

高效液相色谱法测定当归补血汤中阿魏酸的含量

王宏洁 沈欣 杨健 杨桦 边宝林(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)
郭续林(北京医科大学应用药物研究所 100832)

摘要 以高效液相色谱法对当归补血汤中阿魏酸进行了含量测定,同时对阿魏酸在汤剂中的稳定条件及提取分离方法进行了比较研究。

关键词 高效液相色谱 当归补血汤 阿魏酸

Determination of Ferulic Acid in Danggui Buxue Decoction by HPLC

Wang Hongjie, Shen Xin, Yang Jian, Yang Hua, Bian Baolin

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing, 100700)

Guo Xulin(Applied Pharmaceutical Research Institute,
Beijing Medical University, Beijing, 100832)

Abstract: The contents of ferulic acid in Danggui Buxue decoction were determined by HPLC. Stability conditions and extracting methods of ferulic acid in the decoction were studied.

Key words: HPLC, Danggui Buxue decoction, ferulic acid

当归补血汤始载于《内外伤辨惑论》,是著名的补气生血方。主治劳倦内伤,气弱血虚,阳浮外越。本方由黄芪、当归2味药组成。阿魏酸作为当归有效成分之一,曾对其进行过不同产地等方面的含量测定研究^[1,2]。本文选用4种不同的提取、分离方法,对当归补血汤中阿魏酸的含量进行测定比较,为今后本方在体内代谢过程的测定奠定基础。

1 实验材料

1.1 药品与试剂 阿魏酸对照品:上海化学试剂厂,含量98%以上;甲醇、乙醚均为北京化学试剂公司生产(分析纯);水为重蒸水;树脂HP-20为日本三菱化成工业株式会社生产;当归购于甘肃省岷县,黄芪购于山西省浑源县。

1.2 仪器 高效液相色谱仪,日本岛津,型号LC-4A,检测器SPD-ZAS。

2 实验方法与结果

2.1 色谱分析条件 色谱分析柱:TSIC-ODS-80TN(250mm×46mm);粒度10 μ m;

流动相:乙腈-水-乙酸(25:75:1);流速0.8ml/min;柱温35 $^{\circ}$ C;检测波长320nm;灵敏度0.08。

2.2 阿魏酸在日光,加热条件下稳定性考查

称取阿魏酸2.0mg于100ml棕色容量瓶内,以甲醇溶解并稀释至刻度,分别吸取此溶液2ml于10ml容量瓶内,以甲醇稀释至刻度,配得0.4mg/100ml阿魏酸标准品溶液3份,第1份(1号)蔽光室温保存,第2份(2号)室温不蔽光自然放置,第3份(3号)蔽光于50 $^{\circ}$ C水浴加热。3份样品分别在0、2、6、8h取样10 μ l,HPLC测定,结果见表1。

2.3 标准曲线的制备

精密称取阿魏酸2mg于100ml棕色容量瓶内,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别吸取上述溶液3、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5ml于10ml棕色容量瓶内,以甲醇稀释至刻度,摇匀制得6、5、4、3、2、1 μ g/ml标准溶液,进样量10 μ l。以峰面积积分值为纵坐标,阿魏酸进样量为横坐标,绘制标准曲线,得到一条通过原点的直线,回

归方程为 $Y = -71.323 + 2099x, r = 0.9998$ 。阿魏酸在 $0.06\mu\text{g} \sim 0.01\mu\text{g}$ 范围内, 呈良好的线性关系。

2.4 样品制备

2.4.1 甲醇回流法提取 精密称取当归 1.0g、黄芪 5.0g 置锥形瓶内, 加入甲醇 120ml 称重, 加热回流提取 40min, 室温蔽光冷却 30min, 补充损失甲醇液, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液 2ml, 以 0.45μ 微孔膜滤过, 得供试品溶液。HPLC 法测定, 结果见表 2。

2.4.2 甲醇超声波法提取 精密称取当归 1.0g、黄芪 5.0g 于锥形瓶内, 加入甲醇 120ml, 称重, 超声波提取 30min, 室温蔽光冷却 15min, 称重, 补充损失甲醇液, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液 2ml, 以 0.45μ 微孔膜滤过, 得供试品溶液。HPLC 法测定, 结果见表 2。

2.4.3 乙醚萃取法提取 精密称取当归 1.0g、黄芪 5.0g, 加水 120ml, 称重, 加热回流 40min, 室温蔽光放置 30min, 称重, 补充损失水分, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液 2ml, 加入乙醚萃取, 萃取 3 次, 每次 10ml, 合并乙醚萃取液, 浓缩至干, 定量加入甲醇 2ml 溶解, 以 0.45μ 微孔膜滤过, 得供试品溶液。HPLC 法测定, 结果见表 2。

2.4.4 HP-20 树脂柱层析法分离 精密称取当归 1.0g、黄芪 5.0g, 加水 120ml, 称重, 加热回流 40min, 室温蔽光放置 30min, 称重, 补充损失水分, 滤过, 弃初滤, 取续滤液 2ml, 加入到 HP-20 树脂柱上, 树脂用量 5ml (水中体积), 先以水冲洗 25ml, 再以 60% 乙醇洗脱, 浓缩 60% 乙醇洗脱液至干, 定量加入甲醇 2ml 溶解, 以 0.45μ 微孔膜滤过, 得供试品溶液。HPLC 法测定, 结果见表 2。

2.4.5 加样回收率测定 分别精密称定阿魏酸 1.2mg, 于 10ml 容量瓶内, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 取 1ml 置锥形瓶内, 同时称定当归 1.0g、黄芪 5.0g 于同一锥形瓶内, 分别按供试品溶液制备方法制备、测定。结果见表 3。

表 1 阿魏酸在日光, 加热条件下相对百分含量变化 ($n=2$)

样 品	提取后不同时间的含量变化 (%)			
	0	2	6	8 (h)
蔽 光	100	98.55	100.82	100.53
自然放置	100	52.01	29.19	23.41
50℃加热	100	88.49	89.95	86.45

表 2 不同提取及分离法测得阿魏酸的含量 ($n=5$) (mg/100g 生药)

提取分离方法	含量 (%)						\bar{x}	RSD (%)
甲醇提取	9.28	9.18	9.40	9.01	9.44	9.26	1.88	
超声波提取	8.71	9.11	8.98	8.68	8.78	8.85	1.74	
水提萃取法	7.32	7.21	7.83	7.18	7.01	7.31	2.25	
水提柱层析	6.02	5.89	6.31	5.93	5.80	5.99	3.26	

表 3 不同提取及分离法加样回收率测定结果 ($n=5$)

提取分离方法	回收率 (%)						\bar{x}	RSD (%)
甲醇提取	98.8	98.1	97.0	96.3	97.1	97.5	1.01	
超声波提取	95.1	93.1	92.5	94.8	93.2	93.7	1.03	
水提萃取法	91.0	90.3	92.5	93.4	95.7	92.6	2.30	
水提柱层析	88.2	85.1	91.4	91.4	86.3	88.2	2.95	

3 讨论

3.1 阿魏酸为当归补血汤中的主要有效成分之一, 但其具有见光及受热不稳定因素, 特别是见光后, 2h 降低近半, 8h 降低到相对含量的 20%。50℃加热 2h 后也可使其相对百分含量降低至 90% 以下。

3.2 对复方的 3 种提取方法对阿魏酸含量测定的结果有较大的差异。水煎法中, 阿魏酸的含量明显低于甲醇回流的方法, 且回收率较低。这可能与提取温度高, 供试品溶液制备过程长等因素有关, 虽然我们在制备过程中尽量减少光线直射等因素。

3.3 通过多次试验, 建立了用 HPLC 法测定当归补血汤中阿魏酸的含量, 为下一步对本方中的阿魏酸在体内代谢过程的研究提供良好的实验参考数据。

参考文献

- 王小娟, 阮仕清, 曹云清, 等. 当归及不同产地川芎中阿魏酸的薄层扫描法测定. 新兴医药研究, 1995(4):39
- 常明向, 徐莲英, 陶建生. 阿魏酸钠大鼠体内药动力学研究. 西北药学杂志, 1995(4):81