表2 4因素2次正交回归试验结果

No.	抑菌圈直径 Y/mm	No.	抑菌圈直径 Y/mm
1	11.9	14	10.8
2	10.7	15	10.3
3	13.6	16	6.5
4	8.7	17	8.5
5	11.1	18	9.4
6	11.9	19	9.7
7	10.3	20	8.5
8	7.3	21	12.8
9	12.8	22	13.0
10	13.5	23	13.6
11	11.5	24	9.9
12	12.8	25	12.8
13	9.6	26	12.5

对回归方程及各系数进行显著性检验，剔除不显著项，得到4工艺参数对抑菌圈直径的回归方程：

$$Y = 10.923 - 0.178X_1 + 0.955X_2 + 0.539X_3 + 0.705X_4 - 0.569X_1X_2 + 0.063X_1X_3 + 0.481X_1X_4 - 0.419X_2X_3 - 0.044X_2X_4 - 0.744X_3X_4 - 1.056X_1^2 - 0.987X_2^2 + 0.741X_3^2 + 0.218X_4^2$$

将上式中的 X_1, X_2, X_3, X_4 分别用提取温度、乙醇含量、溶剂量和提取时间的实际值 k_1, k_2, k_3, k_4 进行替代，得到回归方程：

$$Y = -7.749 + 0.261k_1 + 0.301k_2 - 0.011k_3 - 9.460\times10^{-4}k_4 - 1.013\times10^{-3}k_1k_2 + 2.800\times10^{-4}k_1k_3 + 5.350\times10^{-4}k_1k_4 - 1.492\times10^{-3}k_2k_3 - 3.916\times10^{-5}k_2k_4 - 1.655\times10^{-3}k_3k_4 - 2.350\times10^{-3}k_1^2 - 1.405\times10^{-3}k_2^2 + 6.595\times10^{-3}k_3^2 + 1.213\times10^{-4}k_4^2$$

2.5 非线性优化结果

以抑菌圈直径回归方程为目标函数，各参数的试验范围为约束条件（$0\leqslant k_1\leqslant90, 20\leqslant k_2\leqslant95, 10\leqslant k_3\leqslant40, 60\leqslant k_4\leqslant180$），建立非线性规划数学模型。应用非线性优化方法，得到各工艺参数的优化组合为：$k_1 = 50.3$ ℃，$k_2 = 66.7\%$，$k_3 = 40$ 倍，$k_4 = 60$ min。最大的抑菌圈直径 $Y = 14.4$ mm。

2.6 优化结果的试验验证

为了验证优化结果，将荷叶中的抑菌有效成分按所得的优化工艺进行提取，对大肠杆菌进行抑菌试验，得到抑菌圈直径为14.2 mm，与理论值14.4 mm相近，说明了试验结果的正确性。

3 结论

采用2次正交回归试验设计建立了荷叶中抑菌有效成分提取的温度、乙醇含量、溶剂量和提取时间4因素回归数学方程，并采用非线性优化技术，得到了荷叶中抑菌有效成分提取的优化工艺为提取温度50.3 ℃，乙醇含量66.7%，溶剂量40倍，提取时间60 min，得到最大抑菌圈直径为14.4 mm。并通过实际试验验证，取得了很好的效果。考虑到实际生产和推广应用，最后确定荷叶中抑菌有效成分的提取工艺条件为提取温度50 ℃，乙醇含量67%，溶剂量40倍，提取时间60 min。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部. 2000. 231.
[2] 肖崇厚. 中药化学. 上海：上海科学技术出版社，1987. 255.
[3] 纪丽莲. 荷叶中抑菌成分的提取及其抑菌活性的研究. 食品科学，1999，8：64.

安睡伴侣软胶囊中丁香酚含量测定方法研究

薄海波[1,2*]，索有瑞[3]，陈立仁[1]
（1. 中国科学院 兰州化学物理研究所，甘肃 兰州 730000；2. 青海出入境检验检疫局，青海 西宁 810000；3. 中国科学院 西北高原生物研究所，青海 西宁 810001）

[收稿日期] 2004-05-08
[通讯作者] *薄海波，Tel：(0971) 8231571，E-mail：bohb1212@163.com

安睡伴侣软胶囊由纯天然传统藏药（包括丁香、肉豆蔻、胡椒、阿魏等6味药材）组方，经超临界 CO_2 萃取其中的挥发油等活性成分后精制而成，具有安

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

神、催眠、抗惊厥等保健功效，无毒副作用。丁香酚是安睡伴侣软胶囊中稳定的、有代表性的功效成分，目前测定药材药品中丁香酚含量的方法主要有液相色谱法(HPLC)[1-3]和气相色谱法(GC)[4-6]等。本试验建立了安睡伴侣软胶囊中丁香酚含量的气相色谱和液相色谱测定方法，采用这2种方法测试了5个批次的安睡伴侣软胶囊样品，并将2种方法的测定结果进行了对比。经数据统计分析(配对 t 检验)显示，HPLC法和GC法所得结果没有显著性差异，2种方法均可满足常规检验要求，都可以作为本制剂的质量检验方法。

1 仪器与材料

美国惠普HP1100型高效液相色谱仪，包括四元泵，在线真空脱气机，可变波长紫外检测器，手动进样阀(装有20 μL定量管)，柱温箱，液相色谱工作站。美国安捷伦6890N气相色谱仪，分流/不分流(S/SL)进样口，氢火焰离子化检测器(FID)，气相色谱工作站。丁香酚对照品(纯度≥99.5%，中国药品生物制品检定所)。安睡伴侣软胶囊样品：中国科学院西北高原生物研究所藏药研究中心研制。甲醇(色谱纯，上海陆忠试剂厂)，无水乙醇(分析纯，北京试剂厂)，二次蒸馏水(本实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 HPLC：Eclipse XDB-C_{18}分析柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，带有前置保护柱，柱温40 ℃，流动相为甲醇-水(70:30)，临用前以0.22 μm微孔滤膜过滤，检测波长215 nm，进样量20 μL，流速1.0 mL·min^{-1}。GC：HP-5毛细管柱(0.32 mm×30 m，0.25 μm)，柱温135 ℃恒温，FID温度250 ℃，H_2 40 mL·min^{-1}，Air 450 mL·min^{-1}，S/SL进样口温度280 ℃，分流比20:1，进样量1.0 μL，载气高纯N_2(99.999%)，流速2.0 mL·min^{-1}。

2.2 对照品溶液的制备 精确称取丁香酚对照品50.0 mg，用无水乙醇溶解，定容于50 mL量瓶，含量为1.0 mg·mL^{-1}。

2.3 供试品溶液的制备 取安睡伴侣软胶囊样品内容物0.1 g，精确称定，加10 mL无水乙醇，摇匀，用快速混匀器混匀后，超声波提取5 min，以1 400 r·min^{-1}离心3 min。吸出上层清液用0.22 μm微孔过滤膜过滤，供色谱分析用。

2.4 阴性对照溶液的制备 按照处方比例(不含丁香)及工艺制成丁香阴性样品，溶液制备方法同上。

2.5 样品测定 在**2.1**色谱条件下，将对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液分别进行HPLC和GC分析，色谱图见图1，2。图1和图2的空白对照品图谱中，在与丁香酚相同保留时间处未见干扰峰。采用外标工作曲线法计算丁香酚含量(mg·g^{-1})。测定5个批次的安睡伴侣软胶囊样品，丁香酚含量的测定结果见表1。

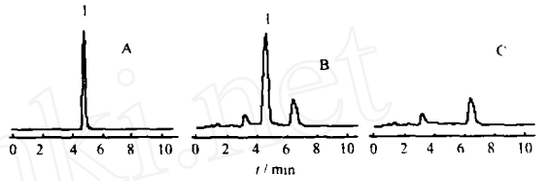

图1 丁香酚对照品及样品HPLC图

A. 对照品；B. 批号020622样品；C. 空白对照品；1. 丁香酚(图2同)

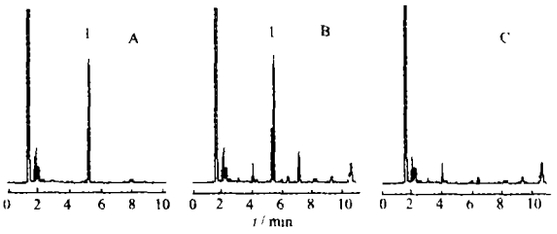

图2 丁香酚对照品及样品GC图

表1 不同批号样品含量 mg·g^{-1}

方法	020622	020704	020717	020731	020901
HPLC	39.3	37.5	40.4	43.1	41.8
GC	39.5	37.8	39.9	42.9	41.4

3 方法学考察

3.1 精密度试验 取供试品溶液，连续重复进样5次进行HPLC和GC分析，丁香酚峰面积的相对标准RSD_{HPLC} 1.4%，RSD_{GC} 2.0%。

3.2 线性关系及最低检出限 用对照品溶液配制含量为0.05，0.1，0.2，0.5，1.0 mg·mL^{-1}的系列溶液，按上述色谱条件进行色谱分析。以丁香酚量为自变量(X)，以峰面积为因变量(Y)，做标准曲线，计算回归方程。最低检出限以3倍噪声计算，结果见表2。从表2数据看出，丁香酚量与HPLC和GC峰面积均在较宽范围内呈良好线性关系，检出限满足安睡伴侣中丁香酚含量测定要求。

表2 线性回归参数及检出限

分析方法	回归方程	r	线性范围/μg	检出限/μg
HPLC	$Y=609.3X-2.7$	0.999 7	0.5～20	0.1
GC	$Y=367.7X-1.9$	0.999 8	0.05～1.0	0.02

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液，每隔2 h进样1次进行HPLC和GC测定，重复进样分析5次，计算丁香酚含量，RSD_{HPLC} 1.5%，RSD_{GC} 1.9%，表明供试品溶液在8 h内稳定。

3.4 重复性试验 取同一样品(批号020622)6份，分别按照供试品溶液制备方法操作，进行HPLC和GC测定，丁香酚平均含量分别为39.3，39.5 $mg \cdot g^{-1}$，RSD_{HPLC} 1.3%，RSD_{GC} 2.0%。

3.5 回收率试验 选择已知丁香酚含量的安睡伴侣软胶囊样品(批号020704)，精密称取内容物0.1 g，5份，每份加入丁香酚对照品5.0 mg，按照样品溶液制备方法操作，分别用HPLC，GC测定，计算回收率，结果见表3。

表3 安睡伴侣中丁香酚加样回收率

测得量/mg		回收率/%		平均值/%		RSD/%	
HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC
8.64	8.59	97.8	96.8				
8.71	8.67	99.2	98.4				
8.67	8.70	98.4	99.0	99.1	98.2	1.1	1.1
8.71	8.62	99.2	97.4				
8.79	8.72	100.8	99.4				

注：加入量均为5.00 mg，样品含量均为3.75 mg

4 讨论

4.1 样品提取方法的选择 对比了以10 mL甲醇、无水乙醇、醋酸乙酯、丙酮为溶剂，用回流法、快速混匀器震荡法、快速混匀后超声波提取法对加标样品的提取效果。结果表明，无水乙醇提取回收率高，精密度好，所需时间短。

4.2 流动相选择 首选最常用的甲醇-水二元系统，比较了不同配比的分离效果，用甲醇-水(70:30)作流动相时，样品中丁香酚与相邻峰完全分离，峰形对称，保留时间仅为5 min。

4.3 HPLC检测波长选择 丁香酚在215，254，270 nm波长均有大吸收。对比了这3个检测波长下的谱图，显示用254，270 nm波长检测时干扰峰较多，用215 nm波长检测时，对丁香酚选择性好，未见相邻干扰峰，并可获得较高灵敏度。

4.4 GC色谱柱的选择 考虑到安睡伴侣软胶囊是经超临界CO_2萃取的药材中挥发油等活性成分组成，以非极性和弱极性为主，根据相似相溶原理，选用弱极性的HP-5柱，该柱适用范围宽，热稳定性好。

4.5 GC载气流速的设置 如果载气流速设置过低，会使谱峰的半峰宽增加，分析时间较长，若载气流速过高，会使相邻峰不能完全分离，甚至出现谱峰重合现象。多次实验表明，载气流速为2 $mL \cdot min^{-1}$时分离效果最理想。

4.6 GC柱箱温度设置 由于安睡伴侣中各组分极性相近，故采用恒温分析。试验表明，柱箱温度设为135 ℃，既可获得满意分离，又能在叫短时间内完成分析。

4.7 数据分析及方法对比 用配对t检验法对表1的数据进行统计分析，得t值为0.671，查表得$t_{0.5(4)}=0.741$. 即概率$P>0.5$，得$P>0.05$(设显著性水准$\alpha=0.05$)。这说明，HPLC法和GC法所得结果没有显著性区别。所以，本研究建立的HPLC和GC均适合于测定安睡伴侣软胶囊中丁香酚的含量。

[参考文献]

[1] 姚连初. 骨痛消酊剂中丁香酚的含量测定. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 38.
[2] 赵 阳, 张 纯. 高效液相色谱法测定苏合香丸中丁香酚的含量. 中国药学杂志, 2001, 26(3): 175.
[3] 余锦雄, 朱炳辉. 风油精中丁香酚含量的高效液相色谱法测定. 中药材, 1995, 18(1): 34.
[4] 郭素华, 潘 馨, 林元桐. 气相色谱法测定小儿健胃灵中丁香酚的含量. 中国药学杂志, 2000, 35(5): 344.
[5] 周长征, 杨春澍. 气相色谱法测定细辛挥发油中甲基丁香酚和黄樟醚的含量. 中国药学杂志, 1999, 34(12): 836.
[6] 潘 馨, 郭素华. 气相色谱法测定丁香及其制剂中丁香酚的含量. 海峡药学, 1999, 11(2): 24.

[责任编辑 刘 晛]

本刊启事

本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和中国期刊网、万方数据(ChinaInfo)系统科技期刊群等，来稿一经刊用，本刊即拥有其在上述及所有媒介再次发表的权利，作者如不同意可作声明。作者著作权使用费与本刊稿酬将在我刊刊用后一次性给付，并赠样刊1本，单行页若干份。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net