

基于 Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 优选经典名方三化汤挥发油 β -环糊精包合工艺

邓亚伟¹, 刘明松¹, 李欣浓¹, 李春花^{1,2,3,4*}, 忻晓东^{1*}(1.河北中医药大学药学院, 石家庄 050200; 2.河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 石家庄 050091; 3.河北省中药组方制剂技术创新中心, 石家庄 050091; 4.河北省中药制剂产业技术研究院, 石家庄 050000)

摘要: 目的 优化经典名方三化汤挥发油饱和水溶液法包合工艺。方法 以 β -环糊精为包合材料, 通过 Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 设计试验, 筛选三化汤总挥发油最佳包合工艺。采用显微镜法、薄层色谱法、紫外分光光度法对包合物进行验证, 顶空-气相色谱-质谱联用确定包合前后挥发性成分变化。结果 经典名方三化汤总挥发油最佳包合工艺为转速 2 000 r·min⁻¹、包合 1 h、料液比 1 : 10、包合温度 30 °C、物料比 1 : 9。3 次验证实验的综合评分分别为 0.981 0, 0.999 9, 0.963 4, 平均值为 0.981 4, 与模型预测值相差 2.87%。结论 饱和水溶液法包合工艺简单、稳定, 挥发性成分包合前后基本不变, 为三化汤开发及经典名方中挥发油包合工艺研究提供参考。

关键词: 经典名方; 三化汤; 挥发油; 饱和水溶液法; 顶空-气相色谱-质谱联用

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)19-2669-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223429

引用本文: 邓亚伟, 刘明松, 李欣浓, 等. 基于 Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 优选经典名方三化汤挥发油 β -环糊精包合工艺[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2669-2676.

Screen the Volatile Oil β -Cyclodextrin Infused Process of the Classic Prescription Recipe Sanhua Decoction Based on Plackett-Burman Combined with Box-Behnken

DENG Yawei¹, LIU Mingsong¹, LI Xinnong¹, LI Chunhua^{1,2,3,4*}, XIN Xiaodong^{1*}(1.College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2.Hebei Higher Education Institute Applied Technology Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050091, China; 3.Hebei Technology Innovation Center of TCM Formula Preparations, Shijiazhuang 050091, China; 4.Hebei Industrial Technology Institute for Traditional Chinese Medicine Preparation, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the cladding process of volatile oil saturated and aqueous solution method of classic prescription Sanhua decoction. **METHODS** β -Cyclodextrin was used as the wrapping material, through Plackett-Burman combined with Box-Behnken design tests, the optimal packaging process of Sanhua decoction's total volatile oil was screened. The clathrate was verified by microscopy, thin layer chromatography, and ultraviolet spectrophotometry, and the change of volatile composition before and after the envelope was determined by headspace-gas chromatography-mass spectrometry. **RESULTS** The best coating process of the total volatile oil of the classic prescription Sanhua decoction was as follows: speed 2 000 r·min⁻¹, wrapping 1 h, feed-liquid ratio 1 : 10, baling temperature 30 °C, material ratio 1 : 9. The comprehensive scores of the three validation experiments were 0.981 0, 0.999 9 and 0.963 4, and the average value was 0.981 4, which was 2.87% different from the predicted value of the model. **CONCLUSION** The saturated aqueous solution method is simple and stable, and the volatile components are basically unchanged before and after the encapsulation, which provides a reference for the development of Sanhua decoction and the research on the volatile oil in the classic recipe.

KEYWORDS: classic prescription; Sanhua decoction; volatile oil; saturated aqueous solution method; headspace-GC-MS

三化汤(Sanhua decoction, SHD)是国家发布的《古代经典名方目录(第一批)》中第 55 首药方, 出自刘完素的《素问病机气宜保命集》中风论, 由大黄、羌活、枳实、厚朴 4 味药组成, 具有调理气机、攻下通便功效, 主治中风病^[1], 临床用于

急性脑出血、急性缺血性脑卒中、出血性中风后便秘, 功效显著^[2]。SHD 主治中风的有效成分多来源于方中挥发油, 如 α -蒎烯、 β -蒎烯、4-异丙基甲苯^[3]、柠檬烯^[4-6]、 γ -萜品烯^[7]、 α -桉叶醇^[8]、 β -桉叶醇^[9]等挥发性成分。

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19272502D); 2022 年省属高校基本科研业务费项目(YXTD2022005)

作者简介: 邓亚伟, 男, 硕士生 E-mail: 1164706563@qq.com *通信作者: 李春花, 女, 硕士, 教授, 博导 E-mail: 13803369966@163.com 忻晓东, 男, 博士生 E-mail: xinxiaodong3418@163.com

国家药品监督管理局 2019 年发布的《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)》指出汤剂可制成颗粒剂。在 SHD 浓缩、制粒及干燥过程中,挥发性成分难以保留,所以采用单独提取的方法,最大程度保留有效部位。现有生产工艺中,常采用直接加入法将挥发油溶解喷洒至制剂中,该方法虽简便易行,但由于挥发油性质不稳定,在制剂中难以长期保存,无法保证临床疗效。有研究表明^[10],将挥发油单独提取制成环糊精包合物加入到制剂中,有利于提高挥发油稳定性,掩盖不良气味。

本研究采用 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)对 SHD 总挥发油进行包合^[11],并通过 Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 筛选最佳包合工艺,对包合物进行验证,采用顶空-气相色谱-质谱联用确定包合前后挥发性成分变化,期望为 SHD 复方制剂开发及经典名方中挥发油包合工艺研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 7890B/5977B 型 GC-MS 仪、Agilent 7697A 型顶空进样器(美国 Agilent 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责任公司);H2050R 台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司,离心半径 15 cm);85-2A 恒温磁力搅拌器(常州越新仪器制造有限公司);LQ-10002 电子天平(上海瑶新电子科技有限公司);UV9000 型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);DZF-6030A 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

厚朴(批号:22022001)、羌活(批号:21081001)、枳实(批号:21052101)购自国药乐仁堂河北药业有限公司,符合中国药典 2020 年版一部相关项下规定,笔者所在项目组共沸精馏耦合技术提取所得 SHD 总挥发油; β -CD(孟州市华兴生物化工有限责任公司,批号:GB1886.180-2016);无水乙醇(分析纯,批号:220601)、正己烷(分析纯,批号:220901)、乙酸乙酯(分析纯,批号:220601)、甲醇(色谱纯,批号:204131)、无水硫酸钠(批号:220218,含量 $\geq 99.0\%$)均购于天津市大茂化学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 SHD 挥发油饱和水溶液法包合工艺

取一定量的 β -CD, 60 °C 制成饱和水溶液,取

SHD 总挥发油 1 mL,等体积无水乙醇溶解,少量多次加入饱和溶液中,搅拌一定时间后置 4 °C 冰箱内 24 h,抽滤,无水乙醇洗涤,40 °C 真空干燥 5 h,得干燥 β -CD 包合物。

2.2 空白回收率的测定^[12]

取 1 mL SHD 总挥发油置于 500 mL 圆底烧瓶中,加 200 mL 蒸馏水,连接挥发油提取器提取 5 h,待冷却后读数,重复测定 3 次,挥发油空白回收率为 91%。

2.3 挥发油包合工艺评价指标及赋权处理

以药物利用率、包合物收得率、包合物含药率为评价指标,信息熵法赋予各指标权重系数,求得综合评分 M , M 值最高者即为最佳包合工艺^[13]。计算公式如下:

$$\text{SHD 包合物含药率} = \frac{\text{SHD 包合物中实际含药量}}{\text{包合物实际量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{SHD 包合物收得率} = \frac{\text{SHD 包合物实际质量}}{(\beta\text{-CD 质量} + \text{投药量})} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{药物利用率} = \frac{\text{包合物中实际含药量}}{(\text{投药量} \times \text{空白回收率})} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{原始矩阵 } P_{ij} = X_{ij} / \sum X_{ij} \quad (4)$$

$$H_i = -1 / \ln \eta \times \sum_{j=1}^n P_{ij} \times \ln P_{ij} \quad (5)$$

$$W_i = (1 - H_i) \div \sum_{i=1}^m (1 - H_i) \quad (6)$$

P_{ij} : 概率矩阵(i 、 j 分别表示矩阵的行、列);
 X_{ij} : 原始数据矩阵; H_i : 各评价指标熵值; η : 待评项目; W_i : 各评价指标权重系数。

2.4 单因素考察

2.4.1 转速 取 β -CD 约 9 g,精密称定,固定温度 30 °C,包合时间 1 h,料液比 1 : 12,物料比 1 : 9,按“2.1”项下方法操作,考察不同转速(200, 800, 1 400, 2 000, 2 400 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$; $n=5$)对综合评分 M 的影响。结果,随着转速加快, M 呈上升趋势,2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, M 值相对较大。结果见图 1。

2.4.2 包合温度 取 β -CD 约 9 g,精密称定,固定转速 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,包合时间 1 h,料液比 1 : 12,物料比 1 : 9,按“2.1”项下方法操作,考察不同包合温度(20, 30, 40, 50, 70 °C; $n=5$)对综合评分 M 的影响。结果,随着温度升高, M 值呈下降趋势,30 °C 时, M 值相对较大。结果见图 1。

2.4.3 包合时间 取 β -CD 约 9 g,精密称定,固定转速 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 30 °C,料液比 1 : 12,

物料比 1:9, 按“2.1”项下方法操作, 考察不同包合时间(0.5, 1, 1.5, 2, 3 h; $n=5$)对综合评分 M 的影响。结果, 随着包合时间延长, M 值呈下降趋势, 1 h 时, M 值相对较大。结果见图 1。

2.4.4 料液比 取 β -CD 约 9 g, 精密称定, 固定转速 2 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 包合时间 1 h, 物料比 1:9, 按“2.1”项下方法操作, 考察不同料液比(1:4, 1:8, 1:12, 1:16, 1:20; $n=5$)对综合评分 M 的影响。结果, 料液比为 1:12 时, M 值相对较大。结果见图 1。

2.4.5 物料比 取一定量 β -CD, 精密称定, 固定转速 2 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 包合时间 1 h, 料液比 1:12, 按“2.1”项下方法操作, 考察不同物料比(1:3, 1:6, 1:9, 1:12, 1:15; $n=5$)对综合评分 M 的影响。结果, 物料比为 1:9 时, M 值相对较大, 通过工艺优化, 能够尽可能地在包合更多挥发油的同时, 减少 β -CD 的用量, 可以节约成本, 减少用药剂量。结果见图 1。

2.5 Plackett-Burman 试验设计优化影响因素水平

根据单因素考察结果, 选取以上 5 个因素[转速(A)、包合温度(B)、包合时间(C)、料液比(D)、物料比(E)], 采用 Plackett-Burman 设计试验, 以药物利用率、包合物收得率、包合物含药率为评价指标, 筛选出显著影响因素。因素水平设计见表 1。

通过 Design-Expert.V8.0.6.1 软件对表 2 试验数据进行统计及结果分析, 得出综合评分 M 与转速(A)、包合温度(B)、包合时间(C)、料液比(D)、

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素水平

Tab. 1 Plackett-Burman experimental design factor level

水平	A 转速/ $r \cdot \text{min}^{-1}$	B 包合 温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 包合 时间/h	D 料 液比	E 物 料比
-1	800	20	0.5	8	6
1	2 000	30	1	12	9

表 2 Plackett-Burman 试验设计与结果($n=12$)

Tab. 2 Plackett-Burman experimental design and results ($n=12$)

序号	A 转速/ $r \cdot \text{min}^{-1}$	B 包 合温 度/ $^{\circ}\text{C}$	C 包 合时 间/h	D 料 液比	E 物 料比	包合 物收 得率/%	药物 利用 率/%	包合 物含 药率/%	综合 评分 M
1	800	30	0.5	1:12	1:9	76.20	67.03	8.01	0.694 9
2	2 000	20	1	1:12	1:6	71.57	69.23	12.57	0.888 9
3	800	20	0.5	1:12	1:6	77.00	42.86	7.24	0.528 6
4	2 000	20	1	1:12	1:9	76.30	89.01	10.62	0.922 1
5	2 000	30	0.5	1:8	1:6	78.14	60.44	10.05	0.735 4
6	800	20	1	1:8	1:9	83.20	52.75	5.77	0.529 5
7	800	30	1	1:12	1:6	67.00	49.45	9.59	0.659 3
8	2 000	20	0.5	1:8	1:9	81.10	75.82	8.51	0.764 3
9	800	30	1	1:8	1:9	76.50	61.54	7.32	0.636 9
10	2 000	30	1	1:8	1:6	73.29	70.33	12.48	0.891 1
11	2 000	30	0.5	1:12	1:9	73.80	78.02	9.62	0.820 8
12	800	20	0.5	1:8	1:6	78.00	38.46	6.41	0.471 1

物料比(E)之间的关系: $M=0.71+0.13A+0.028B+0.043C+0.041D+0.016E$ 。由表 3 可知, 综合评分 M 模型的 $P<0.05$, 表明该模型真实可靠, 具有统计学意义, 能准确预测因素显著性。选中图 2 中 5 个因素显现检验水准线, 5 个因素对 M 的影响程度为 $A>C>D>B>E$, 其中 A 为极显著因素, C、D 为显

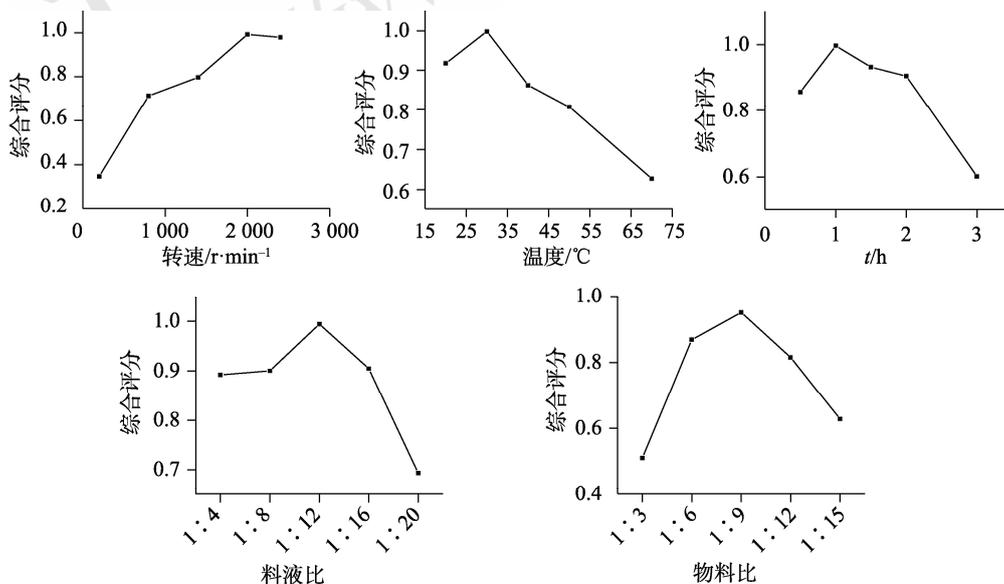


图 1 单因素考察结果

Fig. 1 Results of one-factor investigation

著因素。由表 4 可知, $R^2=0.944 6$, 调整 $R^2=0.898 4$, 表明该模型拟合和线性程度高, 可用于 SHD 总挥发油包合工艺显著因素的筛选, $Adeq=13.06$, 信号充足, 模型可用于导航设计空间^[14]。

表 3 Plackett-Burman 试验方差分析结果

Tab. 3 Analysis of variance of Plackett-Burman experiments

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.24	5	4.8×10^{-2}	20.46	1.00×10^{-3} 显著
A-转速	0.19	1	0.19	79.48	1.00×10^{-4}
B-包合温度	9.3×10^{-3}	1	9.29×10^{-3}	3.93	0.09
C-包合时间	0.02	1	2.19×10^{-2}	9.26	0.02
D-料液比	0.20	1	1.97×10^{-2}	8.32	0.03
E-物料比	3.14×10^{-3}	1	3.14×10^{-3}	1.33	0.29
残差	1.42×10^{-2}	6	2.37×10^{-3}		
总离差	0.26	11			

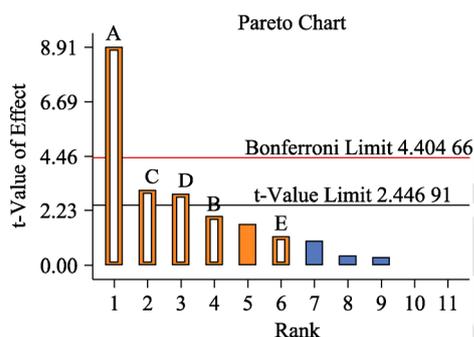


图 2 因素显著性柏拉图

A-转速; B-包合温度; C-包合时间; D-料液比; E-物料比(选中即未填充部分)。

Fig. 2 Factor significance Plato

A-speed; B-wrapping temperature; C-wrapping time; D-material-liquid ratio; E-material ratio(the selected section was the unpopulated section).

表 4 Plackett-Burman 回归方程的可信性分析

Tab. 4 Confidence analysis of Plackett-Burman regression equations

标准差	平均值	变异系数/ %	预测残差 平方和	R^2	调整 R^2	预测 R^2	$Adeq$
0.048 6	0.712	6.833	0.056 8	0.944 6	0.898 4	0.778 4	13.06

2.6 Box-Behnken 试验优化饱和水溶液法包合工艺

在 Plackett-Burman 试验基础上, 以转速(A)、包合时间(B)、料液比(C) 3 个影响因素为自变量, 通过 Box-Behnken 模型设计 3 因素 3 水平 17 组试验, 因素水平设计见表 5, 试验设计与结果见表 6。

通过 Design-Expert.V8.0.6.1 软件对表 6 试验数据进行统计及结果分析, 得出综合评分 $M=0.88+0.14A+0.044B-0.023C+8.903 \times 10^{-3}AB+0.028AC-0.013BC-0.03A^2-0.028B^2-0.039C^2$ 。结果显示, 综合评

表 5 Box-Behnken 试验设计因素水平表

Tab. 5 Box-Behnken experimental design factor level table

水平	A 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	B 包合时间/h	C 料液比
-1	800	0.5	8
0	1 400	0.75	10
1	2 000	1	12

表 6 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 6 Box-Behnken experimental design and results

序号	A 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	B 包合 时间/h	C 料 液比	包合物收 得率/%	药物利用 率/%	包合物含 药率/%	综合评 分 M
1	800	0.75	8	83.50	60.44	6.59	0.709 9
2	1 400	0.5	8	81.00	64.84	7.28	0.773 0
3	800	1	10	81.40	59.34	6.63	0.705 8
4	1 400	1	8	80.30	75.82	8.59	0.907 9
5	1 400	0.75	10	76.90	76.92	9.10	0.941 4
6	1 400	0.75	10	77.00	75.82	8.96	0.927 3
7	2 000	1	10	80.30	83.52	9.46	1.000 0
8	1 400	0.75	10	82.20	74.73	8.27	0.884 4
9	1 400	0.5	12	83.00	62.64	6.87	0.737 8
10	2 000	0.75	8	82.90	79.12	8.69	0.932 5
11	2 000	0.5	10	79.40	75.82	8.69	0.913 0
12	2 000	0.75	12	76.00	78.02	9.34	0.960 6
13	1 400	0.75	10	76.70	63.74	7.56	0.781 1
14	1 400	0.75	10	81.80	71.43	7.95	0.847 4
15	1 400	1	12	72.30	64.84	8.16	0.819 3
16	800	0.5	10	84.50	56.04	6.04	0.654 4
17	800	0.75	12	82.10	52.75	5.85	0.624 7

分 M 模型 $P < 0.05$ 、失拟项 $P > 0.05$, 表明该模型真实可靠, 具有统计学意义; 一次项对综合评分 M 的影响程度为 $A > B > C$, 其中 A 为极显著因素, B 为显著因素, 结果见表 7。 $R^2=0.914 3$, 调整 $R^2=0.804 2$, 表明该模型拟合和线性程度高, 可用于 SHD 总挥发油包合工艺优化; $Adeq=10.08$, 表明信号充足, 模型可用于导航设计空间^[15]。结果见表 8。

通过 Design-Expert.V8.0.6.1 软件得出转速(A)、包合时间(B)、料液比(C)对综合评分 M 影响的 3D 曲面图, 见图 3, 可知 3 因素交互作用显著, 在一定范围内对综合评分 M 产生影响, 其中转速(A)对 M 值影响最大, 包合时间(B)较大, 料液比(C)次之。

根据 Box-Behnken 试验设计结果, 可确定最佳包合工艺为转速 $2 000 r \cdot \min^{-1}$, 包合时间 1 h, 料液比 1 : 10。采用最佳工艺, 平行包合 3 次, 综合评分 M 分别为 0.981 0, 0.999 9, 0.963 4, 平均值为 0.981 4, 与模型预测值相差 2.87%, 说明本试验设计合理, 数据稳定可靠, 可信度高。

表 7 Box-Behnken 试验方差分析结果

Tab. 7 Analysis of variance results of the Box-Behnken test

方差来源	方差分析				
	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.19	9	0.022	8.30	0.005 4
A-转速	0.15	1	0.154	59.61	0.000 1
B-时间	0.015	1	0.016	6.07	0.043 2
C-料液比	4.09×10^{-3}	1	4.08×10^{-3}	1.58	0.249 3
AB	3.17×10^{-4}	1	3.17×10^{-3}	0.12	0.736 7
AC	3.21×10^{-3}	1	3.21×10^{-3}	1.24	0.302 6
BC	4.15×10^{-4}	1	7.15×10^{-4}	0.28	0.615 5
A ²	3.87×10^{-3}	1	3.87×10^{-3}	1.49	0.261 4
B ²	3.24×10^{-3}	1	3.24×10^{-3}	1.25	0.300 5
C ²	6.44×10^{-3}	1	6.44×10^{-3}	2.49	0.158 9
残差	0.018	7	2.59×10^{-3}		
失拟项	1.32×10^{-3}	3	4.41×10^{-4}	0.105	0.952 9
误差	0.017	4	4.20×10^{-3}		
总误差	0.21	16			

表 8 Box-Behnken 回归方程的可信性分析

Tab. 8 Credibility analysis of the Box-Behnken regression equation

标准差	平均值	变异系数/%	预测残差平方和	R ²	调整 R ²	预测 R ²	Adeq
0.051	0.831	6.127	0.047 4	0.914 3	0.804 2	0.776 0	10.08

2.7 包合物质量评价

2.7.1 薄层色谱法 取适量挥发油与 β-CD 制成物理混合物,称取物理混合物、包合物、β-CD 各 0.5 g,置于 10 mL 量瓶内,无水乙醇定容,离心取上清液作为供试品溶液,备用。取包合前后挥发油各 0.4 mL,无水乙醇定容,作为供试品溶液,备用。精密量取上述 5 种供试品溶液各 10 μL,点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛浓硫酸溶液,在 105 °C 加热至斑点显色清晰^[16],见图 4。包合前后挥发油、物理混合物出现斑点,β-CD 和包合物未出现斑点,薄层色谱结果证明,SHD 挥发油与 β-CD 形成包合物,且结构稳定,包合后未对挥发油成分造成明显影响。

2.7.2 紫外分光光度法 取“2.7.1”项下 5 种供试品溶液,于 200~400 nm 波长范围内进行扫描^[17],结果见图 5。

由图 5 可知,β-CD 和包合物未出现挥发油吸收峰,物理混合物出现挥发油吸收峰,包含前后挥发油吸收峰基本一致,可以进一步证明 SHD 挥发油与 β-CD 形成包合物,且结构稳定,包含前后挥发油性质基本一致。

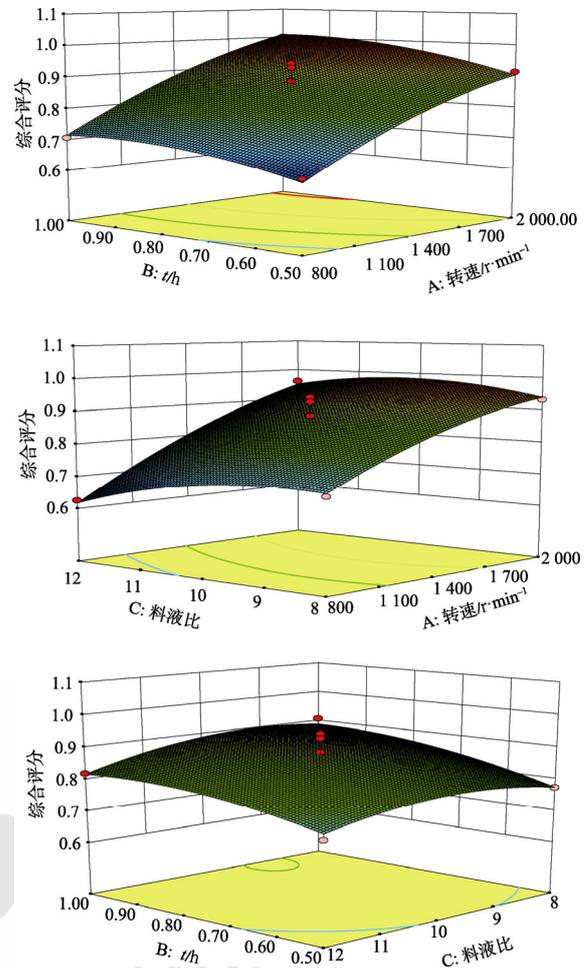


图 3 转速(A)、包合时间(B)、料液比(C)对综合评分影响的 3D 曲面图

Fig. 3 3D surface plot of the effect of rotational speed(A), wrapping time(B), and feed-to-liquid ratio(C) on the comprehensive score



图 4 薄层色谱图

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

Fig. 4 Thin layer chromatogram

1-β-CD; 2-post-encapsulation volatile oil; 3-pre-encapsulation volatile oil; 4-physical mixture; 5-clathrate.

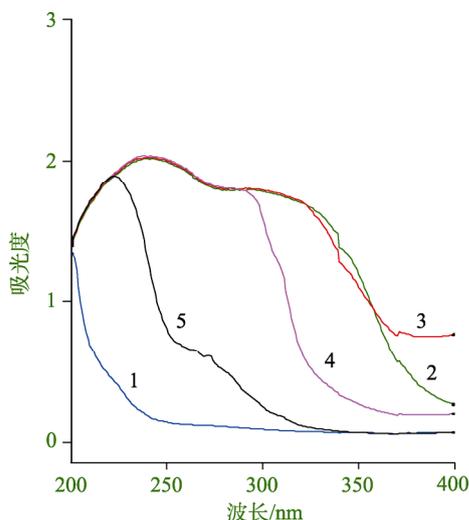


图5 紫外吸收光谱图

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

Fig. 5 UV absorption spectrogram

1-β-CD; 2-post-encapsulation volatile oil; 3-pre-encapsulation volatile oil; 4-physical mixture; 5-clathrate.

2.7.3 显微镜法 取β-CD、包合物适量加水制成玻片样本置于40倍显微镜下观察^[18]。由图6可知,β-CD为块状晶体,与挥发油形成包合物后形状不规则,形成一种新的结构。

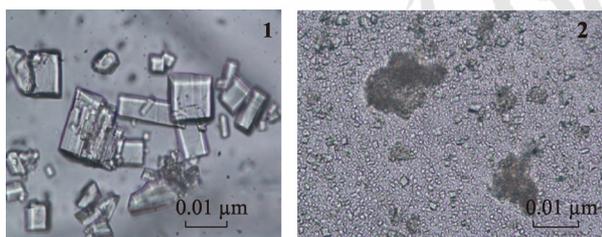


图6 显微鉴别图(40×)

1-β-CD; 2-包合物。

Fig. 6 Microscopic identification diagram(40×)

1-β-CD; 2-clathrate.

2.7.4 顶空-气相色谱-质谱联用法(HS-GC-MS)

供试品的制备:取包合前SHD挥发油0.2 mL置于10 mL量瓶中,甲醇定容;取1 g包合物,精密称定,置于10 mL量瓶中,甲醇定容,超声10 min。分别取50 μL置于顶空样品瓶中备用。

顶空进样条件:20 mL顶空进样瓶,进样平衡温度100℃、平衡时间15 min,持续进样时间1 min,环路温度110℃,传输线温度120℃;气相色谱条件:以HP-5石英毛细管柱(0.32 mm×30.0 m, 0.25 μm)为色谱柱,载气为高纯氦气,进样口温度为250℃,程序升温(初始温度从50℃开始,以2℃·min⁻¹升温到90℃,保持2 min;再以

5℃·min⁻¹升到120℃,保持5 min,再以2℃·min⁻¹升到150℃,保持4 min),进样量为1 μL,分流比为25:1。质谱条件:以电子轰击离子源为离子源,离子能量为70 eV,接口温度为250℃,扫描质量范围为m/z 50~500,溶剂延迟时间为3 min。

HS-GC-MS结果见图7,包合前SHD挥发油和包合物的色谱峰、出峰位置未发现明显变化,再次验证“2.7.1”与“2.7.2”的结果。采用Qualitative Navigator B.08.00软件对包合前SHD挥发油和包合物进行相对定量分析,结果见表9,其中α-蒎烯、β-蒎烯、4-异丙基甲苯、柠檬烯、γ-萜品烯、α-桉叶醇、β-桉叶醇相对含量较高^[19-20]。

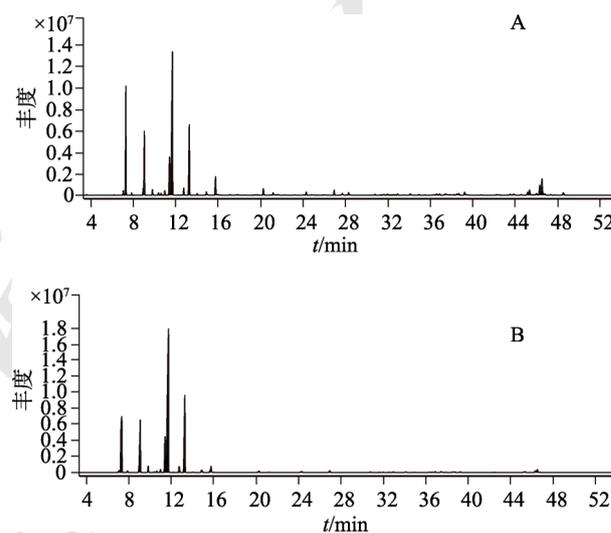


图7 HS-GC-MS总离子流图

A-包合前挥发油; B-包合物。

Fig. 7 Total ion flow diagram of HS-GC-MS

A-pre-encapsulation volatile oil; B-clathrate.

3 讨论

本研究通过单因素试验确定各因素范围,Plackett-Burman试验初步筛选出3个对包合试验影响较大的因素为转速、包合时间和料液比,Box-Behnken设计优化得出包合工艺为转速2000 r·min⁻¹、包合时间1 h、料液比1:10、包合温度30℃、物料比1:9。信息熵法根据各指标的变异程度反映的信息量客观地赋予各指标权重系数,求得综合评分M,反映出包合试验过程中的客观规律,避免了主观因素对试验的影响^[21]。

由Plackett-Burman方差分析可知,转速对包合影响较大,笔者认为转速低,挥发油难以进入β-CD腔道,而转速过高会将挥发油甩出腔道,同时溶液漩涡大、易飞溅,不利于包合。本实验最终

表 9 HS-GC-MS 包合前 SHD 挥发油与包合物成分分析
Tab. 9 Analysis of SHD volatile oil and clathrate composition before encapsulation by HS-GC-MS

峰	保留时间/ min	化合物	挥发油成分 相对含量/%	包合物成分 相对含量/%
1	7.079	水芹烯	0.52	0.50
2	7.315	α -蒎烯	13.42	14.55
3	7.865	莜烯	0.29	0.35
4	9.059	β -蒎烯	8.71	10.28
5	9.805	月桂烯	0.78	0.97
7	10.616	3-蒎烯	0.29	0.26
8	10.965	α -松油烯	0.64	0.56
9	11.397	4-异丙基甲苯	7.29	9.90
10	11.729	柠檬烯	30.90	40.12
11	12.730	罗勒烯	1.01	1.18
12	13.265	γ -蒎品烯	11.77	14.92
13	14.844	蒎品油烯	0.66	0.70
14	15.739	芳樟醇	3.22	1.07
15	20.266	4-蒎烯醇	1.23	0.34
16	24.186	2-异丙基-5-甲基茴香醚	0.55	0.09
17	26.934	(-)-冰片醇乙酸酯	0.73	0.32
18	30.770	(-)- α -蒎烯	0.15	0.10
19	31.616	β -榄香烯	0.16	0.09
20	32.915	(-)-反式石竹烯	0.22	0.13
21	36.876	β -瑟林烯	0.22	0.19
22	37.438	α -瑟林烯	0.42	0.28
23	38.473	β -红没药烯	0.15	0.13
24	38.480	菖蒲酮	0.20	0.13
25	39.232	Δ -杜松烯	0.62	0.14
26	45.344	Γ -桉叶醇	0.08	0.15
27	46.307	β -桉叶醇	2.44	0.37
28	46.491	α -桉叶醇	3.97	0.76
29	48.601	α -红没药醇	0.53	0.09

确定转速为 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ；包合温度较高时，挥发油容易逸散，不易进入 β -CD 的腔道，难以形成包合物，适当的包合温度利于溶解 β -CD 与挥发油形成包合物，节省能耗，符合工业化生产需求^[22]。

本研究通过包合物验证和 HS-GC-MS 分析表明，包合前后的成分稳定，可以有效地保留 SHD 中挥发性成分，但包合前后相对成分含量有所变化。笔者认为挥发性成分在进入 β -CD 时，存在竞争关系，或 β -CD 与挥发性成分存在主-客体间相互选择的作用，从而使包合前后相对成分含量发生变化^[23]。实验时发现，HS-GC-MS 直接测挥发油包合物，进样后只有几个小色谱峰，说明包合物对高温具有一定稳定性；甲醇超声后易检测到色谱峰，说明甲醇超声可破坏包合物结构，使挥

发油溶于甲醇，利于挥发性成分检测。

本研究通过 Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 筛选出的 SHD 总挥发油 β -CD 最佳包合工艺简单、易行，有利于提高挥发油稳定性，可用于工业化生产，为含挥发性有效成分的经典名方开发提供参考。

REFERENCES

- [1] (金)刘完素. 素问病机气宜保命集[M]. 宋乃光, 校注. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 39-43.
- [2] ZHANG X J, ZHANG X Y, LI J H, et al. Research progress of Sanhua Decoction[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2022, 24(6): 69-75.
- [3] ZHANG S C, YE J M. Study on expectorant effect of p-cymene[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 1979, 14(4): 152-154.
- [4] TENG J Y. Screening of chemical components of Fructus Aurantii for promoting gastric motility and study on its action mechanism[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [5] LI C X, YANG Y H, LENG D S, et al. Research progress on chemical constituents and quality evaluation of Fructus Aurantii[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2019, 21(2): 158-161.
- [6] DE SOUZA M C, VIEIRA A J, BESERRA F P, et al. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression[J]. Phytomedicine, 2019(53): 37-42.
- [7] LI Y H. Evaluation and mechanism of active factors in mastic gum against *Helicobacter pylori*[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2007.
- [8] ZHANG M F, SHEN Y Q. Research advances in neuropharmacological effect of Atractylodis Rhizoma and its active constituent β -eudesmol[J]. Anti Infect Pharm(抗感染药理学), 2017, 14(1): 6-11.
- [9] WANG J H, XUE B Y, LIANG A H, et al. Effects of β -eudesmol, an active constituent from Rhizoma Atractylodis on small intestine movement in rats[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2002, 37(4): 266-268.
- [10] HAO J X, ZHA L C, FAN X, et al. Optimization of inclusion process of Xiangguo Jianxiao Pian volatile oils based on the information entropy method and its characterization[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2022, 53(13): 3962-3971.
- [11] LI Y B, ZHOU B J. Study on inclusion technology of β -cyclodextrin of antipyretic and analgesic active fraction of "antipyretic and analgesic powder"[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2011, 34(3): 459-462.
- [12] LI H L, CUI X L, TONG Y, et al. Study on two preparation methods for β -CD inclusion compound of four traditional Chinese medicine volatile oils[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(7): 908-912.
- [13] ZHENG P, ZHAO K X, RAN Z T, et al. Optimization of volatile oil package and technology in Qizhiweitong Granules by response surface methodology combined with information

- entropy principle[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2019, 30(8): 1871-1875.
- [14] LI Z J, LIU Y W, WANG H X, et al. Optimized of ultrasound induced germination of *Saposhnikovia divaricate* seeds based on Plackett-Burman and Box-Behnken design[J]. Forest Engineer(森林工程), 2022, 38(1): 76-85.
- [15] XIN X D, ZHANG X F, WANG S Q, et al. Study on extraction technology of volatile oil from *Artemisia argyi* leaves[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43(1): 150-154.
- [16] DU F, XIA X H, ZHAO B Q, et al. Study on inclusion technology of mixed volatile oil of *Cinnamomum cassia* twig and *Angelica sinensis* with β -cyclodextrin[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(8): 1604-1606.
- [17] XUE F, YIN S Y. Preparation and authentication of β -cyclodextrin complex of volatile oil from *Ledum palustre*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(12): 1898-1902.
- [18] WANG W P, YIN X B, DONG X X, et al. Study on extraction and inclusion process of volatile oil from *Citri Grandis exocarpium* with saturated aqueous solution[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2017, 24(11): 67-70.
- [19] ZHAO D Y, LI X R, NI Y, et al. Study on the properties of mixed oil of *Atractylodes macrocephala*, *Curcuma zedoaria* and *Forsythia suspensa* before and after inclusion with β -cyclodextrin[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(7): 1243-1246.
- [20] CHEN J B, GUO L, WEN C X, et al. Chemotype study of volatile components from *Perillae Folium* of different germplasms[J]. China Pharm(中国药房), 2021, 32(8): 945-951.
- [21] XIE P, WEI H F, WEN R H, et al. Optimization on extraction process of *Mesona chinensis* Benth. based on BP neural network-genetic algorithm and information entropy theory[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2022, 29(2): 86-92.
- [22] GENG Z. Study on preparation of β -cyclodextrin inclusion compound of peppermint oil by saturated aqueous solution method[J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2013, 9(10): 38-40.
- [23] SUN Y. Fundamental studies on the inclusion of β -cyclodextrin with organic sulfur compounds[D]. Qingdao: China University of Petroleum, 2007.

收稿日期: 2022-10-04

(本文责编: 李艳芳)