

高效液相色谱法测定当归-川芎药对配伍复方中阿魏酸的含量

王雁梅^{1*}, 康红钰¹, 刘春杰¹, 邢志霞¹, 史恒军², 朱伟³

(1. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002; 2. 第四军医大学
唐都医院中医科, 西安 710038; 3. 广东省中医院心脏中心, 广州 510120)

[摘要] 目的: 考察当归-川芎药对配伍复方(芎藭汤、生化汤、四物汤)中阿魏酸(FA)含量的变化。方法: 用反相高效液相色谱法进行测定。结果: 芎藭汤、生化汤、四物汤中阿魏酸煎出量依次为(109.4 ± 3.0) mg · L⁻¹, (95.3 ± 1.9) mg · L⁻¹, (85.6 ± 2.0) mg · L⁻¹。结论: 当归-川芎药对配伍桃仁、炮姜、炙甘草, 以及配伍白芍、熟地后阿魏酸煎出量均降低。

[关键词] 当归-川芎药对; 配伍; 复方; 阿魏酸; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0061-03

Determination of Ferulic Acid in Danggui-Chuanxiong Prescription by RP-HPLC

WANG Yan-mei^{1*}, KANG Hong-yu¹, LIU Chun-jie¹, XING Zhi-xia¹, SHI Heng-jun², ZHU Wei³

(1. Luohe Medical University, Luohe 462002, China; 2. Department of TCM, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 3. Heart Center of Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Objective: To study the contents of ferulic acid in chinese herbal compound (Xiongqiongtang, Shenghuatang and Siwutang) that contain Danggui-Chuanxiong pair compatibility. **Method:** The contents of ferulic acid was determined by RP-HPLC. **Result:** The ferulic acid contents in Xiongqiongtang, Shenghuatang and Siwutang was(109. 4 ±3. 0) mg · L⁻¹, (95. 3 ±1. 9) mg · L⁻¹ and(85. 6 ±2. 0) mg · L⁻¹ respectively. **Conclusion:** The contents of ferulic acid decreased both in the decoctions combined with peach kernel, roasted ginger, baked licorice, and in the decoctions combined with peony root, prepared radix rehmanniae.

[Key words] Danggui-Chuanxiong pair; compatibility; chinese herbal compound; ferulic acid; RP-HPLC

药对是中药间最基本的配伍形式, 是两味中药之间的一种比较固定的搭配, 是中医理论和临床实践经验的结晶。药对是方剂最小的组方单位, 是从单味中药到复方之间的一个中间环节, 故从药对入手开展配伍的研究有助于研究复杂方剂的配伍规律^[1]。当归-川芎药对是中医妇科要药, 常配伍用于养血活血, 调经止痛。阿魏酸(ferulic acid, FA, 图 1)是川芎、当归的主要活性成分之一, 本研究在本室已

经建立的制剂/血清中 FA 浓度的测定方法^[2-4]的基础上, 研究当归-川芎药对配伍复方(芎藭汤、生化汤、四物汤)中 FA 浓度变化, 现报道如下。

1 材料

美国 Waters 公司高效液相色谱系统(600

泵, 996 光电二极管阵列

检测器, 7725i 手动进样器, M³² 色谱工作站, Waters 在线脱气系统); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海荣华生化仪器厂); LD-4 低速离心机(上海医用分析仪器厂); XK-96 快速混匀器(江苏姜堰市新康仪器厂)。

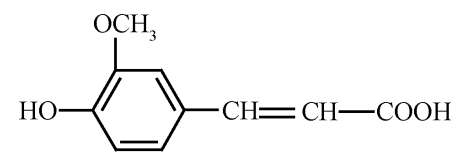


图 1 阿魏酸化学结构

[收稿日期] 2010130(001)

[通讯作者] * 王雁梅, 硕士学位, 副教授, 主要从事中药药理研究工作, Tel: (0395) 2964539; E-mail: yanmei-wang.student@sina.com

阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号

0773-9910); 甲醇(分析纯,天津市化学试剂二厂,批号 20030821); 乙酸(分析纯,开封化学试剂总厂,批号 20001017); 水为自制新鲜双蒸水; 药材当归、川芎、桃仁、炮姜、炙甘草、熟地黄、白芍各饮片均购自唐都医药药剂科,经浙江医药高等专科学校中药系杨雄志副教授鉴定为正品。

2 方法

2.1 色谱条件 固定相日本 GL Sciences 公司 Inertsil ODS-3 C₁₈ 反相柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), C₁₈ 预柱(大连化学物理研究所); 流动相甲醇-水(含 1% 乙酸)(45:55); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 321 nm; 进样量 20 μL。

2.2 检测波长的选择 紫外扫描结果显示,阿魏酸在 234 nm 和 321 nm 处紫外吸收较强,由于在 321 nm 处有最大吸收且干扰小,故选择 321 nm 作为检测波长。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 0.36 mg, 甲醇溶解后,用流动相定容于 10 mL 棕色容量瓶中,得 36.0 mg · L⁻¹ 对照品贮备溶液。

2.4 供试品溶液的制备 按处方(药物组成见表 1)准确称取各味药,充分混匀后分别置于 3 个 1 000 mL 烧杯中,第一次加 8 倍水,室温下浸泡 30 min,煮沸后文火煎 30 min,用 4 层医用纱布过滤,残渣加 6 倍水重复以上过程,合并 2 次滤液,浓缩至 150 mL,即采取相同的加水倍数、浸泡时间、煎煮火候及煎煮时间,分别煎煮,得到 3 组配它的水煎液。

另按上述方法制备不含当归、川芎的阴性对照液。

表 1 当归-川芎药对组方

No.	药物组成
1	当归 9 g, 川芎 9 g
2	当归 9 g, 川芎 9 g, 桃仁 6 g, 炮姜 2 g, 炙甘草 2 g
3	当归 9 g, 川芎 9 g, 白芍 9 g, 熟地黄 12 g

2.5 样品溶液的制备 分别精密量取各煎煮液 200 μL 于 10 mL 离心管中,加入流动相 4 800 μL,电动混匀 3 min, 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清分别过 0.25 μm 微孔滤膜后,取续滤液备用。此得到 1[#]~3[#] 样品及阴性对照液,作为供试品溶液。

3 结果

3.1 色谱系统的适用性考察 分别精取各样品溶液 20 μL, 在选定的色谱条件下分别进样测定。在 FA 出峰位置, 阴性对照液无干扰, 其保留时间为

10.0 min, 14 min 可完成一次测定。色谱图见图 2。

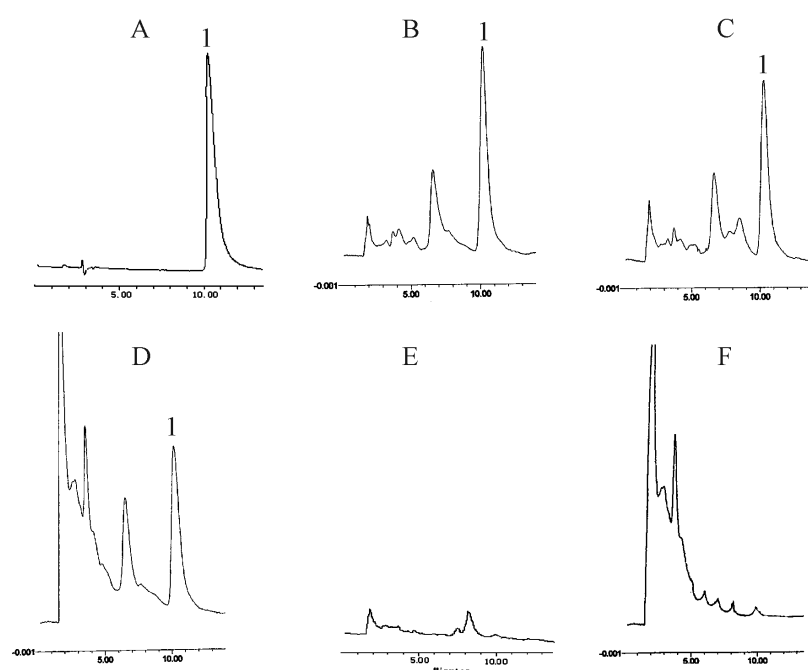


图 2 当归-川芎药对组方色谱图

A. 阿魏酸标准品; B. 芎蒡汤; C. 生化汤; D. 四物汤;
E. 阴性对照液(桃仁 + 炮姜 + 炙甘草);
F. 阴性对照液(白芍 + 熟地黄) a-FA; 1. 阿魏酸

3.2 线性关系考察 精密量取对照品贮备溶液适量,用流动相配成浓度为 0.6, 1.2, 2.4, 4.5, 9.0, 18.0 mg · L⁻¹ 的系列标准工作液。分别进样 20 μL, 以峰面积(Y)对浓度(X)进行回归,回归方程为 $Y = 8.48 \times 10^4 X - 6.66 \times 10^3$ ($r = 0.9999$, $n = 6$)。结果表明,阿魏酸在 0.6 ~ 18.0 mg · L⁻¹ 范围内呈良好线性关系。

3.3 最低检测线测定 取混合对照品溶液,用流动相依次稀释成一系列由高到低的梯度浓度溶液,在上述色谱条件下分别进样,取峰高为噪音 3 倍时的进样量为最低检测浓度,由进样量 20 μL 得出最低检测限。结果最低检测限为 0.58 ng (S/N=3)。

3.4 精密度实验 精密吸取对照品低、中、高 3 个浓度,在 24 h 内测定其日内精密度,在 6 d 内测定日间精密度,结果见表 2,平均日内精密度 RSD 为 2.08%,平均日间精密度 RSD 为 1.57%。

3.5 稳定性实验 精密吸取同一份样品(共煎液) 20 μL, 分别间隔一定时间进样,测定 5 次,结果 48 h 内 RSD 为 1.03%。

3.6 重复性实验 同一份样品,按供试品制备方法下平行制备 6 份,进样分析, RSD 为 2.53%。

3.7 加样回收率实验 精密吸取已测定含量的 1[#] 水煎液样品溶液 500 μL (含 FA 5.47 μg), 分别加入阿魏酸对照品溶液 (36.0 mg · L⁻¹) 150 μL, 电动混匀 1 min, 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清分别过

0.25 μm 微孔滤膜后, 进样测定, 结果平均回收率为 102.65%, RSD 为 2.59% (n=6), 见表 2。

表 2 加样回收率实验 (n=6)

加入量 / μg	测得值 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
5.40	11.04	102.48	102.65	2.59
5.40	10.99	101.10		
5.40	11.13	102.02		
5.40	10.78	99.17		
5.40	11.35	104.41		
5.40	11.60	106.72		

注: 取样量 500 μL。

3.8 样品测定 精密吸取 1[#]~3[#] 样品各 20 μL, 分别进样 3 次, 按外标法计算 FA 含量, 所得结果见表 3。实验结束, 采用完全随机设计的单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计学处理 (P < 0.01), 组间差异采用 Dunnett-t 检验。

表 3 当归-川芎药对组方中阿魏酸含量的测定 (n=3, 珣±s)

No.	含量
1	109.4 ± 3.0
2	95.3 ± 1.9 ¹⁾
3	85.6 ± 2.0 ¹⁾

注: 与 1[#] 水煎液比较¹⁾ P < 0.01

4 讨论

在本实验选定的色谱条件下, 阿魏酸得到较好的分离, 无杂峰干扰测定; 当归-川芎药对配伍复方水煎液是按照传统中药煎煮方法平行操作制得, 因而对其 FA 的煎出量进行比较, 以此研究配伍对 FA 煎出的影响是科学可行的。

当归与川芎相须为用, 活血而不伤血, 补血而不滞血, 二药为养血活血功效的最常用组合。有研究^[5-6] 表明, 在当归与川芎配伍的诸多方剂中, 两者以 1:1 配伍比例出现频率最多。因此我们选择调经基础方四物汤、治疗产后腹痛的生化汤以及治疗妊娠伤胎、难产的芎藭汤, 3 张经方作为研究工具, 为

了研究的可操作性, 方中当归、川芎用量均用中剂量 9 g, 配伍比例 1:1。

本实验条件下, 芎藭汤、生化汤、四物汤中阿魏酸煎出量依次为 (109.4 ± 3.0) mg · L⁻¹, (95.3 ± 1.9) mg · L⁻¹, (85.6 ± 2.0) mg · L⁻¹, 存在明显差异 (P < 0.01)。当归-川芎药对配伍熟地黄、白芍后阿魏酸含量最低。黄熙^[7] 的研究提示当健康人川芎配伍芍药口服时, 其血清中 FA 明显下降, 有利于川芎芍药汤中成分发挥活血化瘀的作用。这些得到了本实验结果的支持。药对进入复方后, 其有效成分的变化, 是否直接影响复方功效的发挥方向? 这些有待于进一步开展中药复方功效与效应物质之间相关性研究。

[参考文献]

- [1] 尤昭玲, 文乐兮. 妇科药对的研究()—妇科药对与证治方药[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(4): 62.
- [2] 王雁梅, 史恒军, 黄熙, 等. 健康女性志愿者口服生化汤后血清中阿魏酸的药动学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1): 46.
- [3] 王雁梅, 邢志霞, 史恒军, 等. 反相高效液相色谱法测定不同溶媒煎煮生化汤中阿魏酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2225.
- [4] Li Y J, Bi K S. HPLC determination of ferulic acid in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong and its compound preparation[J]. Biomed Chromatogr, 2003, 17(8): 543.
- [5] 王欢, 唐于平, 丁安伟, 等. 当归-川芎药对不同配伍的中医应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 44.
- [6] 唐于平, 段金廛, 郭盛, 等. 药对量效关系研究的认识与思考[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(1), 21.
- [7] 黄熙, 任平, 陈可冀, 等. 中药配伍对血清阿魏酸临床生物利用度的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(1): 7.

[责任编辑 顾雪竹]