

反相高效液相色谱法测定当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的含量

曾 宇¹, 杜迎翔^{2*}, 马世平¹

(¹中国药科大学中药药理学教研室; ²分析化学教研室, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 建立当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的同时测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 C₁₈ Lichrospher (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 不锈钢柱; 流动相为甲醇-0.5%冰乙酸 (20:80, v/v) 溶液; 流速 1 ml/min; 在 230 nm 处进行检测; 柱温: 室温。结果: 阿魏酸、芍药苷和其它组分间在 35 min 内完全分离, 阿魏酸浓度在 5.46 ~ 54.6 μg/ml 间线性关系良好, $r = 0.9993$, 芍药苷浓度在 24.64 ~ 246.4 μg/ml 间线性关系良好, $r = 0.9991$ 。方法回收率, 精密度均符合要求。结论: 本法操作简便, 结果准确可靠, 适用于当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的同时测定。

【关键词】 反相高效液相色谱法; 当归芍药散; 芍药苷; 阿魏酸; 含量测定

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)04-0341-03

当归芍药散是《金匱要略》所载著名方剂, 由当归、白芍、茯苓、白术、川芎、泽泻等 6 味中药组成。多年来被广泛用于治疗妇科疾病, 具有养血疏肝, 健脾利湿, 和血利水等功效^[1]。而作为本方指标成分的阿魏酸和芍药苷, 虽然在其各自药材和制剂中的含量测定方法多有报道, 即采用薄层色谱法或高效液相色谱法, 但至今未见当归芍药散中阿魏酸和芍药苷同时测定的报道^[2-5]。本文采用高效液相色谱法测定当归芍药散中阿魏酸和芍药苷的含量, 考察了样品制备方法、流动相系统、检测波长等因素对分析的影响, 处方中其它组分均不干扰测定, 方法简便, 结果准确可靠, 回收率高, 精密度好。

1 实验材料

1.1 仪 器

岛津 LC-10AT 型高效液相色谱仪; SPD-10A 紫外可见检测器; 岛津 C-R6A 色谱数据处理机, 岛津 2501 型紫外可见分光光度计。H66MC 超声仪, 梅特勒 AE-240 电子天平。

1.2 试剂和药品

甲醇为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为二次重蒸水, 其它试剂除特别注明外均为分析纯。阿魏酸对照品 (中国药品生物制品检定所); 芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所), 当归芍药散 (DSS,

自制)。

2 色谱条件和系统适用性

2.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈ Lichrospher 不锈钢柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5%冰乙酸 (20:80, v/v) 溶液; 流速 1 ml/min; 检测波长 230 nm; 进样量 20 μl; 柱温: 室温。

在上述条件下得到阿魏酸和芍药苷对照品及样品色谱图见图 1。

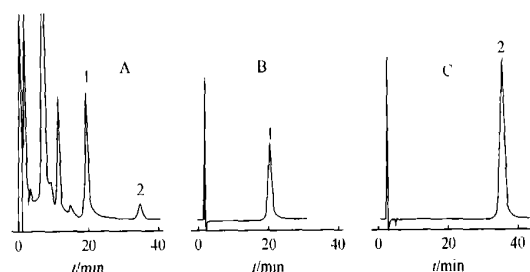


Fig 1. Chromatograms of Dangguishao Yao San
A. sample; B. C. standard; 1. Paeoniflorin; 2. Ferulic acid

2.2 系统适用性

以芍药苷为标准, 计算色谱柱的理论塔板数约为 4340, 上述色谱条件下阿魏酸、芍药苷和样品中其它组分间分离良好。采用柱效较低的色谱柱分离时, 只要适当降低流动相中甲醇的比例, 延长各

* 【收稿日期】 2004-02-07 【通讯作者】 Tel/ Fax: 025-83221790 E-mail: dydingxiang@hotmail.com

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770891); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK2001080)

组分保留时间,便可获得较好的分离度,但 t_R 太大将影响分析速度,故本实验规定色谱柱的理论塔板数应不低于 2000。

3 实验方法

3.1 供试品溶液的制备

取本品约 0.2~0.4 g,精密称定,置于 25 ml 量瓶中,加 50% 甲醇 20 ml 超声提取 45 min,用 50% 甲醇定容至 25 ml,用 0.45 μ m 滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

3.2 标准曲线的制备

精密吸取约 1.25 mg/ml 芍药苷对照品的甲醇溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml, 置于 5 ml 棕色容量瓶中,用甲醇稀释到刻度,摇匀;另精密吸取约 0.25 mg/ml 阿魏酸对照品的甲醇溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml, 置于 5 ml 棕色容量瓶中,用甲醇稀释到刻度,摇匀。在上述色谱条件下各进样 20 μ l, 记录色谱图,测定峰面积。然后分别以阿魏酸和芍药苷的峰面积积分值(A)对其浓度(c)进行线性回归。阿魏酸,芍药苷回归方程结果见表 1。

Tab 1. Linear relationship for peak area-concentration

Components	Range (μ g/ml)	Linear equation	r
Paeoniflorin	24.64 ~ 246.4	$A = 2.962 \times 10^3 c - 410.0$	0.9991
Ferulic acid	5.46 ~ 54.6	$A = 6.134 \times 10^3 c - 315.6$	0.9993

4 实验结果

4.1 进样精密度

精密吸取约 1.25 mg/ml 芍药苷对照品甲醇溶液 0.16 ml 置于 5 ml 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得约 40 μ g/ml 芍药苷标准溶液;另精密吸取约 0.25 mg/ml 阿魏酸对照品甲醇溶液 0.2 ml,置于 5 ml 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得约 10 μ g/ml 阿魏酸标准溶液。在上述色谱条件下分别重复进样 6 次,记录峰面积,芍药苷的平均峰面积为 1.216×10^5 , RSD 为 1.7%,阿魏酸的平均峰面积为 6.819×10^4 , RSD 为 1.9%。进样精密度较高。

4.2 重复性试验

精密称取当归芍药散样品(DSS₆)6 份,按“4.5”项下方法制备供试品溶液,并进行含量测定,6 次重复测定结果:芍药苷的平均含量为 10.44 mg/g,

RSD 为 0.41%;阿魏酸的平均含量为 1.086 mg/g, RSD 为 0.82%。显然,样品含量基本一致, RSD 小于 0.85%,重现性较好。

4.3 稳定性试验

精密吸取约 40 μ g/ml 芍药苷标准溶液、约 10 μ g/ml 阿魏酸标准溶液和当归芍药散供试品溶液,分别于 0, 1, 4, 6, 8, 10, 12 h, 1, 2, 3 d 按色谱条件进样测定,结果芍药苷的峰面积 RSD 为 1.7%,阿魏酸的峰面积 RSD 为 1.9%,表明 3 d 内上述溶液中芍药苷和阿魏酸的稳定性良好。

4.4 回收率试验

采用加样回收法,精密吸取已知含量的当归芍药散(DSS₄)供试品溶液 5 ml,分别置于 10 ml 量瓶中,分别加入芍药苷对照品甲醇溶液和阿魏酸对照品甲醇溶液适量,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液分别进样,外标一点法测定其中芍药苷和阿魏酸的浓度,并计算回收率,结果见表 2。

Tab 2. Result of recovery (n = 5)

Components	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	RSD (%)
Paeoniflorin	0.1972	0.1942	98.48	1.68
	0.4314	0.4305	99.79	0.86
	0.5916	0.5792	97.90	1.7
Ferulic acid	0.02090	0.02070	99.04	1.4
	0.04125	0.04119	99.85	0.98
	0.06875	0.06852	99.67	1.8

4.5 样品测定

取本品按“3.1”项下方法制备供试品溶液,然后精密吸取 20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,测定峰面积,按外标一点法计算阿魏酸和芍药苷的含量。当归芍药散(DSS₁~DSS₇)样品中阿魏酸和芍药苷的含量测定结果见表 3。

5 讨论

5.1 供试液制备方法考察

取本品分别用甲醇和 50% 甲醇为溶媒,超声处理 30 min,余按“4.5”项下方法配制供试品溶液,并测定阿魏酸和芍药苷的含量。结果表明,上述两种溶剂作溶媒时,阿魏酸和芍药苷的提取率基本一致,但用甲醇提取时,阿魏酸色谱峰却发生严重拖尾,故本文确定 50% 甲醇作为样品的提取溶媒。进一步考察超声处理时间对提取率的影响情况,发

现当用 50 % 甲醇水溶液超声处理 45 min 时,阿魏酸和芍药苷已提取完全。

Tab 3. Determination of paeoniflorin and ferulic acid in Dangguishao Yao San ($n = 3$)

	Paeoniflorin(mg/ g)	Ferulic acid(mg/ g)
DSS ₁	11. 70	0. 8627
DSS ₂	7. 290	0. 8915
DSS ₃	10. 98	1. 031
DSS ₄	10. 38	1. 262
DSS ₅	7. 759	1. 857
DSS ₆	3. 386	1. 342
DSS ₇	2. 589	1. 471

5.2 流动相的确定

试验了甲醇-水(25 75, v/ v)、甲醇-0.5 %冰乙酸(25 75, v/ v)两种流动相体系下当归芍药散中阿魏酸、芍药苷和其它组分间的分离情况,结果发现以甲醇-0.5 %冰乙酸为佳。进一步改变此体系中甲醇的比例,调整阿魏酸和芍药苷的保留时间,并改善两者及其它组分间的分离程度,确定甲醇-0.5 %冰乙酸(20 80, v/ v)为最佳流动相系统,此时不仅分析时间较短,阿魏酸和芍药苷的保留时间分别约为 35, 20

min,而且上述组分间均达到完全分离。

5.3 检测波长的选择

分别取约 20 μ g/ ml 的阿魏酸标准溶液和芍药苷标准溶液,在岛津 2501 型紫外可见分光光度计上,于 200 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描,结果发现阿魏酸在 320 nm 和 240 nm 处各有一个吸收峰,而芍药苷在 230 nm 处有最大吸收,但在 320 nm 附近却基本无吸收。故本文选择 230 nm 作为检测波长。

【参 考 文 献】

- [1] 张志耘(Zhang ZY),胡志洁(Hu ZJ). 当归芍药散研究的新进展[J]. 中草药(*Chin Tradit Herb Drugs*),2000,31(7):附8-9.
- [2] 王宝琴(Wang BQ). 中成药质量标准与标准物质研究[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994. 59-61.
- [3] 梁 宏(Liang H),王春芳(Wang CF). 高效液相色谱法测定八珍丸中芍药苷的含量[J]. 药物分析杂志(*Chin J Pharm Anal*),1999,19(1):44-46.
- [4] 李 俊(Li J),胡志厚(Hu ZH),刘良初(Liu LC),等. 高效液相色谱法测定八珍制剂中的芍药苷[J]. 中国药理学杂志(*Chin Pharm J*),1991,26(5):289-290.
- [5] 王宏洁(Wang HJ),沈 欣(Shen X),杨 健(Yang J),等. 高效液相色谱法测定当归补血汤中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志(*Chin J Exp Tradit Med Form*),1998,4(5):9-10.

Determination of Ferulic Acid and Paeoniflorin in Dangguishao Yao San by RP-HPLC

ZENG Yu¹, DU Ying-Xiang^{2*}, MA Shi-Ping¹

(¹ Department of TCM Pharmacology; ² Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

【ABSTRACT】 AIM: To establish a RP-HPLC method for the determination of paeoniflorin and ferulic acid in Dangguishao Yao San. METHOD: The HPLC separation was performed on a Lichrospher-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), with the mobile phase of methanol-0.5 % acetic acid solution (20 80, v/ v) at the detection wavelength of 230 nm. RESULT: The linear ranged from 24.64 to 246.4 μ g/ ml for paeoniflorin ($r = 0.9991$) and 5.46 ~ 54.6 μ g/ ml for ferulic acid ($r = 0.9993$). The recoveries of paeoniflorin and ferulic acid were more than 97.90 % and 99.04 % respectively, and RSD was less than 1.8 %. CONCLUSION: The established method is simple, and accurate. It can be applied to determine paeoniflorin and ferulic acid in Dangguishao Yao San.

【KEY WORDS】 RP-HPLC; Dangguishao Yao San; Paeoniflorin; Ferulic acid; Determination of content

【Foundation Item】 This project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39730500) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2001080)