

HPLC法同时测定川芎药材中 3种有效成分的含量

王漪檬, 张晖芬, 闫宝庆, 陈晓辉, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院药分教研室, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定川芎药材中阿魏酸、6, 7-二羟基茺本内酯和 4-羟基-3-丁基苯酞三组分含量的方法。方法: 采用 SHINWA-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇 (A) - 0.1% 醋酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, A: 30~60; 20~33 min, A: 60~70); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: DAD 多波长检测, 阿魏酸为 278 nm, 6, 7-二羟基茺本内酯 320 nm, 4-羟基-3-丁基苯酞 254 nm。结果: 三组分的检测范围分别为阿魏酸: 7.15~71.50 ng·mL⁻¹ ($r=0.9999$)、6, 7-二羟基茺本内酯: 39.90~399.00 ng·mL⁻¹ ($r=0.9997$)、4-羟基-3-丁基苯酞: 0.29~2.88 ng·mL⁻¹ ($r=0.9998$); 平均回收率 ($n=9$) 分别为阿魏酸 103.2% (RSD=1.9%); 6, 7-二羟基茺本内酯 102.3% (RSD=1.7%); 4-羟基-3-丁基苯酞 102.2% (RSD=2.0%)。结论: 该法操作简单, 结果准确, 重现性好, 为各多组分评价不同产地川芎药材的质量提供了可靠的分析方法。

关键词: HPLC; 阿魏酸; 6, 7-二羟基茺本内酯; 4-羟基-3-丁基苯酞; 川芎

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2109-04

Determination of ferulic acid, 6, 7-di-hydroxylicustilide and 4-hydroxy-3-butylphthalide in Rhizoma Chuanxiong by HPLC

WANG Yi-meng ZHANG Hui-fen YAN Bao-qing

CHEN Xiao-hui BIKai-shun*

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

Abstract Objective To develop an HPLC method for ferulic acid, 6, 7-di-hydroxylicustilide and 4-hydroxy-3-butylphthalide in Rhizoma Chuanxiong. **Methods** A SHINWA-ODS (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) column was used to separate the sample at the column temperature of 30 °C. Methanol was mobile phase A and 0.1% acetic acid was mobile phase B with gradient elution (0~20 min, A: 30~60; 20~33 min, A: 60~70) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detector was DAD. The detection wavelengths of ferulic acid, 6, 7-di-hydroxylicustilide, 4-hydroxy-3-butylphthalide were at 278 nm, 320 nm and 254 nm. **Results** The calibration curve was linear over the concentration of 7.15~71.50 ng·mL⁻¹ for ferulic acid ($r=0.9999$); 39.90~399.00 ng·mL⁻¹ for 6, 7-di-hydroxylicustilide ($r=0.9997$); 0.29~2.88 ng·mL⁻¹ for 4-hydroxy-3-butylphthalide ($r=0.9998$). The average recovery of ferulic acid, 6, 7-di-hydroxylicustilide and 4-hydroxy-3-butylphthalide were 103.2%, 102.3%, 102.2% and the RSD were 1.9%, 1.7%, 2.0%, respectively. **Conclusion** This method is simple and reproducible, which can be used for the quality control of Rhizoma Chuanxiong.

Key words HPLC; ferulic acid; 6, 7-di-hydroxylicustilide; 4-hydroxy-3-butylphthalide; Rhizoma Chuanxiong

川芎 (Rhizoma Chuanxiong) 为伞形科植物川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎, 为活血化瘀常用中药。据文献报道^[1], 川芎的活性成分主要包括苯酞类衍生物 (如 6, 7-二羟基茺本内酯、4-

-羟基-3-丁基苯酞、茺本内酯等)、生物碱 (如川芎嗪等) 和酚酸类化合物 (如阿魏酸等) 等有效成分。这些成分均具在心脑血管、解痉平喘、镇静镇痛等方面有多种生理活性。目前, 众多文献^[2~4] 报道

* 通讯作者 Tel: (024) 23986259 E-mail: z031225@126.com

了川芎中单一成分如藁本内酯、阿魏酸和川芎嗪等的含量测定方法。本文建立了川芎药材中阿魏酸、6,7-二羟基藁本内酯和4-羟基-3-丁基苯酐3组分含量同时测定的方法,并比较了不同产地川芎药材中3组分的含量,对于较全面评价川芎质量具有实际意义。

1 仪器与材料

Agilent-1100型高效液相色谱仪,配有四元梯度泵、在线真空脱气机、柱温箱和二极阵列检测器(DAD)。RE-52型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),超声波清洗器(KUDOS SK250H 上海科导超声仪器有限公司)。

对照品阿魏酸、6,7-二羟基藁本内酯和4-羟基-3-丁基苯酐(自制,经HPLC检测质量分数均>99.0%),川芎药材购自四川等产地,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定均为正品;甲醇为色谱级,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 溶液制备

对照品储备液:分别取阿魏酸、6,7-二羟基藁本内酯、4-羟基-3-丁基苯酐对照品适量,精密称定,置10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制备浓度分别为48.92, 111.20, 1.05 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

供试品溶液:分别取不同产地的川芎药材,粉碎过40目筛,取约1.0 g粉末,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入80%甲醇溶液20 mL,称定总重量,回流提取30 min,冷却,用80%甲醇溶液补足减失重量,摇匀,静置;取上清液,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2 色谱条件的选择 色谱柱:SH NWA-ODS (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min A: 30 $\rightarrow$ 60; 20~33 min A: 60 $\rightarrow$ 70);流速:1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长: DAD多波长检测,阿魏酸 320 nm、6,7-二羟基藁本内酯 278 nm、4-羟基-3-丁基苯酐 254 nm。柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量: 10 μL 。

2.3 系统适用性试验 在上述色谱条件下,各相邻色谱峰之间的分离度均大于1.5,拖尾因子均在0.95~1.05之间;理论塔板数均大于30000,满足定量要求。色谱图见图1。

2.4 标准曲线 分别精密量取对照品储备液阿魏酸 1.5 mL、6,7-二羟基藁本内酯 4.0 mL、4-羟基-3-丁基苯酐 2.0 mL置同一10 mL量瓶中,甲醇

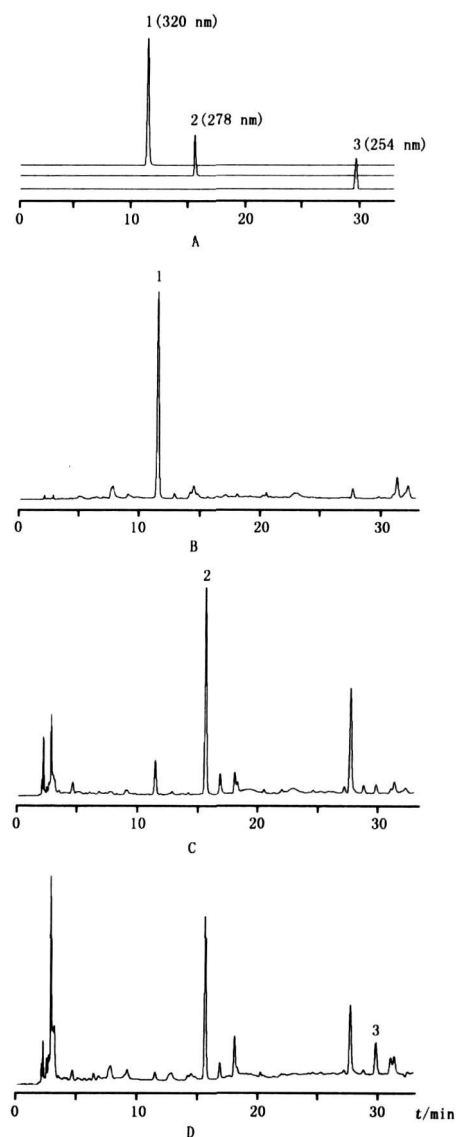


图1 3种对照品(A)与川芎样品(B、C、D)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of standard (A) and Chuanxiong sample (B, C, D)

1. 阿魏酸 (Ferulic acid) (320 nm) 2. 6,7-二羟基藁本内酯 (6,7-di-hydroxy ligustilide) (278 nm) 3. 4-羟基-3-丁基苯酐 (4-hydroxy-3-butylphthalide) (254 nm)

定容至刻度,制得混合对照品储备液;分别精密移取此混合对照品储备液,配成混合对照品系列溶液,按照“2.2”色谱条件,进样分析,以各自的峰面积(Y)为纵坐标和浓度X($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线,所得阿魏酸、6,7-二羟基藁本内酯、4-羟基-3-丁基苯酐回归方程分别为:

$$Y = 25.44X - 0.967 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 10.81X - 9.892 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 122.3X - 1.583 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为: 7.15~71.50, 39.90~399.00, 0.29~2.88 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 精密度试验 取一定浓度的混合对照品溶液,按上述色谱条件,连续进样 6 次,分别记录 3 种组分的峰面积,计算得阿魏酸、6,7-二羟基茺本内酯、4-羟基-3-丁基苯酞的 RSD 均为 1.6%,说明精密度良好。

2.6 重复性试验 分别取同一产地川芎药材粉末约 1.0 g 6 份,精密称定,按“2.1”项下制备供试品溶液,照“2.2”色谱条件,进样分析,分别求得阿魏酸、6,7-二羟基茺本内酯、4-羟基-3-丁基苯酞含量平均值的 RSD 分别为 1.8%, 1.8%, 1.3%。

2.7 稳定性试验 取“2.1”项下的同一供试品溶液,室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 照“2.2”色

谱条件,进样分析,分别求得阿魏酸、6,7-二羟基茺本内酯、4-羟基-3-丁基苯酞峰面积的 RSD 分别为 1.4%, 2.0%, 1.9%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一产地川芎药材粉末 9 份,每份约 0.5 g 精密称定,分别精密加入混合标准品储备液适量,按“2.1”项下制备低、中、高 3 个浓度各 3 份的供试品溶液,照“2.2”色谱条件,进样分析,计算回收率,结果见表 1。阿魏酸、6,7-二羟基茺本内酯、4-羟基-3-丁基苯酞的平均回收率分别为 103.2%, 102.3%, 102.2%; RSD 分别为 1.9%, 1.7%, 2.0%。

表 1 回收率试验结果 (n= 9)

Tab 1 Result of recovery test

(components)	已知含量 (original) / ng	加入量 (added) / ng	测定量 (found) / ng	回收率 (recovery) %	平均值 (mean) %	RSD %
阿魏酸 (ferulic acid)	12.23	3.575	15.82	101.6	103.2	1.9
	12.23	3.575	15.84	100.9		
	12.23	3.575	15.88	102.1		
	12.23	21.45	34.43	103.5		
	12.23	21.45	33.99	101.5		
	12.23	21.45	34.72	104.9		
	12.23	50.05	64.88	105		
	12.23	50.05	64.78	105		
	12.23	50.05	64.61	104.7		
6,7-二羟基茺本内酯 (6,7-di-hydroxy ligustilide)	27.79	19.954	7.689	9.7	102.3	1.7
	27.79	19.95	47.96	101.1		
	27.79	19.95	47.95	101		
	27.79	119.7	152	103.7		
	27.79	119.7	148.4	100.8		
	27.79	119.7	153.2	104.8		
	27.79	279.3	313.5	102.3		
	27.79	279.3	318.5	104.1		
	27.79	279.3	314.4	102.6		
4-羟基-3-丁基苯酞 (4-hydroxy-3-butylphthalide)	0.262	0.144	0.405	99.7	102.2	2.0
	0.262	0.144	0.408	101		
	0.262	0.144	0.41	102.5		
	0.262	0.864	1.152	103		
	0.262	0.864	1.131	100.7		
	0.262	0.864	1.158	103.7		
	0.262	2.016	2.321	102.2		
	0.262	2.016	2.333	102.8		
	0.262	2.016	2.301	101.2		

2.9 样品测定 取不同产地的川芎药材粉末约 1.0 g 精密称定,按“2.1”项下制备供试品溶液,按“2.2”色谱条件,进样分析,分别计算其 3 种成分的含量,结果见表 2。

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的优化 由于阿魏酸的最大吸收波

长为 320 nm, 6,7-二羟基茺本内酯的最大吸收波长为 278 nm, 4-羟基-3-丁基苯酞的最大吸收波长为 254 nm, 故利用 DAD 进行多波长检测分析,实现了 3 组分含量的同时测定,获得了满意结果。由于 3 种化合物的极性差别较大,因此在建立 HPLC 方法时,对流动相的选择和优化进行了系统考察,最终选择了

表 2 不同产地川芎中阿魏酸、6, 7-二羟基藁本内酯、4-羟基-3-丁基苯酐的含量 (n = 3)
Tab 2 The contents of ferulic acid, 6, 7- di- hydroxy ligustilide, 4- hydroxy- 3- butyl phthalide
in Chuanxiong of different origins (n = 3)

产地 (origins)	阿魏酸 (ferulic acid)		6, 7-二羟基藁本内酯 (6, 7- di- hydroxy ligustilide)		4-羟基-3-丁基苯酐 (4- hydroxy- 3- butyl phthalide)	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
	(contents) /mg· g ⁻¹	%	(contents) /mg· g ⁻¹	%	(contents) /mg· g ⁻¹	%
四川广元 (Sichuan gangyuan)	1. 11	0. 45	5. 34	0. 19	0. 024	0. 94
四川成都 (Sichuan chengdu)	1. 50	0. 25	5. 20	1. 70	0. 023	1. 60
四川眉山 (Sichuan meishan)	0. 71	1. 30	2. 23	0. 02	0. 030	0. 44
哈尔滨 (haerbin)	0. 70	0. 78	7. 57	0. 20	0. 026	1. 50
长春 (Changchun)	1. 30	0. 19	6. 21	0. 03	0. 025	0. 51
河北 (Hebei)	0. 37	0. 39	6. 67	0. 04	0. 024	0. 92
安徽 (Anhui)	0. 93	0. 73	3. 35	0. 76	0. 031	1. 20
青海 (Qinghai)	1. 60	0. 02	4. 70	0. 07	0. 021	1. 70
山东 (Shandong)	0. 80	0. 87	2. 45	0. 77	0. 023	0. 90
河南 (Henan)	1. 14	0. 90	1. 98	0. 55	0. 018	0. 57

本实验甲醇-0.1%醋酸溶液的梯度洗脱条件,经实验证实所选的色谱系统适用性好,结果可靠。

3.2 供试品提取条件的考察 采用单因素循环的方法,分别考察了提取方式(冷浸,超声,回流);提取溶剂(甲醇、水、90% 甲醇、80% 甲醇、70% 甲醇、60% 甲醇、40% 甲醇、20% 甲醇);提取溶剂倍数(10, 20, 30倍);提取次数(1, 2, 3次);提取时间(15, 30, 60 min)。进样分析,均以阿魏酸、6, 7-二羟基藁本内酯、4-羟基-3-丁基苯酐三成分的含量进行比较,确定了本文供试品提取条件。

3.3 由于藁本内酯性质不稳定,容易挥发,药材粉碎后若不及时测定则损失很大,而且测定前需要密闭、避光、低温贮藏^[5~7],因此选择稳定性较好且在川芎中含量较大的同苯酐类衍生物 6, 7-二羟基藁本内酯和 4-羟基-3-丁基苯酐与酚酸类化合物阿魏酸 3组分同时进行含量测定;并测定了不同产地川芎药材中这 3组分的含量。本方法简便、准确、重现性好,为川芎药材质量控制提供了可靠的实验依据。

3.4 据通过分析不同产地的川芎样品,结果表明阿魏酸、6, 7-二羟基藁本内酯、4-羟基-3-丁基苯酐的含量均有明显差别,4-羟基-3-丁基苯酐各产地最大可相差 2倍;阿魏酸各产地最大相差 3倍;6, 7-二羟基藁本内酯各产地最大可相差 6倍;但基于某些产区收集到的样品数量较少,代表性不强,以及受贮藏时间和方式的影响,不能完全推断川芎药材中这 3种组分的含量是否与产地有关,笔者将在随后的实验中进一步研究其关系及 3组分在体内的

药理疗效和药动学。

参考文献

1 Natio T, Kubota K, Shinoda Y, et al Effects of constituents in a Chinese crude drug *Ligustici rhizoma* on vasocontraction and blood viscosity *Nat Med*, 1995(49): 288
2 CHAO Zhen-zhen(晁真真), CHAO Ruo-bing(晁若冰). Determination of ligustilide in *Ligustium chuanxiong* Hort by HPLC (HPLC测定川芎药材中藁本内酯的含量). *West Chin J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2004, 19(3): 197
3 WANG Fang(王芳), KUANG Wei-hua(匡维华). RP-HPLC Determination of ferulic acid in the different origin of *Rhizoma Chuanxiong*(反相高效液相色谱法对不同产地川芎中阿魏酸的测定). *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药科学), 2002, 19(2): 312
4 JIANG Xiao-han(姜寒寒), FENG Yi-fan(冯毅凡), LIANG Han-ming(梁汉明), et al HPLC analysis of butylidenephthalide in *Szechwan lovage rhizome* from different habitat (不同产地川芎中丁烯基苯酐的 HPLC分析). *Acta J Guangdong coll pharm* (广东药学院学报), 2006, 22(6): 132
5 SHI Li-fu(石力夫), DENG Yan-zhao(邓延昭), WU Bo-sheng(吴柏生). Study oil the chemical constituents and the stability of the essential oil from aryl rhizome of *Ligustium chuanxiong* Hort (川芎干燥根茎挥发油化学成分及其稳定性的研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(3): 26
6 Lin LZ, He XG, Lian LZ, et al Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z- ligustilide *J Chromatogr A*, 1998(810): 71
7 LI Gui-sheng(李桂生), MA Cheng-jun(马成俊), LI Xiang-yu(李香玉). Studies on the stability ligustilide and the analysis of its isomerized products by GC-MS(藁本内酯的稳定性研究及异构化产物的 GC-MS分析). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(6): 405

(本文于 2009 年 5 月 18 日修改回)