

纸色谱分离-紫外分光光度法 测定当归中阿魏酸含量^{*}

龚明贵¹, 董娟娥¹, 李进瞳¹, 潘晓²

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2 三原县林业局, 陕西 三原 713800)

[摘 要] 直接用紫外分光光度法测定当归提取液中阿魏酸含量时, 由于杂质干扰较大, 影响测定精度, 而采用纸层析分离可以将杂质除去。研究对纸层析的展开系统、不同萃取溶剂的稳定性等因素进行比较分析后, 建立了纸层析分离-紫外分光光度法测定当归中阿魏酸含量的方法。纸层析分离条件为: 以氯仿、甲醇、水和冰醋酸按体积比 2:2:6:0.5 配比作为展开剂, 检测波长为 330 nm, 加样回收率为 99.61%, 标准差为 2.79%, 吸光度在 0.020~0.061 时线性关系良好。

[关键词] 当归; 阿魏酸; 纸色谱; 分光光度法; 含量测定

[中图分类号] O 658.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0049-04

当归 (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels) 为伞形科当归属植物, 干燥根可入药, 阿魏酸 (Ferulic acid) 是其活性成分之一。据文献^[1]报道, 用阿魏酸含量来评价当归质量有重要意义。现代药理研究认为, 阿魏酸具有抗动脉粥样硬化, 抗血小板聚集和血栓, 抗菌消炎, 抗肿瘤、突变, 以及增强人体免疫力、提高人体精子活力和运动性等功能, 能为人体吸收并易于从尿中排出, 是一种安全性极高的药物^[2]。目前, 测定阿魏酸含量的方法主要有高效液相色谱法^[3,4]、薄层扫描法^[5]、毛细管电泳法^[6]等, 但这些方法所需仪器设备较为昂贵。本研究用紫外分光光度法与纸层析结合, 在测定前对其中的杂质进行了分离, 使测定精度大大提高。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验用当归购自杨凌药材公司, 经专家鉴定为当归 (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels)。

1.2 仪器与试剂

仪器 UV-2000 型紫外分光光度计 (上海尤尼可仪器有限公司), H6605T 超声波清洗机 (无锡超声仪器厂), RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), 365 nm 紫外分析仪 (上海科艺光学仪器厂),

10 μ L 微量进样器 (上海高欣玻璃仪器厂), 层析滤纸 (上海新华滤纸), FA 2004 型电子天平 (上海精科天平)。

试剂 阿魏酸 (反式) 对照品 (上海试剂一厂); 氯仿, 甲醇, 冰醋酸, 950 mL/L 乙醇, 均为分析纯。

1.3 方 法

1.3.1 阿魏酸标准液的制备 精密称量阿魏酸标准品 50 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 用 950 mL/L 乙醇定容至刻度。取 1 mL 该溶液, 稀释 10 倍, 即浓度为 0.1 mg/mL, 待用。

1.3.2 最大吸收波长的确定 用 950 mL/L 乙醇稀释阿魏酸标准液至 0.002 mg/mL, 以 950 mL/L 乙醇作空白对照, 用紫外分光光度计在 320 nm 附近不断变化波长, 测定吸光度, 以确定最大吸收波长 ($\lambda_{\max}$)。

1.3.3 展开剂和 R_f 值的确定 用毛细管吸取当归的乙醇提取液, 点样于层析滤纸上, 冷风吹干; 以不同比例的氯仿、甲醇、水和冰乙酸作为展开剂, 上行展开, 自然晾干, 用 365 nm 紫外分析仪观察荧光点, 进行比较, 并以阿魏酸标准品为对照, 确定适宜的展开剂。所选择的展开剂应使样品荧光点明显, 无拖尾, 各点分离度好。最后, 用铅笔画出阿魏酸的位置, 计算 R_f 值。

^{*} [收稿日期] 2004-07-13

[基金项目] 西北农林科技大学科研专项

[作者简介] 龚明贵 (1978-), 男, 湖北十堰人, 在读硕士, 主要从事野生动植物保护与利用研究。

[通讯作者] 董娟娥 (1968-), 女, 陕西蒲城人, 副教授, 在职博士, 主要从事天然产物提取研究。

1.3.4 萃取溶剂的选择 分别采用水和 950 mL/L 乙醇作为纸层析分离后的萃取溶剂,考察萃取效果和阿魏酸在萃取溶剂中的稳定性。

1.3.5 标准曲线的制作 用微量进样器分别吸取 0.1 mg/mL 阿魏酸标准溶液 20, 30, 40, 50, 60, 70 和 80 μ L, 长条状均匀点样于层析滤纸上(各 3 个重复), 冷风吹干, 以选择的展开剂上行展开, 晾干后, 在紫外灯下定位; 将载有样品的层析滤纸剪下成细条状, 装入 20 mL 具塞刻度试管中, 加入萃取溶剂 10 mL, 超声波振荡 15 min, 吸取上清液, 在最大吸收波长处测定吸光度(A), 以浓度和吸光度为坐标轴绘出标准曲线, 并计算回归方程。

1.3.6 点样量的确定 用微量进样器吸取一定量 0.1 g/mL (按生药计) 的乙醇提取液, 按 1.3.5 的方法操作(3 个重复), 根据标准曲线方程范围确定提取液的点样量。

1.3.7 加样回收率试验 精确吸取 2, 3, 4, 5, 6 mL 已知浓度的提取液, 各加入 0.5 mL 0.1 mg/mL 阿魏酸标准液, 摇匀, 按 1.3.5 的方法操作(3 个重

复), 计算加样回收率。
1.3.8 精密度试验 将 0.1 mg/mL 标准液 40 μ L 点样于滤纸上, 按 1.3.5 的方法操作(5 个重复), 以标准曲线计算测定浓度和变异系数 RSD (%)。

2 结果与分析

2.1 阿魏酸的吸收光谱

图 1 为以 950 mL/L 乙醇作为溶剂和空白对照所测得的阿魏酸的吸收光谱。由图 1 可以看出, 该化合物在 330 nm 波长处吸收最大。

2.2 展开剂与 R_f 值

2.2.1 展开剂的选择 阿魏酸是一种有机酸, 在中性或碱性条件下易电离, 在不同配比的展开剂中加入一定量冰乙酸可以抑制其电离。试验结果表明, 阿魏酸在氯仿、甲醇、水和冰醋酸按体积比 2:2:6:0.5 配比的展开剂中, 可以与其他物质完全分离, 斑点集中, 无拖尾现象。

2.2.2 R_f 值 图 2 为阿魏酸标准样品及当归提取液的纸色谱图, 经计算, 阿魏酸的比移值为 0.27。

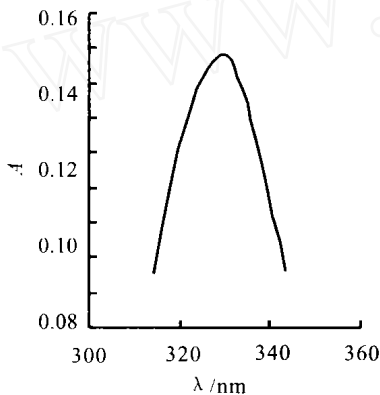


图 1 阿魏酸的吸收光谱

Fig. 1 Absorption of ferulic acid in 95% ethanol

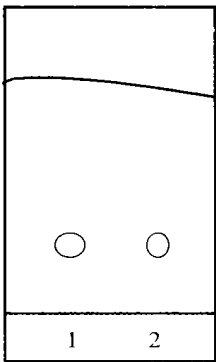


图 2 阿魏酸的纸色谱图

1. 阿魏酸标准样品; 2. 当归提取液

Fig. 2 Paper chromatogram

1. Ferulic acid; 2. Extract of *Angelica sinensis*

2.3 萃取溶剂的选择

分别以水和 950 mL/L 乙醇为层析分离后的萃取溶剂, 萃取后不同时间段内吸光度的变化见表 1。由表 1 可知, 用水和 950 mL/L 乙醇作为萃取溶剂时, 阿魏酸在水中的稳定性很差, 0.5 h 后, 其吸光

度即不断下降, 对实验结果影响很大; 而在 950 mL/L 乙醇中, 4 h 后吸光度略有降低。所以, 萃取溶剂应选用 950 mL/L 乙醇, 测定工作宜在 4 h 内完成。

表 1 不同萃取溶剂的稳定性测定结果

Table 1 Stability of ferulic acid in different extracting solvents

时间/h Time	0	0.5	1.5	2.5	3.5	4.0	4.5
水 Water	0.042	0.038	0.033	0.028	0.024	0.022	0.019
950 mL/L 乙醇 Ethanol	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.041	0.041

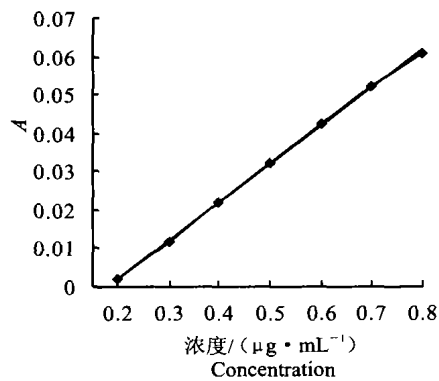


图 3 阿魏酸标准曲线

Fig 3 Standard curve of measuring ferulic acid

2.4 标准曲线与回归方程

图 3 表明, 进行纸层析后, 当吸光度在0.020~0.061 时, 阿魏酸的浓度与吸光度呈良好的线性关

系。经计算, 其回归方程为: $Y = 0.10225A + 0.001706$, $R = 0.99936$; 式中, A 为吸光度, Y 为阿魏酸的浓度。

2.5 点样量的确定

表 2 的测定结果显示, 点样量为 20~50 μL 的吸光度值均在标准曲线范围内, 但点样量大时, 相对点样次数会增多, 易引起更大误差, 且浪费时间。因此, 确定 30 μL 为适宜点样量。

表 2 点样量的选择结果

Table 2 Selection of the quantity of the sample for PC

点样量/ μL Quantity	20	30	40	50
吸光度 Absorption	0.026	0.035	0.037	0.048

2.6 加样回收率

表 3 表明, 采用该测定方法回收率高, 平均回收率可达 99.61%, 测定结果稳定可靠。

表 3 加样回收率试验结果($n=5$)

Table 3 Results of recovery test

提取液/ mL Volume of extract	提取液 阿魏酸的量/ mg Original contents of sample	加入量/ mg Added	测定值/ mg Found	回收率/% Recovery	RSD/%
2	0.44532	0.05	0.47853	96.61	3.40
3	0.66798	0.05	0.69819	97.24	3.73
4	0.89064	0.05	0.93399	99.29	0.71
5	1.11330	0.05	1.16924	100.51	0.51
6	1.33596	0.05	1.44729	104.43	4.43

2.7 精密度测定

由表 4 知, RSD 为 1%~4%, 说明本测定方法重现性好, 精密可靠。

表 4 测定精密度试验结果

Table 4 Precision evaluation of the method

序号 Serial number	标准品浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration of standard sample	测定浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Detemined concentration	RSD/%
1	0.1	0.09612	3.88
2	0.1	0.09863	1.37
3	0.1	0.10367	3.67
4	0.1	0.10363	3.62
5	0.1	0.09860	1.40

3 讨 论

1) 用高效液相色谱、高效薄层扫描等方法测定样品中有效成分的含量时, 仪器在测定过程中对样

品所含成分自动进行了分离, 选择性强, 测定精度高, 但这些方法所使用的仪器价格昂贵。直接用分光光度法对植物样品中的有效成分进行测定时, 由于其他杂质在相同波长下也会有吸收, 从而产生干扰, 使测定准确性降低。本研究所采用的纸层析法, 可对样品用合适的展开系统进行分离, 得到较纯的成分, 然后再使用分光光度法进行测定, 使测定精度大大提高。同时, 由于该法操作简便, 仪器价格较低, 更适合普通实验室和药物生产厂家使用。

2) 阿魏酸为酚酸, 与水溶液相比, 其在 950 mL/L 乙醇中较稳定, 但亦不宜放置较长时间, 如放置过夜的提取液经层析后出现 2 个斑点, 说明该成分已发生分解。本试验结果表明, 纸层析后所得的乙醇萃取液须在 4 h 内测定, 或将其蒸干后置于乙醚中, 待用时将乙醚挥去, 加乙醇溶解后测定。同样, 标准品乙醇溶液也应新鲜配制, 以减少测定误差。

【参考文献】

[1] 侯家麟, 李象新, 孙亚琪, 等. 对中国药典(1977 年版) 当归质量标准修改的探讨[J]. 中草药, 1985, 16(3): 11- 13

- [2] 欧仕益, 包惠燕, 蓝志东. 阿魏酸及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(3): 220- 221.
- [3] 陈汉平, 刘素香, 李桂梅, 等. 高效液相色谱法测定当归及其炮制品中阿魏酸的含量[J]. 中草药, 1988, 19(10): 15- 16.
- [4] 张 涛. HPLC 法测定当归注射液中阿魏酸含量[J]. 广西中医学院学报, 2001, 4(3): 60- 61.
- [5] 任延军, 阙宁宇. 中成药中阿魏酸含量的薄层扫描测定法[J]. 中国药学杂志, 1991, 26(12): 136- 138.
- [6] 邵元福, 马玉杰, 纪松刚. 毛细管区带电泳法测定当归中阿魏酸含量[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(9): 702- 703.

Detem ination of ferulic acid in *A ngelica sinensis* root by PC-spectrophotom etry m ethod

GONGM ing-gui¹, DONG Juan-e¹, L I J in-tong², PAN Xiao²

(1 College of Forestry, Northw est A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Forestry Bureau of Sanyuan County, Sanyuan, Shaanxi 713800, China)

Abstract: Detem ining precision was affected by the impurities in the extract of *A ngelica sinensis* when the content of ferulic acid was detem ined directly by UV-spectrophotom etry. Paper chrom atography (PC) was used to elim inate these impurities. The separation condition of PC and the stability of different extrac-tion solvents were studied. Based on the results, a detem ination m ethod of ferulic acid in *A ngelica sinensis* by PC-spectrophotom etry was established. The elution system for PC was: chloroform:methanol (water:acetic acid) (6:2:2:0.5), the wavelength for spectrophotom etry was 330 nm. The recovery rate of the m ethod was 99.61% and relative standard deviation (RSD) was 2.79%. The absorbency show s good lin-earity relation between 0.020 and 0.061.

Key words: *A ngelica sinensis*; ferulic acid; paper chrom atography; spectrophotom etry; content detem in-ation

(上接第 48 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)05-0044-EA

Evaluation of tourist resources and analysis of development condition in Ziwuling Natural Reserve

ZHANG Jing-qun^a, CHEN Cheng^a, ZHANG Zhao-yin^b

(a College of Forestry; b College of Economy, Northw est A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Ziwuling, with abundant propagation resources, unique natural scenery and rare human sights, can meet people's minds of "Returning to the true nature" at present and is an ideal place for eco-tourism. On the basis of detailed investigation, this paper appraises and analyses its tourism resources and developing condition appropriately, according to the relevant regulation Standard Project of Forest Park by using both qualitative and quantitative methods. It provides scientific basis to enhance natural resources protection, develop tourism properly and realize sustainable development in Ziwuling Natural Reserve. The total appraisal score of the landscape resources and the development condition of Ziwuling Nature Reserve is 44.24, which accords with the standard of the first grade Forest Park. So the developing condition is fairly well.

Key words: Ziwuling; Natural Reserve; evaluation of tourist resources; development condition