

阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸的定量分析方法考察

王娟¹, 马桂芝¹, 高娟¹, 李思远¹, 于富生², 王长虹^{3*}, 滕亮^{4*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆华圣元医药科技有限公司, 乌鲁木齐 830011;
3. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;
4. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的:建立阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸的定量分析方法,为该制剂的质量控制提供参考。方法:以甲醇体积分数、溶剂用量、超声时间为自变量,阿魏酸峰面积为因变量,利用响应面设计优选阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸的超声提取工艺。采用HPLC测定阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸的含量,流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85),检测波长322 nm。结果:阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸的最佳超声提取工艺为以79%甲醇为提取溶媒,溶剂用量4.2倍/粒,超声时间33 min。阿魏酸质量0.919 2 μg/粒。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于阿魏海螵蛸软胶囊的质量控制。

[关键词] 阿魏海螵蛸软胶囊;阿魏酸;超声提取;响应面法;海螵蛸

[中图分类号] R284.1;R283.6;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0024-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040024

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151229.1127.010.html>

[网络出版时间] 2015-12-29 11:27

Investigation of Quantitative Analysis Method of Ferulic Acid from Awei Haipiaoxiao Soft Capsules

WANG Juan¹, MA Gui-zhi¹, GAO Juan¹, LI Si-yuan¹, YU Fu-sheng²,
WANG Chang-hong^{3*}, TENG Liang^{4*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Huashengyuan Medicine Technology Co. Ltd., Urumqi 830011, China; 3. Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine, Ministry of Education, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative analysis method for ferulic acid from Awei Haipiaoxiao soft capsules, which laid a test base for quality control of this preparation. **Method:** Independent variables were methanol concentration, solvent amounts and extracting time, dependent variable was peak area of ferulic acid, response surface methodology was adopted to optimize ultrasonic-assisted extraction technology, and an HPLC method for determining the content of ferulic acid from Awei Haipiaoxiao soft capsules was established. **Result:** Optimum extraction process was as following: adding 4.2 times the amount of 79% methanol, extraction time of 33 min. Conditions of HPLC were as follows: mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (15:85), flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelength at 322 nm. The content of ferulic acid was

[收稿日期] 20150705(002)

[基金项目] 乌鲁木齐市科学技术计划项目(Y111310035);新疆维吾尔自治区科技型中小企业技术创新基金项目(201253165);国家科技部科技型中小企业技术创新基金项目(12C26216507308)

[第一作者] 王娟,在读硕士,从事中药民族药新药研究,Tel:13139635771,E-mail:623856413@qq.com

[通讯作者] *滕亮,博士,教授,主任药师,硕士生导师,从事中药民族药新药研究,Tel:0991-4362893,E-mail:tl750212@126.com;

*王长虹,研究员,博士,博士生导师,从事中药新制剂与体内过程研究,Tel:021-51322511,E-mail:wchexm@hotmail.com

0.919 2 μg per grain. **Conclusion:** This quantitative analysis method of ferulic acid from Awei Haipiaoxiao soft capsules is simple, accurate and reproducible, which can be used for quality control of this preparation.

[**Key words**] Awei Haipiaoxiao soft capsules; ferulic acid; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology; Sepiae Endoconcha

消化性溃疡 (peptic ulcer, PU) 是一种常见病、易发病,包括胃溃疡 (gastric ulcer, GU) 和十二指肠溃疡 (doudenal ulcer, DU)^[1]。阿魏海螵蛸软胶囊是由阿魏和海螵蛸组成的治疗消化性溃疡的天然药物复方制剂,课题组前期以溃疡抑制率为指标,采用拆方试验确定了该方中阿魏与海螵蛸比例及其给药剂量,并通过内容物处方筛选试验与胶皮处方筛选试验确定了制剂的处方组成。阿魏隶属于伞形科阿魏属,在我国主要分布于新疆维吾尔自治区^[2-3],具有多种生理活性,如抗菌、抗炎、抗过敏、抗氧化、抑制胃肠蠕动和抗胃癌活性等^[4-6]。海螵蛸为乌贼科动物无针乌贼或金乌贼的干燥内壳^[7],可通过中和胃酸、加强细胞保护等途径实现防治胃溃疡的作用^[8]。前期完成了阿魏海螵蛸软胶囊的生产工艺研究及中试生产研究,本实验主要报道阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸定量分析方法的研究,为建立该制剂的质量控制体系奠定基础。

1 材料

BS110S 型 1/10 万电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司), TDL-5A 型离心机 (上海菲恰尔分析仪器有限公司), LC-20A 型高效液相色谱仪 (日本岛津)。阿魏酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 773-92084), 阿魏海螵蛸软胶囊 (新疆华圣元医药科技有限公司, 批号 20141018, 20141019, 20141020), 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取阿魏酸对照品 2.7 mg, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取 10 粒软胶囊, 将胶皮剪开, 置于具塞锥形瓶中, 加入 80% 甲醇 40 mL, 摇匀, 超声处理 30 min, 于 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 水浴 70 $^{\circ}\text{C}$ 挥至 10 mL, 即得。

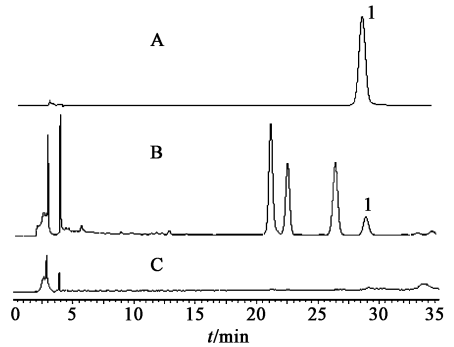
2.1.3 阴性样品溶液 按阿魏海螵蛸软胶囊的生产工艺称取相应质量的海螵蛸及辅料, 制备缺阿魏的阴性样品, 按 2.1.2 项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件^[9-10] Kromasil C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷

酸溶液 (15:85), 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 322 nm, 进样量 20 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 在 2.2 项色谱条件下, 阿魏酸和供试品中其他组分的色谱峰可达到基线分离, 分离度 > 1.5, 以阿魏酸色谱峰计算柱效, 理论塔板数 > 5 000, 拖尾因子在 0.95 ~ 1.05。阴性样品在阿魏酸色谱峰位置处无相应色谱峰出现。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 阿魏酸

图 1 阿魏海螵蛸软胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Awei Haipiaoxiao soft capsules

2.3.2 线性范围考察 精密吸取阿魏酸对照品储备液, 配成质量浓度分别为 0.084 4, 0.169, 0.338, 0.675, 1.35, 2.70, 5.40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液, 按 2.2 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 104\ 109X + 2\ 430.4$ ($r = 0.999\ 4$), 线性范围 0.084 4 ~ 5.40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 按 2.2 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算阿魏酸峰面积的 RSD 1.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12 h 按 2.2 项下色谱条件测定, 计算阿魏酸峰面积的 RSD 1.7%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.5 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件测定, 计算阿魏酸峰面积的 RSD 1.9%, 表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取已知阿魏酸含量的供

试品溶液 6 份,分别精密加入一定质量浓度的对照品溶液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件测定,结果平均加样回收率 98.4%, RSD 1.9%。

2.3.7 耐用性考察 对不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹),不同柱温(25, 30, 35 °C)及流动相中磷酸水溶液的不同质量分数(0.08%, 0.10%, 0.12%)进行考察。结果表明流速在 0.8 mL·min⁻¹ 时分离度 < 1.5, 1.2 mL·min⁻¹ 时拖尾较严重,说明流速对阿魏酸含量测定有影响,确定流速选择 1.0 mL·min⁻¹。在设定的柱温 30 °C 上下浮动,分离度均 > 1.5, 但 35 °C 时拖尾因子不在 0.95 ~ 1.05, 故色谱柱柱温选择 25 ~ 30 °C。流动相中磷酸水溶液质量分数在设定的 0.1% 上下浮动,分离度均 > 1.5, 但磷酸质量分数为 0.08% 和 0.12% 时,拖尾因子不在规定范围内。

2.3.8 样品测定 分别取 3 批阿魏海螵蛸软胶囊各 10 粒,按优选的工艺条件制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件测定,计算阿魏酸平均质量分别为 0.929 4, 0.918 9, 0.909 3 μg/粒。故暂定阿魏酸质量宜 ≥ 0.735 4 μg/粒^[11-12]。

2.4 响应面优选超声提取工艺 在单因素试验基础上,以甲醇体积分数、溶剂用量和超声提取时间为自变量,阿魏酸峰面积为响应值,设计三因素三水平共 17 个试验点的响应面优选,其中 12 个为析因试验,5 个为中心试验。试验因素及水平见表 1, 方差分析见表 2。

采用 Design Expert 8.06 软件对试验结果进行方差分析和多元二次回归拟合,得回归方程 $Y = 96\ 402.80 - 4\ 343.50A + 2\ 665.63B + 5\ 688.88C + 964.50AB - 800.00AC - 1\ 697.75BC - 11\ 426.53A^2 - 2\ 065.28B^2 - 4\ 369.77C^2$ 。说明该模型极显著,模型的复相关系数 (R^2) 0.981 1, 调整 $R^2_{Adj} = 0.956\ 9$, 说明该模型能解释 98.11% 响应值的变化,即该模型与实际试验拟合良好,试验误差小。模型失拟项 $P > 0.05$, 不显著,认为无失拟因素存在,回归模型显著,能够较好地描述试验结果。一次项 A, B, C 和二次项 A^2, C^2 表现为极显著,其余项均不显著。各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。

依据回归方程作响应面分析图及等高线,见图 2。结果显示各因素间的交互作用不显著,但 3 个因素对阿魏酸的提取均有显著性影响,其中因素 C 的影响最显著,随着提取时间的增加,阿魏酸峰面积随

表 1 阿魏海螵蛸软胶囊中阿魏酸超声提取工艺响应面优选分析
Table 1 Response surface analysis of ultrasonic extraction process of ferulic acid from Awei Haipiaoxiao soft capsules

No.	A 甲醇体积分数/%	B 溶剂用量/mL	C 超声时间/min	阿魏酸峰面积
1	70	40	15	77 935
2	70	50	30	89 839
3	90	40	45	81 678
4	80	30	45	95 046
5	80	40	30	95 256
6	80	40	30	96 728
7	80	40	30	97 699
8	80	40	30	95 268
9	70	30	30	84 050
10	80	40	30	97 063
11	70	40	45	92 585
12	90	50	30	83 701
13	80	30	15	81 945
14	80	50	45	94 595
15	90	40	15	70 228
16	90	30	30	74 054
17	80	50	15	88 285

表 2 阿魏酸峰面积回归方程的方差分析
Table 2 Analysis of variance for regression equation of peak area of ferulic acid

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.175 × 10 ⁹	9	1.306 × 10 ⁸	40.48	<0.000 1
A	1.509 × 10 ⁸	1	1.509 × 10 ⁸	46.79	0.000 2
B	5.684 × 10 ⁷	1	5.684 × 10 ⁷	17.62	0.004 0
C	2.589 × 10 ⁸	1	2.589 × 10 ⁸	80.27	<0.000 1
AB	3.721 × 10 ⁶	1	3.721 × 10 ⁶	1.15	0.318 4
AC	2.560 × 10 ⁶	1	2.560 × 10 ⁶	0.79	0.402 6
BC	1.153 × 10 ⁷	1	1.153 × 10 ⁷	3.57	0.100 6
A ²	5.497 × 10 ⁸	1	5.497 × 10 ⁸	170.43	<0.000 1
B ²	1.796 × 10 ⁷	1	1.796 × 10 ⁷	5.57	0.050 4
C ²	8.040 × 10 ⁷	1	8.040 × 10 ⁷	24.93	0.001 6
残差	2.258 × 10 ⁷	7	3.266 × 10 ⁶		
失拟项	1.775 × 10 ⁷	3	5.918 × 10 ⁶	4.91	0.079 2
误差	4.825 × 10 ⁶	4	1.206 × 10 ⁶		
总离差	1.198 × 10 ⁹	16			

之增大,表现为等高线更为陡峭。

为验证阿魏酸超声提取模型方程的适用性,对

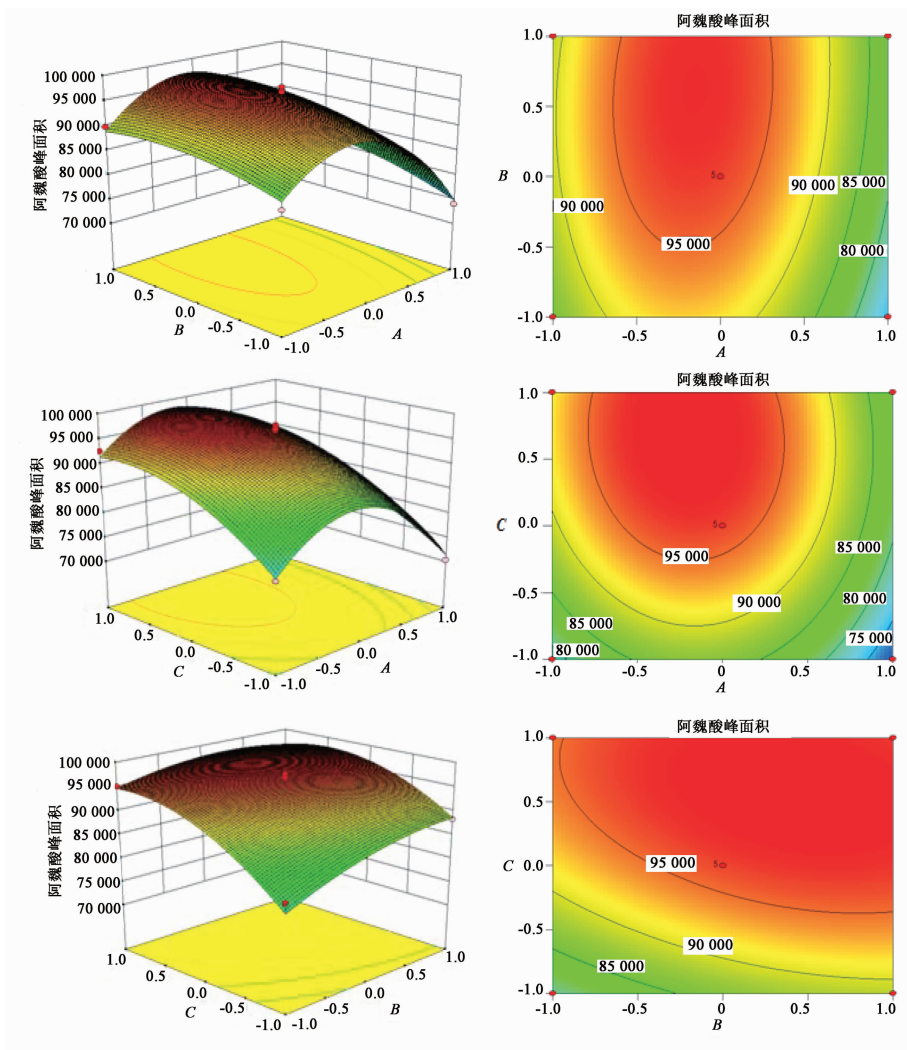


图 2 甲醇体积分数、溶剂用量及超声时间对阿魏酸超声提取工艺影响的响应面和等高线
Fig. 2 Response surfaces and contours of effects of methanol concentration, solvent dosage and ultrasonic time on ultrasonic extraction process of ferulic acid

回归方程求导,并令其等于零,得曲面的最大点,因素 A, B, C 的最佳水平值分别为 $-0.133, 0.222, 0.222$, 即优选的提取条件为甲醇体积分数 78.67%, 溶剂用量 42.33 mL, 超声时间 33.33 min。在此条件下,阿魏酸峰面积达 98 229。根据工作实际将优选提取条件修正为甲醇体积分数 79%, 溶剂用量 42 mL, 超声时间 33 min。

2.5 验证试验 取 3 份软胶囊,每份 10 粒,按优选的工艺条件进行提取,按 2.2 项下色谱条件测定,结果阿魏酸峰面积平均值 99 688, RSD 2.7%, 与理论预测值较为接近,充分验证了所建模型的正确性。

3 讨论

目前软胶囊品种含量测定方法的前处理中大多仅是针对软胶囊内容物进行处理。由于阿魏海螵蛸软胶囊内容物为混悬液,在预试验中同时考察了前

处理对象分别为软胶囊内容物与整粒软胶囊的区别,结果表明软胶囊内容物所制备的样品溶液平行 3 份差异较大,且含量低于整粒软胶囊的样品。进一步考察发现囊壳中含有阿魏酸成分,质量约 $0.26 \mu\text{g}/\text{粒}$,推测可能由于囊壳成分含水且阿魏酸为水溶性化合物,致使阿魏酸向囊壳迁移。为了充分浸出并准确测定试验制剂所含阿魏酸的含量,参考文献 [11-12], 选择将软胶囊囊壳与内容物一并进行超声提取作为该制剂的前处理方式,验证试验及方法学考察表明该前处理方法可行。

阿魏海螵蛸软胶囊辅料中大豆油所占比例相对较大,而阿魏酸是水溶性化合物,因此选取合适的提取工艺较为关键。预试验对超声提取法和浸渍法 2 种方法进行了横向比较。与浸渍法相比,超声法能将阿魏酸更充分提取出来,且节省时间。由于阿魏

酸是水溶性化合物,因此考察了水、甲醇、乙醇3种溶剂作为提取溶剂,结果水作为提取溶剂时,提取液呈黏稠块状,难以检测,而乙醇作为提取溶剂时,色谱峰峰形较差,分离效果不好。故采用不同体积分数甲醇作为提取溶剂。

本文在单因素试验基础上,采用响应面设计优化提取工艺参数,得到的工艺参数与单因素试验结果较为接近,但更加精准。单因素试验结果提示提取次数对阿魏酸峰面积影响不大,故确定提取数为1次,而甲醇体积分数、溶剂用量和超声时间对阿魏酸峰面积有一定影响。超声提取时间对试验结果影响最为显著,可能是因为超声时间过短会使阿魏酸提取不充分,时间过长可能导致超声波仪器运行时产生的能量转化成热能从而影响阿魏酸的稳定性。而甲醇体积分数对试验结果的影响次之,可能是因为不同体积分数甲醇与软胶囊混溶的程度会影响阿魏酸的提取。随着溶剂用量的增加,阿魏酸的溶出慢慢趋于饱和。

[参考文献]

[1] 周雄杰. 消化性溃疡的致病因素与治疗探讨[J]. 中外医疗, 2009, 28(14): 58.
[2] Maggi F, Cecchini C, Cresci A, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy) [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(1): 68-72.
[3] 胡跃, 李晓东, 李国玉, 等. 阿魏的化学成分研究[J].

中国现代中药, 2009, 11(7): 18-19.

[4] 赵保胜, 桂海水, 朱寅荻, 等. 阿魏化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 279-281.
[5] 徐晓琴, 滕亮, 戴秀勇, 等. 新疆阿魏水溶性抗溃疡有效成分的提取纯化工艺的研究[J]. 中成药, 2010, 32(6): 931-936.
[6] Kartal N, Sokmen M, Tepe B, et al. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure[J]. *Food Chem*, 2007, 100(2): 584-589.
[7] 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: 277.
[8] 郭一峰, 周文丽, 张建鹏, 等. 海螵蛸多糖对小鼠胃黏膜保护作用的研究[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(11): 1328-1332.
[9] 马桂芝, 滕亮, 徐晓琴, 等. 新疆阿魏水提取物高效液相指纹图谱的建立及其在纯化工艺中的应用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 1009-1011.
[10] 滕亮, 郑立明, 马桂芝, 等. 含新疆阿魏水提物及挥发油微囊的胃内漂浮片处方优选[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(2): 157-161.
[11] 赵春顺, 崔升森, 向柏, 等. 布洛伪麻软胶囊含量测定方法的研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(8): 621-623.
[12] 桑育黎, 郝延军, 陈沉, 等. HPLC测定独一味软胶囊中8-epideoxyloganic acid的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 107-108.

[责任编辑 刘德文]