

基于熵权法与响应面法优化香连和胃汤挥发油提取工艺

张秀芳¹, 张静宜^{2,3}, 刘明松¹, 李春花^{1,3,4,5*} (1.河北中医学院药学院, 石家庄 050090; 2.河北省中医院药学部, 石家庄 050000; 3.河北省中药制剂产业技术研究院, 石家庄 050090; 4.河北省中药组方制剂技术创新中心, 石家庄 050090; 5.河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 石家庄 050090)

摘要: 目的 筛选香连和胃汤中挥发油的最优提取工艺及包合工艺, 提高挥发油的利用率。方法 以主要成分百秋李醇、桉油精、乙酸龙脑酯以及挥发油得率为指标, 采用 GC 法测定有效成分含量, DX8trial 软件设计试验方案, 熵权法处理实验数据, 最终筛选出挥发油最佳提取工艺; 采用研磨法对挥发油进行包合, 通过正交试验设计包合方案, 逐一记录挥发油包合率、包合物收得率及包合物含油率 3 个指标, 熵权法对指标进行权重分析, 根据权重系数计算 3 个指标的综合评分, 并筛选出最佳包合工艺。结果 挥发油最佳提取工艺: 浸泡时间 1.5 h, 提取时间 8 h, 加水量为 8 倍水。最佳包合工艺: 采用研磨法进行制备, β -CD-挥发油为 6:1, 料液比为 6:1, 研磨时间为 0.5 h。结论 通过试验筛选的挥发油最佳提取工艺能提高香连和胃汤中挥发油的得率及有效成分含量, 筛选所得最佳包合工艺, 能有效包合香连和胃汤中的挥发油。

关键词: 香连和胃汤; 挥发油; 响应面法; 正交试验; 包合工艺

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)14-1848-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.14.009

引用本文: 张秀芳, 张静宜, 刘明松, 等. 基于熵权法与响应面法优化香连和胃汤挥发油提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1848-1855.

Optimization of the Extraction Process of Volatile Oil from Xianglian Hewei Soup Based on Entropy Weight Method and Response Surface Method

ZHANG Xiufang¹, ZHANG Jingyi^{2,3}, LIU Mingsong¹, LI Chunhua^{1,3,4,5*} (1.College of Pharmacy, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050090, China; 2.Department of Pharmacy, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000; 3.Hebei Industrial Technology Institute for Traditional Chinese Medicine Preparation, Shijiazhuang 050090, China; 4.Hebei Technology Innovation Center of TCM Formula Preparations, Shijiazhuang 050090, China; 5.Hebei Province College Chinese Medicine Group Formulation Application Technology R&D Center, Shijiazhuang 050090, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The optimal extraction process and inclusion process of volatile oil in Xianglian Hewei soup were selected to improve the utilization rate of volatile oil. **METHODS** The index was based on the content of the main ingredients patchouli alcohol, cineole, bomyl acetate and the yield of volatile oil, the GC method was used to determine the content of active ingredients, the DX8trial designed the test plan, and the entropy weight method was used to process the experimental data, and finally screened out the best extraction process for volatile oil. Used grinding method to clathrate volatile oil, and the inclusion scheme was designed through orthogonal experiments, and record 3 indicators of volatile oil inclusion rate, inclusion compound yield and inclusion compound oil rate one by one. The entropy weight method was used to perform the index Weight analysis, calculate the comprehensive score of the three indicators according to the weight coefficient, and screen out the best inclusion technology. **RESULTS** The best extraction process for volatile oil was immersion time of 1.5 h, extraction time of 8 h, and the amount of water added of 8 times water. The best inclusion process was as follows: prepared by grinding method, β -CD-volatile oil was 6:1, material liquid ratio was 6:1 and the grinding time was 0.5 h. **CONCLUSION** The best extraction process of volatile oil selected by the experiment can increase the yield of volatile oil and the content of active ingredients in Xianglian Hewei soup, and the best inclusion technology obtained by screening can effectively include the volatile oil in Xianglian Hewei soup.

KEYWORDS: Xianglian Hewei soup; volatile oil; response surface methodology; orthogonal test; inclusion process

医院中药制剂也被称为医疗机构制剂, 指严格按照国家有关政策法规, 以具有明显临床疗效

的中药处方为基础, 满足诊断和治疗需求, 并通过一系列研究和批准程序, 仅限于医院或固定单

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19272502D)

作者简介: 张秀芳, 女, 研究生 E-mail: 1214453089@qq.com

*通信作者: 李春花, 女, 硕士, 教授 E-mail: 13803369966@163.com

位使用的中药制剂。医院中药制剂经反复临床实践,具有疗效确切的特点,在临床工作中具有非常重要的作用。

香连和胃汤依据李佃贵国医大师浊毒理论而组方,是河北省中医院脾胃病科多年来治疗慢性胃炎伴或不伴肠上皮化生、上皮内瘤变等疾病的经验方,经过临床经验证明本方为治疗此病的良药。本方由 18 味药组成,其挥发性成分主要来自广藿香、砂仁、豆蔻等 7 味药。广藿香具有芳香化浊、开胃止呕、解暑的功效,能调节肠胃;砂仁主要用于化湿开胃、温脾止泻等,可以增强胃肠的运动功能、促进胃肠蠕动,抗胃溃疡等药理作用^[1-2];豆蔻具有调中补胃,健脾消食等作用。

提取方法及工艺是影响挥发油质量和临床疗效的关键,本研究采用中国药典 2020 年版提取挥发油的方法水蒸气蒸馏法对本方中含有挥发性成分的药物进行挥发油提取,以其主要药效成分和挥发油得率为指标,基于响应面法和熵权法优选提取工艺,提高制剂中挥发油的含量;挥发油的稳定性影响制剂的整体质量和临床疗效,因此本实验用环糊精(β -CD)包合技术对其进行包合,并采用正交试验结合信息熵原理,综合考察影响包合的各个因素,多指标筛选其最佳包合工艺。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 7890B 气相色谱仪(Agilent 科技公司);SPH-300A 型氢气发生器、SPB-3 型全自动空气源(北京中惠普分析技术研究所);24/29 标口塞 5 mL 量管挥发油测定器(相对密度 <1.0);SQP 型精密分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);YP2002 电子天平(上海津平科学仪器有限公司);TD5A-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Milli-QReference 超纯水系统(法国 Millipore SAS 67120 Moisheim);DHG-9000 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DSC-60 型差示热扫描仪(日本岛津公司);ECLIPSE Ci 电子显微镜(日本尼康)。

1.2 饮片

广藿香(产地:广东;河北药兴药业有限公司;批号:200502)、豆蔻为印尼白豆蔻(产地:广西;国药乐仁堂河北药业有限公司;批号:20071601)、砂仁为阳春砂(产地:广东;河北药兴药业有限公司;批号:200501),经河北中医

学院侯芳洁副教授鉴定符合中国药典 2020 年版一部相关规定。

1.3 试剂

百秋李醇(批号: MUST-20093001;含量: 98.37%)、桉油精(批号: MUST-20101001;含量: 99.48%)、乙酸龙脑酯(批号: MUST-20081605;含量: 97.00%)对照品均购自中国科学院成都生物研究所; β -环糊精(山东滨州化学试剂厂);无水硫酸钠(深圳市中发源生物科技有限公司);甲醇(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取工艺

2.1.1 挥发油的提取及得率的测定 按处方比例,称取广藿香 20 g,豆蔻 12 g,砂仁 12 g 及其他 4 味饮片共 118 g,于 2 000 mL 的圆底烧瓶中,连接挥发油提取器及冷凝管等装置,用水蒸气蒸馏法提取其混合挥发油,并计算挥发油得率。

2.1.2 挥发油有效成分含量测定

2.1.2.1 对照品溶液的制备 分别取适量百秋李醇、桉油精、乙酸龙脑酯适量,精密称定,分别为 1.63, 4.75, 11.65 mg,放在 5 mL 的量瓶里,用甲醇定容,得到浓度分别为 0.33, 0.95, 2.33 mg $\cdot$ mL⁻¹的对照品溶液,备用。

2.1.2.2 供试品溶液的制备 按照“2.1.1”项下方法,提取混合挥发油,将所收集的挥发油经无水硫酸钠干燥,4 000 r $\cdot$ min⁻¹离心 6 min,即得,将所得挥发油用甲醇定容到 10 mL 的量瓶里,再取 0.5 mL 用甲醇定容到 10 mL 量瓶里,得供试品溶液。

2.1.2.3 有效成分的含量测定 安捷伦 Hp-5 毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m),FID 检测;程序升温:以 1 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹的升温速度由 60 $^{\circ}$ C 升温至 70 $^{\circ}$ C;以 10 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹的升温速度由 70 $^{\circ}$ C 升温至 140 $^{\circ}$ C;以 1 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹的升温速度由 140 $^{\circ}$ C 升温至 153 $^{\circ}$ C,后运行 300 $^{\circ}$ C 保持 5 min;进样量:1 μ L,分流比 10:1,载气为氮气,氮气流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹,进样口温度为 250 $^{\circ}$ C,检测器温度为 260 $^{\circ}$ C,空气流速 390 mL $\cdot$ min⁻¹,氢气流速 36 mL $\cdot$ min⁻¹,尾吹 15 mL $\cdot$ min⁻¹。色谱图见图 1。

2.1.2.4 线性关系的考察 分别精密吸取百秋李醇对照品溶液 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mL,桉油精对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL,乙酸龙脑酯对照品溶液 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀后得到一系列对照品稀释液,

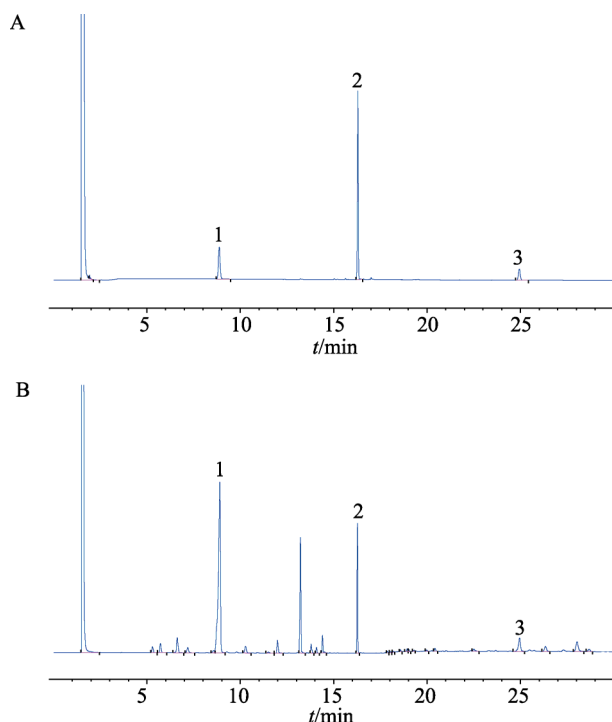


图1 气相色谱图

A-对照品; B-挥发油样品; 1-桉油精; 2-乙酸龙脑酯; 3-百秋里醇。

Fig. 1 Gas chromatograms

A-reference substance; B-volatile oil sample; 1-cineole; 2-bomyl acetate; 3-patchouli alcohol.

并按“2.1.2.3”项下气相色谱优化的条件进样,对所得结果以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X)进行线性回归,得到线性回归方程见表1。

表1 3种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of 3 components

成分	回归方程	R^2	线性范围/mg·mL ⁻¹
百秋李醇	$y=14\,370x-8.128\,6$	0.999 9	0.003 3~0.066 0
桉油精	$y=12\,022x+313.51$	0.999 1	0.095~0.475
乙酸龙脑酯	$y=19\,765x+13.493$	0.999 8	0.023~0.460

2.1.2.5 仪器精密度试验 按照“2.1.2.3”项下的色谱条件,对百秋李醇、桉油精、乙酸龙脑酯的对照品溶液进样,对同一对照品溶液进样6针,记录所得的峰面积,并求其RSD值($n=6$),结果为百秋李醇1.30%、桉油精0.40%、乙酸龙脑酯1.28%,其RSD值均<3%,表明该仪器的精密度良好。

2.1.2.6 重复性试验 取同一挥发油样品,按照“2.1.2.2”项下方法制得6份供试品溶液,按“2.1.2.3”项下色谱条件各进样1针,记录所得峰面积,并求其RSD值($n=6$),结果为百秋李醇1.53%、桉油精1.43%、乙酸龙脑酯1.28%,其RSD值均<3%,表明此方法重复性良好。

2.1.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,按照“2.1.2.3”项下色谱条件将供试品溶液分别于0, 2, 4, 6, 8, 12 h进样,记录所得峰面积,并求其RSD值($n=6$),结果为百秋李醇1.44%、桉油精1.61%、乙酸龙脑酯1.55%,其RSD值均<3%,表明成分在12 h内稳定性良好。

2.1.2.8 加样回收率试验 精密吸取9份已知试样含量的供试品溶液,按中国药典2020年版,每份分别按供试品溶液中含量的1.5:1, 1:1, 0.5:1左右分别加入百秋李醇、桉油精、乙酸龙脑酯对照品,进行含量测定,计算其回收率^[3]。结果见表2。

表2 加样回收率结果($n=9$)

Tab. 2 Results of recovery by adding sample($n=9$)

成分物质	样品含量/ mg	加入对照品量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	RSD/ %
百秋李醇	0.032 6	0.049 0	0.078 8	96.54	0.36
	0.032 6	0.048 9	0.079 3	97.34	
	0.032 6	0.048 7	0.079 0	97.21	
	0.032 6	0.032 5	0.063 4	97.43	
	0.032 6	0.032 4	0.063 4	97.54	
	0.032 6	0.032 7	0.063 2	96.72	
	0.032 6	0.016 5	0.047 5	96.81	
	0.032 6	0.016 4	0.047 7	97.34	
	0.032 6	0.016 2	0.047 5	97.31	
	0.112 0	0.167 3	0.274 6	98.32	
桉油精	0.112 0	0.171 0	0.278 6	98.43	0.76
	0.112 0	0.166 8	0.272 2	97.65	
	0.112 0	0.113 3	0.219 7	97.52	
	0.112 0	0.112 6	0.219 3	97.63	
	0.112 0	0.113 5	0.222 2	98.53	
	0.112 0	0.056 2	0.166 1	98.73	
	0.112 0	0.057 3	0.165 1	97.53	
	0.112 0	0.057 1	0.162 9	96.34	
	0.388 4	0.584 3	0.959 6	98.65	
	0.388 4	0.585 3	0.961 6	98.76	
乙酸龙脑酯	0.388 4	0.583 2	0.944 9	97.25	0.54
	0.388 4	0.389 5	0.759 8	97.67	
	0.388 4	0.399 3	0.770 9	97.87	
	0.388 4	0.387 2	0.762 8	98.35	
	0.388 4	0.195 3	0.575 8	98.64	
	0.388 4	0.197 5	0.572 1	97.65	
	0.388 4	0.194 7	0.571 2	97.96	

2.1.3 熵权法结合响应面法优选提取工艺

2.1.3.1 试验设计与结果 通过预实验及查阅文献,选取了提取时间、浸泡时间和加水量3个因素为变量,采用DX8Trial软件,以挥发油得率和3

个有效成分含量为响应值,运用 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平 17 个试验点的响应面分析试验^[4](12 个析因试验,5 个中心试验)。试验设计因素水平表见表 3,Box-Behnken 试验方案与结果见表 4。

表 3 试验设计因素水平

Tab. 3 Level of experimental design factors

水平/因素	A 浸泡时间/h	B 加水量/倍	C 提取时间/h
-1	1.0	8	4
0	1.5	10	6
1	2.0	12	8

表 4 Box-Behnken 试验方案与结果

Tab. 4 Box-Behnken test scheme and results

试验号	A	B	C	含量/mg·mL ⁻¹			挥发油 提取率/%	综合 得分 M
				百秋李醇	桉油精	乙酸龙脑酯		
1	1.0	10	4	0.025	0.336	0.058	1.70	0.866
2	1.5	12	8	0.019	0.375	0.051	1.85	0.817
3	1.5	8	4	0.024	0.363	0.055	1.50	0.588
4	1.0	10	8	0.026	0.291	0.059	1.60	0.848
5	2.0	8	6	0.021	0.344	0.054	1.70	0.812
6	2.0	10	4	0.023	0.356	0.047	1.50	0.657
7	2.0	12	6	0.020	0.393	0.058	1.80	0.855
8	1.5	10	6	0.022	0.344	0.061	1.80	0.861
9	1.5	10	6	0.023	0.354	0.068	1.35	0.831
10	1.5	8	8	0.022	0.347	0.063	2.00	0.957
11	1.5	10	6	0.020	0.381	0.056	1.75	0.833
12	1.5	10	6	0.015	0.399	0.067	1.30	0.745
13	2.0	10	8	0.019	0.378	0.190	2.00	0.868
14	1.0	12	6	0.023	0.414	0.225	1.70	0.874
15	1.5	10	6	0.024	0.339	0.240	1.70	0.893
16	1.0	8	6	0.021	0.344	0.209	1.30	0.793
17	1.5	12	4	0.021	0.456	0.211	1.50	0.817

2.1.3.2 熵权法对各指标权重系数及综合评分 M 的计算 根据公式(1)对“2.1.3.1”项下的挥发油得率及有效成分含量进行处理,建立原始矩阵和概率矩阵 $(P_{ij})_{mn}$ ^[5-7],见图 2。根据公式(2)和公式(3),计算各指标的 H_i 和 W_i 。结果 4 个评价指标

$H_i=[0.998\ 5, 0.994\ 8, 0.997\ 5, 0.997\ 1]$,4 个评价指标的权重系数分别为 $W_i=[0.169\ 1, 0.212\ 5, 0.285\ 6, 0.332\ 8]$ 。

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

$$H_i = -1/\ln \eta \times \sum_{j=1}^n P_{ij} \times \ln P_{ij} \quad (2)$$

$$W_i = (1 - H_i) / \sum_{i=1}^m (1 - H_i) \quad (3)$$

应用公式 $M=(\text{挥发油提取率}/\text{挥发油提取率}_{\max}) \times W_1 + (\text{百秋李醇含量}/\text{百秋李醇含量}_{\max}) \times W_2 + (\text{桉油精含量}/\text{桉油精含量}_{\max}) \times W_3 + (\text{乙酸龙脑酯}/\text{乙酸龙脑酯}_{\max}) \times W_4$,计算出综合得分(M),记录至表 4。将 M 值带入 DX8Trial 软件,进行响应面法的数据分析,通过对 M 值数据的回归拟合和响应面的绘制,预测出最佳的提取工艺及相应的 M 值。

2.1.3.3 模型方程的建立与方差分析 经 DX8Trial 软件对 M 进行多元拟合分析,得到对浸泡时间(A)、加水量(B)、提取时间(C)3 个变量的二次多项回归方程为 $y=-0.83-0.38A+0.20B+0.27C-0.009\ 618AB+0.057AC-0.023BC+0.032A^2-0.001\ 783B^2-0.007\ 696C^2$,方差分析及显著性结果见表 5。

由表 5 可知,本试验模型 $P=0.045\ 5<0.05$,显著性为显著,失拟项 $P=0.501\ 1>0.05$,显著性为不显著,表明模型真实可靠。因 $P_C<P_B<P_A$,故 3 因素对综合评分 M 的影响程度为 $C>B>A$ 。一次项中 C 为显著,二次项中 BC 为显著。 $R_2=0.830\ 9, R_{2\text{adj}}=0.613\ 4$,表示该模型可以解释 61.34%响应值的变化^[8-11], $r=0.10/0.12=83.33\%$,表明响应值的变化有 83.33%来源于所选变量,证明该模型拟合程度好,可用于分析和预测香连和胃汤挥发油的提取。

2.1.3.4 响应面结果分析 经 DX8Trial 软件分析,可得各影响因素对挥发油提取综合评分 M 的三维响应面图,响应面图的陡峭程度可直接反映各影

$X=$	3.926	4.420	4.274	3.426	4.052	4.199	4.633	4.053	4.179	4.095	4.489	4.704	4.459	4.883	3.998	4.052	5.378
	0.967	0.864	0.933	0.994	0.914	0.784	0.984	1.029	1.140	1.057	0.950	1.128	0.965	0.983	1.132	1.142	0.859
	0.244	0.185	0.237	0.252	0.203	0.228	0.200	0.213	0.231	0.218	0.197	0.152	0.190	0.225	0.240	0.209	0.211
	1.70	1.85	1.50	1.60	1.70	1.50	1.80	1.80	1.35	2.00	1.75	1.30	2.00	1.70	1.70	1.30	1.50
$P=$	0.054	0.060	0.058	0.048	0.056	0.057	0.063	0.056	0.057	0.056	0.061	0.064	0.061	0.066	0.055	0.056	0.072
	0.058	0.051	0.055	0.059	0.054	0.047	0.058	0.061	0.068	0.063	0.056	0.067	0.057	0.058	0.067	0.068	0.051
	0.067	0.051	0.065	0.070	0.056	0.063	0.055	0.058	0.064	0.060	0.054	0.041	0.052	0.062	0.066	0.057	0.058
	0.061	0.066	0.053	0.057	0.061	0.053	0.064	0.064	0.048	0.071	0.062	0.046	0.071	0.061	0.061	0.046	0.053

图 2 原始评价指标矩阵 $(X_{ij})_{mn}$ 和概率矩阵 $(P_{ij})_{mn}$

Fig. 2 Original evaluation index matrix $(X_{ij})_{mn}$ and probability matrix $(P_{ij})_{mn}$

表5 方差分析及显著性检验

Tab. 5 Analysis of variance and significance test

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.1	9	0.011	3.82	0.045 5	显著
A-浸泡时间	2.22×10^{-3}	1	2.22×10^{-3}	0.75	0.414 5	
B-加水量	5.72×10^{-3}	1	5.72×10^{-3}	1.94	0.206 5	
C-提取时间	0.017	1	0.017	5.83	0.046 5	显著
AB	3.70×10^{-4}	1	3.70×10^{-4}	0.13	0.733 7	
AC	0.013	1	0.013	4.43	0.073 3	
BC	0.034	1	0.034	11.48	0.011 6	显著
A ²	2.68×10^{-4}	1	2.68×10^{-4}	0.091	0.771 8	
B ²	2.14×10^{-4}	1	2.14×10^{-4}	0.073	0.795 4	
C ²	3.99×10^{-3}	1	3.99×10^{-3}	1.35	0.283 1	
残差	0.021	7	2.95×10^{-3}			
失拟项	8.53×10^{-3}	3	2.84×10^{-3}	0.94	0.501 1	不显著
误差	0.012	4	3.03×10^{-3}			
总离差	0.12	16				

响因素交互作用强弱,由图3可得,BC的陡峭程度比AB、AC大,说明BC的交互作用较强,与表5的显著性结果一致。

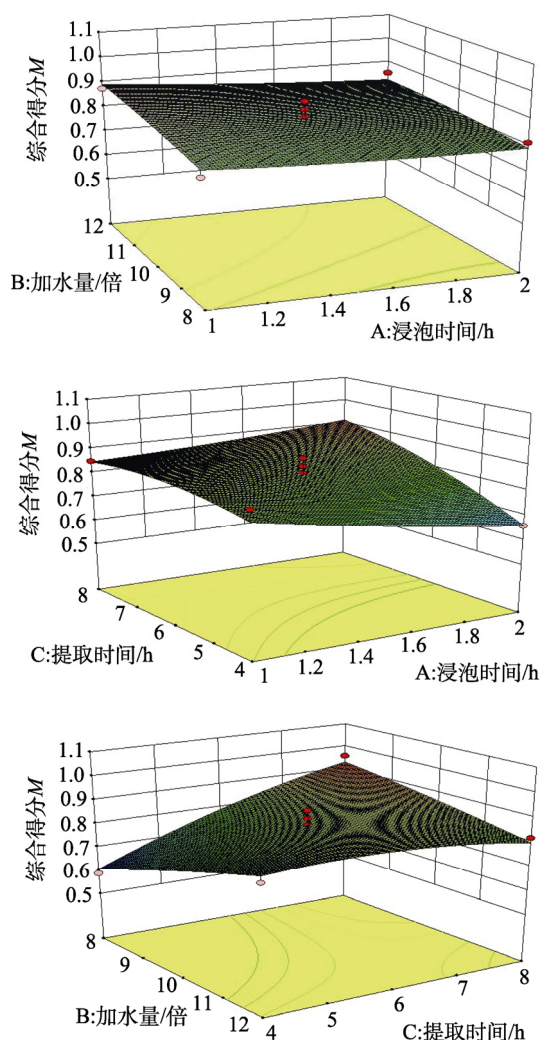


图3 影响因素对综合得分(M)影响的响应面图

Fig. 3 Response surface diagram of influencing factors on integrated index(M)

2.1.3.5 最佳工艺验证 根据DX8Trial软件分析得提取香连和胃汤中挥发油的最佳工艺:浸泡1.5 h,加水量为8倍水,提取时间8 h。采用最佳提取工艺做3组平行试验,香连和胃汤挥发油综合指标分别为0.927, 0.932, 0.939,平均值为0.933,比模型预测值0.930高,且相差 $\leq 1\%$,表明模型预测性良好,稳定可靠,该方法可用于香连和胃汤的挥发油提取。

2.2 β -环糊精包合工艺

2.2.1 挥发油空白回收率的测定 按上述工艺制备挥发油样品,取1 mL挥发油,放入圆底烧瓶中,加适量蒸馏水,提取至挥发油提取器中的油量不再增加,冷却后准确读取挥发油的量。平行测定3组,按空白回收率=(挥发油测得量/挥发油加入量) $\times 100\%$,计算挥发油空白回收率^[12-13]。

2.2.2 挥发油包合物的制备 通过查阅文献^[14]及预实验,本试验选用研磨法制备包合物。称取适量 β -CD于研钵中,加入一定量的蒸馏水,研磨均匀。取挥发油样品适量,按挥发油:无水乙醇=1:1的比例加入乙醇溶解,缓慢滴入研钵中,沿一个方向研磨至规定时间。置冰箱中冷藏24 h后抽滤,同时用适量无水乙醇洗涤,除去未被包合的挥发油,40℃真空干燥4 h,得干燥包合物,称重记录包合物的重量。将所得的干燥包合物放入圆底烧瓶中,加100 mL蒸馏水,提取至挥发油提取器中的油量不再增加,冷却并准确读取所得挥发油的量。按以下公式计算各个指标^[15-17]:包合物含油率=包合物中挥发油质量/包合物质量 $\times 100\%$;包合物收得率=包合物质量/(β -CD加入量+挥发油加入量) $\times 100\%$;挥发油包合率=包合物中挥发油量/(挥发油投入量 $\times$ 空白回收率) $\times 100\%$ 。

2.2.3 熵权法结合正交试验优选包合工艺

2.2.3.1 正交试验设计 通过查阅相关文献^[14]及预实验,选取了 β -CD:挥发油、液料比和研磨时间3个因素为变量,并对每个因素选取3个水平进行正交试验,得到9组试验方案,按照试验方案进行试验,收集各指标的数据,采用熵权法权重得到综合得分M作为指标,筛选出最佳包合工艺。正交试验的因素水平及结果见表6~7。

2.2.3.2 熵权法权重分析 按照“2.1.3.2”项下方法和公式,根据表7中各评价指标数据,建立原始矩阵 $(X_{ij})_{mn}$ 和概率矩阵 $(P_{ij})_{mn}$,根据相关公式计算得到 $H_i=[0.986\ 2, 0.999\ 6, 0.995\ 6]$, $W_i=[0.743\ 8,$

0.020 4, 0.235 8], 原始矩阵和概率矩阵见图 4。

表 6 正交试验因素水平表

Tab. 6 Orthogonal factor level table

水平	因素		
	A(β -CD : 挥发油)	B(液料比)	C(研磨时间)
1	6 : 1	2 : 1	1.5
2	8 : 1	4 : 1	1
3	10 : 1	6 : 1	0.5

表 7 正交试验结果表

Tab. 7 Orthogonal test results table

试验号	A	B	C	包合物含油率/%	包合物收得率/%	挥发油包合率/%	综合得分 M
1	1	1	1	7.22	89.00	52.94	0.792 4
2	1	2	2	9.42	83.43	64.71	0.791 7
3	1	3	3	11.93	83.86	82.35	0.998 7
4	2	1	2	7.24	84.44	64.71	0.505 9
5	2	2	3	6.45	86.11	58.82	0.590 5
6	2	3	1	6.66	83.44	58.82	0.602 8
7	3	1	3	6.86	79.45	70.59	0.648 5
8	3	2	1	6.10	89.36	70.59	0.453 2
9	3	3	2	5.19	78.82	52.94	0.493 3
K_1	2.583	1.947	1.848				
K_2	1.699	1.835	1.791				
K_3	1.595	2.095	2.238				
R	0.329 300	0.086 446	0.148 896				

$X=$	7.22	9.42	11.93	7.24	6.45	6.66	6.86	6.10	5.19
	89.00	83.43	83.86	84.44	86.11	83.44	79.45	89.36	78.82
	52.94	64.71	82.35	64.71	58.82	58.82	70.59	70.59	52.94
$P=$	0.108	0.140	0.178	0.108	0.096	0.099	0.102	0.091	0.077
	0.117	0.110	0.111	0.111	0.114	0.110	0.105	0.118	0.104
	0.092	0.112	0.143	0.112	0.102	0.102	0.122	0.122	0.092

图 4 原始评价指标矩阵(X_{ij})_{mn}和概率矩阵(P_{ij})_{mn}

Fig. 4 Original evaluation index matrix(X_{ij})_{mn} and probability matrix(P_{ij})_{mn}

2.2.3.3 正交试验数据分析与结果 由表 7 数据直观分析表明最佳工艺为 $A_1B_3C_3$, 即 β -CD : 挥发油=6 : 1, 料液比为 6 : 1, 研磨时间为 0.5 h。由表 8 方差分析结果表明, $F_A > 19$, $P < 0.05$, 因素 A 对实验结果有显著性影响; $F_B < 19$ 、 $F_C < 19$, $P > 0.05$, B、C 对实验无显著性影响。

表 8 正交试验方差分析

Tab. 8 Variance analysis of orthogonal test

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值	显著性
A	0.20	2.00	0.10	42.42	19	$P < 0.05$
B	0.01	2.00	0.01	2.44	19	—
C	0.04	2.00	0.02	8.50	19	—

2.2.3.4 包合工艺验证试验 量取 3 份挥发油样品各 1 mL, 按照所筛选的最佳包合工艺进行 3 组平行试验, 试验结果如表 9 所示, 三者的 RSD 值分别为 1.82%, 0.49%, 0.13%, 均 $< 2\%$, 表明本试验确定的包合工艺稳定可行, 并且重复性良好。

表 9 挥发油包合工艺验证试验

Tab. 9 Verification test of volatile oil inclusion process

试验序号	包合物含油率/%	包合物收得率/%	挥发油包合率/%
1	11.84	85.03	82.03
2	11.52	84.21	81.92
3	12.24	84.75	82.14
平均值	11.90	84.66	82.03
RSD/%	1.82	0.49	0.13

2.2.4 包合物的质量评价

2.2.4.1 薄层色谱法 制备 β -CD、 β -CD 与挥发油样品混合物、包合前挥发油、包合后挥发油及包合物 5 组样品, 分别为样品 1~5, 取适量乙醇溶解, 过滤取上清液作为样品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取以上制备的 5 组样品溶液各 10 μ L, 分别点在同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(20 : 1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。薄层色谱图见图 5, 样品 3 和 4 出现相应斑点表明挥发油包合前后没有发生明显改变; 样品 1 和 5 没有出现斑点, 样品 2 出现斑点, 说明只将 β -环糊精和挥发油样品物理混合无法形成挥发油包合物, 通过研磨法将 β -CD 和挥发油样品进行包合处理后, 挥发油进入 β -CD 腔内形成了挥发油包合物。

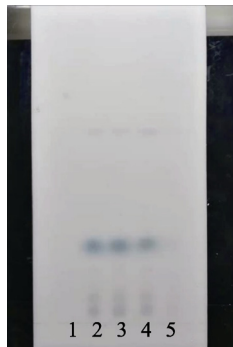


图 5 薄层色谱图

Fig. 5 Thin-layer chromatogram

2.2.4.2 差式扫描热量法(DSC) 制备香连和胃汤挥发油、 β -CD 与挥发油包合物、 β -CD 与挥发油物理混合物 3 种样品进行差示热分析, 扫描条件^[18]: 以空氧化铝 (Al_2O_3) 坩埚为参比, 升温速度 10 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹, 扫描范围为 0~200 $^{\circ}$ C, 分别记录样品

的 DSC 升温曲线。 β -CD 与总挥发油包合物 DSC 图(B)既不同于总挥发油 DSC 图(A), 也不同于 β -CD 与总挥发油包合物物理混合物 DSC 图(C), 说明已形成新的物相, 见图 6。

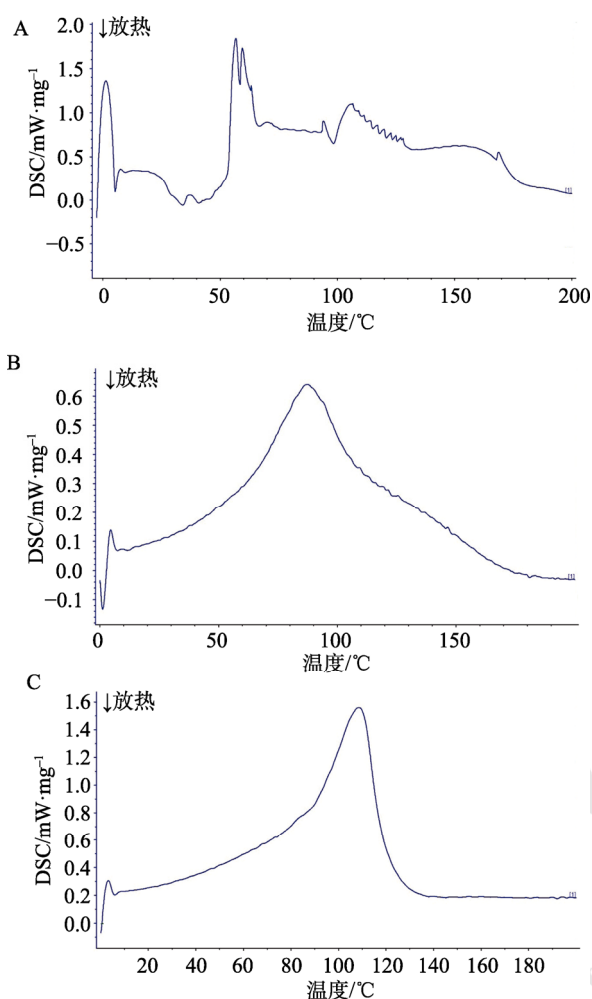


图 6 差示扫描热量法结果图

A-挥发油; B- β -CD 与挥发油包合物; C- β -CD 与挥发油包合物物理混合物。

Fig. 6 Results of Differential Scanning Calorimetry

A-volatile oil; B- β -CD and volatile oil inclusion complex; C- β -CD and volatile oil physical mixture.

3 讨论

本实验采用水蒸气蒸馏法来提取混合挥发油, 水蒸气蒸馏法用于中药挥发油的提取, 要求提取物在 100 °C 左右有一定的蒸汽压, 一般满足这个条件的化合物都会被提取出来。经查阅文献, 广藿香、砂仁、豆蔻均可用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 且通过预实验发现, 各挥发油密度相近, 因此可同时提取其挥发油混合物。

熵权法是采用信息熵原理对多个指标赋予权重的一种科学的权重方法。对于某个指标, 熵值

用于判断指标的分散程度。信息熵越小, 分散程度越大, 该指标对综合评价的影响越大, 即权重越大。因此, 使用信息熵作为工具可以为综合评估多个指标提供基础。该部分中的 2 个试验均设定了多个指标, 挥发油提取工艺中的指标为各有效成分的含量及挥发油得率, 其有效成分含量与挥发油得率之间相关性较小; 挥发油包合工艺中各指标之间有差异, 包合物收得率高的方法不一定挥发油包合率就高, 且各组指标的差距无法主观臆断, 因此手动设置权重有失偏颇, 针对以上问题采用熵权法来赋予各指标权重, 使试验结果更科学、更有说服力。

经查阅文献及预实验^[14], 选定采用研磨法对挥发油进行包合, 研磨法中一般加水量为 2~5 倍, 相较饱和水溶液法的加水量少, 说明此法更能使 β -CD 和挥发油充分接触进而形成包合物, 因此采用研磨法进行包合物的制备。包合物的验证试验采用薄层色谱法和 DSC, 其中 DSC 以试样与参比物的能量差为纵坐标, 时间为横坐标绘制 DSC 曲线。不同的试样在不同时间释放的能量亦不同, 通过此法来确定包合前后物质的变化, 从而确定形成了新的包合物。其中混合挥发油的 DSC 曲线呈不规则样式, 且出现大小不同的几个峰, 推测因其为混合挥发油, 成分较多, 不同挥发油的放热时间和程度不同, 因此会出现多个峰的情况。

REFERENCES

- [1] HUANG C C. The research progress on chemical constituents, pharmacological action and clinical application of *Amomum villosum*[J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med(内蒙古中医药), 2017, 36(Z1): 210-212.
- [2] LI L L, TIAN W C, LIU Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Amomum villosum*[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2018, 18(22): 4390-4396.
- [3] ZHANG Y, ZHANG T, WANG W T. Optimization of the determination method of multi index content in daqili San by multi wavelength HPLC combined with CCD response surface[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(7): 841-845.
- [4] LIU W, SUN W F, WU X R. Application of response surface methodology in optimization of extraction technology of Chinese medicinal material[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2014, 32(8): 1960-1962.
- [5] TANG Y, HE F Y, DENG K W, et al. Study of the rainbow potential between constituents in Chinese materia medica with enthalpy of combustion, entropy of information and bioentropy[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2019, 36(7): 841-845.

- 志), 2012, 27(4): 867-873.
- [6] WANG S H, WANG J, HE Q Y, et al. Couplet medicines is extracted from old and famous doctor of TCM in treating angina pectoris of coronary artery disease based on information entropy[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2008, 26(10): 2150-2152.
- [7] GUO Z Z, WEI B, SUN J J, et al. Syndrome element summary and pathogenesis analysis of hepatitis B caused cirrhosis based on the information entropy[J]. World Chin Med(世界中医药), 2016, 11(10): 2172-2175, 2179.
- [8] 周光姣, 黄翔, 冯学花. 复方五花颗粒制备工艺的优化[J]. 中成药, 2019, 41: 1389-1391.
- [9] 杜银香, 张建伟, 胡泽华, 等. 华中枸骨叶总黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌作用[J]. 中成药, 2019, 41: 2200-2203.
- [10] DUN J Y, ZHENG P, LI J J, et al. Optimization of water extraction technology of Taohe Chengqi decoction by response surface methodology combined with information entropy theory[J]. China Pharm(中国药房), 2019, 30(16): 2210-2215.
- [11] 丁兴杰, 蒲忠慧, 熊亮, 等. 附子多糖纯化工艺的优化及其毒性[J]. 中成药, 2019, 41: 2737-2740.
- [12] ZHENG P, LI J J, WEI Y T, et al. Study on inclusion process of β -CD of *Schisandra*, *Forsythia* and mint mixed volatile oil[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45(21): 72-76.
- [13] GAO Y L. Study on extraction, inclusion and stability of forsythia's volatile oil and nepeta's volatile oil in antelope cold preparation[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [14] 郑鹏, 赵可新, 冉子婷, 等. 响应面法结合信息熵原理筛选气滞胃痛颗粒中挥发油最佳包和工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1871-1875.
- [15] LI C H, ZHANG J Y, ZHANG H T, et al. Study on β -cyclodextrin inclusion process of volatile oil from *Atractylodes rhizome* and *Ramulus cinnamomi* from Tingli Shengmai decoction[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2016, 27(9): 2167-2170.
- [16] SONG F L, JIN H J, PAN Y F, et al. Preparation of β -cyclodextrin inclusion compound of volatile oil from Baizhishan cold granule[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(23): 9-12.
- [17] ZHANG J Y. Study on extraction process and inclusion process of volatile oil from *Atractylodes macrocephala* and *Ramulus cinnamomi* of Tingli Shengmai decoction[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2016.
- [18] XIANG C K, ZHANG J Y, LI J J, et al. Preparation and evaluation of *Rhizoma Atractylodis macrocephalae* and *Ramulus cinnamomi* oil- β -cyclodextrin inclusion complex[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29(1): 50-55.

收稿日期: 2021-05-14

(本文责编: 蔡珊珊)