

HPLC 法测定川芎中阿魏酸和藁本内酯

刘 毅, 刘素香, 张铁军, 陈常青

天津药物研究院, 天津 300193

摘 要 目的: 用反相高效液相色谱法, 建立测定川芎药材中阿魏酸和藁本内酯的方法。**方法:** 采用 Accurasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相, 进行线性梯度洗脱。**结果:** 川芎中 2 种成分得到良好的分离, 阿魏酸在 34.96~524.4 ng 范围内线性关系良好, 藁本内酯在 276.7~2213.6 ng 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 99.81%和 99.20%, RSD 为 1.32%和 1.65%。**结论:** 本方法简便, 准确, 重复性好, 可同时测定川芎药材中 2 种主要的化学成分。

关键词 川芎; HPLC; 阿魏酸; 藁本内酯

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2010) 03-0210-03

Determination of ferulic acid and ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* by HPLC

LIU Yi, LIU Su-xiang, ZHANG Tie-jun, CHEN Chang-qing

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of ferulic acid and ligustilide in *Ligusticum chuanxiong*. **Methods:** The HPLC method was used with Accurasil-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and methanol -0.05% phosphoric acid as mobile phase in a gradient elution. **Results:** The ferulic acid and ligustilide was separated perfectly. The standard curve was linear within the concentration range of 0.034 96—0.524 4 μg for ferulic acid and 0.276 7—2.213 6 μg for ligustilide, respectively. The recovery was 99.81% for ferulic acid and 99.20% for ligustilide, respectively. The RSD was 1.32% for ferulic acid and 1.65% for ligustilide, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used repeatedly for the determination of ferulic acid and ligustilide in *L. chuanxiong*.

Key word *Ligusticum chuanxiong* Hort.; HPLC; ferulic acid; ligustilide

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 的干燥根茎, 有活血行气, 祛风止痛之功效, 为活血化瘀常用中药。川芎在中医临床中应用较广, 其中成药制剂也有广泛使用。川芎所含的成分较为复杂, 各类成分之间极性差异很大, 其活性成分有以川芎嗪为代表的生物碱类^[1], 以阿魏酸为代表的有机酸类^[2], 以藁本内酯为代表的苯酞类^[3]。生物碱与有机酸是川芎活血化瘀的主要活性成分, 川芎挥发油中苯酞类成分量最高, 多种苯酞类化合物被证明是川芎中对心脑血管作用的主要成分^[4]。关于川芎药材定量测定的报道有很多, 都是测定其中的单一化学成分, 如阿魏酸、川芎嗪和藁本内酯。本实验对川芎嗪的色谱测定条件进行了考察, 但药材中川芎嗪的量甚微, 不易检测到。故采用反相高效液相色谱法, 建立了同时测定川芎药材中阿魏酸和藁本内

酯 2 种主要成分的方法, 为制定川芎药材的质量标准提供了科学依据。

1 实验材料

1.1 仪器

戴安液相色谱仪, 包括 P680 四元液相梯度泵、ASI-100 自动进样器、CO-201 柱温箱、Dionex UVD170U 检测器、Chromeleon 色谱工作站。

1.2 试剂

阿魏酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号为 773-9303; 藁本内酯对照品 (自制, 质量分数 >98%); 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为天磁纯净水。

1.3 药材

川芎饮片购自天津市各药店, 由天津药物研究院张铁军研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Accurasil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液, 线性梯度洗脱: 0~14 min (35: 65~50: 50), 14~16 min (50: 50~75: 25), 16~35 min (75: 25~77: 23), 35~36 min (77: 23~35: 65); 检测波长: 320 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备

精密称取阿魏酸对照品 8.74 mg, 加 70%甲醇溶解制成 174.8 mg/mL 的阿魏酸对照品储备溶液; 精密称取藁本内酯对照品 27.67 mg, 加甲醇溶解制成 553.4 mg/mL 的藁本内酯对照品储备溶液。分别精密吸取阿魏酸对照品储备溶液 0.5 mL 和藁本内酯对照品储备溶液 1.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用 70%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取川芎粉末 (过 40 目筛), 约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定称质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液用微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法的专属性

在拟定的色谱条件下, 分别取对照品溶液和供试品溶液进样测定, 在供试品色谱图中, 各色谱峰得到良好的分离, 无干扰, 色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取阿魏酸对照品储备溶液 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mL, 和藁本内酯对照品储备溶液 0.5、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 70%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件测定, 分别进样 10 μL, 记录色谱图, 读取峰面积, 以进样量 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标制作标准曲线, 结果见表 1。

2.6 精密度试验

取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录阿魏酸和藁本内酯 2 种成分峰面积值, 分别以峰面积计算其 RSD 值, 阿魏酸为 0.51%, 藁本内酯为 0.46%, 结果表明精密度良好。

2.7 稳定性试验

阿魏酸和藁本内酯对照品溶液密闭、避光于室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测定这 2 种成分峰面积值, 分别以峰面积计算其

RSD 值, 阿魏酸为 0.72%, 藁本内酯为 0.66%。取川芎粉末, 按 2.3 项下方法处理制得供试品溶液, 密闭、避光于室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、12、20、40 h 进样, 测定上述 2 种成分峰面积值, 分别以峰面积计算其 RSD 值, 阿魏酸为 1.86%, 藁本内酯为 1.00%。结果表明, 对照品溶液在室温避光放置 24 h 内稳定, 供试品溶液在室温避光放置 40 h 内稳定。

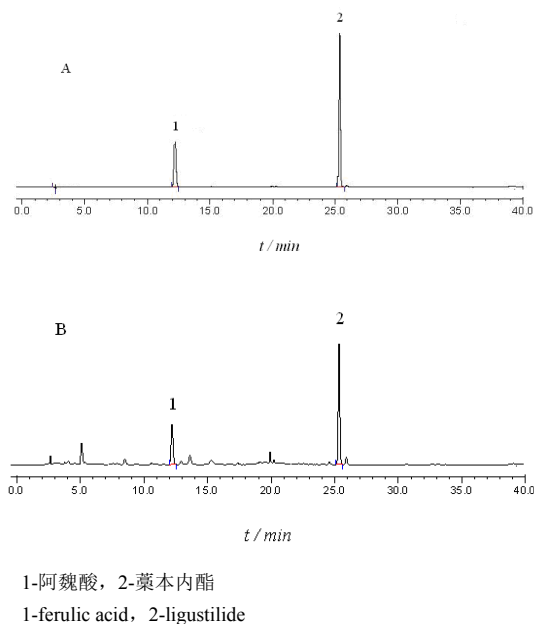


图 1 对照品 (A) 和川芎药材 (B) 色谱图
Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance(A) and *L. chuanxiong* Hort. (B)

表 1 回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Rregression equation, related coefficient and linear range

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
阿魏酸	$Y=5\ 036.9X+5.92$	0.999 9	0.034 96~0.524 4
藁本内酯	$Y=1\ 425.5X-5.56$	0.999 8	0.276 7~2.213 6

2.8 重复性实验

取川芎粉末, 精密称取 6 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 按 2.3 项下方法处理, 进行测定, 计算 2 种成分的质量分数。结果阿魏酸为 1.52 mg/g, 其 RSD 为 0.90%; 藁本内酯为 12.02 mg/g, 其 RSD 为 0.55%。结果表明, 重复性良好。

2.9 回收率实验

取已知质量分数的同批川芎粉末约 0.05 g, 精密称取 6 份, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 0.5 mL 阿魏酸对照品溶液 (0.174 8 mg/mL) 和 1.0 mL

藁本内酯对照品溶液 (0.553 4 mg/mL), 再精密加入 70% 甲醇 20 mL, 按 2.3 项下方法处理, 制备 6 份供试品溶液, 进样, 测定, 计算各成分的回收率。结果, 阿魏酸平均回收率为 99.81%, 其 RSD 为 1.32%; 藁本内酯平均回收率为 99.20%, 其 RSD 为

1.65%。结果表明, 加样回收率良好。

2.10 样品的测定

取购买的川芎样品, 按 2.3 项下方法制备, 进样 10 μ L 测定, 记录色谱图, 计算上述 2 种成分的质量分数, 结果见表 2。

表 2 川芎药材中阿魏酸和藁本内酯测定结果 ($n=2$)

Table 2 Determination of ferulic acid and ligustilide in *L. chuanxiong* Hort. ($n=2$)

批 号	来 源	购买时间	状 态	阿魏酸/(mg·g ⁻¹)	藁本内酯/(mg·g ⁻¹)
1	河北安国	2005 年	原药材	1.46	12.40
2	河北安国	2005 年	药材粉末 (放置 1 个月)	1.28	9.40
3	协和药店	2008 年	饮片	1.61	10.22
4	华丰药店	2008 年	饮片	1.57	10.01
5	安舜药店	2008 年	饮片	1.03	9.81
6	平湖药店	2008 年	饮片	1.48	8.65
7	敬一堂药店	2008 年	饮片	1.23	8.74
8	世纪三潭药店	2008 年	饮片	1.64	11.34
9	泰和鑫药店	2008 年	饮片	2.03	13.32
10	泰和鑫药店	2008 年	药材粉末 (放置 1 个月)	1.78	9.76
11	源盈药店	2008 年	饮片	1.20	10.61
12	天津饮片厂	2007 年	饮片	1.51	10.22
13	敬一堂药店	2004 年	饮片	1.11	7.00
14	世纪三潭药店	2004 年	饮片	1.01	6.57

3 讨论

3.1 色谱条件的选取与优化

分别以甲醇-磷酸水溶液、甲醇-冰醋酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-冰醋酸水溶液系统考察色谱分离能力, 结果, 以甲醇-0.05% 磷酸水溶液能达到较好的分离效果, 并且在同一色谱系统下, 采用梯度洗脱的方法首次实现了阿魏酸和藁本内酯的同时测定。

3.2 供试品溶液的制备方法考察

根据川芎药材所含的成分, 考察了不同浓度的甲醇、乙醇和甲醇-甲酸作为提取溶媒, 结果以 70% 甲醇为提取溶媒得到的阿魏酸的量较高, 几种溶剂的测定结果对藁本内酯的含量无明显差异; 另外, 同时比较了超声和回流的提取方法, 结果回流方法提取的量明显高于超声提取的方法。因此, 采用以 70% 甲醇回流提取 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

3.3 据文献报道, 阿魏酸和藁本内酯对照品均不稳定, 但是通过本实验研究发现, 在避光条件下, 这 2 种成分溶液的稳定性良好, 因此, 采用高效液相色谱法测定这 2 种成分成为可能, 并可为川芎和当归等含

有这 2 种成分的药材建立质量标准提供科学依据。

3.4 本试验的结果显示, 随着贮存时间的延长, 川芎药材中的阿魏酸和藁本内酯的量均会降低, 尤其是藁本内酯的量降低的非常明显, 这应该与药材在贮存中经常发生“泛油”的现象有关; 川芎药材以粉末状态放置 1 个月后藁本内酯会降低 20%~30%, 表面“泛油”的现象十分严重。因此, 建议在川芎的储藏过程中, 为保证药材质量, 避免药效成分的流失, 川芎药材不宜贮存时间过长, 更不能以粉末状态贮存备用, 应以非切片的原药材保存为最佳。

参考文献:

[1] 北京制药工业研究所. 川芎成分的化学研究[J]. 药学通报, 1980, 15(10):471.

[2] 北京制药工业研究所. 川芎有效成分研究[J]. 药学报, 1979, 14(11):670.

[3] 李章万, 张 强. 中药川芎中内酯类化合物的 GC-MS 分离及鉴定[J]. 药物分析杂志, 1993, 13(3):187-189.

[4] Natio T, Kubota K, Shimoda Y, *et al.* Effects of constituents in a Chinese crude drug, *Ligustici chuanxiong rhizoma* on vaso contraction and blood viscosity [J]. *Nat Med*, 1995, 49:288.