

HPLC 测定不同川芎药材中藁本内酯

汪程远^{1,2}, 张 浩^{1*}, 钱忠明²

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 香港理工大学 应用生物及化学技术系, 香港)

川芎为伞形科藁本属植物 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 具有行气活血、祛风止痛之功效, 为活血化瘀常用中药。川芎在中医中应用较广, 在中成药制剂中也有广泛使用。川芎所含的成分较为复杂, 有极性差异很大的各类成分, 其挥发油是川芎的主要有效部位, 而其中藁本内酯的量最高, 是公认的主要有效成分, 且有较强的药理作用^[1]。对各种川芎药材中藁本内酯的系统测定比较尚未见报道, 而以往报道^[2,3]中对藁本内酯的 HPLC 测定均采用内标法, 也未见用外标法测定的报道。因而本实验建立了 HPLC 的外标法, 测定了川芎道地产区——四川灌县各地产的不同采收时间的多批川芎药材以及不同川芎品种(山川芎、奶芎、日本川芎)中藁本内酯的量, 揭示了川芎药材中藁本内酯的变化规律, 为川芎的合理利用提供了依据。

1 仪器与试药

岛津 LC—10Avp 高效液相色谱仪(带有 LC—10AT 双泵、CTO—10A 柱温箱、SPD—10AV 检测器、SCL—10A 系统控制器、Class-vp 色谱工作站等)(日本岛津公司); KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。藁本内酯对照品(自制, GC 检测质量分数 > 99%); 甲醇、异丙醇为 HPLC 级; 二次重蒸水; 各种川芎药材(成都中医药大学贾敏如教授鉴定); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: 岛津 ODS-18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 甲醇-5% 异丙醇水溶液 (55 : 45); 检测波长为 280 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 ℃。在此条件下, 样品中的藁本内酯与其他峰均能达到基线分离, 其理论塔板数为 9 500, 藁本内酯与相邻后峰的分度为 2.8, 对称因子为 0.98。藁本内酯的保留时间为 22.1 min, 对照品和样品的色谱图见图 1。

2.2 标准曲线的制备: 精密称取藁本内酯对照品 5.5 mg, 加甲醇溶解定容至 10 mL。按上述色谱条

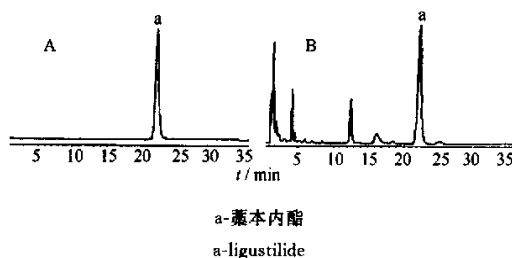


图 1 对照品(A)和川芎样品(B)色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and *L. chuanxiong* sample (B)

件, 分别进样 1、2、4、6、8、10 μL, 测定, 记录各自峰面积, 以对照品质量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 藁本内酯线性回归方程为: $Y = 3 \times 10^6 X - 1.07 \times 10^5$, ($r = 0.9997$)。结果表明: 藁本内酯的进样量在 0.55~5.5 μg 时与峰面积呈良好线性关系, 可用外标两点法计算质量分数。

2.3 样品溶液制备: 分别取各种川芎药材, 粉碎过 40 目筛, 精密称取 1 g 粉末, 分别加入 20 mL 甲醇, 超声提取 20 min, 滤过, 药渣再分别加甲醇(10、10 mL)按上述方法超声提取两次, 滤液滤过后合并, 甲醇定容至 50 mL, 备用。

2.4 精密度试验: 取同一样品溶液, 按上述色谱条件, 重复进样 5 次, 每次 5 μL, 测定藁本内酯峰面积, RSD 为 1.0%, 表明精密度良好。

2.5 稳定性试验: 取同一样品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h, 按上述色谱条件, 分别进样 5 μL, 测定藁本内酯峰面积, 其 RSD 为 1.7%, 表明样品溶液在至少 8 h 内稳定。

2.6 重现性试验: 分别称取 1 g 同一川芎药材粉末 5 份, 按样品溶液制备方法制备 5 份供试液, 按上述色谱条件, 分别各进样 5 μL, 测定藁本内酯峰面积, 并计算其量的 RSD 为 1.4%, 表明该分析方法的重现性良好。

2.7 回收率试验: 分别称取 0.5 g 同一川芎药材粉末 6 份, 分别定量加入藁本内酯对照品溶液(4.2

收稿日期: 2005-05-25

基金项目: 国家科技部重点科技攻关计划项目(99-929-02-08)

* 通讯作者 张 浩 Tel: (028) 85503037

mg/mL)各0.5、0.5、1.1、2.2 mL,按样品溶液制备方法制备加样回收供试品溶液,并按上述色谱条件进行测定,计算回收率,结果藁本内酯的平均回收率为99.2%,其RSD为1.1%。

2.8 样品测定:分别取各制备好的样品溶液,按上述色谱条件,进样5 μ L,测定,记录藁本内酯峰面积,重复测定3次,取平均值,计算各自藁本内酯的量,结果见表1。

表1 各种川芎中藁本内酯的量(n=3)

Table 1 Determination of ligustilide in various *L. chuanxiong* (n=3)

品 种	产 地	采收时间	藁本内酯/%
川 芎	都江堰徐渡乡徐渡村	02-05-30	0.888
	都江堰徐渡乡徐渡村	02-05-20	0.928
	都江堰徐渡乡马祖村	02-05-30	1.482
	都江堰徐渡乡马祖村	01-05-20	0.797
	都江堰徐渡乡马祖村	00-05-30	0.866
	都江堰民兴乡五桂村	02-05-30	1.121
	都江堰民兴乡五桂村	02-05-10	1.222
	都江堰民兴乡五桂村	01-05-30	0.730
	都江堰石羊镇金花村	02-05-20	1.156
	都江堰石羊镇金花村	01-05-20	0.698
	都江堰石羊镇	2001	0.838
	都江堰	1994	0.532
	彭州敖平	02-05-30	1.857
	彭州敖平(水洗法)	02-05-20	0.974
	彭州敖平	01-05-20	0.769
山川芎	彭州敖平	00-05-24	0.803
	彭州敖平	1999-05	0.498
	彭州敖平	1994	0.294
奶 芎	都江堰两河村	01-08-13	1.193
	汶川县水磨灯草坪	02-08-06	1.482
奶 芎	都江堰中药材公司	01-02-28	0.456
	彭州敖平	01-01-20	0.503
	成都荷花池市场	01-02-23	0.722
日本川芎	日本	1991	0.075
	四川洪雅	03-03-20	0.761
	日本	1993	0.106
	吉林延边	91-12-09	0.123
	吉林延边	91-08-26	0.059

3 讨论

3.1 实验在建立HPLC方法时,对检测波长的确定、流动相的选择、柱温和不同色谱柱等进行了系统考察,最终选择了本实验的色谱条件,并通过对其柱效、分离度、对称因子及方法学的考察,证实所选的色谱系统适用性好,结果可靠。本方法简便、准确、重现性好,完全适用于藁本内酯的测定,并为川芎以及含藁本内酯药材的测定提供了典范。

3.2 在HPLC流动相的选择中,比较了甲醇-水与乙腈-水的不同比例,发现藁本内酯由于极性太小易在柱上滞留不易洗脱,在流动相中加入氯仿^[2]或异丙醇^[3]可提高洗脱力,并阻止其在柱上滞留,适当保

护柱子,因而试验了甲醇(1% CHCl₃)-水(CHCl₃饱和)、乙腈(1% CHCl₃)-水(CHCl₃饱和)、乙腈-10%异丙醇、乙腈-5%异丙醇系统的不同比例,发现这些系统中藁本内酯相邻峰难达基线分离;又比较甲醇-10%异丙醇与甲醇-5%异丙醇系统,发现藁本内酯与相邻峰能达基线分离,但甲醇-5%异丙醇系统的分离度与柱效比甲醇-10%异丙醇好,因而选用甲醇-5%异丙醇系统,最终确定甲醇-5%异丙醇(55:45)为流动相。

3.3 大量实验研究报道^[4-7]藁本内酯纯品的稳定性较差,特别是在室温下放置极易异构化。但本实验通过反复摸索后,发现藁本内酯在甲醇中稳定性良好,从而使用外标法来测定藁本内酯成为可能,因而选用甲醇为提取溶剂。

3.4 藁本内酯作为川芎中量最高的主要有效成分,直接反应川芎药材的质量。传统观点认为川芎药材中本身含有一定比例的各种内酯成分,使其量最高的藁本内酯的异构化反应趋于平衡,从而使药材中藁本内酯量基本稳定。但本实验的测定结果发现各种川芎药材随着采收后放置时间的延长,藁本内酯的量有逐渐降低的趋势,这可能是由于在放置过程中藁本内酯缓慢异构化为其他内酯成分所造成的(此将另文报道),这为川芎的合理利用和开发提供了有力的理论依据,因而建议川芎在采收后不易放置太久时间后再使用。

3.5 实验发现山川芎和川芎中藁本内酯量相似,奶芎中量则低一些,说明山川芎在某种程度上可代替川芎使用,而奶芎则不可,这与山川芎与奶芎的民间使用是相符合。而日本川芎中藁本内酯量明显低很多,其量的显著差别说明了其药理药效必定有差别,这从成分方面揭示了川芎与日本川芎种属的不同,为日本川芎与川芎在临床上的区别应用提供了有力证据。

致谢:川芎药材大部分由成都中医药大学的贾敏如教授提供。

References:

- [1] Shi L F, Zheng X M. Comparison of influence of essential oil from *Ligusticum chuanxiong* Hort. on microcirculation in rabbit conjunctive bulbar before and after decomposition of ligustilide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1995, 9 (2): 157-158.
- [2] Wu G T, Shi L F, Hu P H, et al. The determination of ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* Hort. By supercritical fluid extraction [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33 (6): 457-460.
- [3] Zhang J L, He X F, Zhou Z H. HPLC Determination of five constituents in plants of genus *Ligusticum* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31 (8): 622-625.

- [4] Shi L F, Deng Y Z, Wu B S. Studies on chemical constituents and their stability of the essential oil from dry rhizome of *Ligusticum chuansiong* Hort. [J]. *China J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15 (3): 26-30.
- [5] Li H, Wang Y T. Influencing factor of the stability of ligustilide and means of stabilization [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 2003, 15 (1): 56-57.
- [6] Lin L Z, He X G, Lian L Z, et al. Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide [J]. *J Chromat A*, 1998 (810): 71-79.
- [7] Li G S, Ma C J, Li X Y. Studies on the stability ligustilide and the analysis of its isomerized products by GC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (6): 405-407.

天津地区黄花蒿中青蒿素测定

齐向娟, 李士雨, 何玉娟

(天津大学化工学院, 天津 300072)

黄花蒿又名青蒿, 为菊科植物 *Artemisia annua* L. 的干燥全草, 20 世纪 70 年代我国学者从中分离得到的青蒿素 (artemisinin) 是我国唯一得到国际承认的抗疟新药^[1]。

目前, 商用的青蒿素主要来自植物提取物。除黄花蒿外, 尚未发现含有青蒿素的其他天然植物资源。黄花蒿虽然系世界广布种, 但青蒿素量随产地不同差异极大。据迄今的研究结果, 除我国重庆东部、福建、广西、海南部分地区外, 世界绝大多数地区生产的黄花蒿中的青蒿素的量都很低 (不足 0.1%), 无生产价值, 使得青蒿素的天然资源相对匮乏^[2]。天津地区黄花蒿资源丰富, 但至今仍未得到开发利用。本实验对天津地区黄花蒿植物资源的青蒿素的量进行了定量测定, 力求真实客观地反映药材的质量, 同时为该地区黄花蒿的开发利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器及试剂: 仪器包括 XF-20C 型粉碎机 (振兴机电仪器厂); DEG-403 型电热真空干燥箱 (天津市天宇实验仪器有限公司); AL204 型分析天平 (上海梅特勒仪器有限公司); RE52AA 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 90-3 型定时恒温双向磁力搅拌器 (上海亚荣生化仪器厂); 2XZ-1 型真空泵 (浙江黄岩求精真空泵厂); UV9100 型紫外分光光度计 (北京瑞丽分析仪器有限公司)。主要试剂有石油醚 (30~60 °C)、乙醇、氢氧化钠, 均为分析纯; 青蒿素对照品 (质量分数 99%, 昆明同持医药研究有限公司提供)。

1.2 试药: 实验所用黄花蒿植株 8 月份采自天津市武清区, 野生, 经北京中医药研究院附属医院孟广义

主任药师鉴定为菊科植物黄花蒿 *A. annua* L. 的地上干燥全草。将干黄花蒿样品用粉碎机粉碎后, 过筛, 制成黄花蒿粉末, 置于干燥器 (40~60 °C) 备用。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 精确称取 80 °C 干燥至恒重的青蒿素对照品 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 用 95% 乙醇稀释至刻度。分别吸取 0.2、4、6、8、10 mL 于 50 mL 量瓶中, 以 95% 乙醇补充至 10 mL, 补加 0.2% NaOH 溶液至刻度, 置 50 °C 水浴中反应 30 min, 流水冷却至室温。

取 10 mL 95% 乙醇置于 50 mL 量瓶中, 补加 0.2% NaOH 溶液至刻度配置空白溶液。

2.2 供试品溶液的制备: 将干黄花蒿样品粉碎后, 过筛, 制成青蒿粉末。称取经干燥的黄花蒿样品粉末 1.0804 g, 置于 250 mL 索氏提取器中, 加入 60 mL 石油醚 (30~60 °C) 浸渍 4 h, 50 °C 恒温水浴提取至无色 (48 h)。提取液抽滤, 滤液置于分液漏斗中, 加入 2% NaOH 溶液洗去碱溶性部分, 弃去下层碱液后, 以蒸馏水洗涤至中性。经水洗后的提取液置于茄形烧瓶中 50 °C 旋转蒸发, 得到含青蒿素的浸膏, 再以 95% 乙醇溶解浸膏, 并定容于 100 mL 量瓶中备测。量取样液 5 mL 于 50 mL 量瓶中, 补充 95% 乙醇至 10 mL 后, 加入 0.2% NaOH 溶液至刻度。50 °C 水浴中反应 30 min 后取出, 流水冷却至室温作为供试品溶液。

2.3 测定波长的选择: 青蒿素紫外无吸收峰, 其乙醇溶液与 0.2% NaOH 溶液反应后产生具有紫外吸收的化合物 (α, β -不饱和酮酸盐)。取 2.1 制备的 1 mg/mL 对照品溶液, 测定其紫外光谱图 (260~340