

· 制剂与质量 ·

喂饲补阳还五汤的大鼠血清中阿魏酸的高效毛细管电泳分析

罗奇志¹, 佟丽², 杨蒙蒙², 刑学峰², 马安德^{1*}

(1. 第一军医大学 中心实验室, 广东 广州 510510 2 第一军医大学 中医系, 广东 广州 510510)

摘要: 目的 采用高效毛细管电泳法测定补阳还五汤及给药大鼠血清中阿魏酸的含量。方法 以毛细管区带电泳分离分析待测样品中的阿魏酸, 内标法定量, 紫外检测, 缓冲液为 25 mmol/L 硼砂-甲醇 (85:15), 未涂层融硅毛细管 (52 cm×50 μm, 有效长度 30 cm), 分离电压 20 kV, 压力进样 3 s, 检测波长 320 nm, 温度 30℃。结果 在上述条件下, 阿魏酸在 6 min 内得到很好的分离, 血清中阿魏酸的加样回收率为 97.20%, 补阳还五汤中阿魏酸的回收率为 103.28%, RSD 分别为 3.73% 和 0.91% (n=3)。结论 该方法可为血清样品及复方制剂中阿魏酸的含量测定提供参考。

关键词: 补阳还五汤; 阿魏酸; 高效毛细管电泳

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)04-0388-03

High-performance capillary electrophoresis method for ferulic acid assay in serum of rats treated with Buyang Huanwu Decoction

LUO Qi-zhi¹, TONG Li², YANG Meng-meng², XING Xue-feng², MA An-de¹

(1. Center Laboratory; 2 Department of Traditional Chinese Medicine, First

Military Medical University, Guangzhou 510510 China)

Abstract **Object** To develop a high-performance capillary electrophoresis method to determine ferulic acid concentrations in serum of rats treated with Buyang Huanwu Decoction (BHD). **Methods** Capillary zone electrophoresis was applied for ferulic acid assay, quantitative determination was based on internal standard and detection was carried on by direct UV. The electrolyte buffer was composed of 25 mmol/L borax-methanol (85:15). Capillary electrophoresis was performed using a 52 cm (30 cm to detector)×50 μm fused-silica capillary tube. Separation voltage was 20 kV, sampling time was 3 s, detection wavelength was 320 nm, and the temperature was 30℃. **Results** Ferulic acid was successfully separated within 6 min, the recoveries were 97.2% in serum and 103.28% in BHD, respectively. RSD were 3.73% and 0.91% (n=3), respectively. **Conclusion** This method can supply reference for the determination of ferulic acid in serum samples and BHD.

Key words Buyang Huanwu Decoction (BHD); ferulic acid; high-performance capillary electrophoresis (HPCE)

补阳还五汤为清代名医王清任创制的名方, 对治疗中风、中风后遗症等气虚血瘀症疗效显著。该方由黄芪 120 g、川芎 3 g、当归 6 g、赤芍 6 g、桃仁 3 g、红花 3 g、地龙 3 g 组成, 其中阿魏酸为川芎、当归药材的主要有效成分, 有抑制血小板聚集, 降低血小板活性和改善微循环等作用。阿魏酸含量测定常用薄层色谱^[1]、高效液相色谱^[2]等方法。但该复方中成分复杂, 阿魏酸含量较低, 因此本实验采用高效毛细管电泳法分离测定该复方及给药大鼠血清中阿魏酸的含量, 为生物样品及复方制剂中阿魏酸的含量测定

提供参考。

1 仪器与试剂

270A-HT 型高效毛细管电泳仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 毛细管: 未涂层融硅毛细管 (52 cm×50 μm, 有效长度 30 cm, 河北永年锐沅色谱器件有限公司), HW-2000 色谱工作站数据处理系统 (南京千谱软件有限公司); Millipore-Q 纯水器。

甲醇色谱纯, 乙醇、硼砂均为国产分析纯; 葛根素 (批号: 753-200007)、阿魏酸 (批号: 0773-9910) 对

* 收稿日期: 2003-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970900); 广东省中医药管理局基金资助项目 (100006)

作者简介: 罗奇志 (1976-), 女, 湖南新化人, 助教, 药学硕士, 主要从事药物分析研究

Tel: (020) 61648172 Fax: (020) 61648173 E-mail: qiqi1377@sina.com

照品均购于中国药品生物制品检定所。黄芪、川芎、当归、赤芍、桃仁、红花、地龙药材均购自广东省药材公司,经本校中药鉴定教研室刘传明讲师鉴定,分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根茎、伞形科植物川芎 *Ligusticum sinense* Hort. 干燥根茎、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* Diels 干燥根茎、毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 干燥根茎、蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 成熟种子、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 干燥花、钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 干燥全虫体。

SD 大鼠, 10 只, 雌雄各半, 体重 250~280 g 由第一军医大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[3,4]: 按处方配比取补阳还五汤各味药饮片, 常规煎煮, 浓缩至含生药 3 g/mL, 取浓缩液加 30% 乙醇超声提取 2 次, 每次 15 min,

离心, 上清液加入内标葛根素, 定容后 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得补阳还五汤供试品溶液。大鼠按临床等效量 (组 I) 及 2 倍等效量 (组 II) 给药 (空白组给生理盐水), 2 次/d 连续 3 d 于末次给药 1 h 后, 无菌条件下, 腹主动脉取血, 离心分离后大鼠血清于 56℃ 水浴中灭活, 0.45 μm 微孔滤膜滤过除菌, 即得血清供试品溶液。分装, -20℃ 冰箱保存备用。

精密量取空白及给药血清各 1 mL, 加入内标物葛根素, 用乙腈共 5 mL 涡旋混合 10 min 提取 2 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 合并两次的上清液, 室温 N₂ 吹干, 残渣以甲醇溶解, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.2 电泳条件^[5]: 缓冲液: 25 mmol/L 硼酸-甲醇 (85:15), 分离电压 20 kV, 进样 3 s, 检测波长 320 nm, 温度 30℃。在所选条件下, 血清和补阳还五汤中阿魏酸实现了基线分离, 空白血清没有干扰峰。色谱图见图 1。

2.3 标准曲线

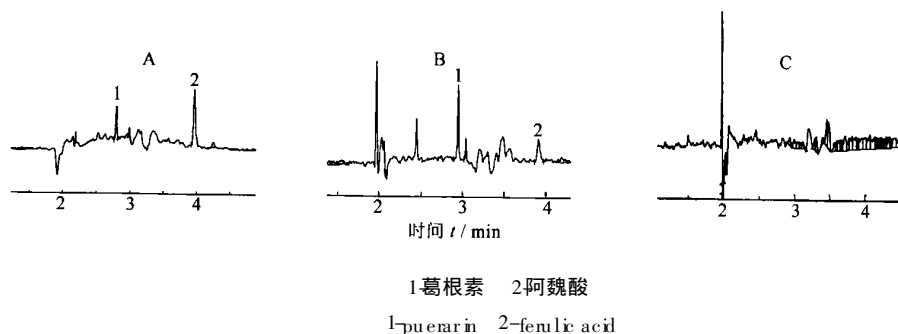


图 1 补阳还五汤 (A)、给药血清 (B) 和空白血清 (C) 的毛细管电泳图谱

Fig 1 HPCE chromatograms of BHD (A), serum with BHD (B), and blank serum (C)

2.3.1 体外工作曲线: 精密称取阿魏酸对照品 0.1667 mg 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 制得储备液; 精确量取该液 0.6, 1.2, 4.6, 8 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入内标葛根素, 甲醇定容, 依次进样, 以内标浓度为 1 计, 测得阿魏酸峰面积与内标葛根素峰面积之比 (A) 以阿魏酸与内标浓度 (计为 1) 之比 (C) 对 A 进行线性回归, 得回归方程 $C = 0.0179 + 0.2287A$, $r = 0.9995$, 线性范围: 1.00~10.00 μg/mL。

2.3.2 体内工作曲线: 依次精确量取阿魏酸储备液于空白血清中, 加入内标, 按 2.1 项下方法处理, 配成 1.00~10.00 μg/mL 系列浓度, 依次进样, 以内标浓度为 1 计, 测得阿魏酸峰面积与内标葛根素峰面积比 (A) 以阿魏酸与内标浓度之比 (C) 对 A 进行线性回归, 得回归方程 $C = 0.0193 + 0.2261A$,

$r = 0.9991$

2.4 精密度试验: 取同一供试品溶液, 连续测定 5 次, 得各自的峰面积, 求出阿魏酸峰面积与内标峰面积之比, 其 RSD 为 1.63%, 迁移时间的 RSD 为 1.08%。将同一供试品溶液连续测定 3 d 求得阿魏酸峰面积与内标峰面积之比的 RSD 为 3.23%, 迁移时间的 RSD 为 2.23%。

2.5 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 在 1 d 内 3 个不同时间进样, 测得阿魏酸与内标物的峰面积比的 RSD 为 2.15%。表明在 1 d 内供试品溶液稳定。

2.6 回收率试验: 取已测含量补阳还五汤及血清样品各 3 份, 分别加入适量的阿魏酸对照品, 用选定的电泳条件测定并计算。结果补阳还五汤及血清样品的平均回收率分别为 103.28% 和 97.20%, RSD 分别为 0.9% 和 3.73% ($n = 3$)。结果见表 1。

表 1 样品中阿魏酸的回收率测定结果 ($n=3$)Table 1 Recoveries of ferulic acid in samples ($n=3$)

样 品	加入量 μg	测得量 μg	回收率 $\%$	RSD $\%$
补阳还五汤	1 000	1 024.9	103.28	0.91
		1 043.1		
		1 030.3		
血 清	0 440	0 426.8	97.20	3.73
		0 444.0		
		0 412.2		

2.7 样品的测定: 供试品溶液平行 3 份, 每份测 3 次。将峰面积与内标物峰面积之比代入各自标准曲线方程, 求得各自的浓度, 测定结果见表 2。

表 2 样品中阿魏酸的含量测定结果 ($n=3$)Table 2 Contents of ferulic acid in samples ($n=3$)

样 品	阿魏酸浓度 $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD $\%$
组 I 血清	0 306.8	2.42
组 II 血清	0 636.3	2.37
补阳还五汤	4 754.0	2.91

3 讨论

补阳还五汤由 7 味药组成, 成分复杂, 而其中含阿魏酸的川芎、当归药材用量较少, 因此给该复方,

特别是 ig 给药大鼠血清中阿魏酸的含量测定带来一定困难, 高效毛细管电泳法作为一种新型的分离分析技术, 分离效率高, 对于多成分的复杂样品的分离具有独特优势, 而且其样品处理简单, 分离时间短, 在中药复方研究中将有广泛的应用前景。

References

- [1] Zhang L, Wang Q G. Determination of ferulic acid in Guqin Tincture by double wave TLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1997, 19(2): 15-16.
- [2] Lei M H, Jin F, Sun X Y, *et al*. Determination of ferulic acid in Guishao Mixture by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1997, 19(3): 13-14.
- [3] Tong L, Qu H D, Chen Y Y, *et al*. Effects of Buyanghuanwu Decoction (BYHW D) on proliferation of cultured rat cortical neurons [J]. *Acad J First Med Coll PLA* (第一军医大学学报), 2002, 22(8): 711-712.
- [4] Tong L, Shen J G, Qiu X S, *et al*. Study on preventive effect of Buyanghuanwu Decoction on cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia reoxygenation in rats [J]. *Chin J Integrat Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(7): 522-524.
- [5] Chen Y, Yang X, Han F M, *et al*. Determination of ligustrazin and ferulic acid in Chuanxiong rhizome by capillary electrophoresis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(9): 699-701.

青藤碱缓释片释放度影响因素的研究

任福正¹, 景秋芳¹, 孙淑英², 沈永嘉^{1*}

(1 华东理工大学化学与制药学院, 上海 200237; 2 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 考察各处方和工艺因素对以羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 为骨架材料的青藤碱缓释片中药物释放的影响。方法 采用不同黏度级 (K 4M, K 15M 和 K 100M) 和不同用量 HPMC 及不同的制备工艺制备青藤碱缓释片。结果 不同黏度级的 HPMC 在用量为 30% 时对青藤碱的释放度影响不大; 当 HPMC 的用量小于 30% 时, 随着 HPMC 用量增大, 释放速度减慢, 但 HPMC 的用量大于 30% 时释放速度变化不明显; 当青藤碱和 HPMC 的比例为 1:1.5 时, 片重从 280 mg 增大到 360 mg, 青藤碱释放速度减慢; HPMC 粒度及片剂的硬度对青藤碱的释放速度影响较小。结论 制备青藤碱缓释片应考虑选择合适的片重及 HPMC 的用量。

关键词: 青藤碱; 羟丙基甲基纤维素; 缓释片; 释放度

中图分类号: R283.3 R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0390-04

Influence factors on sinomenine releasing rate from Sinomenine Sustained-release Tablet

REN Fu-zheng¹, JING Qiu-fang¹, SUN Shu-ying², SHEN Yong-jia¹

(1 School of Chemistry and Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(2 School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Object To study the preparation and technology on sinomenine (SM) release from Sinomenine Sustained-release Tablets (SSTs) in which hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) was used as the primary excipients. **Methods** SSTs were prepared with different HPMC viscosity of K 4M, K 15M, and K 100M, different HPMC content and preparing technology. **Results** Little effect was observed on the releasing rate of SM with different HPMC viscosity when the content of HPMC was 30%. SM releasing rate increased with the decreasing of proportion of HPMC while the content of HPMC was less than

* 收稿日期: 2003-06-04

作者简介: 任福正, 男, 讲师, 主要从事新剂型研究。Tel: (021) 64252241 E-mail: renfz@yahoo.com