

均匀设计对藁本药材中阿魏酸含量测定方法的改进

★ 张凌 许怀远 张道英 (江西中医学院科研处 南昌 330006)

摘要:目的:改进藁本药材中有效成分阿魏酸的含量测定方法。方法:采用均匀设计安排试验,对藁本颗粒大小、提取溶剂的量、提取时间等条件进行考察,得出最佳的提取条件。结果:藁本中阿魏酸的含量测定以药材粉末过药典 6 号筛,水浴回流提取 2 小时的方法为最佳。结论:改进后得到的最佳提取方式可以更真实地反映出藁本药材中阿魏酸的含量。

关键词:藁本药材;含量测定;高效液相色谱法;均匀设计

中图分类号:TQ 460.6 **文献标识码:**A

The Amelioration of Ferulic Acid Analysis of Rhizoma Ligustici with Uniform Design

ZHANG Ling, XU Huai-yuan, ZHANG Dao-ying

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: By taking reversed phased high performance liquid chromatography and uniform design, study and ameliorate the ferulic acid assay of Rhizoma Ligustici. Methods: By comparing the extracting method, granule size, extracting solvent and extracting time, we got the optimum extracting condition. Results: the optimum extracting condition was water bath re-circulating extract for 2 hours, the granule size pass through 100 mesh. Conclusion: the ameliorated extracting method could improve the extracting efficiency greatly, and evaluate the quality of raw Rhizoma Ligustici more truly.

Key Words: Raw Rhizoma Ligustici; Determination; HPLC; Uniform Design

藁本为伞形科植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 或辽藁本 *Ligusticum jeholense* Nakai et Kitag. 的干燥根茎及根^[1]。其功效为散风寒湿邪。主治风寒头痛、巅顶痛、寒湿腹痛,性味辛,温,入膀胱经。作为藁本入药的植物,长期以来名称比较混乱,各地习用品种比较多^[2]。为有效地评价和控制藁本药材的质量,2005 版《中国药典》针对藁本药材的阿魏酸成分进行了定性、定量分析。药典在含量测定中供试品的制备方法是取藁本粗粉约 0.1 g,精密称定,置 10mL 具塞离心管中,精密加入甲醇 5 mL,称定重量,冷浸过夜,超声处理 20 分钟,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,离心,吸取上清液,以微孔滤膜(0.45 μ m)滤过。本文通过对藁本药材阿魏酸含量测定中供试品溶液的制备过程进行研究比较,找到了相对更好的、能真实反映藁本药材中阿魏酸含量的液相提取方法。

1 仪器与药材

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪;DAD

紫外检测仪;METTLER AB104-N 万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);SHIMADZU 十万分之一分析天平。

1.2 试剂 甲醇:分析纯,上海振兴化工一厂;乙腈:色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂;超纯水。

1.3 药材 藁本药材共 38 个样品(江西祥云药业有限公司提供),以上样品都经江西中医学院中药系鉴定教研室罗光明教授鉴定;阿魏酸对照品(批号 0773-9910,中国药品生物制品检定所)。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 采用二极管阵列检测器(DAD)对藁本指纹图谱的检测波长进行了选择,发现在 324 nm 处阿魏酸有最大吸收,故以 324 nm 为测定波长;色谱柱:Varian C₁₈ ODS 柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈:0.8%冰醋酸水溶液(20:80);流速 1.0 mL/min;柱温 25 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品

(60 ℃干燥 10 小时)0.005 40 g,置于 50mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成浓度为 108 μg/mL 的阿魏酸对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取藁本药材粉末(通过 100 目药典筛)约 0.5 g,精密称定,加甲醇 50 mL,称重后 80 ℃回流提取 60 分钟,放冷后补重,直接吸取样品溶液,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.4 提取方式的选择 对比了超声、回流和索氏提取 3 种提取方式,发现超声提取时阿魏酸的峰面积(350)要远小于回流提取峰面积(2025)和索氏提取得到的峰面积(1850)。索氏提取和回流提取之间没有明显差异,考虑到索氏提取比较繁琐,所以最后采用回流提取。

2.5 提取溶剂的选择 对比了甲醇(峰面积 1012)、乙醇(峰面积 464)、乙酸乙酯(没有峰出现)和氯仿(170.5)提取样品的色谱图,发现用甲醇提取更完全,故最后选用甲醇提取。

2.6 提取方式的优选 在确定了以甲醇为溶剂、回流提取的方法后,我们对藁本药材的粉碎度、加入甲醇的量和回流时间分别进行了考察。由于考察的各因素水平较多,使用正交设计实验次数过多,故我们采用了均匀设计,以减少实验次数。实验安排见表 1,相对应的均匀设计表:U₇^(7,6),设计如表 1。

表 1 均匀设计因素水平设置

水平	颗粒大小(x1)	加甲醇量(x2)	回流时间(x3)
1	>2 号筛	10 mL	0.5h
2	2~3 号筛	20 mL	1h
3	3~4 号筛	30 mL	2h
4	4~5 号筛	40 mL	3h
5	5~6 号筛	50 mL	4h
6	6~7 号筛	60 mL	5h

均匀设计实验方法:分别取不同粒度的藁本药粉各 0.5 g,加入到 150 mL 的平底烧瓶中,按照表 2 中的要求加入不同量的甲醇,并按规定时间水浴回流提取,放冷后过滤,并用甲醇将烧瓶荡洗干净,合并提取液与洗涤液,置水浴上挥干,用适量甲醇溶解,并转移至 25 mL 容量瓶中,再用甲醇稀释至刻度,摇匀。过 0.45 μm 滤膜,进样 10 mL,进行比较,实验结果见表 2。

表 2 均匀设计表

	颗粒大小(x1)	加甲醇量(x2)	回流时间(x3)	峰面积(y)
1	> 2 号筛	20mL	2h	890.1
2	2~3 号筛	40mL	5h	656.9
3	3~4 号筛	60mL	1h	506.9
4	4~5 号筛	10mL	4h	559.5
5	5~6 号筛	30mL	0.5h	470.7
6	过 6 号筛	50mL	3h	2054.7

对上述数据采用 SAS 软件的非线性回归法进行拟合,根据拟合结果的决定系数(R^2)和模型显著性检验 P 值调整模型拟合的参数,最后确定拟合的模型如下:

$$y = -313.2 \times x_1 + 25.6643 \times x_1^2 + 2 \times 10^{-14} \times x_1^{20} + 1393.1$$

$R^2 = -0.9931$,模型显著性检验结果 $P = 0.0103$ 。

从决定系数和模型检验结果来看,模型是可信的。

依据拟合模型做曲线见图 1。

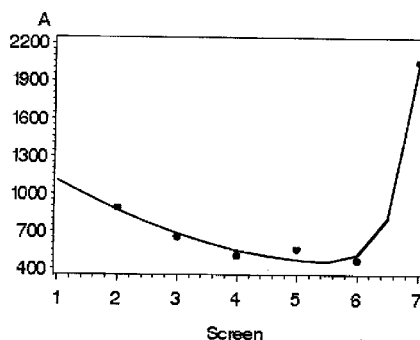


图 1 均匀设计模型拟合曲线

注:图 1 中实线为拟合曲线,圆点为实际测得值。

从图 1 和模型决定系数可知,方程的拟合效果很好。峰面积只与筛孔大小呈一定相关性,表现为 1~6 号筛孔对应的峰面积逐渐减小,大于 6 号筛孔则峰面积骤增。回流时间和加甲醇量对峰面积影响不大,且没有规律性。

2.7 样品溶液的最佳制备方法 根据回归方程,确定溶液的最佳制备工艺为:过 6 号筛、加甲醇量为 50 mL、回流时间为 2 小时。样品溶液的最佳制备方法为:取过 6 号筛的藁本粉末 0.5 g,精密称定,置 150 mL 平底烧瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,水浴回流提取 2 小时,放冷后再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀后直接吸取甲醇提取液,过 0.45 μm 滤膜,即得。

3 方法学考察

3.1 标准曲线的制备 精密吸取阿魏酸对照品溶液 0.5,1,2,5,8,10 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,各进样 10 μL,记录色谱图,依次测定峰面积,以浓度对峰面积进行线性回归,得回归方程: $Y = 6247.9X + 42.683$, $R^2 = 0.9999$,结果表明,浓度在 5.4~108 μg/mL 之间,阿魏酸的浓度与峰面积呈良好线性关系。

3.2 精密度试验 精密吸取同一样品溶液 10 mL,

重复进样 5 次, $RSD = 1.05\%$ 。结果说明该方法的精密度良好。

3.3 重复性试验 取同一样品(批号 6-3-1)6 份,精密称定,照“样品溶液的最佳制备方法”项下进行制备,分别进样 10 mL, $RSD = 2.20\%$,结果说明该方法的重复性良好。

3.4 稳定性试验 精密吸取样品溶液 10 mL,在 0、5、18、24、40、48 小时重复进样, $RSD = 1.32\%$,结果说明样品在 48 小时内稳定良好。

3.5 加样回收率试验 取藁本(过 6 号筛)粉末 0.25 g,精密称定,置 150 mL 平底烧瓶中,按照药材中阿魏酸 80%、100% 和 120% 的量,分别加入不同量的阿魏酸对照品,称定重量,水浴回流提取 2 小时,放冷后再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀后直接吸取甲醇提取液,过 0.45 μm 滤膜,分别进样 10 mL。样品溶液平均回收率为 98.05%, $RSD = 1.75\%$,说明该测定方法测得的结果准确,详见表 3。

表 3 加样回收率实验结果

编号	样品中的量 / μg	添加量 / μg	测得量 / μg	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD
1	680	540	1210	97.43	98.05	1.75%
2	680	540	1215	98.35		
3	680	700	1341	97.21		
4	680	700	1330	95.59		
5	680	810	1490	99.26		
6	680	810	1500	100.49		

我们依照《中国药典》(2005 版一部)藁本中阿魏酸含量测定的方法,对供试品溶液的制备过程进行了改进,通过实验考察,确定改进后的制备方法能更真实地反映出藁本药材中阿魏酸的含量。并用改进后的制备方法对江西祥云生物药业有限公司提供的 38 批藁本药材样品进行检测,结果阿魏酸平均含量为 0.18%,相对标准偏差为 0.25%;同时对全国各地药店购买的 20 个藁本样品进行检测结果阿魏酸平均含量为 0.21%,相对标准偏差为 0.48%。建议将药典藁本药材中阿魏酸含量由不低于 0.05% 调为不低于 0.15% 更为合理。

4 讨论

(1)药材含量测定必须在供试品溶液制备过程中进行多方面的考察,使得药材中待测有效成分尽

可能被提取完全。如果提取方式出现问题,则有可能在制剂过程中某药材用其它方式的提取效率高于分析中的提取效率,从而出现药材中有效成分的转移率大于 100% 的不合理情况。所以供试品溶液制备的考察很重要。

(2)按《中国药典》(2005 版)的要求,取藁本粗粉约 0.1 g,精密称定。我们认为取样量过低,因为藁本药材使用的是根茎部位,在加工干燥过程中难免会搀杂入泥沙等杂质。打粉后这些杂质很容易混在粉末中。如果只称 0.1 g 样品,则不慎带入的杂质对称样的准确性会造成很大干扰。故我们认为像藁本类使用根茎的药材样品至少要称到 0.5 g 为宜。

(3)在藁本药材的提取方式上,我们比较后认为水浴回流提取的效率要远远大于超声提取,故认为药典中的提取方式应当改进。当然在我们比较过的其它药材提取方式中,也有很多是水浴回流提取和超声提取差别很小的,所以并不是水浴回流一定好于超声提取,每种药材要具体考察才行。

(4)《中国药典》(2005 版)使用藁本粗粉进行检测,我们的试验结果证明藁本样品粉末大小对提取效率影响极大。我们在试验中对比了超声条件下颗粒大小对提取效率的影响,发现趋势和回流提取是一样的,故使用粗粉不能将阿魏酸提取完全,而且打粗粉也相对不好掌握,故建议应当注明药材的粉碎程度,这样具有更好的操作性和良好的重现性。

(5)使用均匀设计,我们对藁本药材的粉碎度、加入甲醇的量和回流时间进行了 6 水平的考察,在试验次数只有 6 次的情况下,得出药材的粉碎度是影响阿魏酸峰面积主要因素,而甲醇量和回流时间对阿魏酸峰面积影响不大的结果。因此,认为均匀设计在药材的提取方式优选中可以有非常大的用途。

参考文献

- [1]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2005.313
- [2]溥发鼎. 中国藁本属修订(续)[J]. 植物分类学报,1991.29(6): 525~548
- [3]张金兰,周志华,陈若芸. 藁本药材化学成分、质量控制及药效学研究[J]. Chin Pharm J,2002,37(9):10

(收稿日期:2006-03-02)

欢 迎 投 稿 ! 欢 迎 订 阅 !