

# 气滞胃痛颗粒中挥发性指标成分柠檬烯的质量控制

常馨<sup>1</sup>, 王帅<sup>1,2</sup>, 孟宪生<sup>1,2\*</sup>, 包永睿<sup>1,2</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;

2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600)

**[摘要]** **目的:**对气滞胃痛颗粒复方中挥发性指标成分柠檬烯进行含量测定,完善气滞胃痛颗粒复方中挥发性成分的质量控制标准。**方法:**采用高效液相色谱法,考察了无糖型气滞胃痛颗粒中柠檬烯的最佳前处理工艺,并对此方法进行了方法学考察,与此同时定量检测 10 批气滞胃痛颗粒的柠檬烯含量,确定其含量限度。检测气滞胃痛颗粒红外光谱,并应用灰色关联理论分析与柠檬烯含量相关的谱峰。**结果:**实验所得的柠檬烯的最佳前处理方法为取无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g,加甲醇 50 mL,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,经方法学考察确定,柠檬烯线性范围为 0.17 ~ 1.68  $\mu\text{g}$  ( $r=0.999\ 8$ ),平均加样回收率为 99.77%,最终确定每袋无糖型气滞胃痛颗粒中柠檬烯含量应不低于 1.00 mg。灰色关联分析共得到 3 个与柠檬烯含量相关的谱峰。**结论:**该方法操作简便、科学合理,可作为气滞胃痛颗粒中柠檬烯的含量测定方法,该研究对气滞胃痛颗粒的质量评价具有重大意义。结合灰色理论数据分析方法,构建了粗略检验气滞胃痛颗粒中柠檬烯含量的红外光谱分析法,为气滞胃痛颗粒中柠檬烯含量的快速鉴别提供了一种有效、简便和直观的方法,为全面、综合评价中药成方制剂气滞胃痛颗粒的质量提供了有力补充。

**[关键词]** 气滞胃痛颗粒; 柠檬烯; 质量控制; 红外光谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0101-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050101

## Quality Control of Volatile Index Component Limonene in Qizhi Weitong Granules

CHANG Xin<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>1,2</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1,2\*</sup>, BAO Yong-rui<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Component Medicine Engineering Research Center of Liaoning Province, Liaoning Province  
Modern Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the content of volatile index component limonene in Qizhi Weitong granules, and improve the quality control standard of volatile components in Qizhi Weitong granules compound. **Method:** In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to investigate the optimum pretreatment process of limonene in sugarless Qizhi Weitong granules, and a methodological study was done for this method. At the same time, content of limonene in 10 batches of Qizhi Weitong granules was detected and their content limits were determined, and to establish a rapid identification by infrared spectroscopy easy way limonene content. **Result:** The obtained optimum pretreatment method for limonene was as follows: take sugarless Qizhi Weitong granules 2.5 g, add methanol 50 mL, and with ultrasonic treatment (power 250 W, frequency 40 kHz) for 30 min. Methodological study identified a linear range of limonene between 0.17-1.68  $\mu\text{g}$  ( $r=0.999\ 8$ ), and the average recovery rate was 99.77%, and the content limit of limonene in Qizhi Weitong granules was determined as not less than 1.00 mg. Gray correlation analysis were obtained 3 and limonene content related peaks. **Conclusion:** The method is simple, scientific and reasonable, and can be used as a method for the determination of

**[收稿日期]** 20150914(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81241111);辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(LR2013044)

**[第一作者]** 常馨,在读硕士,中药学专业,从事药物分析研究,TeL:13942830994,E-mail:cx19900312@163.com

**[通讯作者]** \*孟宪生,博士,教授,从事中药药效物质和作用机制研究,TeL:0411-85890185,E-mail:mxsvvv@126.com

limonene content in Qizhi Weitong granules. The present study has great significance for quality evaluation of Qizhi Weitong granules, and provides great supplementary for the full and comprehensive evaluation of traditional Chinese medicine prescriptions. The study combined data analysis of gray theory, construction of the coarse particle inspection Qizhiweitong limonene content of infrared spectroscopy, for the rapid identification of stomach Qi stagnation particles limonene provides an effective, simple and intuitive way, for the full, comprehensive evaluation of traditional Chinese medicine prescription preparations Qizhiweitong the quality of the particles provide a strong complement.

[Key words] Qizhi Weitong granules; limonene; quality control; infrared spectroscopy

气滞胃痛颗粒是由柴胡、延胡索(炙)、枳壳、香附(炙)、白芍、炙甘草 6 味药材组成,具有舒肝理气,和胃止痛的功效,主治肝郁气滞,胸痞胀满,胃脘疼痛等<sup>[1]</sup>。本方是以东汉末年中医学经典临床著作《伤寒论》中四逆散为主方,添加理气止痛的香附和延胡索而成<sup>[2]</sup>。经现代研究表明,本方具有抗溃疡、抗炎镇痛及促胃肠动力的作用<sup>[3-6]</sup>,而枳壳中所含的柠檬烯则是促进胃肠蠕动的主要成分<sup>[7-8]</sup>,然而现行《中国药典》仅定量检查了芍药苷,定性检查了延胡索乙素,并没有气滞胃痛颗粒中挥发性成分的质量控制标准研究。本次实验采用高效液相色谱法对气滞胃痛颗粒复方中发挥促胃肠动力作用的主要成分柠檬烯进行含量测定,为进一步研究本复方发挥促胃肠动力作用的药效物质基础做准备,同时为完善气滞胃痛复方挥发性成分的质量控制标准奠定基础。

## 1 材料

10A 型高效液相色谱仪(日本岛津),HS6150 型超声波清洗器(天津恒奥科技发展有限公司),Milli-Q 超纯水处理装置(美国 Millipore 公司)。

气滞胃痛颗粒(批号分别为 20141112, 20141111, 20140304, 20140914, 20140910, 20140601, 20140911, 20140404, 20140718, 20140912, 辽宁华润本溪三药有限公司),柠檬烯对照品(批号 100470-200701,中国食品药品检定研究院)。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液制备** 取无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g,精密称定,置于锥形瓶中,加一定浓度、一定量的甲醇溶剂,称重,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz),放冷,再次称重,用一定浓度甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.2 对照品溶液制备** 取柠檬烯对照品适量,精密量取,加甲醇制成每 1 mL 含柠檬烯 0.084 mg 的溶液,即得。

**2.3 色谱条件** Welch Ultimate LP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(70:30),运行时间 30 min,柱温室温,检测波长 210 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性** 采用高效液相色谱仪,按 2.3 项下色谱条件,分别检测甲醇、对照品溶液、阴性对照及供试品溶液,进样量 8 μL。结果见图 1。

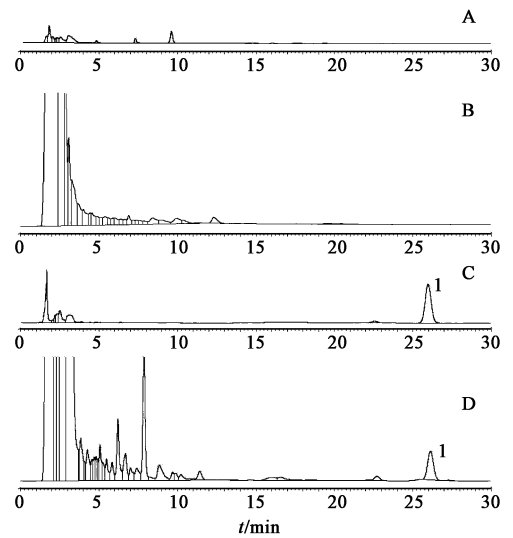


图 1 气滞胃痛颗粒 HPLC  
A. 空白溶剂; B. 缺枳壳的阴性液; C. 对照品; D. 供试品; 1. 柠檬烯

Fig. 1 HPLC chromatogram of Qizhi Weitong granules

**2.4.2 线性关系** 精密吸取质量浓度为 0.084 g·L<sup>-1</sup> 的柠檬烯对照品溶液 2, 4, 8, 10, 12, 20 μL, 按 2.3 项下色谱条件,测定各自峰面积,以对照品进样量为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y,得回归方程  $Y = 756494X + 691.76$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明柠檬烯 0.17 ~ 1.68 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

**2.4.3 精密度** 取同一对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件,重复进样 6 次,各色谱峰峰面积的 RSD 0.8%。表明仪器精密度良好。

**2.4.4 稳定性** 取同一供试品溶液 8 μL(批号

20141111), 按 2.3 项下色谱条件, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定, 结果柠檬烯含量 RSD 为 1.6%, 表明本方法稳定性良好。

**2.4.5 重复性** 取同一批次气滞胃痛颗粒 6 份(批号 20141111), 制成供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 结果柠檬烯平均质量分数 0.799 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.6%。表明本方法重复性良好。

**2.4.6 加样回收率** 取同一批次气滞胃痛颗粒 6 份(批号 20141111), 每份 1.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 0.041 g·L<sup>-1</sup> 柠檬烯对照品溶液 25 mL, 加甲醇 25 mL, 按 2.1 项下方法制成供试品溶液, 测定样品中柠檬烯的含量, 计算加样回收率, 结果平均回收率 99.77%, RSD 2.9%, 表明此方法具有较好的回收率, 见表 1。

表 1 气滞胃痛颗粒加样回收率试验

Table 1 Recovery test of Qizhi Weitong granules

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.249 9	0.998 7	2.013	98.95	99.78	2.6
1.249 8	0.998 6	1.996	97.31		
1.250 2	0.998 9	2.071	104.60		
1.250 1	0.998 8	2.042	101.77		
1.250 2	0.998 9	2.009	98.55		
1.249 9	0.998 7	1.998	97.49		

注: 加入量均为 1.025 mg。

**2.5 含量测定** 取 10 批次气滞胃痛颗粒 2.5 g, 精密称定, 制成供试品溶液, 测定柠檬烯质量分数分别为 0.486, 0.738, 0.568, 0.590, 0.482, 0.584, 0.583, 0.685, 0.468, 0.459 mg·g<sup>-1</sup>。根据以上 10 批样品中柠檬烯的含量测定结果, 确定含量限度为每袋无糖型气滞胃痛颗粒含柠檬烯量应不低于 1.00 mg。

**2.6 气滞胃痛颗粒红外光谱的检测** 取 10 批气滞胃痛颗粒样品少量, 研细, 过 100 目筛, 将均匀的样品置于红外光谱仪中测定红外光谱, 测定区域 4 000 ~ 650 cm<sup>-1</sup>, 采用衰减全反射技术, 分辨率 16 cm<sup>-1</sup>, 每批样品扫描 8 次, 样品扫描完成后, 通过仪器自带软件扣除背景, 经 S-G quad-cubi 平滑函数处理, 得到的气滞胃痛颗粒红外指纹图谱, 见图 2。

**2.7 气滞胃痛颗粒红外光谱峰与柠檬烯含量关联性分析** 应用红外分析软件, 对 10 批气滞胃痛颗粒的红外光谱图做标峰处理, 得到 12 个具有显著特征的共有峰, 记录峰高数据。应用 Grey Modeling\_V3.0 灰色关联度分析软件, 以柠檬烯含量为母序

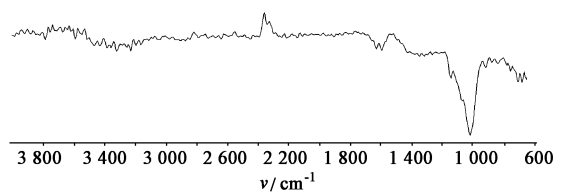


图 2 气滞胃痛颗粒红外对照指纹谱

Fig. 2 Reference infrared spectra of Qizhiweitong particles

列, 12 个特征峰的峰高为子序列, 做相对关联分析, 结果见表 2。

表 2 关联度分析

Table 2 Correlation analysis

No.	波数/cm <sup>-1</sup>	关联度	No.	波数/cm <sup>-1</sup>	关联度
1	761	0.966 6	7	3 036	0.585 5
2	1 014	0.674 2	8	3 325	0.712 7
3	1 593	0.983 1	9	3 450	0.501 8
4	2 084	0.630 7	10	3 787	0.725 0
5	2 293	0.826 7	11	3 823	0.622 1
6	2 968	0.756 8	12	3 984	0.959 3

由关联度分析结果可知, 波数为 761, 1 593, 3 984 cm<sup>-1</sup> 的红外峰与柠檬烯含量的相关系数可达 0.9 以上, 说明此 6 个红外峰与柠檬烯含量密切相关, 可通过此 3 个红外峰的峰高信息反映柠檬烯的含量。

### 3 讨论与结论

**3.1 提取方式考察** 取同一批次无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g, 共 4 份(批号 20140601), 精密称定, 置于锥形瓶中, 加 50% 甲醇 25 mL, 称重, 分别采用超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min 和加热回流 60 min 的处理方式, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。结果超声提取、加热回流提取平均值分别为 0.221, 0.082 mg·g<sup>-1</sup>。表明超声提取法较加热回流提取法柠檬烯含量较大, 故将提取方法定为超声提取。

**3.2 提取溶剂考察** 取同一批次无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g, 共 6 份(批号 20140910), 精密称定, 置于锥形瓶中, 分别加 30% 甲醇, 50% 甲醇, 100% 甲醇 25 mL, 称重, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用提取溶剂补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得, 结果柠檬烯质量分数分别为 0.054, 0.243, 0.423 mg·g<sup>-1</sup>。表明采用 100% 甲醇为提取溶剂的样品所测得的柠檬烯含量高于其他 2 种溶剂, 故采用 100% 甲醇为提取溶剂。

**3.3 提取时间考察** 取同一批次无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g, 共 6 份(批号 20140910), 精密称定, 置于锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 称重, 分别超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 10, 30, 60 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。结果柠檬烯质量分数分别为 0.044, 0.390, 0.341  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明, 提取时间为 10 min 时检测到的柠檬烯含量较低, 提取时间为 30, 60 min 时, 测得的柠檬烯的含量差异不大, 而故将提取时间定为 30 min。

**3.4 溶剂用量考察** 取同一批次无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g, 共 8 份(批号 20140404), 精密称定, 置于锥形瓶中, 分别加甲醇 10, 25, 50, 100 mL, 称重, 分别超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。结果柠檬烯质量分数分别为 0.385, 0.586, 0.689, 0.539  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明, 溶剂用量为 50 mL 时测得的柠檬烯的含量最大, 故将提取溶剂用量定为 50 mL。

综上所述, 气滞胃痛颗粒中柠檬烯的最佳前处理工艺为, 取无糖型气滞胃痛颗粒 2.5 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 称重, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再次称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液。

由含量测定结果可知, 10 批气滞胃痛颗粒中柠檬烯的含量从 0.4  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  到 0.9  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  不等, 这可能与气滞胃痛颗粒制备时所选的原料药有关, 中药复方制剂中化学成分往往会受到原料药的产地、采收期、批次的影响。

柠檬烯属于挥发油类成分, 大多采用气相色谱法进行检测<sup>[9-12]</sup>, 然而气相色谱法存在操作复杂、适用范围有限等缺点, 因此, 本实验选用更为简便、适用范围更广的高效液相色谱法来检测气滞胃痛颗粒中柠檬烯的含量, 由于挥发油类成分的特殊性, 本实验对不同规格的 TC-C<sub>18</sub>, RP-C<sub>18</sub>, LP-C<sub>18</sub> 3 种色谱柱进行了考察, 结果发现 LP-C<sub>18</sub> 色谱柱具有较好的耐用性, 此色谱柱填料为 3 个硅羟基键与一个键合相 C<sub>18</sub> 结合, 极性较强, 对极性化合物有较强的保留, 由柠檬烯结构可知, 其为弱极性化合物, 因此采用极性较强的色谱柱分离柠檬烯效果更好。

本实验在色谱法检测柠檬烯含量的基础上, 应用红外光谱技术检测了气滞胃痛颗粒粉末的红外光谱, 应用灰色关联理论, 分析了 10 批气滞胃痛颗粒

红外光谱特征共有峰与柠檬烯含量的关系, 得到 3 个与柠檬烯含量相关的红外谱峰。在中药质量控制方面色谱法虽然较为常用, 但色谱法要求的分离提取过程复杂, 且色谱条件的建立耗时、费力<sup>[13]</sup>, 本实验在色谱法对柠檬烯准确定量的基础上, 建立了采用红外光谱法快速鉴定柠檬烯含量的新方法, 为气滞胃痛颗粒中柠檬烯含量的快速鉴别提供了一种有效、简便和直观的方法。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 570.
- [2] 董媛, 李忠琼, 张赞华, 等. 气滞胃痛颗粒的质量分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2340-2342.
- [3] 温小萍, 刁云鹏, 韩凌, 等. 气滞胃痛颗粒抗大鼠实验性胃溃疡作用研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1948-1950.
- [4] 姚东, 孟宪生, 潘英, 等. 气滞胃痛颗粒镇痛作用研究及机制初探[J]. 中成药, 2012, 34(3): 556-558.
- [5] 包永睿, 王帅, 孟宪生, 等. 气滞胃痛颗粒促胃肠动力作用谱效关系网络模型的构建[J]. 中药材, 2014, 37(5): 829-833.
- [6] 吴寅萍, 王帅, 孟宪生, 等. 通过两种方法评价气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分对胃溃疡模型大鼠的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(23): 2116-2118.
- [7] 崔亚玲, 孟宪生, 包永睿, 等. 气滞胃痛颗粒促胃肠动力有效物质组分协同关系及作用机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1): 52-57.
- [8] 李爽, 包永睿, 王帅, 等. 基于多功效多指标药效综合评价的气滞胃痛颗粒组分配伍研究[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(24): 2860-2865.
- [9] 薛海萍, 侯剑伟, 杨骏, 等. GC 测定香榧假种皮挥发油中  $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯和柠檬烯含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 57-59.
- [10] 张加, 陈晓辉, 张迪, 等. GC 法同时测定萆薢茄挥发油中 6 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 424-427.
- [11] 阎卉, 靳文仙, 王成港. 气相法同时测定不同产地藏茴香中葛缕酮和柠檬烯含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 97-99.
- [12] 何华, 王海波, 李先宽, 等. GC 同时测定五味子种子挥发油中 6 种成分含量[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 1131-1133.
- [13] 卢丽萍, 林励, 黄爱华, 等. 化橘红药材红外指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 319-323.

[责任编辑 顾雪竹]