

毛细管气相色谱法考察超微粉碎过程对细辛挥发油的影响*

□朱 盈 王玉蓉** (北京中医药大学中药学院 北京 100102)
杨玉芬 盖国胜 (清华大学材料工程与科学系 北京 100084)

摘要:目的:通过确定细辛超微粉体制备工艺,探讨了粉碎过程对其挥发性成分的影响。方法:以细辛粉末粒径分布 D_{90} 及 D_{50} 值为指标,初步筛选出细辛超微粉碎工艺最佳时间;采用毛细管气相色谱法测定细辛细粉和不同粒径超微粉中甲基丁香酚及黄樟醚的含量。采用红外光谱法观测超微粉碎前后细辛化学成分的变化。结果:振动磨粉碎可实现细辛药材的细胞破壁;于低温下粉碎未造成细辛中挥发性成分的损失,振动粉碎 6min 时甲基丁香酚含量最高,振动粉碎 12min 时黄樟醚含量最高,细辛经超微粉碎后其成分未发生变化。结论:本研究初步表明超微粉碎工艺适用于细辛粉末的制备。

关键词:细辛 超微粉碎 挥发油 甲基丁香酚 黄樟醚 毛细管气相色谱法 红外光谱法
doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.019

细辛为马兜铃科植物北细辛、汉城细辛或华细辛的根及根茎。辛,温。归心、肺、肾经。具有祛风散寒,通窍止痛,温肺化饮之功效^[1]。中医临床常用于风寒感冒,头痛,牙痛,鼻塞鼻渊,风湿痹痛,痰饮喘咳等症。细辛的主要有效成分为挥发油,其中甲基丁香酚有麻醉和镇痛作用,黄樟醚为广谱抗霉菌成分但有较大毒副作用,两者存在于细辛属的 31 种植物中,被认为是细辛属植物挥发油的特征成分,可作为药材细辛的品质评价指标^[2]。鉴于细辛含挥发油,一般采用双提法但大生产不易保留挥发油,因此本研究选择细辛为研究对象,进行超微粉碎技术的适用性研究。

超微粉碎是近几年来发展非常迅速的一项高新技术,应用这项技术可将固体物质粉碎到微米甚至纳米级。超微粉末具有一般颗粒所不具有的一些特殊的理化性质,如良好的溶解性、分散性、吸附性、化学反应活性等^[3]。中药超微粉碎技术又称中药细胞级微粉碎技术或中药细胞破壁技术。中药进行超微粉碎后,可实现药材细胞破壁。当细胞破壁后其细胞内有效成分暴露出来后,起效速度快,且药效可大幅度提高^[4]。中药超微粉具有节省药材、提高药效、质量可控等优点,研究超微粉碎技术的适用范围具有重要意义。目前比较公认的中药超微粉的粒径范围是 0.1~75 μm ^[5]。本实验拟通过测定细辛超微粉中甲基丁香酚及黄樟醚的

收稿日期: 2010-05-12

修回日期: 2011-02-12

* 国家中医药管理局中医药行业科研专项资助项目(200807054):赤芍、马钱子等 40 种中药粉体标准的研究,负责人:蔡光先。

** 通讯作者:王玉蓉,教授,博士生导师,主要研究方向:中药新制剂与新剂型创制,E-mail:yurong.wang@163.com。

含量变化,初步探讨超微粉技术对于细辛中挥发性成分的影响。

一、仪器与试药

Agilent 7890A 气相色谱仪(美国 Agilent 公司),SGH-300 高纯氢气发生器(北京东方精华苑科技有限公司),检测器为 FID,Air compressor 91-33320(日本 Hitachi 公司),GC 色谱柱:Agilent J&W DB-5 石英毛细管色谱柱(柱长:30m,内径 0.25mm,膜厚:0.25 μ m),挥发油提取器 1.0 以下(北京玻璃仪器厂),RT 型静音粉碎机(山东桓台东齐粉体设备有限公司),SYF-8II 型超微粉碎振动磨(济南松岳机器有限责任公司),MASTERSIZER 2000 型激光粒度分布仪(MALVERN 仪器公司)。

甲基丁香酚对照品(批号:111642-200301,中国药品生物制品检定所),黄樟醚对照品(含量 99%,英国 BDH 化学试剂公司),正十三烷(色标级,北京试剂公司),正己烷(分析纯,北京北化精细化学品有限责任公司);细辛饮片购自河北省安国市药材市场(经本校陈玉婷教授鉴定为北细辛正品);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

二、方法与结果

1. 细辛细粉与超微粉的制备与分析

(1) 细粉的制备。

采用静音粉碎机处理细辛饮片,根据《中国药典》2005 年版细粉标准过筛,制得。

(2) 超微粉的制备。

为防止温度过高引起挥发油成分的损失,采用 SYF-8II 型超微粉碎振动(低温-10 $^{\circ}$ C)对细辛细粉进行粉碎,制得。

超微粉分别于 3、6、12、20min 取样。采用 MASTERSIZER 2000 型激光粒度分布仪对细辛细粉和各级超微粉的粒径分布进行分析,以 D90 及 D50 为指标,筛选超微粉碎工艺^[6]。结果见表 1、图 1~2。低温振动粉碎 6min 时,粒径减小趋缓。振动粉碎 6min 后,细胞已达到破壁。

2. GC 分析方法的建立

(1) 色谱条件。

色谱柱:Agilent J&W DB-5 石英毛细管色谱柱(柱长:30m,内径 0.25mm,膜厚:0.25 μ m);程序升温:100 $^{\circ}$ C 保持 1min 后以 4 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 112 $^{\circ}$ C 保持

1min,后以 0.5 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 117 $^{\circ}$ C 保持 0.5min,继以 2 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 130 $^{\circ}$ C,再以 50 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 250 $^{\circ}$ C 保持 5min;气化室温度:280 $^{\circ}$ C;FID 温度:280 $^{\circ}$ C;载气:氮气(流速:1mL \cdot min⁻¹);分流比:10:1;进样量:1 μ L。

(2) 内标物的确定。

将挥发油的气相色谱图分别与正十二烷、正十三烷、正十四烷、正十五烷、正十六烷的气相色谱图比较,发现仅正十三烷符合要求。故选定正十三烷作为内标物。

(3) 对照品与供试品溶液的制备。

甲基丁香酚对照品溶液的制备:精密称取甲基丁香酚对照品 0.1342g,加正己烷溶解至 25mL 量瓶中,定容并摇匀,精密量取 7.5mL 至 25mL 量瓶中,正

表 1 细辛细粉及各级超微粉粒径分布

样品类别	D ₉₀ (μ m)	D ₅₀ (μ m)
细粉	154.415	26.429
超微粉 3min	99.153	19.522
超微粉 6min	63.482	14.632
超微粉 12min	49.452	15.302
超微粉 20min	38.464	14.489

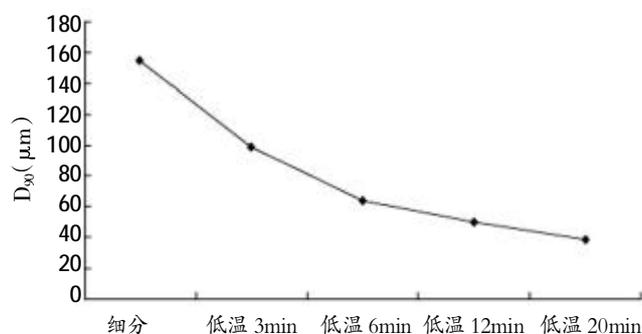


图 1 不同粉碎时间粉体 D₉₀ 比较

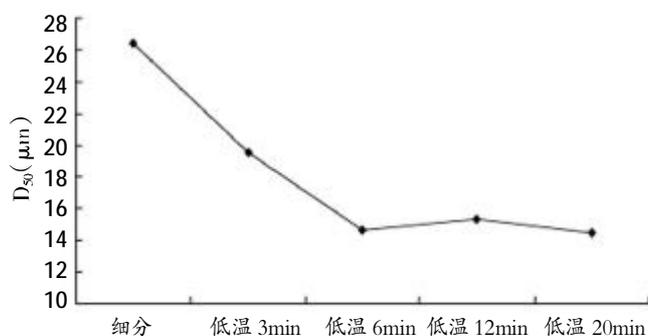


图 2 不同粉碎时间粉体 D₅₀ 比较

己烷定容并摇匀,配制成 $1.6106\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

黄樟醚对照品溶液的制备:精密称取黄樟醚对照品 0.0726g ,加正己烷溶解至 50mL 量瓶中,定容并摇匀,配制成 $1.4520\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

样品溶液的制备:精密称定本品细粉 2.5g ,置 500mL 圆底烧瓶中,加入蒸馏水 250mL ,在挥发油测定器的刻度部分充满水后,滴加 0.5mL 正己烷使其位于水层之上,按《中华人民共和国药典》2005 年版一部附录 XD 挥发油测定法项下甲法提取挥发油,提取 4h ,将含挥发油的正己烷层转移至 50mL 量瓶中,加入 0.25mL 正十三烷作为内标物,正己烷定容并摇匀, $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜,滤过,取续滤液,即得。每次平

行提取 3 份,见图 3~5。

(4)线性关系考察。

精密吸取浓度为 $1.6106\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲基丁香酚对照品溶液 0.25mL 、 0.5mL 、 1.0mL 、 2.0mL 、 3.0mL 及浓度为 $1.4520\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄樟醚对照品溶液 0.1 、 0.3 、 0.5 、 0.7 、 1.0mL ,分别置于 10mL 量瓶中,再分别加入正十三烷 $50\mu\text{L}$,依次加入正己烷,稀释至刻度摇匀,即得不同浓度的对照品溶液,按上述色谱条件进行测定。

分别以色谱图中甲基丁香酚峰面积/正十三烷峰面积的比值、黄樟醚峰面积/正十三烷峰面积的比值为横坐标,每毫升溶剂中所含对照品质量为纵坐标。得回归方程:甲基丁香酚: $y=0.0636x+0.0024$, $r=0.9999$,表明甲基丁香酚进样量在 $0.0403\sim 0.4832\text{mg}\cdot$

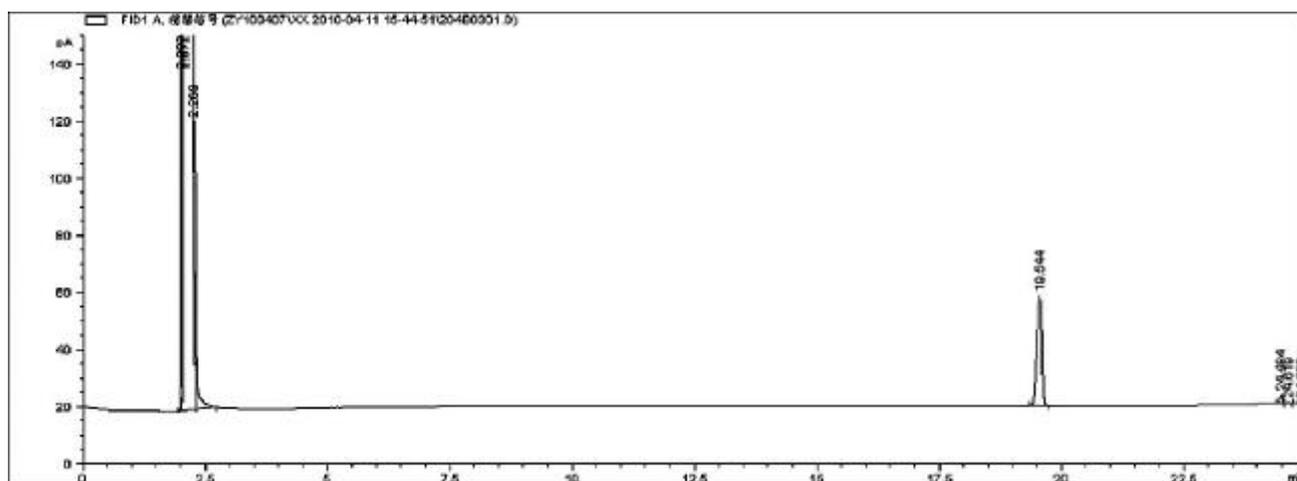


图 3 甲基丁香酚对照品 GC 色谱图

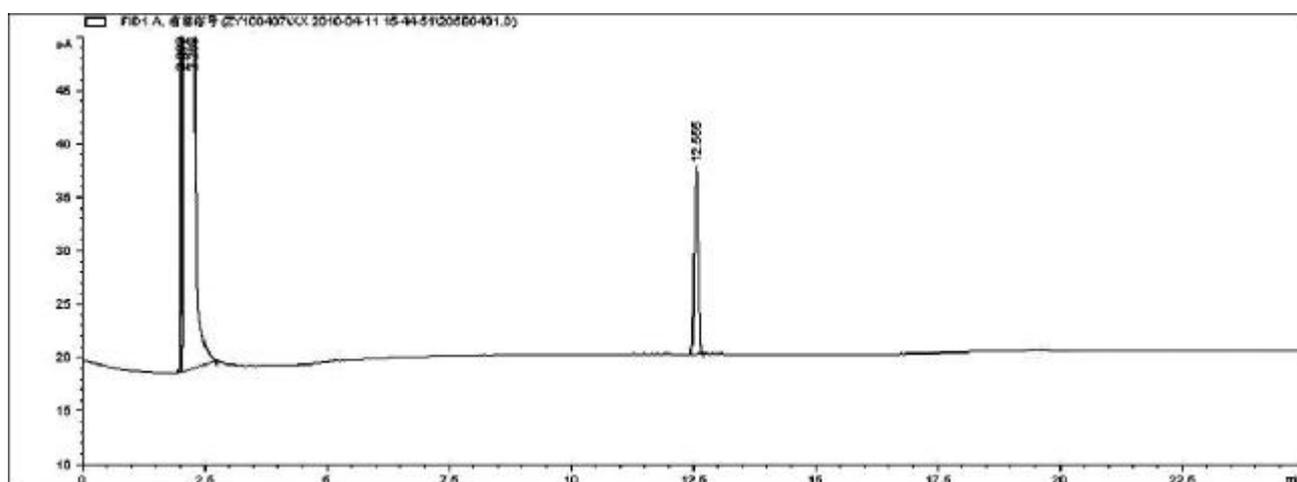


图 4 黄樟醚对照品 GC 色谱图

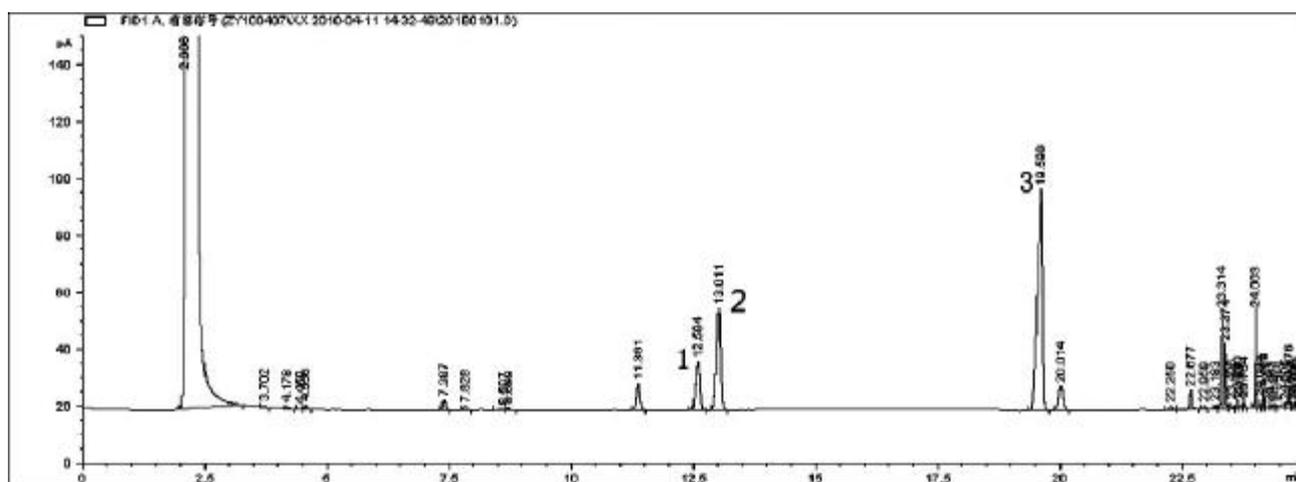


图5 供试品 GC 色谱图

注:1-黄樟醚,2-正十三烷,3-甲基丁香酚

mL^{-1} 范围内具有良好的线性关系; 黄樟醚: $y=0.0752x+0.0005$, $r=0.9999$, 表明黄樟醚进样量在 $0.0145\sim 0.1452\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系, 见图 6~7。

(5) 精密度实验。

制备同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 甲基丁香酚 $\text{RSD}=0.12\%$, 黄樟醚 $\text{RSD}=0.06\%$ 。

(6) 稳定性实验。

制备供试品溶液 1 份, 分别于配制后 0、4、8、12、24h 测定, 甲基丁香酚 $\text{RSD}=1.28\%$, 黄樟醚 $\text{RSD}=0.59\%$, 供试品溶液在 24h 内基本稳定。

(7) 重复性实验。

精密称取同一批样品, 平行 5 份测定, 甲基丁香酚 $\text{RSD}=2.12\%$, 黄樟醚 $\text{RSD}=1.44\%$ 。

(8) 加样回收率。

精密称取已知含量的同一批细辛粉末 (含量: 甲基丁香酚 $4.3165\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 黄樟醚 $0.8871\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 2.5g, 平行 6 份, 分别加入精密加入甲基丁香酚对照品 ($5.3688\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1.4mL、黄樟醚对照品 ($1.4520\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1.5mL, 测定并计算, 甲基丁香酚的平均回收率为 96.95% , $\text{RSD}=0.55\%$; 黄樟醚的平均回收率为 99.82% , $\text{RSD}=1.01\%$ 。

3. 样品含量测定

取细辛细粉和低温粉碎的不同规格粉末, 按供试品溶液的制备方法制备, 按上述色谱条件, 注入气相色谱仪, 进行测定, 结果见表 2 和图 8。细辛振动粉碎 6min 时甲基丁香酚含量最高, 振动粉碎 12min 时黄

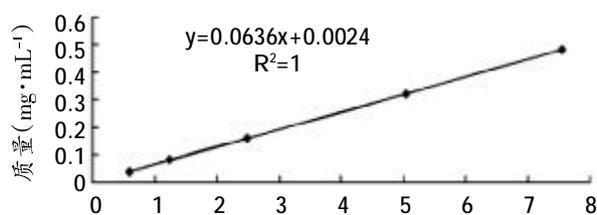


图6 甲基丁香酚标准曲线

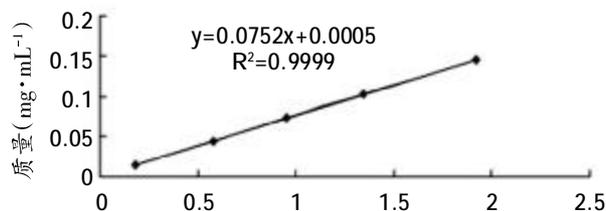


图7 黄樟醚标准曲线

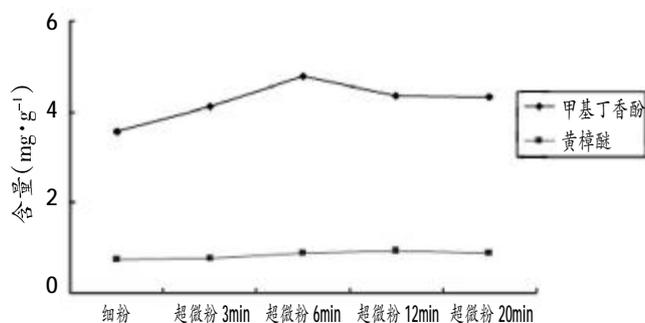


图8 甲基丁香酚及黄樟醚 GC 含量变化图

樟醚含量最高。与细粉相比,细辛超微粉中甲基丁香酚及黄樟醚的含量均有所增加,表明细胞破壁后有利于成分的溶出。

4. 细辛细粉和超微粉红外光谱比较

采用 KBr 压片法,将细粉和各种超微粉样品和 200 目 KBr(光谱纯)粉末置入玛瑙乳钵中研匀,装入压片模具制备 KBr 样片。样品与 KBr 的比例量为 1:100(V/V),整个操作过程应在红外灯下进行,以防吸潮。结果见图 9~13。

由此可看出,细辛经振动粉碎成超微粉后,与细粉的红外光谱相近,吸收峰均在 3369~3385 cm^{-1} , 2928~2929 cm^{-1} , 1640~1650 cm^{-1} , 1514~1515 cm^{-1} , 1413~1416 cm^{-1} , 1371 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , 1021~1022 cm^{-1} , 933~934 cm^{-1} , 855~864 cm^{-1} , 763 cm^{-1} , 706~707 cm^{-1} , 579 cm^{-1} , 525~526 cm^{-1} , 479 cm^{-1} , 434~435 cm^{-1} 处出现。

红外光谱测定结果显示,细辛经超微粉碎后,其成分基本未发生变化。

三、讨论

表 2 甲基丁香酚含量及黄樟醚 GC 含量测定结果(n=3)

样品类别	甲基丁香酚含量均值 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄樟醚含量均值 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
细粉	3.5614±0.2287	0.7459±0.0493
超微粉 3min	4.1055±0.1048	0.7717±0.0370
超微粉 6min	4.7890±0.0766	0.8733±0.0712
超微粉 12min	4.3611±0.0307	0.9418±0.0578
超微粉 20min	4.3165±0.2035	0.8871±0.0131

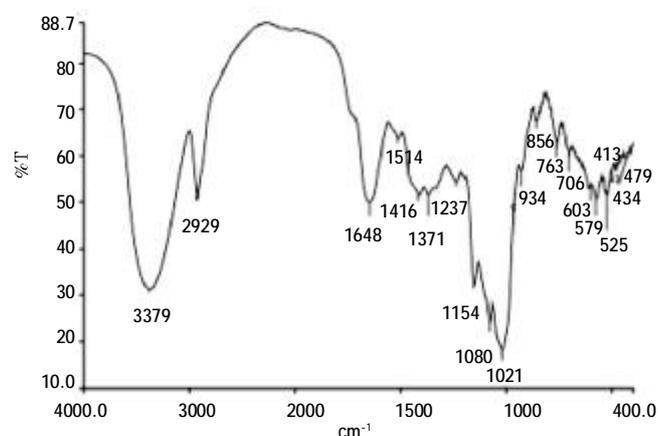


图 9 细辛细粉红外光谱图

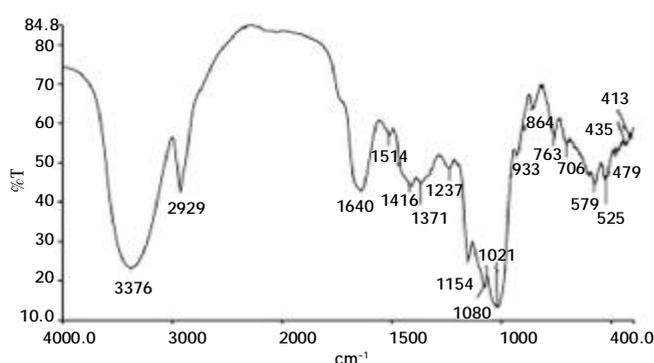


图 10 超微粉 3min 红外光谱图

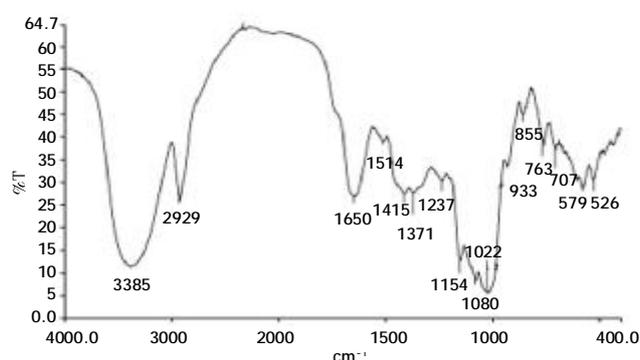


图 11 超微粉 6min 红外光谱图

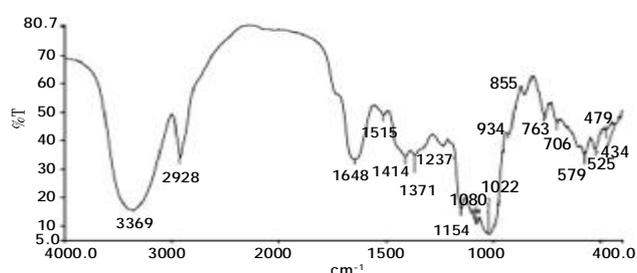


图 12 超微粉 12min 红外光谱图

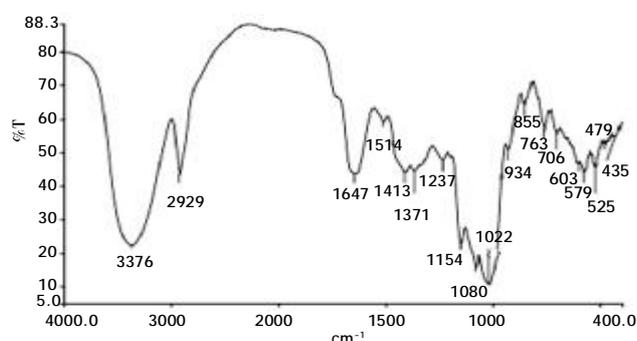


图 13 超微粉 20min 红外光谱图

1. 粉碎时间的确定

超微粉碎 6min 时甲基丁香酚含量最高,超微粉碎 12min 时黄樟醚的含量偏高,初步表明振动粉碎 6min 后,细胞已达到破壁。提示为避免有毒成分黄樟醚含量的增高,宜选择 6min。

2. 低温粉碎

由于低温粉碎可避免挥发性成分的损失^[6],前期研究表明,随着粉碎时间的增加,常温粉碎 20min 时甲基丁香酚及黄樟醚的含量均已降低,说明振动时间过长也会引起细辛中挥发性成分的损失,因此确定采用低温粉碎。

本研究初步显示,低温超微粉碎可防止细辛中挥发性有效成分的损失,具体结果还有待进一步以

药效验证。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 年版 (一部). 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 2 谢伟, 陆满文. 细辛挥发油的化学与药理作用. 宁夏医学杂志, 1995, 17(2):123-124.
- 3 张亚红, 刘红宁, 朱卫丰. 超微粉碎技术及其在中药制药中的应用. 江西中医学院学报, 2002, 14(1):57-58.
- 4 宁宏双, 郝爱民. 超微粉碎技术在中药生产中的应用. 天津药学, 2005, 17(5):64-66.
- 5 蔡光先, 杨永华, 李雅. 中药超细粉体研究概况. science and technology Review, 2007, 25(10):50-52.
- 6 项瑞, 王玉蓉, 杨连威, 等. 超微粉碎过程温度对羌活有效成分影响的考察. 北京中医药大学学报, 2010, 33(2):123-126.

Influence of Ultra-fine Pulverization Process on Volatile Oil in Xixin (Asarum) by Capillary Gas Chromatography

Zhu Ying¹, Wang Yurong¹, Yang Yufen², Gai Guosheng²

- (1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Department of Material Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The study aimed to determine the preparation process of micron particles of Asarum, and to investigate impact on volatile components during the process of ultra-fine pulverization. The particle size distribution value of Asarum was defined as D_{90} and D_{50} . The best time of Asarum pulverization was preliminary screened. Capillary gas chromatography was used to compare the methyleugenol and safrole content of Asarum powders of different sizes. Infrared spectrometry was applied to determine the chemical composition change of Asarum before and after pulverization. Results show that vibration mill grinding is able to break the cell wall, and yet cause no loss of volatile components in Asarum at low temperature. Content of methyleugenol reaches to the highest level at 6 minutes during vibration grinding process, but the content of safrole reaches to the highest level at 12 minutes. No chemical composition change of Asarum had been detected after ultra-fine pulverization. Preliminary study proved that ultra-fine pulverization techniques can be used for Asarum powder preparation.

Keywords: Asarum, ultrafine pulverization, Volatile oil, Methyleugenol, Safrole, Capillary gas chromatography, Infrared spectrometry

(责任编辑: 李沙沙 张志华, 责任译审: 王 晶)