

气滞胃痛颗粒中挥发性成分提取工艺的优化

郑 鹏¹, 赵 昭², 李佳佳¹, 顿佳颖¹, 李春花^{1*}

(1. 河北中医学院药学院, 河北 石家庄 050200; 2. 河北省图书馆, 河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 优化气滞胃痛颗粒中挥发性成分的提取工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以加水量、浸泡时间、提取时间为影响因素, 挥发油提取率及柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮含有量的综合评分为评价指标, 响应面法结合信息熵优化提取-共沸精馏耦合工艺。**结果** 最佳条件为加水量 13 倍, 浸泡时间 1.1 h, 提取时间 6.5 h, 综合评分 0.922 2。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取气滞胃痛颗粒中挥发性成分。
关键词: 气滞胃痛颗粒; 挥发性成分; 提取; 提取-共沸精馏耦合; 响应面法; 信息熵
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)06-1214-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.003

Extraction process optimization for volatile components from Qizhi Weitong Granules

ZHENG Peng¹, ZHAO Zhao², LI Jia-jia¹, DUN Jia-ying¹, LI Chun-hua^{1*}

(1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Hebei Provincial Library, Shijiazhuang 050011, China)

KEY WORDS: Qizhi Weitong Granules; volatile components; extraction; aqueous extraction coupling rectification; response surface method; information entropy

气滞胃痛颗粒基于《伤寒论》中的四逆散, 由枳壳、香附(炙)、元胡索(炙)、甘草(炙)、白芍、柴胡组成, 已在全国数千家医院推广应用 20 余年^[1], 有效率达 85% 以上。张春艳等^[2]对气滞胃痛颗粒挥发性成分进行表征及药材归属, 发现其挥发性成分来源于枳壳与香附, 前者主要为柠檬烯, 具有减痛、抑菌、消炎、防治癌症的作用^[3]; α -香附酮、香附烯酮, 具有抗菌消炎、镇痛、抑制子宫收缩等作用, 在妇科疾病治疗中有广泛应用^[4]。本实验基于响应面法结合信息熵法, 优化气滞胃痛颗粒中挥发性成分提取工艺。

1 材料

1.1 仪器 SPH-300 氢气发生器、SPB-3 全自动空气源(北京 HP 分析技术研究所); 安捷伦 7890B 气相色谱仪(美国安捷伦科技公司); LQ-A10002 电子天平(上海乐祺精密电子厂); BSM1

204 分析天平(上海卓精仪器厂); KQ-300DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料 枳壳(批号 16081801)、醋香附(批号 16120301)购自安国药材市场, 经河北省药品检验研究院孙宝惠老师鉴定符合 2015 年版《中国药典》一部相关项下规定。柠檬烯、 α -香附酮(Z1708242)、香附烯酮(Z1705241)对照品。无水乙醇、甲醇为分析纯(天津市永大化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取^[5-6] 按组方比例称取枳壳、醋香附各 50 g, 粉碎后置于圆底烧瓶中, 加适量水混匀, 连接提取-共沸精馏耦合装置提取一定时间, 按 2015 年版《中国药典》规定读取挥发油量, 并计算其含量。

2.2 单因素试验^[7] 称取样品 4 份, 其中 3 份按

收稿日期: 2018-08-22
基金项目: 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2017245)
作者简介: 郑 鹏(1994—), 男, 硕士生, 研究方向为中药药剂学。Tel: 15612792566
* 通信作者: 李春花(1965—), 女, 教授, 研究方向为中药制剂新剂型与新方法。Tel: 13803369966, E-mail: 13393378952@163.com

2015年版《中国药典》规定分别制成粗粉、中粉、细粉，另1份保持不变，固定浸泡时间3 h、提取时间3 h、加水量7倍，按“2.1”项下方法提取挥发油，测得4份样品提取率分别为0.25%、0.5%、0.45%、0.3%，即粗粉最高，故选择其作为粒径。

然后，对提取时间、加水量、浸泡时间进行考察。称取5份样品，固定浸泡时间3 h、加水量7倍，提取2、4、6、8、10 h，测得挥发油提取率分别为0.45%、0.6%、0.7%、0.7%、0.7%，即提取6 h时最高，故选择5、6、7 h；固定浸泡时间3 h、提取时间3 h，加入7、9、11、13、15倍量水，测得挥发油提取率分别为0.5%、0.6%、0.65%、0.8%、0.8%，即加水量13倍时最高，故选择12、13、14倍；固定加水量7倍、提取时间3 h，浸泡0、1、2、3、4 h，测得挥发油提取率分别为0.25%、0.35%、0.35%、0.35%、0.3%，即浸泡1 h时最高，故选择0.5、1、1.5 h。

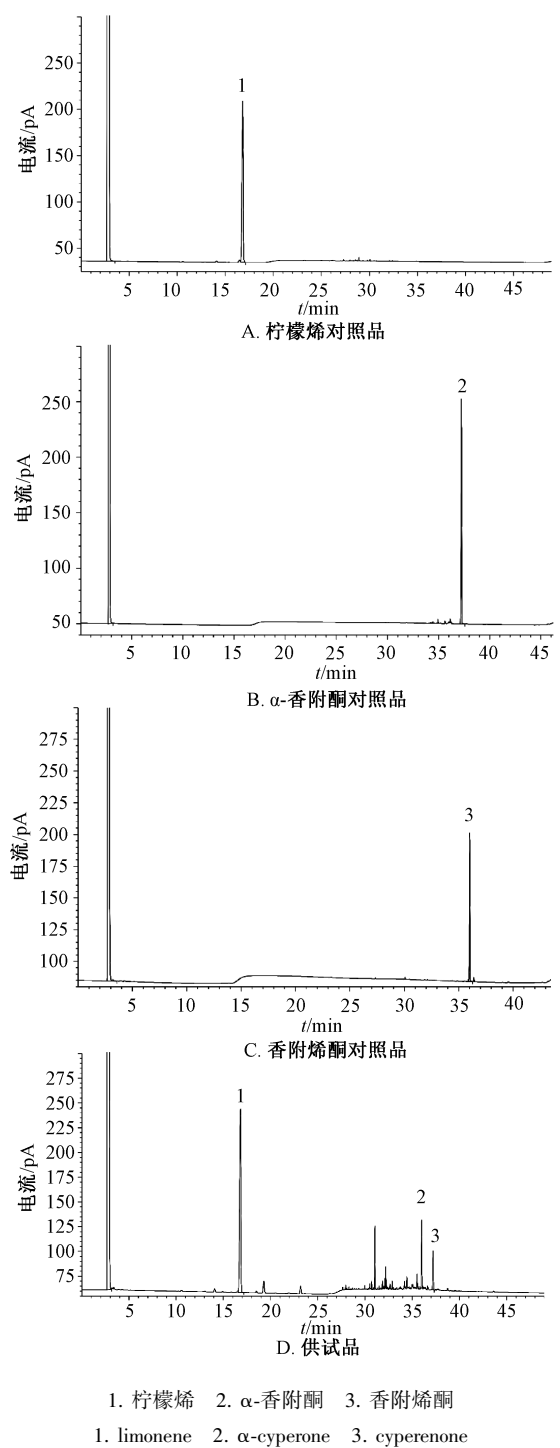
2.3 GC法测定柠檬烯、α-香附酮、香附烯酮含量

2.3.1 色谱条件^[8-9] 安捷伦 HP-5 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)；氢火焰离子化检测器 (FID) 检测；程序升温，见表1；进样量5 μL；分流比70：1；载气N₂；进样口温度250℃；检测器温度260℃；空气体积流量390 mL/min；氢气体积流量36 mL/min；尾吹气体积流量15 mL/min；氮气体积流量1 mL/min。色谱图见图1。

表1 升温程序		
Tab.1 Heating-up programs		
温度/℃	升温速率/(℃·min ⁻¹)	保持时间/min
55	1	0
80	25	0
170	1	0
190	30	0
300	0	10

2.3.2 对照品溶液制备 分别精密称取柠檬烯、α-香附酮、香附烯酮对照品7.90、6.70、1.92 mg，置于5 mL量瓶中，甲醇定容至刻度，即得(1.58、1.34、0.384 mg/mL)。

2.3.3 供试品溶液制备 按“2.1”项下方法提取挥发油，无水硫酸钠干燥后3 000 r/min离心6 min，取0.1 mL置于50 mL量瓶中，甲醇溶解，即得。



1. 柠檬烯 2. α-香附酮 3. 香附烯酮
1. limonene 2. α-cyperone 3. cyperenone

图1 各成分GC色谱图

Fig.1 GC chromatograms of various constituents

2.3.4 线性关系考察 取对照品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定5次，其中α-香附酮、香附烯酮进样量分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μL，柠檬烯分别为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μL。以峰面积为纵坐标(Y)，进样量为横坐标(X)进行回归，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents			
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
柠檬烯	$Y=194.18X+13.01$	0.999 7	1.58~7.90
α -香附酮	$Y=276.87X-23.75$	0.999 9	0.67~3.35
香附烯酮	$Y=367.53X-5.09$	0.999 7	0.19~0.94

2.3.5 精密度试验 取对照品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮峰面积 RSD 分别为 0.94%、0.52%、1.73%，表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下于 2、4、6、8、10 h 进样测定，测得柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮峰面积 RSD 分别为 0.27%、0.16%、0.25%，表明溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 按“2.3.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，测得柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮峰面积 RSD 分别为 0.26%、0.12%、0.23%，表明赶快方法重复性较好。

2.3.8 加样回收率试验^[10-11] 分别称取一定量柠

表 4 试验设计及结果

Tab. 4 Design and results of tests								
试验号	A/倍	B/h	C/h	挥发油提取率/%	柠檬烯/mg	α -香附酮/mg	香附烯酮/mg	Y 综合评分
1	13	0.5	5	1.5	1 057.89	149.99	131.33	0.720 4
2	13	1	6	1.7	1 790.67	163.91	136.27	0.880 3
3	13	1.5	7	1.7	1 817.18	156.92	125.7	0.851 7
4	14	1	5	1.7	1 789.98	99.55	103.25	0.711 6
5	13	0.5	7	1.6	1 456.35	142.84	118.03	0.720 7
6	14	1.5	6	1.5	1 408.92	167.71	136.35	0.817 4
7	12	1.5	6	1.7	1 964.79	156.98	107.82	0.838 9
8	14	0.5	6	1.5	1 247.13	151.61	131.33	0.754 8
9	12	1	7	1.7	1 682.37	135.85	90.64	0.722 6
10	12	1	5	1.5	1 214.06	157.25	136.19	0.768 2
11	13	1	6	1.6	1 666.16	194.47	155.74	0.945 1
12	12	0.5	6	1.6	1 250.64	119.98	94.6	0.631 5
13	13	1.5	5	1.8	1 826.28	116.35	85.91	0.709 2
14	13	1	6	1.6	1 511.15	189.05	151.74	0.902 2
15	14	1	7	1.8	1 820.49	167.22	140.68	0.902

注:综合评分=(挥发油提取率/最大值) $\times w_1$ +(柠檬烯含量/最大值) $\times w_2$ +(α -香附酮含量/最大值) $\times w_3$ +(香附烯酮含量/最大值) $\times w_4$,其中 w 为各指标权重系数,由信息熵法求得

2.4.2 信息熵^[12-13] 1 个评价指标系统中有 m 个评价对象、 n 个评价指标，其形成的原始指标数据

柠檬烯含量已知的枳壳饮片及 α -香附酮、香附烯酮含量已知的醋香附饮片，按 2015 年版《中国药典》规定制成粗粉，精密称取 6 份，每份 0.25 g，加入适量对照品溶液，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮平均加样回收率分别为 97.15%、97.83%、98.96%，RSD 分别为 1.35%、1.61%、0.43%。

2.4 工艺优化

2.4.1 响应面法 在单因素试验基础上，采用 Design Expert 10.0 软件，选择加水量（A）、浸泡时间（B）、提取时间（C）作为影响因素，挥发油提取率及柠檬烯、香附酮、香附烯含有量的综合评分（Y）作为评价指标，设计 3 因素 3 水平、15 个试验点的响应面分析试验（12 个析因试验、3 个中心试验）。因素水平见表 3，结果见表 4。

表 3 因素水平

Tab. 3 Factors and levels			
水平	A 加水量/倍	B 浸泡时间/h	C 提取时间/h
-1	12	0.5	5
0	13	1	6
1	14	1.5	7

矩阵为 $Y=(y_{ij})_{mn}$ 。对表 5 数据处理，建立原始评价指标矩阵 $(X_{ij})_{mn}$ 和概率矩阵 $(P_{ij})_{mn}$ 。

X=

1.51.71.71.71.61.51.71.51.71.51.61.61.81.61.8

1507.891790.671817.181789.981456.351408.921964.791247.131682.371214.061666.161250.641826.281511.151820.49

149.99163.91156.9299.55142.84167.71156.98151.61135.85157.25194.47119.98116.35189.05167.22

131.33136.27125.70103.25118.03136.35107.82131.3390.64136.19155.7494.685.91151.74140.68

P=

0.06120.0690.0690.0690.0650.0610.0690.0610.0690.0610.0650.0650.0730.0650.073

0.0450.0760.0770.0760.0620.0600.0830.0530.0710.0520.0710.0530.0780.0640.077

0.0660.0720.0690.0430.0620.0740.0690.0670.0600.0690.0860.0530.0510.0830.074

0.0710.0740.0680.0560.0640.0740.0580.0710.0490.0740.0840.0510.0470.0820.076

$$P_{ij} = X_{ij} / (\sum_{j=1}^n X_{ij})$$

计算各项指标信息熵，得到评价指标 H_i ，公

式为 $H_i = -1/\ln\eta \times \sum_{j=1}^n P_{ij} \times \ln P_{ij}$ ，得 $H_i = [0.9992$

$0.9943 \quad 0.9949 \quad 0.9943]$ 。再计算各指标权重

系数 W_i ，公式为 $W_i = \frac{1 - H_i}{\sum_{i=1}^m (1 - H_i)}$ ，得 $W_i =$

[0.0411 0.3312 0.2985 0.3292]，分别代表挥发油提取率及柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮含量。

2.4.3 方程拟合与分析^[14] 通过 Design Expert 10.0 软件对表 4 数据进行多元回归拟合分析，得方程为 $Y = 0.91 + 0.029A + 0.049B + 0.037C - 0.036AB + 0.061AC + 0.035BC - 0.061A^2 - 0.088B^2 - 0.070C^2$ ，方差分析见表 5。

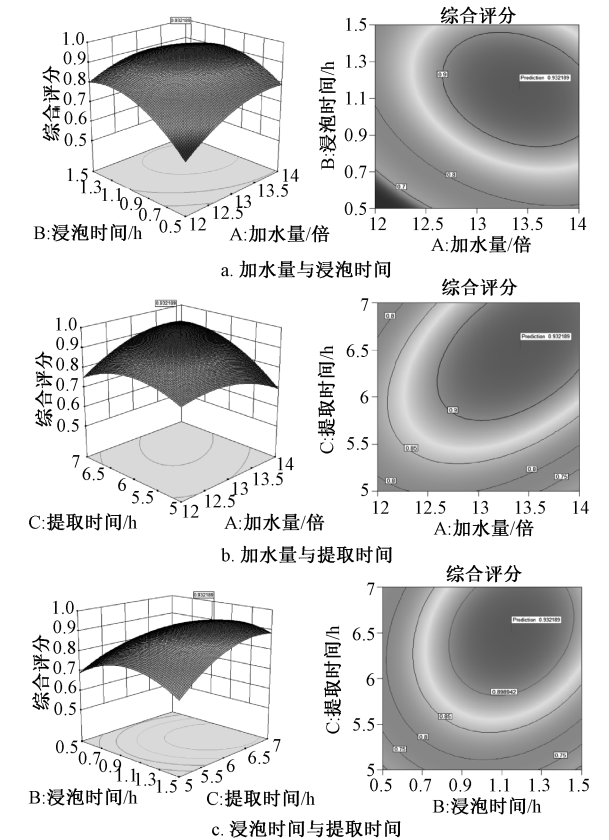
表 5 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.11	9	0.013	12.63	0.0061
A	6.880×10^{-3}	1	6.880×10^{-3}	6.81	0.0477
B	0.019	1	0.019	19.04	0.0073
C	0.011	1	0.011	10.79	0.0219
AB	5.242×10^{-3}	1	5.242×10^{-3}	5.19	0.0717
AC	0.015	1	0.015	14.98	0.0118
BC	4.886×10^{-3}	1	4.886×10^{-3}	4.54	0.0791
A ²	0.014	1	0.014	13.39	0.0146
B ²	0.029	1	0.029	28.33	0.0031
C ²	0.018	1	0.018	17.95	0.0082
残差	5.050×10^{-3}	5	1.010×10^{-3}	—	—
失拟项	2.877×10^{-3}	3	9.589×10^{-3}	0.88	0.5700
误差	2.173×10^{-3}	2	1.087×10^{-3}	—	—
总离差	0.12	14	—	—	—

由表可知，模型有显著影响 ($P < 0.01$)，失拟项不显著 ($P > 0.05$) 不显著，表明模型真实可靠；各因素影响程度依次为 $B > C > A$ ；各一次项、各二次项、交互项 AC 有显著影响 ($P < 0.05$ ， $P <$

0.01)； $R^2 = 0.9579$ ， $R^2_{adj} = 0.8820$ ，表明该模型可解释 88.20% 响应值的变化； $r = 0.9167$ ，表明响应值的变化有 91.67% 来源于所选变量，响应面图^[15-16]见图 2。通过 Design Expert 10.0 软件分析，得到最优工艺为加水量 13.418 倍，浸泡时间 1.149 h，提取时间 6.518 h，考虑到实际情况，将其修正为加水量 13 倍，浸泡时间 1.1 h，提取时间 6.5 h。



注：左图为三维曲面图，右图为等高线图

图 2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

2.4.4 验证试验 采用“2.4.3”项下优化工艺进行 3 批验证试验，测得综合评分分别为 0.9316、0.9120、0.9230，平均 0.9222，与模型预测值 0.9322 相当（偏离率为 1%），表明模型预测性良

好，稳定可靠。

3 讨论

正交试验只能进行线性数学模型拟合^[17]，确定单一因素对试验结果的影响，但往往与真实值有较大差异；响应面法通过 Design Expert 10.0 软件，可更直观地分析各交互因素对试验结果的影响，结果与真实值差异较小。

目前，关于挥发油最佳提取工艺的研究大多仅选择其提取率作为评价指标，但所含有效成分含量也是其发挥药效的重要因素。本实验先对挥发油提取率进行单因素试验，再综合柠檬烯、 α -香附酮、香附烯酮含量进行响应面优化，以期提高其准确性。由于柠檬烯含量与香附烯酮、 α -香附酮有明显差异，易于提取前者的方法不一定适合后两者，故再通过信息熵赋予各指标权重系数，计算其综合评分，可使优化工艺更严谨，并能有效提高气滞胃痛颗粒中挥发油含量，为该制剂进一步开发提供科学依据。

参考文献：

[1] 许雯雯,王 帅,孟宪生,等. 基于抗炎镇痛作用的气滞胃痛颗粒颗粒有效组分活性研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 295-298.

[2] 张春艳,包永睿,孟宪生,等. 气滞胃痛颗粒挥发性成分表征及药材归属研究[J]. 中南药学, 2014, 12(7): 654-657.

[3] 舒尊鹏,胡书法,翟亚东,等. 中药枳壳化学成分及药理作用研究[J]. 科技创新与应用, 2012(7A): 8-9.

[4] 田友清,丁 平. 香附挥发油的研究进展及其开发前景[J]. 中国药业, 2010, 19(3): 1-2.

[5] 耿榕徽,姜福义,王春民,等. 提取-共沸精馏耦合工艺提取挥发油制备颈复康颗粒的活血化瘀作用[J]. 中国实验

方剂学杂志, 2013, 19(2): 239-242.

[6] 杨宇杰,刘振虹,王春民,等. 提取-共沸精馏耦合工艺提取挥发油制备颈复康颗粒的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 274-278.

[7] 潘 磊,郑 柳,牛 卉,等. 细辛挥发油成分提取与甲基丁香酚含量测定的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 967-970.

[8] 钟才宁,何 敏,杨再波,等. 均匀设计优化野菊花挥发油提取工艺及抗氧化研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 888-889.

[9] 张菲菲,马永建,孙桂菊,等. 菊花挥发油提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 834-836.

[10] 刘继鑫,王克霞,李朝品. 水蒸气蒸馏法提取中药挥发油存在的问题及解决方法[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 97-98.

[11] 袁子民,王 静,吕 佳,等. 正交法优选肉豆蔻挥发油提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 1063-1064.

[12] 王师菡,王 阶,何庆勇,等. 基于信息熵法提取名老中医治疗冠心病心绞痛的药对[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(10): 2150-2152.

[13] 郭志忠,魏 滨,孙继佳,等. 基于信息熵的乙肝后肝硬化证素提取及病机分析[J]. 世界中医药, 2016, 11(10): 2172-2175, 2179.

[14] 王月亮,陈 凯,李 慧,等. 星点设计-响应面法优化石菖蒲挥发油经丙基- β -环糊精的包合工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 20-24.

[15] 郭宜城,谭志江,丁志军,等. Box-Behnken 设计-效应面法优化荆防止痒颗粒中挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 32-35.

[16] 谷民举,鞠建峰,朱宗敏. 星点设计-效应面法优化荆芥穗黄酮类成分的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 29-33.

[17] 高天曙,赵义红,王会丽. Box-Behnken 响应面分析法优化金银花药材中绿原酸与木犀草苷的提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2211-2215.