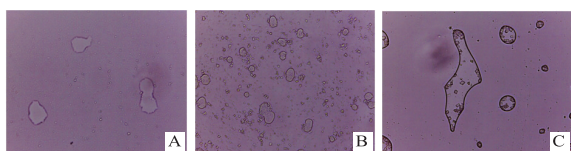
2.2.5 三批验证实验 按照优选的挥发油的最佳包合工艺,进行 3 批平行验证实验,结果见表 6,三批验证试验平均包合率为 95.83%,大于正交表中的最佳包合率 93.75%,说明该包合工艺稳定可行。

表 6 挥发油包合验证实验

试验号	包合率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	92.50		
2	98.75	95.83	0.033
3	96.25		

2.3 包合物表征

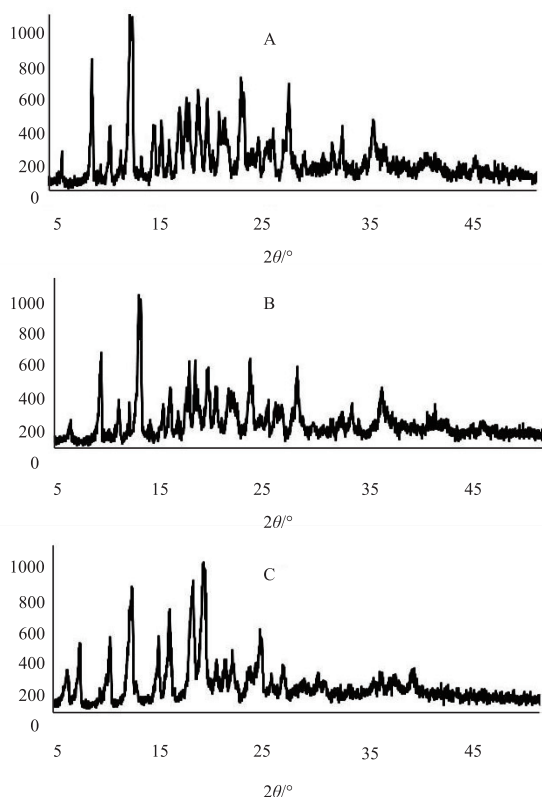
2.3.1 包合物的显微成像 分别取适量 β -CD、挥发油与 β -CD 物理混合物及包合物,过 100 目筛,分别放于 3 张载玻片上,以少量蒸馏水分散溶解,盖上盖玻片,于 10×10 倍显微镜下观察。 β -CD、挥发油与 β -CD 物理混合物、挥发油包合物显微图分别如图 1 所示。 β -CD 在显微镜下呈不规则透明团块,成像清晰;物理混合物类似于 β -CD,且有大量细小油滴存在。包合物的显微图与以上二者具有明显区别,包合物已经形成且包合状态良好。



注:A 为 β -CD;B 为物理混合物;C 为包合物

图 1 包合物的显微成像图(10×40)

2.3.2 X 射线衍射法 取空白 β -CD、混合挥发油与 β -CD 的物理混合物、 β -CD 与混合油的包合物分别进行 X 射线衍射,以扫描角度为横坐标,衍射强度为纵坐标,采用 Origin 软件绘制 X 射线粉末衍射图。结果如图 2 所示。由图所示,包合物的衍射峰



注:A 为 β -CD;B 为物理混合物;C 为包合物

图 2 X 射线粉末衍射图

在 $2\theta=6\sim 8^\circ$ 、 $16\sim 18^\circ$ 、 20° 、 24° 产生新的吸收峰,在 $2\theta=10^\circ$ 、 $26\sim 27^\circ$ 、 32° 、 35° 的峰消失,说明混合油与 β -CD 形成了包合物。

3 讨论

本实验利用现代包合技术,将挥发油包合在 β -CD 分子之中,获得稳定的包合物。本研究结果显示,最佳提取工艺是不浸泡,加 10 倍量水,提 12 小时。最佳包合工艺为:油(mL): β -CD(g):水(mL)比例为 1:10:100,包合温度为 40°C ,包合时间为 3 小时。通过显微镜法、X 射线衍射法对挥发油进行表征,结果显示包合物形成且包合状态良好。该工艺操作方便,实用性强,有利于生产。

化橘红、当归、连翘的混合挥发油成分比较复杂,单凭挥发油的提取率和包合率来表示挥发油的提取会有一定的局限性。后期可以测定一下不同提取工艺和包合工艺中各成分含量差别进行完善。

参 考 文 献

- [1] 张贵君. 中药鉴定学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2009:119.
- [2] 马艳艳. 化橘红有效部位组合规律的药效研究[D]. 广州:广州中医药大学,2008.
- [3] 郭际,沈映君,解宇环. 连翘挥发油抗炎作用的实验研究[J]. 四川生理科学杂志,2005,(3):136-137.
- [4] 王志旺,李永华,任远,等. 当归挥发油对实验性哮喘大鼠肺功能及其组织病理学的影响[J]. 中成药,2013,35(10):2098-2103.
- [5] 陶静仪,阮于平,梅其炳,等. 当归成分藁本内酯平喘作用的实验研究[J]. 药学报,1984,(8):561-565.
- [6] 冯淬灵,于会勇,黄文通,等. 清热化痰理气中药复方治疗 65 例急性加重期慢性阻塞性肺疾病疗效评价[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(11):786-790.
- [7] 陈英,冯淬灵,李根茂,等. 清金化痰汤对 COPD 模型大鼠肺组织中性粒细胞弹性蛋白酶及黏蛋白 5AC 表达的影响[J]. 吉林中医药,2016,(1):65-71.
- [8] 穆启运,阮新民. β -环糊精包合广藿香和橘红挥发油的工艺研究[J]. 中药材,2009,32(9):1454-1457.
- [9] 李海亮,崔小丽,仝燕,等. 2 种方法制备 4 种中药挥发油 β -环糊精包合物的规律性探索[J]. 中国中药杂志,2012,37(7):908-912.
- [10] 司奇,吴丹,曹青日,等. 缬草挥发油 β -环糊精包合物的制备与评价[J]. 中国中药杂志,2013,38(14):2309-2313.

(收稿日期:2016-12-22)

(本文编辑:董历华)