

验。本法经一步制备即可获得纯度为 92.4% 的 HSYA, 可满足一些药理实验的需要。若欲制备含量测定用对照品, 再经凝胶柱色谱纯化即可。实验中水洗脱时应注意在除去糖类时应尽可能保留较多的 HSYA, 每一次色谱制备结束后, 应以稀碱液及稀醇液洗掉树脂上吸附的残余黄酮成分, 并以蒸馏水洗净担体后方可进行下一次制备。由于 HSYA 不稳定, 制备时加热浓缩温度不可太高, SY 及 HSYA 溶液均可短期冷藏保存, 长期保存则应冷冻。

References

[1] Zang B X, Jin M, Si N, et al. Antagonistic effect of hydroxy-safflor yellow A against platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 696-699.
 [2] Jin M, Wu W, Chen W M, et al. Inhibitory effect of gross

safflor yellow against platelet activating factor receptor binding *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2001, 37(3): 167-169.
 [3] Zang B X, Wang Y Q, Li J S, et al. Spectrophotometric determination of safflor yellow [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(2): 137-138.
 [4] Meselhy M R, Kadota S, Momose Y, et al. Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca⁺⁺ antagonistic activity of tinctomine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(10): 1796-1802.
 [5] Huang Z L, Gao Q M, Cui Z M. Pharmacological study of safflor yellow [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1984, 15(8): 12-14.
 [6] Zang B X, Wu W, Li W R, et al. Experimental study of safflor yellow prepared through silica gel adsorption procedure on anticoagulation effect [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2001, 37(2): 106-109.

阿魏酸的稳定性及其在川芎和当归药材中的存在形式

丁明玉¹, 马帅武², 刘德麟^{2*}

(1. 清华大学 化学系, 北京 100084; 2. 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

摘要: 目的 确认阿魏酸的异构体转换反应及川芎、当归药材中阿魏酸的存在形式。方法 采用高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用等手段研究阿魏酸的异构体转换。结果 反式阿魏酸在常规保存条件下, 可部分转变成顺式, 在川芎和当归药材中, 反式和顺式阿魏酸是共存的。结论 反式阿魏酸有较好的热稳定性, 但存在缓慢的异构体转换反应。

关键词: 阿魏酸; 稳定性; 川芎; 当归

中图分类号: R282.6; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0028-03

Stability of ferulic acid and its existing form in *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis*

DING Ming-yu¹, MA Shuai-wu², LIU De-lin²

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: **Object** To investigate the isomer transition reaction of ferulic acid and the existing form of ferulic acid in *Ligusticum chuanxiong* Hort and *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. **Methods** HPLC and HPLC-MS were used to confirm the isomer transition of ferulic acid. **Results** The *trans*-ferulic acid was translated into *cis*-ferulic acid partly when its solution was deposited under some routine conditions, and the *trans*- and *cis*-ferulic acids could coexist in the Chinese medicinal materials, *L. chuanxiong* and *A. sinensis*. **Conclusion** The *trans*-ferulic acid is stable thermodynamically, but could be translated into *cis*-ferulic acid partly and slowly.

Key words: ferulic acid; stability; *Ligusticum chuanxiong* Hort; *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels

川芎和当归都是常用中药材, 阿魏酸是它们的有效成分之一。从化学结构上看, 阿魏酸有顺式和反

式两种立体异构体(图 1)。有关阿魏酸(钠)的药理作用和中药(药材及中成药)中阿魏酸的液相色谱分

* 收稿日期: 2003-06-12

基金项目: 科技部社会公益专项(2001B1B00150)

作者简介: 丁明玉(1960—), 男, 湖南华容人, 清华大学化学系副教授, 博士, 1986 年获中国地质大学应用化学硕士学位, 1995 年获日本山梨大学工学部生物工科学科博士学位, 1995 年至 1997 年在清华大学作为博士后研究人员, 主要从事色谱分析与中药化学及制剂技术的研究。Tel: (010) 62781687 E-mail: dingmy@mail.tsinghua.edu.cn

析方法的报道很多,但有关阿魏酸稳定性的报道却极少。贾晓斌等^[1]研究阿魏酸的 HPLC 分析方法时,发现阿魏酸对照品有杂质峰,而且用水或甲醇(乙醇)配制的阿魏酸溶液不稳定,阿魏酸峰逐步降低,与此同时,杂质峰逐渐增大,采用含醋酸的甲醇配制阿魏酸,保证阿魏酸在一定时间内维持稳定,但没有对这些现象进行深入研究和作出合理解释。陈倩洁等^[2]证明了煎煮时间对川芎中阿魏酸稳定性无影响,也有报道^[3]用⁶⁰Co- γ 射线照射当归药材,对其中阿魏酸的含量也无明显影响。有关阿魏酸顺反异构体互变以及在原药材和制剂中阿魏酸的存在形式,未见研究报道。以往的药理研究和成分分析所用阿魏酸并未注明是顺式还是反式,通常情况下都是采用结构更为稳定的反式阿魏酸。笔者在研究川芎和当归有效成分的过程中发现:新配制的高纯度反式阿魏酸对照品溶液在液相色谱图上为单一色谱峰,但如果此反式阿魏酸对照品溶液放置时间较长,会在其色谱峰之后出现一个小的色谱峰。另外,在川芎和当归的原药材中,也会在反式阿魏酸之后相应的位置出现这个色谱峰^[4]。推测是反式部分变顺式。本实验结合紫外光谱、HPLC 和 HPLC-MS 联用的分析结果,对反式阿魏酸溶液的稳定性进行了研究。

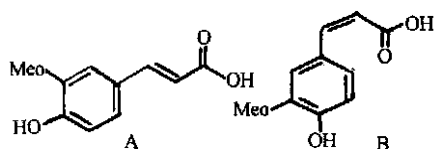


图 1 阿魏酸异构体——反式阿魏酸(A)和顺式阿魏酸(B)

Fig 1 Isomers of ferulic acid—trans-ferulic acid (A) and cis-ferulic acid (B)

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪,由四元低压梯度泵、在线脱气装置、二极管阵列检测器(DAD)和 HP 化学工作站组成;API 3000 HPLC-MS-MS 联用仪(美国 PE 公司)。

反式阿魏酸对照品购于中国药品生物制品检定所。川芎药材为伞形科植物川芎 *Ligusticum sinense* Hort 的干燥根茎,购自四川灌县。当归药材为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根茎,购自甘肃岷县。甲醇为色谱纯,实验中所用其他试剂均为分析纯,水为重蒸去离子水。

2 方法

2.1 川芎和当归样品处理:在川芎和当归的乙醇提取液中加水配制成 70% 乙醇水溶液,经石油醚萃取分离色素等脂溶性杂质后,将水相浓缩至近干,浓缩

物用少量 5% 盐酸水溶液溶解,滤过后得到的酸不溶物,用醋酸乙酯溶解,然后用 5% NaOH 水溶液萃取,所得水相酸化后用乙醚再萃取,所得乙醚相挥干后用乙醇溶解,此样品用于测定川芎和当归药材中的阿魏酸。

2.2 色谱条件: HPLC: Zorbax SB-C₁₈ 分离柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(HP 公司产品);流动相为甲醇-1% 醋酸水溶液(30 : 70),使用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过;流速: 0.8 mL/min;柱温: 30 °C;检测波长: 322 nm;进样量: 20 μL。

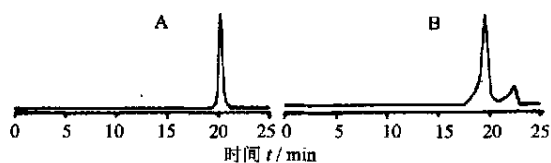
HPLC-MS: 色谱分离条件同上述 HPLC。质谱条件:电喷雾源(ESI),分别采用正、负离子方式检测或采用全扫描方式检测;质量范围: m/z 60~700。

3 结果与讨论

3.1 阿魏酸顺反异构体确认:新配制的高纯度反式阿魏酸溶液和在冰箱中放置 6 个月的该溶液在相同条件下的 HPLC 色谱图见图 2。新配溶液在色谱图中仅有一个色谱峰,而在冰箱中放置 6 个月的反式阿魏酸溶液的色谱图中,在反式阿魏酸峰之后又出现了一个比它小得多的色谱峰。从二极管阵列检测器得到的这两个物质的紫外吸收光谱很类似。一般情况下,如果一个化合物分解或与其他物质反应生成了新的化合物,其分子光谱(紫外光谱)会有明显变化。因此,反式阿魏酸放置过程中发生分解的可能性很小,可能是转变成了顺式阿魏酸。为此,进一步通过 HPLC-MS 确认它们的结构。质谱检测采用负离子扫描方式,得到反式阿魏酸峰与在其后出现的色谱峰的质量数都是 193,即它们的相对分子质量都是 194。因此,反式阿魏酸之后的色谱峰应是顺式阿魏酸。从阿魏酸顺反异构体的空间结构不难看出反式阿魏酸更为稳定,应为阿魏酸成分的主要存在形式。同时反式阿魏酸的极性比顺式强,采用本实验中的反相 HPLC 分析时,反式阿魏酸应该先洗脱出来,这与图 2 显示的实际结果也是吻合的。

将川芎和当归药材按分离有机酸的方法分离出含阿魏酸的有机酸部分,并在同样条件下做 HPLC-MS 分析,并对质量数为 193 的负离子进行搜索,得到川芎有机酸部分的总离子流图(图 3)。从图 3 可知,对质量数为 193 的负离子进行搜索时,样品中搜索到的两个物质正好与阿魏酸对照品的顺反异构体对应。如果按文献,加热对阿魏酸的稳定性无影响^[2],则可排除样品处理中加热导致的顺反互变,说明阿魏酸在川芎药材中本来就是顺反异构体共存。

3.2 阿魏酸的稳定性:阿魏酸是川芎和当归中主要



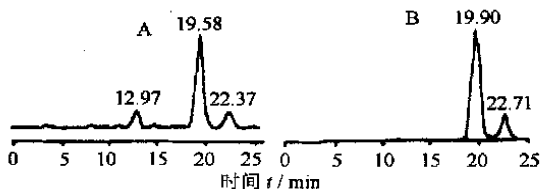
A-新配溶液 B-冰箱保存 6 个月溶液

A-fresh solution

B-solution deposited for 6 month in refrigeratory

图 2 阿魏酸对照品的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of ferulic acid reference substance



A-川芎萃取物有机酸部分 B-在 m/z 193 下负离子扫描

A-organic acid portion of Chuanxiong extract

B-negative-ion scanning at m/z 193

图 3 液质联用色谱图

Fig 3 Chromatograms of HPLC-MS

有效成分之一,其稳定性对药理研究、制剂质量控制都有重要意义。为此本实验对阿魏酸的稳定性进行了初步考察。因为通常采用甲醇做流动相和处理样品,所以本实验重点考察阿魏酸在甲醇溶液中的稳定性。用甲醇配制一定浓度的阿魏酸对照品(反式),室温(约 25)放置,在 48 h 内用 HPLC 多次测定阿魏酸顺反异构体。以顺式和反式阿魏酸峰面积之比表示顺反异构体的含量之比,并以该含量比为纵坐标,时间为横坐标,绘制阿魏酸顺反异构体变化曲线,见图 4。从图 4 可以看出,新配制的反式阿魏酸中也有少量(约 1%)顺式阿魏酸,这可能是对照品纯度不够高所造成。在 48 h 之内,虽说顺式阿魏酸的比例呈增加趋势,但仅有约 1% 的反式阿魏酸转化为顺式,对于定量分析而言,在测定误差允许的范围之内。反式阿魏酸长期放置(冰箱中冷藏 6 个月)后,顺反异构体的峰面积之比约为 1 : 10,这个比例与川芎和当归药材中阿魏酸的顺反异构体峰面积之比大体一致。据此,可以推测这一比例应该是阿魏酸顺反异构体互变处于平衡状态的大致比例。

3.3 溶剂对阿魏酸保留行为的影响: 配制阿魏酸所用溶剂的不同也会影响阿魏酸在色谱柱上的保留行为。图 5 是分别用纯甲醇和流动相甲醇-1% 醋酸水溶液(20 : 80)配制的阿魏酸(顺反异构体共存)所得到的色谱图。从图中可见,在相同流动相条件下,用

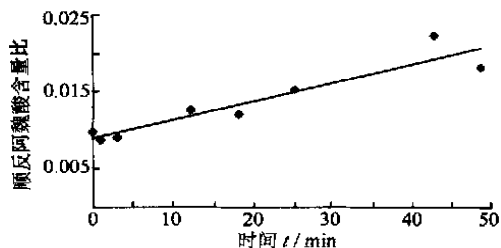
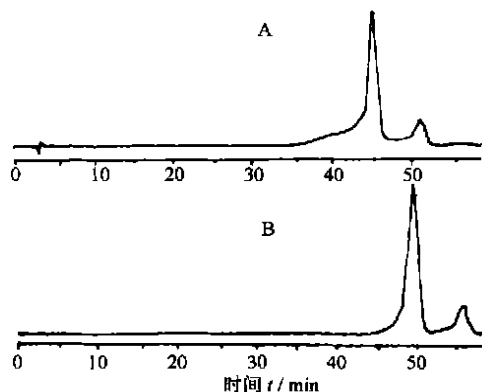


图 4 阿魏酸顺反异构体的变化

Fig 4 Changes of isomers of cis- and trans-ferulic acid



A-阿魏酸用甲醇配制

B-阿魏酸用流动相甲醇-1% 醋酸(20 : 80)配制

A-ferulic acid prepared with methanol B-ferulic acid prepared using mobile phase methanol-1% acetic acid (20 : 80)

图 5 阿魏酸在 ODS 柱上的保留行为

Fig 5 Retention behavior of ferulic acid on ODS column

纯甲醇配制的阿魏酸保留时间短,用流动相配制的阿魏酸保留时间长。这说明阿魏酸用含酸的水溶液配制,阿魏酸的离解受到抑制,使阿魏酸的极性减弱,有利于增强在 C_{18} 固定相上的保留。而不含醋酸的阿魏酸溶液在进入流动相后再接触醋酸水溶液,阿魏酸不能立即达到酸离解的抑制平衡,溶质(阿魏酸)分子的极性就要大一些,在固定相中的保留也就弱一些。

References:

[1] Jia X B, Shi Y F, Huang Y P, et al. Improvement of HPLC determination method for ferulic acid in Chuanxiong and Danggui [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1998, 20(6): 37-38.

[2] Chen Q J, Sun M, Liang R X, et al. Effect of decoction time on the stability of ferulic acid [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2002, 13(4): 249-250.

[3] Lei X, Xia W J. Determination of ferulic acid in *Angelica sinensis* before and after irradiation by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13(6): 333-334.

[4] L üK, Ding M Y, Li H X, et al. Determination of ferulic acid in Chuanxiong and in animal serum and cerebrospinal fluid by reversed-phase HPLC [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2000, 18(6): 518-520.