技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)12-1692-04

正交试验优选鼻炎凝胶剂中挥发油的包合工艺

卓玉娟,刘 新,马廉举,喻录容
(重庆医科大学药学院临床药学教研室、重庆医科大学药物工程中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:优选 β-环糊精包合鼻炎凝胶剂中挥发油的最佳工艺条件。方法:采用正交试验法,以包合物收率和挥发油的包合率作为考察指标,确定包合的最佳工艺条件;用显微镜观察法、薄层色谱法(Thin-layer chormatography,TLC)、紫外扫描法(Ultraviolet spectroscop,UV)和差示扫描热分析(Differential scanning calorimety,DSC)进行鉴别。结果:包合的最佳工艺条件为挥发油:β-环糊精(ml/g)为 1:8,包合温度为 80℃,包合时间为 1 h。结论:优选工艺方法简单,效率较高,适合工业化生产。

【关键词】鼻炎凝胶剂;挥发油;β-环糊精;正交试验;包合
【中国图书分类法分类号】R283.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-26

Optimizing the inclusion process of volatile oil in anti-rhinitis medicine through orthogonal experiment

ZHUO Yu-juan, et al
(*Departmetn Clinical pharmacy College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To optimize β-cyclodextrin inclusion process in the inclusion of volatile oil in anti-rhinitis gel. *Methods*: Orthogonal experiment was performed, and the inclusion process was evaluated with inclusion rate of volatile oil, recovery rate of inclusion compound as indexes. The findings were distinguished by microscopy, thin-layer chormatography (TLC), ultraviolet spectroscop (UV) and differential scanning calorimety (DSC). *Results*: The optimized inclusion condition was as follows. The rate of volatile oil to β-cyclodextrin was 1:8 (ml/g), the inclusion temperature was at 80℃ and inclusion time was 1 h. *Conclusion*: The optimized method was simple and efficient, and suitable for industrialized production.

【Key words】Anti-rhinitis gel; Volatile oil; β-cyclodextrin; Orthogonal experiment; Inclusion

作者介绍:卓玉娟(1979-),女,硕士,
研究方向:中药制剂研究。
通讯作者:刘 新,男,教授,E-mail:liuxin8829@sina.com。
基金项目:重庆市教委自然科学基金资助(编号:KJ080309)。

123 例喉癌组织,确实存在 HPV 感染。PCR 和 DNA 测序结果让我们了解了重庆地区喉癌中 HPV 的感染情况。用 PCR 方法检测,L1 片段的检出率最高,16E6、E7 的检出率次之,18E6、E7 的检出率再次之。E6、E7 两者符合得很好。其它各特异型的检出率均较低,可能不是引起喉癌的主要的病毒性病因。

在喉癌中,用 HPV-16、-18 特异 E6/E7 引物和 L1 区设计的通用型引物所测得的阳性率均较高,从另一个侧面反映在喉癌中,HPV 的整合可能是一个比较普遍的现象。HPV-E6、E7 的 PCR 结果符合性很好,说明在整合过程中,E6、E7 常一起保留,与宫颈癌中 HPV-E6、E7 的文献报道一致[7-9]。

参 考 文 献

[1] Munger K, Howley P M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions [J]. Virus Res, 2002, 89(2):213-228.
[2] Gonzalez S L, Stremlau M, He X, et al. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7 [J]. J Virol, 2001, 75(16): 7583-7591.
[3] Lehtinen M, Apter D, Dubin G, et al. Enrolement of 22000 adolescent women to cancer registry follow-up for long-term human papillomavirus vaccine efficacy: guarding against guessing[J]. Int J STD AIDS, 2006, 17(8): 517-521.
[4] McNicol P, Guijon F, Wayer S, et al. Expression of human papillomavirus type16 E6、E7 gene varies quantitatively in biopsy tissue from different grades of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Clin Microbiol, 1995, 33(5): 1169-1173.
[5] Morgan D W, Ahdullah V, Quiney R, et al. Human papilloma virus and carcinoma of the laryngopharynx[J]. Laryngol Otol, 1999, 105(4): 288-290.
[6] Shen Z Y, Xu L Y, Chen X H, et al. The genetic events of HPV-immortalized esophageal epithelium cells[J]. Int J Mol Med, 2001, 8(5): 537-542.
[7] Sashiyama H, Shino Y, Kawamata Y, et al. Immortalization of human esophageal keratinocytes by E6 and E7 of human papillomavirus type 16 [J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 97-103.
[8] 姜海蓉,彭方毅,刘 芳,等.HPV16-E7 基因的原核克隆及表达,[J].重庆医科大学学报,2009,35(9):1215-1217.
[9] 姜海蓉,彭方毅,陈远翔,等.原位杂交检测 HPV-16E6,-18E6 在喉癌组织中的表达 [J].免疫学杂志,2009,25(4):442-446.

(责任编辑:关蕴良)

本中心研制的鼻炎凝胶剂由多味药材加工而成,其中辛夷、苍耳子、白芷、金银花、紫苏叶、细辛等药材均含挥发油,其君药辛夷所含挥发油中就鉴定出 69 种化合物[1]。挥发油为制剂的有效成分之一,但挥发油化学性质不稳定,在制剂中易挥发,为保证其疗效,增强其稳定性,将药材提取挥发油后,采用 β-环糊精包合。本文通过正交实验对包合工艺进行了优选,确定了最佳工艺,并用了适当的方法对包合物和包合前后的挥发油进行了鉴别,表明包合物已经形成,包合前后挥发油的化学性质未发生明显改变。

1 仪器和试药

挥发油提取器(上海玻璃仪器厂),电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司),分析天平(上海梅特勒—托利多公司),烘箱(重庆汉瞻仪器有限公司),显微镜(上海精密 XSP-8C),紫外分光光度计(岛津 UV-3150),差示扫描热分析仪(NETZs CH STA449C)。

β-环糊精购自广州省郁南县永光环状糊精有限公司,批号:070901,纯度大于 98%;95%乙醇为分析纯。制剂所用药材购自重庆全兴大药房有限公司,经鉴定均符合《中国药典》2005 年版一部相关规定。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取

按处方比例称取药材,加水 8 倍量,按《中国药典》2005 年版一部附录 XD 方法提取 5 h,得挥发油,相对密度为 0.875 1 mg/ml。

2.2 挥发油包合的正交实验[2-5]

采用 β-环糊精包合挥发油,常用的方法有:饱和水溶液法,超声法,研磨法等。本试验采用饱和水溶液法对挥发油进行包合,并通过正交试验对包合条件进行优选。经预实验,选择主要的影响因素:油与环糊精的比例、包合温度、搅拌时间 3 个因素,各取 3 个水平,按 $L_9(3^4)$正交表进行正交设计(表 1)。因挥发油包合率越高,则包合效果越好,故挥发油包合率可作为衡量包合效果的重要指标。包合物收率对大生产也有非常重要的意义,在 β-环糊精量和挥发油投入量一定的情况下,包合物收率越高,则包合效果越好,故包合物收率可作为衡量包合效果的次要指标。为了便于分析将包合物收率和挥发油包合率合并为综合评分并赋予二者不同的权重,挥发油包合率为 0.7,包合物收率为 0.3。

2.2.1 包合工艺研究 按正交试验设计方案要求,精密称取 β-环糊精,在 40℃、60℃和 80℃3 种水温下,分别将环糊精按 37、80、183 g/L 的比例配成相应温度下的饱和水溶液,控制加热温度,于搅拌(500 r/min)下缓慢加入挥发油乙醇溶液(挥发油:95%乙醇 =1:5)(V/V),边加边搅,恒温下搅拌至规定时间。然后将形成的包合物混悬液置冰箱(0 ℃~5 ℃)冷藏 24 h,沉淀,抽滤,摊开,50 ℃干燥 4 h,再用少量石油醚(30℃~60℃)分 3 次洗涤去未包合的挥发油,挥干石油醚,得疏松白色包合物粉末,称重,备用。

2.2.2 挥发油空白回收率测定 取挥发油 1 ml,置于加有沸石的挥发油提取器中,加水 200 ml,按挥发油提取方法提取挥发油,量取回收的挥发油量,计算挥发油提取器的回收率为 90.4%,见表 2。

回收率 = 回收挥发油量(ml)/加入挥发油量(ml) × 100%

2.2.3 包合物收率和挥发油包合率的测定 精密称定正交试验中所得干燥包合物,计算包合物收率,其结果见表 3。并将干燥的精密称重的包合物,置于挥发油提取器中,放入沸石,加水适量,振摇混合后,按挥发油提取方法提取挥发油,加热至沸并保持微沸,观察挥发油测定器中油量不再增加,停止加热,放置 1 h,读数,并计算挥发油包合率,其结果见表3。

包合物收率 = 包合物重量(g)/[β-环糊精(g)+ 投油量(ml) × 油密度] × 100%

挥发油包合率 = 回收的挥发油量(ml)/[加入的挥发油量(ml) × 挥发油空白回收率] × 100%

根据正交试验的结果直观分析可知,因素 A>B>C,A2B3C3 是最佳包合条件。进一步方差分析可知,挥发油与 β-环糊精的比例为制备工艺的显著性影响因素,包合温度不显著,包合时间影响最不显著。根据正交实验结果并结合生产的实际情况确定包合条件为:β-环糊精(ml/g)为 1:8,包合温度为 80℃,包合时间为 1 h,此条件 A2B3C1 正好在正

表 1 因素水平表

水平	A	B	C
	挥发油:β-CD(ml/g)	包合温度(℃)	包合时间(h)
1	1:6	40	1
2	1:8	60	2
3	1:10	80	3

表 2 空白回收率

试验号	加入挥发油的体积 V(ml)	回收挥发油的体积 V(ml)	挥发油回收率(%)	平均值(%)
1	1.00	0.90	90.1	
2	1.00	0.89	89.0	90.4
3	1.00	0.92	92.0	

交设计表中,且综合评分为最高的。以此条件重复进行 3 次验证试验,试验结果见表 5。

根据试验结果,在此条件下连续进行 3 次试验,包合物收率、挥发油包合率和综合评分均与正交试验 A2B3C1 的结果接近且稳定,由此选择此条件为最佳的包合试验条件。

2.3 包合物验证试验

2.3.1 显微镜成像法 文献[7]报道,由于晶格排列发生变化所致显微镜观察含药的包合物与不含药的包合物形状不同。按上述包合物制备方法将 β-环糊精制成 β-环糊精空白包合物,另取挥发油和 β-环糊精制成包合物,分别在显微镜(10×10)下观察,前者为规则、透明、块状的结晶,而包合物则为无规则粉末,见图 1。说明 β-环糊精和挥发油已经形成包合物。

2.3.2 薄层色谱法(TLC)[8] 取 β-环糊精制成包合物水饱和溶液作为样品溶液 A;取挥发油 50%乙醇溶液,作为样品溶液 B(包合前的挥发油);取包合物按挥发油提取方法提取的挥发油 50%乙醇溶液作为样品溶液 C(包合后的挥发油);取 β-环糊精和挥发油的物理混合物制成的 50%乙醇溶液作为样品 D;取 β-环糊精水饱和溶液作为样品 E。分别取上述五种溶液各 5 μl,点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30℃~60℃)-醋酸乙酯(8:1)为展开剂,饱和 30 min 后,上行展开。取出,晾干,用 5%磷钼酸溶液显色。挥发油、从包合物回收的挥发油和 β-环糊精与挥发油的物理混合物制成的溶液在相同的位置显相同斑点,而包合物水饱和溶液及 β-环糊精水饱和溶液在相同的位置不显斑点。由此说明包合物已形成而非物理混合,且包合过程挥发油成分见变化,没有游离的挥发油,包合效果良好,见图 2。

2.3.3 紫外扫描法(UV) 文献[7]报道,主要是从紫外可见吸收曲线与吸收峰的位置和高度来判断包合物是否形成。分别取挥发油、β-环糊精、包合物以及挥发油与 β-环糊精的物理混合物,加 50%的乙醇溶液制成溶液,滤过,滤液于 200~400 nm 作紫外扫描。结果表明:挥发油和挥发油与 β-环糊精的物理混合物紫外图谱基本一致,挥发油和包合物的紫外图谱则有较大区别,挥发油紫外最大吸收峰在包合物中已经消失,说明挥发油与 β-环糊精形成了包合物,见图 3。

2.3.4 差示扫描热分析法(DSC) 取一定量样品,设定一定的扫描速度及扫描范围温度,对挥发油、β-环糊精、包合物及挥发油和 β-环糊精物理混合物(与包合物含药量相同)分别进行了差示扫描热分析。结果显示挥发油在 89℃时有 1 个特征吸热峰;而 β-环糊精在 62℃时有 1 个特征吸热峰、220℃时有 1 个特征放热峰和 333℃时有 1 个特征吸热峰;挥发油和 β-环糊精物理混合物在 60℃、90℃和 332℃处均有 1 个吸热峰,在 219℃有 1 个放热峰;包合物在挥发油 89℃时特征吸热峰和 β-环糊精 220℃左右的放热峰消失,而在 110℃时多了 1 个吸热峰。由此说明挥发油包合物构成了新的物相,见图 4。

3 讨 论

挥发油的水溶性较差且易挥发,很难和 β-环糊精进行直接包合,故应选择适当的溶剂,和挥发油可以互溶的有乙醚、石油醚、乙醇、乙酸乙酯和丙酮等,考虑到制剂和生产操作的安全性,本实验选择 95%乙醇。

挥发油成分中以萜类成分多见,另外,尚含有小分子脂肪族化合物和小分子芳香族化合物,具有特殊的气味、易挥发,对空气、光、水和热均较敏感,易氧化变质,从而降低疗效。通过 β-环糊精包合后,在一定程度上掩盖了它的不良气味并使它与外界隔离,避免了空气、光、水和热的影响,从而保证了制剂的质量。

β-环糊精包合技术目前是中药制剂中的 1 项

表 3 正交试验结果

试验号	挥发油:β-CD (ml/g)	包合温度(℃)	搅拌时间(h)	包合物收率(%)	挥发油包合率(%)	综合评分(%)
1	1:6	40	1	48.3	38.8	41.6
2	1:6	60	2	51.1	50.7	50.8
3	1:6	80	3	62.3	59.8	60.5
4	1:8	40	2	82.7	72.6	75.6
5	1:8	60	3	81.6	78.9	79.7
6	1:8	80	1	86.9	80.6	82.5
7	1:10	40	3	82.6	66.6	71.4
8	1:10	60	1	87.9	70.5	75.7
9	1:10	80	2	88.4	75.7	79.5
均值 1	51.007	62.893	66.620	66.957		
均值 2	79.277	68.750	68.653	68.237		
均值 3 极差	75.543 28.270	74.183 11.290	70.553 3.933	70.633 6.671		

注:综合评分=挥发油包合率×0.7+包合物收率×0.3

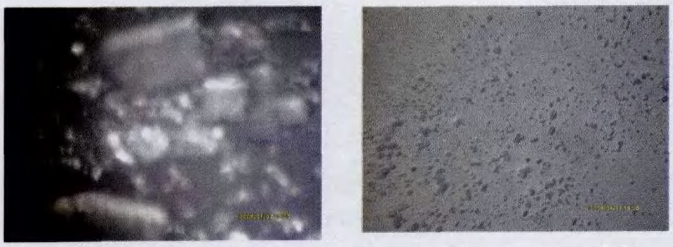
表 4 综合评分方差分析结果表

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	1 415.179	2	707.58	67.71	$P<0.05$
B	191.286	2	95.64	9.15	
C	23.216	2	11.60	1.11	
D	20.900	2	10.45		
误差	1 650.58	8			

注：$F_{0.05}(2,2)=19$ $F_{0.01}(2,2)=99$

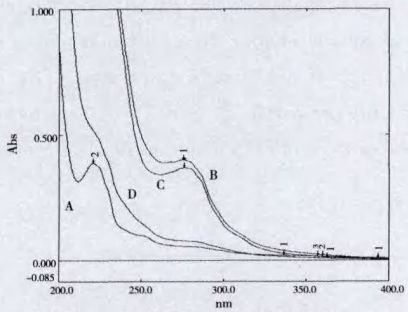
表 5 最佳包合条件验证结果

试验号	包合物收率(%)	挥发电包合率(%)	综合评分(%)
1	83.7	79.3	82.4
2	84.9	82.6	84.2
3	81.6	78.6	80.7



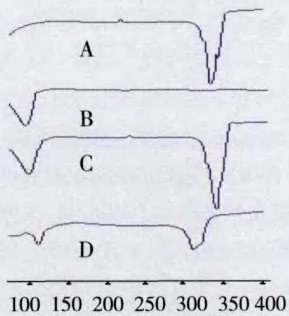
A. 含挥发油包合物　　B. 空白包合物

图 1 包合物显微镜观察照片



A. β－环糊精；B. 挥发油；C. 物理混合物；D. 包合物

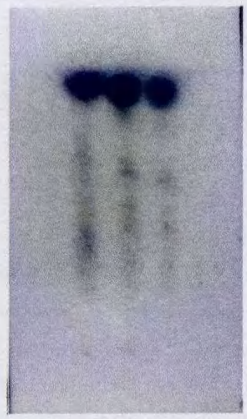
图 3 紫外扫描图



A. β-CD；B. 挥发油；C. 物理混合物；D. 包合物

图 4 差示扫描热分析图

新技术。实验结果表明，挥发油经包合后成为白色粉末，成功地将液体药物进行固化，有利于多种剂型的研制，便于临床应用。本包合物中各成分的在包含过程中及制剂中的变化情况还有待进一步研究。



A　B　C　D　E

A. 包合物；B. 包合前的挥发油；C. 包合后的挥发油；D. 物理混合物；E. β-CD

图 2 挥发油 TLC 图

参 考 文 献

[1] 徐植灵，潘炯光，赵中振.辛夷挥发油的研究[J].中国中药杂志，1989，14(5)：38-39.

[2] 陆　彬.药物新剂型与新技术[M].北京：人民卫生出版社，1998.37.

[3] 余松林.医学统计学[M].北京：人民卫生出版社，2002.349-355.

[4] 李春花，李　清，宋晓宇，等.正交试验优化鼻渊灵颗粒中挥发油的包合工艺[J].中国药房，2006，17(3)：180.

[5] 佟　爽，阎　君，张　本.一种抗鼻炎制剂的挥发油包合试验[J].中成药，2006，28(4)：488-489.

[6] 聂其霞，赵小妹，臧　琛，等.辛夷挥发油 β－环糊精包合物的制备工艺研究[J].中国中药杂志，2003，28 (6)：507-508

[7] 陆　彬.药物新剂型与新技术[M].北京：人民卫生出版社.1998.47-51.

[8] 薛　明，狄留庆，黄耀洲.细辛辛夷挥发油的羟丙基－β－环糊精包合物制备工艺的研究[J].时珍国医国药，2002，13(3)：143-145.

(责任编辑：冉明会)