

RP-HPLC 法测定不同煎煮方法下当归芍药汤中阿魏酸和芍药苷的含量

葛尔宁

(浙江中医学院中心测试室, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的: 测定当归芍药汤及汤中几种主药在单煎、合煎情况下阿魏酸和芍药苷的溶出量及变化规律。方法: 采用 RP-HPLC 法, EuroBond-C₁₈ 柱(125mm × 4.0mm, 5 μ m), 以甲醇-水-磷酸(40: 60: 0.5)为流动相, 流速为 1mL·min⁻¹, 波长分别为 313nm(阿魏酸) 243nm(芍药苷), 柱温: 30℃。结果: 阿魏酸在 0.006~0.3 μ g, 芍药苷在 0.096~1.92 μ g 范围内线性关系良好, *r* 分别为 0.9997 0.9996。结论: 该方在煎煮过程中, 同煎的其他药物对阿魏酸和芍药苷的溶出产生影响, 文火滚煎约 47min 后, 药汤中阿魏酸和芍药苷含量同时达到高峰。

关键词: 当归芍药汤; 阿魏酸; 芍药苷; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)06-0016-03

当归芍药汤(散)始载于《金匱要略》^[1], 由当归、川芎、芍药、茯苓、白术、泽泻六味药组成, 有养血疏肝、健脾利湿、止痛安胎等作用, 临床主治肝脾不调、腹痛、妊娠肝脾不调等症。是历代医家所推崇的名方之一。本方既可作为散剂又可作为汤剂, 病轻者、缓者用散剂; 病重者、急者, 用汤剂^[2]。阿魏酸和芍药苷具解痉、活血、镇痛、镇静等功能^[3], 正是本方上述功效的两种重要成分, 有关当归、川芎和芍药中阿魏酸和芍药苷的检测方法, 已有许多报道^[4-5], 但有关它在汤药煎煮过程中的溶出量测定, 国内未有报道。本文分别对当归芍药汤组方及方中三种主药(当归、川芎、芍药)进行煎煮, 分时采样, 再用 RP-HPLC 法分别测定各组样中阿魏酸和芍药苷的含量及变化规律, 得知在合煎情况下, 汤中阿魏酸和芍药苷的溶出量比主药单煎时的递加量要低, 由拟和曲线算得在文火滚煎约 47min 后, 汤药中的阿魏酸和芍药苷含量近乎同时达到高峰并趋平稳, 方法简便、准确、可靠。

1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪, 484 紫外检测器, 510 泵, 680 控制器, 浙江大学 N2000 色谱工作台, 甲醇为色谱醇, 水为双蒸水, 磷酸为分析醇。

阿魏酸和芍药苷化学对照品(中国药品生物制

品检定所), 全方六味药材均购自华东医药股份有限公司。

2 色谱条件

色谱柱: EuroBond-C₁₈ column(125 mm × 4.0mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇-水-磷酸(35: 65: 0.5), 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 313 nm(阿魏酸), 243 nm(芍药苷), 柱温: 30℃。

3 对照品溶液和被测样品溶液的制备

3.1 对照品溶液制备 精密称取阿魏酸对照品 5mg, 置 50mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 精密吸取该溶液 0.1 0.5 1 2.0 3.5 5.0mL 分置六只 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 超声震荡、摇均后备用。

精密称取芍药苷对照品 16mg, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 精密吸取该溶液 0.1 0.25 0.5、1.0 1.5 2.0 mL 分置六只 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 超声震荡、摇均后备用。

3.2 样品溶液的制备 煎法设计: 煎法 1: 当归 9g, 川芎、泽泻各 24g, 芍药 48g, 茯苓、白术各 12g。煎法 2: 当归 9g。煎法 3: 川芎 24g。煎法 4: 芍药 48g。

按上述 4 种不同煎法称取各药材, 置 4 只圆底烧瓶中, 按《金匱要略》要求各加 200mL 水, 调节电压使四只加热电炉温度达到一致。快火至沸取第一样, 后同时用文火煎煮, 每 5 或 10min 取一次样(每次 1mL)并记录总溶液量。上述实验重复 3 次, 并对应混和 3 次所提样品, 共提取 55 个待测样品, 经离心、取上清液、再经微孔滤膜过滤、碳 18 预柱吸附过滤后备用。

收稿日期: 2004-09-09

通讯作者: 葛尔宁 Tel: (0571) 86613589 E-mail: ge_er_ning@

sina.com

4 线性范围

取上述阿魏酸对照品溶液 6μL 进样, 记录色谱图(见图 1), 以对照品峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X (μg) 为横坐标绘制标准曲线, 阿魏酸进样量在 0.006 ~ 0.3μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。回归方程: $Y = 420710X - 1060, r = 0.9997 (n = 5)$ 。

取上述芍药苷对照品溶液 6μL 进样, 记录色谱图(见图 1), 以对照品峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X (μg) 为横坐标绘制标准曲线, 芍药苷进样量在 0.096 ~ 1.92μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。回归方程: $Y = 291210X + 2320, r = 0.9996 (n = 5)$ 。

5 重复性和稳定性

精密吸取煎法 1 中的最后一次样品, 按含量测定方法重复进样 6μL 5 次, 测定峰面积, RSD 为 1.1% (阿魏酸) 1.6% (芍药苷); 分别精密吸取该样品溶液 6μL, 于 0, 2, 4, 8, 16h 进样, 测定阿魏酸和芍药苷峰面积积分值, RSD 为 0.8% (阿魏酸); RSD 为 1.0% (芍药苷), 稳定性良好。

6 样品测定

取 4 种煎法所提取的样品溶液各 6μL 进样, 记录高效液相色谱图(见图 1)。根据各图谱中阿魏酸和芍药苷的峰面积, 由 4 中两回归方程算出各样品

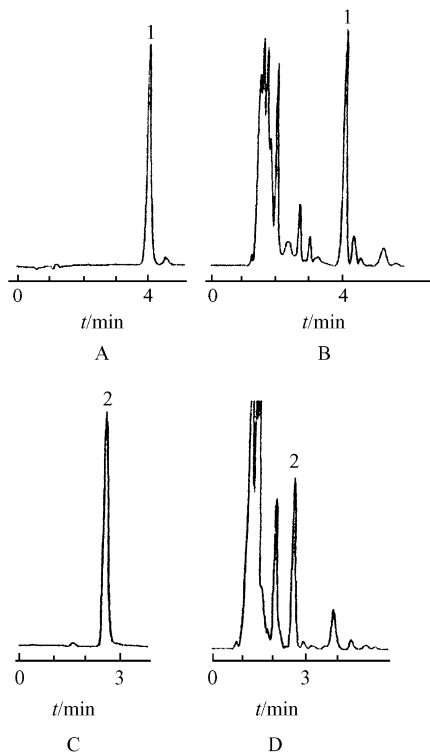


图 1 高效液相色谱图

A. 阿魏酸对照品 B. D. 当归芍药汤 C. 芍药苷对照品
1. 阿魏酸 2. 芍药苷

中阿魏酸和芍药苷的含量, 以煎煮时间 t 为横坐标, 药汤中阿魏酸和芍药苷的溶出量 Y_1 、 Y_2 为纵坐标绘

制趋势图(见图 2、图 3), 设沸腾点为 0 点, 以二次曲线拟合求得当归芍药汤中阿魏酸和芍药苷随煎煮时间的变化方程为:

$$Y_1(\text{阿魏酸}) = -0.004 t^2 + 0.380 t + 6.304$$

$$Y_2(\text{芍药苷}) = -0.0027 t^2 + 0.251 t + 9.533$$

微分得: $dY_1/dt = -0.008 t + 0.380$

$$dY_2/dt = -0.0054 t + 0.251$$

当 $dY_1/dt = 0$ 时 $t \approx 47$ (分钟),

当 $dY_2/dt = 0$ 时 $t \approx 46$ (分钟)

由此得知, 煎煮至 47 min 时, 汤中阿魏酸和芍药苷溶出量达到高峰并在后半 h 煎煮中保持总量基本不变。

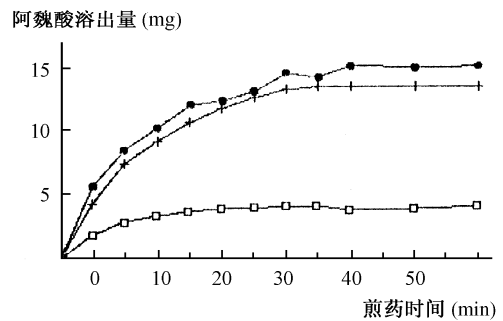


图 2 阿魏酸溶出量随煎药时间的变化规律

●●: 煎法 1 □□: 煎法 2 +++ 煎法 3

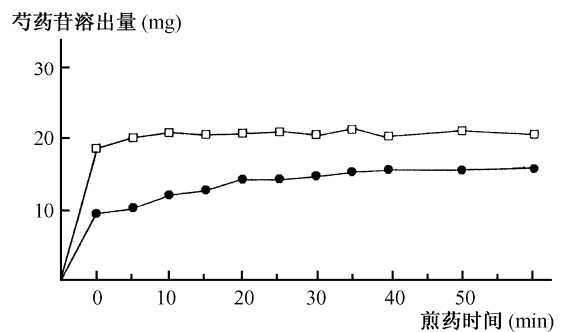


图 3 芍药苷溶出量随煎药时间的变化规律

●●: 煎法 1 □□: 煎法 4

7 讨论

由 HPLC 分析得知, 本方中无论是阿魏酸或芍药苷的溶出量明显受同煎其他几种药的干扰, 其中阿魏酸的溶出量比由当归和川芎单煎之和约少 15%, 芍药苷溶出量比芍药单煎时约少 23%。

见图 2: 方中阿魏酸的溶出量与川芎单煎时相似, 而当归单煎时溶出速度较快, 无论那种煎法, 继续滚煎半小时, 汤中阿魏酸总量仍能保持稳定。

见图 3: 芍药单煎时芍药苷溶出速度较快, 水一滚就基本达到煎出高峰, 而全方合煎时芍药苷溶出速度相对较慢, 继续滚煎半小时, 这两种煎法中的芍药苷总量也能保持稳定。

用文火完全煎出该汤中的阿魏酸和芍药苷需要较长的 47min。这对临床科学煎药有一定的指导意义。

本方法检测阿魏酸和芍药苷,方便快捷、效果颇佳。色谱图中阿魏酸和芍药苷的特征峰非常明显,与其他峰的分离也较好,完全能够满足阿魏酸和芍药苷质量检测标准的要求。

参考文献:

[1] 李文瑞. 金匱要略汤证论治[M]. 北京: 中国医药科技出

版社, 1993. 703-713.

[2] 王付. 仲景方临床应用指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 512-516.

[3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖, 等. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1997. 第一卷, 629-672.

[4] 姚永珍, 崔晓光, 高玉香. 当归浸膏中阿魏酸含量比较研究[J]. 药物分析杂志, 1994, 14(3): 53-54.

[5] 孙文基, 谢世昌. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003. 169-171.

[6] 李玉娟, 李平, 李会军, 等. 酸枣仁汤不同配伍情况下棘苷的 RP-HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(3): 208.