

HPLC法测定川产道地药材川芎中川芎嗪的含量*

朱美晓^{1,2}, 黄志芳¹, 肖红斌³, 易进海^{1**}

(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 泸州医学院, 泸州 646000; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

摘要 目的: 建立川芎中川芎嗪的含量测定方法, 并测定川产道地药材川芎中川芎嗪的含量。方法: 采用高效液相色谱法测定川芎中川芎嗪的含量。色谱柱: Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-四氢呋喃-20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液 (pH 9.5) (68: 7: 425); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 °C。结果: 川产道地药材川芎中川芎嗪含量甚微, 大多数药材含量低于检测限 0.10 μg·g⁻¹ 而未检出。结论: 川芎嗪为川芎中主要有效成分是一个认识误区, 本方法测定结果可靠, 为进一步科学认识川芎药效成分提供参考。

关键词: 川芎; 川芎嗪; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0103-04

HPLC determination of tetramethylpyrazine in geo-authentic *Ligusticum chuanxiong* Hort. of Sichuan province*ZHU Mei-xiao^{1,2}, HUANG Zhi-fang¹, XIAO Hong-bin³, YI Jin-hai^{1**}

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu 610041, China; 2. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract Objective To establish determination method of tetramethylpyrazine in *Ligusticum chuanxiong* Hort., and determine the content of tetramethylpyrazine in geo-authentic *Ligusticum chuanxiong* Hort. of Sichuan province. **Methods** The contents of tetramethylpyrazine were determined by HPLC. HPLC was carried out with a Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, the mobile phase was methanol-tetrahydrofuran (THF)-20 mmol·L⁻¹ ammonium acetate water solution (pH 9.5) (68: 7: 425) with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 280 nm and the column temperature was 35 °C. **Results** The content of tetramethylpyrazine in geo-authentic *Ligusticum chuanxiong* Hort. of Sichuan province was minimal and mostly lower than 0.10 μg·g⁻¹ then not be detected. **Conclusion** There is a cognition mistake that tetramethylpyrazine is the main active component in *Ligusticum chuanxiong* Hort. The result determined by this method is reliable, which provide the basis in order to further scientific cognition about pharmacodynamic action component of *Ligusticum chuanxiong* Hort.

Key words *Ligusticum chuanxiong* Hort.; tetramethylpyrazine; HPLC; assay

川芎为著名的川产道地药材, 来源于伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 具有活血行气、祛风止痛之功效。川芎为我国主要出口药材之一, 70% ~ 80% 产自四川, 四川都江堰、彭州为川芎的道地产区。川芎化学成分复杂, 主要含有挥发油、生物碱、酚性物质、有机酸、苯酐内酯等成分^[1,2]。文献报道^[3~9]川芎嗪为川芎中主要有效成分及具有重

要生理活性的生物碱成分之一, 含量从千万分之几到千分之几, 相差万倍。关于川芎中川芎嗪的含量一直存在争议, 本文对 15 批川产川芎中川芎嗪的含量进行测定, 优化分析方法, 为川芎中川芎嗪的含量提供一种准确可行的检测方法, 结果显示仅从 2 批川芎样品中检出川芎嗪, 其中 1 批含量为 0.44 μg·g⁻¹, 另 1 批含量在 0.10 μg·g⁻¹ (检测限) ~ 0.39 μg·g⁻¹ (定

* 国家自然科学基金项目 (30973873)

** 通讯作者 Tel (028) 85210843 E-mail yjinha@yahoo.com.cn

量限)之间,其他 13 批含量均小于 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 而未检出。参考化学药品磷酸川芎嗪口服制剂的 1 d 用量为 150~300 mg 笔者认为川芎嗪为川芎中主要有效成分是一个认识误区。

1 仪器和试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD 检测器, 柱温箱, 自动进样器, 工作站); KQ-100 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); OAKDN pH 510 型 pH 计; 岛津 AUW 220D 型十万分之一电子天平。甲醇、四氢呋喃为美国 Tedia 色谱纯; 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

盐酸川芎嗪对照品(批号 110817-200305 含量测定用, 中国药品生物制品检定所)。样品来源于四川都江堰、彭州、成都荷花池药材市场、四川新荷花中药饮片有限公司、成都同仁堂等地, 经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-四氢呋喃-20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液 (pH 9.5) (68:7:25); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 °C; 对照品溶液进样量 5 μL, 供试品溶液进样量 20 μL; 理论塔板数按川芎嗪峰计算应不低于 5000。在此色谱条件下, 盐酸川芎嗪对照品及川芎药材的色谱图见图 1。

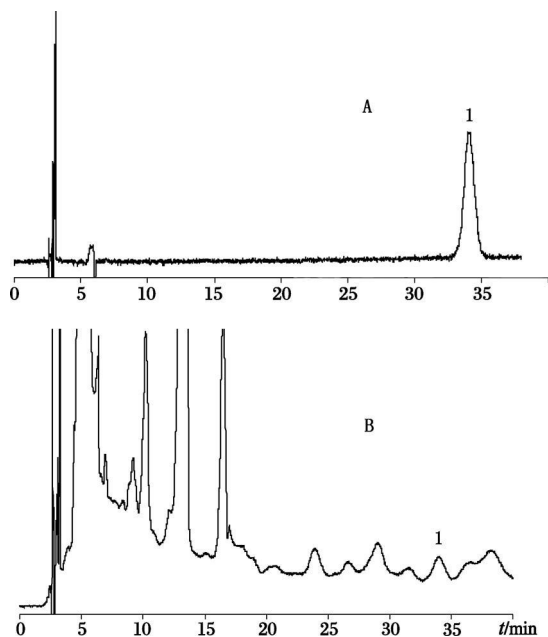


图 1 盐酸川芎嗪对照品 (A) 与川芎药材 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of tetraethylpyrazine hydrochloride reference substance (A) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (B)

1 川芎嗪 (tetraethylpyrazine)

2.2 线性关系考察 精密称取盐酸川芎嗪对照品 5.58 mg (折合川芎嗪 3.64 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件依次测定。以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:

$$Y = 3.44 \times 10^3 X + 0.19 \quad r = 0.9998$$

结果表明, 川芎嗪在 0.005824~0.02912 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.3 检测限与定量限 信噪比为 3 时, 测得川芎嗪检测限为 1.5 ng 当信噪比为 10 时, 测得川芎嗪定量限为 5.8 ng

2.4 供试品溶液的制备 精密称取川芎样品粉末 (过 3 号筛) 3 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 放置过夜, 超声处理 (功率 100 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸甲醇溶液 0.4 mL 调 pH 至 2~3, 50 °C 减压蒸干。残渣加 1 mol·L⁻¹ 盐酸 15 mL 使溶解, 滤过, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸洗涤滤纸, 洗液与滤液合并, 加浓氨水 2.5 mL 调 pH 9~10 用二氯甲烷萃取 2 次 (20, 15 mL), 合并二氯甲烷液, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸甲醇溶液 0.5 mL 调 pH 至 2~3, 50 °C 减压蒸干。残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL, 在上述色谱条件下, 连续进样 5 次, 分别测定川芎嗪峰面积, RSD 为 0.4% ($n=5$), 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一川芎粉末 6 份, 照“2.4”项下方法分别制成供试品溶液, 依法测定, 结果川芎嗪平均含量为 $0.44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 3.2% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取上述同一供试品溶液, 分别于室温放置 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 后依法测定, 结果川芎嗪峰面积的 RSD 为 1.8% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 分别取已知川芎嗪含量 ($0.44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 的川芎粉末 (过 3 号筛) 1.5 g 共 6 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别准确加入盐酸川芎嗪对照品溶液 (川芎嗪浓度 $2.912 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.25 mL 照“2.4”项下方法制成供试溶液, 依法测

定, 计算回收率, 结果平均回收率为 95.9%, RSD 为 2.4% ($n=6$)。

2.9 样品含量测定 取 15 批川芎样品分别按“2.4”项下方法制成供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 记录色谱峰面积, 以峰面积按外标法计

算含量, 结果见表 1。仅从 2 批川芎样品中检出川芎嗪, 其中 1 批含量为 $0.44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 另 1 批含量在 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (检测限) $\sim 0.39 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (定量限) 之间, 其他 13 批含量均小于 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 而未检出。

表 1 15 批川芎样品中川芎嗪的含量测定结果

Tab 1 Result of tetraethylpyrazine content determination in 15 batches of *Ligusticum chuanxiong* Hort samples

规格 (specifications)	编号 (No.)	来源 (sources)	含量 (content) / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
川芎药材 (<i>L. chuanxiong</i>)	1	都江堰市敖平镇 (Aoping Dujiangyan)	0.10~0.39
	2	都江堰市敖平镇 (Aoping Dujiangyan)	未检出 (not detected)
	3	彭州 (Pengzhou)	未检出 (not detected)
	4	彭州 (Pengzhou)	未检出 (not detected)
	5	都江堰都源贸易有限公司 (Dujiangyan Duyuan Trading Company Ltd.)	未检出 (not detected)
	6	成都荷花池药材市场 (Chengdu Hehuachi Herbal Medicine Market)	未检出 (not detected)
	7	成都荷花池药材市场 (Chengdu Hehuachi Herbal Medicine Market)	未检出 (not detected)
川芎饮片 (prepared pieces of <i>L. chuanxiong</i>)	8	都江堰市 (Dujiangyan)	未检出 (not detected)
	9	都江堰市 (Dujiangyan)	未检出 (not detected)
	10	彭州 (Pengzhou)	未检出 (not detected)
	11	成都荷花池药材市场 (Chengdu Hehuachi Herbal Medicine Market)	0.44
	12	成都荷花池药材市场 (Chengdu Hehuachi Herbal Medicine Market)	未检出 (not detected)
	13	成都同仁堂 (Chengdu Tongrentang)	未检出 (not detected)
	14	四川新荷花中药饮片有限公司 (Sichuan Neatus Traditional Chinese Medicine Co. Ltd.)	未检出 (not detected)
	15	四川新荷花中药饮片有限公司 (Sichuan Neatus Traditional Chinese Medicine Co. Ltd.)	未检出 (not detected)

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备 参照文献 [8, 10], 对无水乙醇、甲醇的提取效果进行了比较, 确定甲醇为提取溶剂。研究表明供试品溶液的制备方法对分离效果影响很大, 川芎样品经甲醇提取后, 若直接进样, 则杂质干扰大, 分离效果不佳, 且与对照品的紫外光谱比较相似性差。经二氯甲烷萃取后, 则杂质干扰显著减小, 供试品中川芎嗪达到基线分离, 且与对照品的紫外光谱基本一致。

3.2 色谱条件的选择 本文参照文献 [5, 6] 对色谱条件进行比较研究, 结果显示采用酸性流动相: 甲醇 - 1% 醋酸 (20: 80), 分离效果不理想, 样品中川芎嗪与对照品的 DAD 光谱相似性差。本试验在甲醇 - $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液 ($\text{pH} 9.05$) - 四氢呋喃 (19: 81: 2) 流动相^[7] 的基础上进行优化, 发现流动相的 pH 对分离效果影响较大, 采用甲醇 - 四氢呋喃 - $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液 ($\text{pH} 9.5$) (68: 7: 425) 为流动相时, 样品中川芎嗪峰与相邻成分峰分离良好, 与对照品的紫外光谱基本一致。此外, 由于样

品中川芎嗪含量极低, 色谱分离时易受干扰, 在每次分析完成后, 须用甲醇冲柱 10 min 以确保下一次分析获得良好的分离效果。DAD 光谱显示川芎嗪在 280 nm 处有最大吸收, 因此选择检测波长为 280 nm。

3.3 验证试验 为了进一步验证本文的检测方法, 在未检出川芎嗪的药材样品中加入对照品, 按供试品溶液制备方法操作, 进行测定, 川芎嗪的回收率可达 96%, 说明该方法准确可信。孙新国等^[5] 报道采用 HPLC 法测得川芎中川芎嗪含量为 $0.12 \sim 0.87 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 而易涛^[10] 报道采用 LC-MS 测得川芎中川芎嗪含量低于检测限 $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 而未检出。笔者认为: 部分文献报道^[4, 6~8] 川芎嗪含量较高, 可能是测试干扰导致川芎嗪色谱峰包裹其他成分, 造成含量偏高。

3.4 结论 本文研究结果表明, 川产川芎中川芎嗪含量甚微, 大多数药材含量低于检测限 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 而未检出。但一般人, 甚至医药工作者, 都误以为川芎嗪是川芎的主要有效成分^[3, 4, 8, 9], 参考化学药品磷酸川芎嗪口服制剂的 1 d 用量为 150~300

mg 笔者认为川芎嗪为川芎中主要有效成分是一个认识误区。

参考文献

- 1 CHP(中国药典). 2005 VolI (一部): 28
- 2 WEI Hong- chao(魏洪超), LI Lei(李蕾). Research development on *Ligusticum chuanxiong* Hort (川芎的研究进展). *Heilongjiang Med J*(黑龙江医药), 2008, 21(5): 101
- 3 SHU Bing(舒冰), ZHOU Chong- jian(周重建), MA Ying- hui(马迎辉), *et al* Research progress on pharmacological activities of the available compositions in Chinese medicinal herb *Ligusticum chuanxiong* (中药川芎中有效成分的药理作用研究进展). *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2006, 22(9): 1043
- 4 LIU Cai- xia(刘彩霞), LIAO Meng- xia(廖梦霞), DENG Tian- long(邓天龙). Species and quality of geo- authentic *Ligusticum chuanxiong* in Sichuan province(川产道地药材川芎的品种和质量). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35(10): 附 2
- 5 SUN Xin- guo(孙新国), WANG Tao(王涛), ZHU Jing- shen(朱景申). Determination of tetraethylpyrazine in *Ligusticum chuanxiong* Hort by RP- HPLC coupled with counter current extraction(逆流萃取- 反相高效液相色谱法测定川芎中川芎嗪的含量). *Acta Univ Med Tongji*(同济医科大学学报), 2001, 30(3): 209
- 6 ZHU Chang- fu(朱长福), SHI Quan- xin(石全信), YAN Yu-

- ping(严玉平), *et al* Determination and fingerprint analysis of tetraethylpyrazine and ferulic acid in *Ligusticum chuanxiong* (不同川芎药材中川芎嗪及阿魏酸含量及指纹图谱研究). *J Chin Med Mater*(中药材), 2008, 31(8): 1113
- 7 CAO Yang(曹阳), WANG Tie- jie(王铁杰), WANG Yu(王玉), *et al* HPLC determination of tetraethylpyrazine in *Ligusticum chuanxiong* Hort (HPLC法测定不同产地川芎中川芎嗪的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(3): 278
 - 8 YUAN Bo- yong(袁伯勇), YUAN Hui(袁慧), ZHAO Ming(赵铭). Determination of tetraethylpyrazine in three kinds of decoction pieces(3种饮片川芎嗪含量的测定). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2000, 31(6): 430
 - 9 ZHAO Zhi- chun(赵志春), YU Hui- qin(俞惠琴), LU Ke- ping(陆克平), *et al* Determination of tetraethylpyrazine in traditional Chinese medicines by high performance liquid chromatography (中药制剂中川芎嗪含量的高效液相色谱法测定). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1991, 16(12): 729
 - 10 YI Tao(易涛). Study on the quality standards of two Chinese material medica(两种常用中药材的质量标准研究): [PhD Thesis(博士学位论文)]. Chengdu(成都): Sichuan University(四川大学), 2006

(本文于 2010年 1月 27日收到)

《药物分析杂志》继续被评为 2010年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了 2009年度精品科技期刊示范项目 和英文版期刊国际推广项目 总结验收及 2010年度精品科技期刊新增示范项目 评审工作。根据中国科协学函[2010]59号文的评审结果,《药物分析杂志》继续成为 2010年度精品科技期刊示范项目 C类项目。在这次评选中,中国科协所属全国学会主办 960余种科技期刊中,有 92种期刊被列为 2010年度精品科技期刊示范项目,其中 A类项目 7项、B类项目 40项、C类项目 45项,各类项目资助额度分别为每项 25、15、5万元/年。中国科协从 2006年开始评选精品期刊项目至今,《药物分析杂志》已连续 5年被评为中国科学精品期刊示范项目(C类)。