

[成分分析]

高效液相色谱-质谱法同时测定川芎提取液中7种有效成分

刘洁, 余李敏, 翟帆

(陕西新药技术开发中心, 陕西 西安 710075)

关键词: 川芎; 香草醛; 阿魏酸; HPLC/MS

摘要: 目的: 建立高效液相色谱-电喷雾质谱方法, 测定川芎中香草醛等7种有效成分的含量。方法: 超声法提取川芎中的有效成分, 反相高效液相色谱梯度洗脱法进行分离, 电喷雾质谱多级反应模式进行含量测定。结果: 香草醛等7种有效成分的检测限分别为: 40, 20, 80, 20, 10, 60 和 50 ng/mL, 线性范围分别为: 1~450, 4~490, 1~625, 2~360, 2~700, 1~244 和 21~210 $\mu\text{g/mL}$ 。在川芎药材中的平均含量分别为: 0.12, 0.25, 0.41, 0.99, 0.30, 8.96 和 11.25 mg/g。结论: 本方法简便、快速、灵敏度高, 可作为川芎药材的多成分分析方法。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4528(2010)08-1380-03

Simultaneous determination of 7 kinds of bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by HPLC-MS

LIU Jie, YU Li-min, ZHAI Fan

(Shaanxi Pharmaceutical Development Center, Xi'an 710075, China)

KEY WORDS: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; vanillin; ferulaic acid; HPLC/MS

ABSTRACT: **AIM:** To establish an HPLC-MS for determining seven bioactive components, including vanillin, ferulaic acid, ligustrazine, senkyunolid I, H, and A, and ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* Hort. **METHODS:** The bioactive components were extracted by ultrasonic method, and then were separated by reverse HPLC, and finally were determined by the multiple reaction mode of MS. **RESULTS:** The detected limits of the seven bioactive components such as vanillin were 40, 20, 80, 20, 10, 60 and 50 ng/mL, respectively. Their linear range were 1~450, 4~490, 1~625, 2~360, 2~700, 1~244 and 21~210 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The average contents of the above components in *Ligusticum chuanxiong* Hort. were 0.12, 0.25, 0.41, 0.99, 0.30, 8.96 and 11.25 mg/g, respectively. **CONCLUSION:** The proposed method has the characteristic of simplicity, rapidly and high sensitivity. It could be used in analyzing the whole components of *Ligusticum chuanxiong* Hort.

川芎 (*Rhizoma Chuanxiong*) 为伞形科植物川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎, 性温、味辛, 具有活血行气、祛风止痛的功效, 临床主要用于治疗月经不调、经闭痛经和头痛等症, 是中医临床广泛应用的药材之一^[1]。川芎中含有酚酸、生物碱、内酯和挥发油等多类有效成分, 文献常用的测定方法包括液相色谱-紫外检测法、液相色谱-质谱法、毛细管电泳-紫外检测法和气相色谱-质谱法等。上述方法为川芎的质量控制作出了重要的贡献, 且具有良好的应用前景。然而, 如何建立一种川芎中多种有效成分同时测定的方法是值得探讨的问题。本文

采用液相色谱-质谱同时测定川芎中7种有效成分的含量, 旨在为川芎的综合质量控制做出贡献。

1 仪器与材料

仪器: Agilent 1100 系列高效液相色谱-离子阱质谱联用系统 (包括二元梯度泵, 7725i 手动进样器, DAD 二极管阵列检测器, SL 型电喷雾-离子阱质谱和 Chemstation 5.2 工作站); Sartorius BP221s 型电子分析天平 (万分之一, 美国 Sartorius 公司)。

材料: 香草醛为分析纯; 阿魏酸和盐酸川芎嗪对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号: 110773-200612、110817-200305); 川芎内酯 I、川芎内酯 H、

收稿日期: 2009-09-16

作者简介: 刘洁 (1982-) 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事药物分析及相关工作。Tel: 13032946066 E-mail: nsdr1230@126.com

川芎内酯 A 和藁本内酯对照品为本实验室采用制备液相色谱制备,归一化法测定纯度均不低于 96.0%;川芎药材(四川产)购于陕西省药材公司,并由陕西省药品检验所进行鉴定。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相 A 为 0.2% 的乙酸水溶液, B 为甲醇,梯度洗脱设置为:30% B 保持 5.0 min, 30 min 内线性增加为 80% B,保持 5.0 min;柱温为 25.0 °C;流速:0.8 mL/min(柱后 3:1 分流, V : V)。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源正离子模式;喷雾电压 3.5 kV;毛细管电压 -3 500 V,干燥气流速 7.0 L/min;干燥气温度 325 °C;雾化气压力 45 psi;雾化气温度 350 °C;质量扫描范围 50 ~ 1 000 amu。

2.2 对照品供试品溶液的制备

精密称取香草醛、阿魏酸、盐酸川芎嗪、川芎内酯 I、川芎内酯 H、川芎内酯 A 和藁本内酯对照品适量,加 95% 的甲醇配制成浓度分别为 0.90, 1.80, 1.35, 3.6, 1.40, 2.44 和 2.10 mg/mL 的混合供试品溶液, 4.0 °C 冷藏备用。

2.3 药材供试品溶液的制备

取干燥川芎药材,粉碎,过 40 目筛。精密称取 5.0 g 药材粉末,加入 6 倍量 95% 的甲醇水溶液,超声 30.0 min,过滤,重复 3 次,合并滤液,95% 的甲醇水溶液定溶于 100.0 mL 量瓶中, 4.0 °C 冷藏备用。

2.4 线性关系

取 2.2 项下对照品溶液适量,加 95% 甲醇水溶液配制成系列供试品溶液,在拟定分析条件下,精密吸取 10.0 μL 进样,采用离子阱质谱的多级反应模式(MRM)进行分析,香草醛选择 m/z 153.1 为母离子, m/z 126.1 为子离子;阿魏酸选择 m/z 195.3 为母离子, m/z 178.1 为子离子;川芎嗪选择 m/z 137.2 为母离子, m/z 122.3 为子离子,川芎内酯 I 选择 m/z 225.1 为母离子, m/z 208.2 为子离子,川芎内酯 H 选择 m/z 225.1 为母离子, m/z 208.2 为子离子,川芎内酯 A 选择 m/z 105.1 为母离子, m/z 147.9 为子离子,藁本内酯选择 m/z 191.2 为母离子, m/z 148.1 为子离子,采集提取离子流图,以各对照品提取离子峰峰面积对其浓度作图,得线性回归方程,计算线性范围,结果见表 1。

表 1
Tab. 1 线性关系测定结果
Results of calibration curve

名称	$y = ax + b$		r^2	线性范围 /(μg/mL)/(ng/mL)	检测限
	斜率(a)	截距(b)			
香草醛	0.062 6	-0.003 1	0.998 7	1~450	40
阿魏酸	0.039 4	0.006 5	0.999 1	4~900	20
川芎嗪	0.058 2	-0.004 3	0.999 4	1~625	80
川芎内酯 I	0.067 4	-0.002 2	0.999 6	2~360	20
川芎内酯 H	0.045 8	0.001 5	0.998 9	2~700	10
川芎内酯 A	0.021 4	-0.002 8	0.999 3	1~244	60
藁本内酯	0.020 9	-0.003 1	0.999 5	21~210	50

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取 2.3 项下川芎供试品溶液 20.0 μL,在拟定分析条件下,重复进样 5 次,分别测定香草醛等有效成分的含量,结果发现 7 种有效成分的相对标准偏差分别为 1.12%, 0.94%, 1.31%, 1.20%, 1.24%, 0.97% 和 0.82% (n = 5),表明该方法具有较好的精密度。

2.5.2 重复性试验 取川芎药材粉末适量,按 2.3 项下的样品制备方法平行制备药材供试品溶液 5 份,在拟定分析条件下,进样分析,计算 7 种有效成分的相对标准偏差分别为 0.96%, 0.82%, 1.231%, 1.17%, 0.94%, 1.07% 和 0.91% (n = 5),表明该方法具有良好的重复性。

2.5.3 稳定性试验 取川芎药材供试品溶液,分别于室温放置 0, 4, 8, 12, 24 h 后依法测定 7 种有效成分的含量,计算相对标准偏差分别为 1.01%, 0.87%, 1.14%, 1.05%, 0.934%, 1.07% 和 0.76% (n = 5),表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 加样回收率试验 分别取香草醛等 7 种有效成分含量分别为 0.06, 0.21, 0.04, 0.97, 0.32, 8.20 和 12.53 mg/g 的川芎药材粉末约 0.1 g,精密称定,分别准确加入 0.5、1.0 和 2.0 mL 混合对照品溶液,按 2.3 项的样品制备方法制备药材供试品溶液。拟定分析条件下,测定各有效成分的含量,计算回收率。结果发现 7 种有效成分的平均回收率分别为 98.7%, 101.2%, 99.2%, 98.4%, 102.5%, 101.6% 和 99.7% (n = 6),对应的相对标准偏差(RSD)分别为 1.2%、0.8%、0.5%、1.4%、0.6%、0.3% 和 0.7%,表明该方法回收率良好。

2.6 样品含量测定

精密称取川芎药材粉末 3 份,每份 0.5 g,按 2.3 项下样品制备方法制备药材供试品溶液。精密吸取 20.0 μL,拟定分析条件下进样分析,总离子流图见图 1。重复 3 次,测得药材中 7 种有效成分含量的

平均含量分别为:0.12, 0.25, 0.41, 0.99, 0.30, 8.96 和 11.25 mg/g。

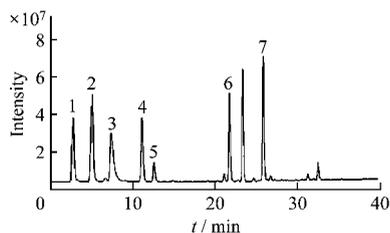


图1 川芎药材供试品溶液液相色谱-电喷雾质谱总离子流图

1. 香草醛 2. 阿魏酸 3. 川芎嗪 4. 川芎内酯 I 5. 川芎内酯 H
6. 川芎内酯 A 7. 藁本内酯

Fig. 1 Total ion current chromatogram of *Ligusticum chuanxiong* Hort. extraction

1. Vanillin 2. Ferulaic acid 3. Ligustrazine 4. Senkyunolide I 5. Senkyunolide H 6. Senkyunolide A 7. Ligustilide

3 讨论

3.1 文献中有关川芎中有效成分含量测定的报道较多,常用的方法为高效液相紫外检测法。然而,该方法每次仅能对川芎中的某一类有效成分进行测定,且往往会因检测波长的不同导致方法灵敏度下

降,使其在川芎多成分分析方面的应用受到限制。本文采用高效液相色谱-电喷雾质谱法测定了川芎中的7种有效成分,证明该法具有简便、快速和定性定量准确的特点,特别适合于药材的多成分分析和指纹图谱研究。

3.2 图1中保留时间为23.4 min的色谱峰分离良好且强度较大,质谱法测得其分子离子峰为 m/z 357.4,与苯酐类化合物 Coniferylferulate 的质谱信息一致,但由于缺少相应的对照品,本文未能对该化合物进行准确定性和含量测定。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005:28.
 [2] 韩丽,黄媛莉,杨明,等. 川芎配方颗粒高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2924-2925.
 [3] 曹建敏,王棕华,孙广平,等. 川芎中内酯类化学成分的提取与溶剂萃取分离方法研究[J]. 分析实验室, 2005, 24(9): 59-62.
 [4] Jin Y U, Liang T U, Fu Qing, et al. Fingerprint analysis of *Ligusticum chuanxiong* using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatography A*, 2009, 1216: 2136-2141.

桑枝多糖的分离纯化及结构初步分析

王佩香, 欧阳臻*, 张磊, 方静, 汤建明
(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

关键词: 桑枝; 多糖; 分离纯化; 结构分析

摘要:目的:从桑枝中分离纯化出桑枝多糖,并研究其组成及初步结构。方法:桑枝经水提醇沉、脱蛋白、DEAE-纤维素柱和 Sephadex G-100 柱层析,得 RMPS1 和 RMPS2 二个多糖组分。采用 TLC、GC、HPLC、IR 和 Smith 降解等方法分析其组成和初步结构。结果:RMPS1 和 RMPS2 的平均分子量分别为: 5.8×10^5 、 6.5×10^5 , RMPS1 有鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖组成,其摩尔比为:1.08 : 1 : 1.40 : 1.57; RMPS2 有鼠李糖、葡萄糖和半乳糖组成,其摩尔比为:11.38 : 1 : 1.35; 通过高碘酸氧化和 Smith 降解初步分析, RMPS1、RMPS2 中连接方式主要为 1→2、1→4 糖苷键,此外包括 1→3 糖苷键,红外光谱显示,均具有糖的特征吸收峰。结论:首次测定桑枝多糖 RMPS1 和 RMPS2 的初步结构,为桑枝多糖的进一步研究提供依据。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2010)08-1382-04

Separation, purification and preliminary structure analysis of *Ramulus Mori* polysaccharide

收稿日期: 2009-08-04

基金项目: 江苏省镇江市新产品新技术开发推广项目(镇经贸拔[2007]312号文-42号)

作者简介: 王佩香(1984-)女,硕士,主要从事中药活性成分及新药的开发。Tel: 15951409131 E-mail: wangpeixiang1984@126.com

* 通讯作者: 欧阳臻(1964-)女,教授,博士生导师。Tel: (0511)88791564 E-mail: zhenouyang@ujs.edu.cn