

洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的降解产物研究

左爱华, 王 莉, 肖红斌*

中国科学院大连化学物理研究所 分离分析重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要:目的 考察影响洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 稳定性的因素, 分离和鉴定其室温自然光照条件下放置 2 个月后的降解产物, 并推测其可能降解途径。方法 半制备 HPLC 分离制备降解产物, UV、MS 和 NMR 鉴定结构。结果 氧是影响洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 稳定性的主要因素, 室温自然光照 2 个月后, 洋川芎内酯 A 通过脱氢反应完全转化为丁基苯酐; 洋川芎内酯 I 通过异构化反应部分转化为其同分异构体 (*E*)-6, 7-反式-双羟基藁本内酯。结论 洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 要尽量保存在低温、避光和无氧环境中, 以保持其稳定性。

关键词: 川芎; 洋川芎内酯 A; 洋川芎内酯 I; 降解产物; (*E*)-6, 7-反式-双羟基藁本内酯; 丁基苯酐

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)11-2127-05

Study on degradation products of senkyunolide A and senkyunolide I

ZUO Ai-hua, WANG Li, XIAO Hong-bin

Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Objective To investigate the factors influencing the stability of senkyunolide A and senkyunolide I, then to isolate and identify the degradation products stored at room temperature under direct sunlight for 2 months. The possible degradation pathways were proposed. **Methods** Semi-preparative HPLC was employed to isolate the degradation products. UV, MS, and NMR were used for the structure elucidation. **Results** Oxygen is the major factor influencing the stability of senkyunolide A and senkyunolide I. Under the conditions mentioned above, senkyunolide A was completely transferred into butylphthalide through dehydrogenation, while senkyunolide I was partly transferred into its isomer (*E*)-6, 7-transdihydroxyligustilide through isomerization after direct sunlight for 2 months. **Conclusion** To keep their stability, senkyunolide A and senkyunolide I should be stored at low temperature condition without light and oxygen.

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; senkyunolide A; senkyunolide I; degradation products; (*E*)-6, 7-transdihydroxyligustilide; butylphthalide

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 为活血化瘀常用中药。化学成分主要包括苯酐类、少量的酚酸类和生物碱类^[1]。《中国药典》2010 年版中以阿魏酸作为其质量控制的指标, 但是阿魏酸质量分数最高仅为 0.9 mg/g^[2], 也存在于其他中药中, 无法准确控制川芎的质量。而川芎中苯酐类成分质量分数高达 20 mg/g, 是其主要有效成分, 具有扩张血管、解痉平喘、镇痛及抗肿瘤等作用^[3]。其中藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 作为主要苯酐类成分, 受到越来越多的关注^[4-5]。但苯酐类成分多为油状, 容易通过氧化、

水解、光解和异构化等反应发生结构改变^[6]。目前对藁本内酯稳定性的研究比较广泛, 包括影响因素的考察^[7]、异构化产物的分析^[8]等, 而对洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的研究未见报道。为了更好地储存并控制其质量, 有必要对其稳定性及转化产物进行系统分析。本实验考察影响洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 稳定性的因素, 并对其在室温自然光照下的降解产物进行分离和结构鉴定, 推测其可能的降解途径。

1 仪器与材料

Bruker 500 MHz 核磁共振仪; Waters 600E 制备

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973873)

作者简介: 左爱华 (1984—) 女, 山东临沂人, 博士研究生, 主要从事天然产物的分离制备及药物体内过程研究。

Tel: (0411)84379907 E-mail: zuoaihua@dicp.ac.cn

*通讯作者 肖红斌 Tel/Fax: (0411)84379756 E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn

型高效液相色谱仪; Waters 2690 高效液相色谱仪 (包括四元梯度泵, 真空脱气机, 自动进样器, 柱恒温系统); Waters 996 二极管阵列检测器; Millennium 32 色谱工作站; Finnigan TSQ 三级四极杆质谱仪 (美国 Thermo 公司), 带有 ESI 源和 Xcalibur 1.0 工作站。乙腈 (色谱纯, Fisher Chemicals 公司); 甲醇 (色谱纯, 中国禹王公司); 冰醋酸 (色谱纯, 天津科密欧试剂); Millipore 超纯水 (美国 Millipore 公司)。

川芎购于四川成都, 由四川中医药科学院易进海教授鉴定为伞形科植物 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 干燥根茎。洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 由本实验室从川芎中分离制备得到, 经 HPLC 面积归一化, 质量分数均在 95% 以上。

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 分析色谱条件 Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, B 为超纯水, 梯度洗脱程序: 0~5 min, 5%~10% A; 5~45 min, 10%~70% A; 45~60 min, 70%~100% A, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm。

2.1.2 制备色谱条件 色谱柱 Chromatorex C₁₈ (250 mm×20 mm, 10 μm), 流动相为甲醇和水, 体积流量 15 mL/min, 检测波长 280 nm。

2.1.3 质谱条件 电喷雾电离 (ESI) 接口, 正离子全扫描检测, 扫描范围 m/z 100~1 000, 加热毛细管温度 320 °C, 雾化电压为 4.2 kV, 吹扫气压力为 27.9 kPa, 辅助气为 20 AU。

2.2 不同条件对洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 质量分数的影响

分别称取洋川芎内酯 A 17.32 mg 和洋川芎内酯 I 140.67 mg, 用甲醇定容至 25 mL, 分别取 1 mL 置

于瓶中, 考察密闭、不密闭条件下避光、自然光照和强光对其稳定性影响。恒温加速试验分别在 40、60、80 °C 密闭条件下进行, 于 0、2、3、4、5、6、7、8、9 h 测定其质量分数。

2.3 降解样品的制备

分别称取洋川芎内酯 A 34 mg 和洋川芎内酯 I 1.40 mg, 置于室温自然光照处, 2 个月后上述样品经甲醇溶解后进行 HPLC-MS 分析。

3 结果

3.1 不同条件下洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 质量分数的变化

以 0 h 测定量为 100%, 计算 5 d 后密闭、不密闭时避光、自然光照和强光条件下质量分数的经时变化 (表 1)。密闭条件下 5 d 后, 光照对洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的质量分数基本无影响。而不密闭条件下 5 d 后, 洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的质量分数均有所下降, 且光照越强, 质量分数越低, 这可能是光照、氧、挥发性等因素综合作用的结果。

图 1 表示洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 在不同温度下不同时间的质量分数变化, 以 0 h 的测定量为 100%, 可见洋川芎内酯 A 在 40 °C 密闭条件下稳定存在, 质量分数基本不变; 在 60 °C 下 6 h 内较

表 1 不同条件下洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的质量分数
Table 1 Determination of senkyunolide A and senkyunolide I under different conditions

条 件	洋川芎内酯 A / %	洋川芎内酯 I / %
避光	密闭	99.70
	不密闭	86.91
自然光照	密闭	99.71
	不密闭	80.17
强光	密闭	98.57
	不密闭	73.13

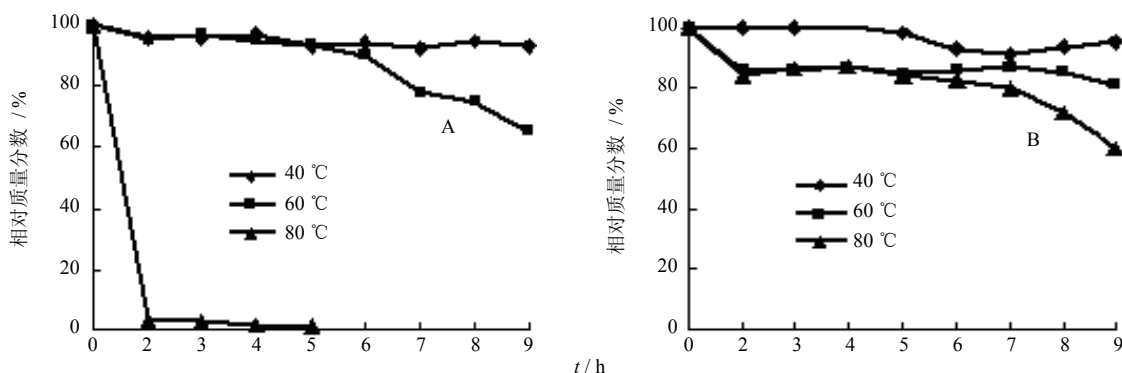


图 1 洋川芎内酯 A (A) 和洋川芎内酯 I (B) 不同温度、时间质量分数变化

Fig. 1 Content changes of senkyunolide A (A) and senkyunolide I (B) at different temperatures and time

稳定性, 质量分数变化不大, 然后质量分数略有下降; 在 80 °C 不稳定, 2 h 质量分数急速下降。而洋川芎内酯 I 在不同温度时间下质量分数变化不大, 在 80 °C 7 h 后质量分数有所下降。

综上可见, 在密闭条件下, 光照和温度低于 60 °C 对其影响不大, 而不密闭时, 光照对其影响较大, 说明空气中的氧是影响其稳定性的主要因素, 在有氧条件下, 光照和温度均能加速其降解。

3.2 洋川芎内酯 A 降解产物的结构鉴定

洋川芎内酯 A 及其室温自然光照 2 个月后的样品的 HPLC 图见图 2。2 个月后, 洋川芎内酯 A 的色谱峰 (保留时间 39.70 min) 已经完全消失, 主要转化为与其保留时间 (40.55 min) 相近的新化合物的色谱峰, 经 HPLC 峰面积归一化, 新化合物色谱峰面积占 90%, 说明洋川芎内酯 A 已经完全转化, 新化合物是主要的转化产物。

洋川芎内酯 A 和新化合物紫外吸收光谱不同, 紫外最大吸收波长分别为 280.6、273.5 nm, 且后者呈现小的双峰 (图 3)。

正离子检测模式下, 一级质谱图中 (图 4) 新化合物有准分子离子峰 m/z 191 $[M+H]^+$ 和强的加合离子峰 m/z 232 $[M+H+CH_3CN]^+$, 据此推断该化合物的相对分子质量为 190, 比洋川芎内酯 A 的相

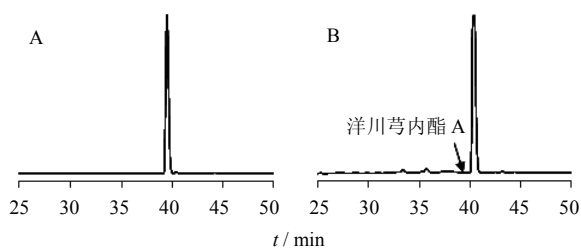


图 2 洋川芎内酯 A (A) 及其室温自然光照 2 个月后的样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of senkyunolide A (A) and sample kept at room temperature under sunlight for 2 months (B)

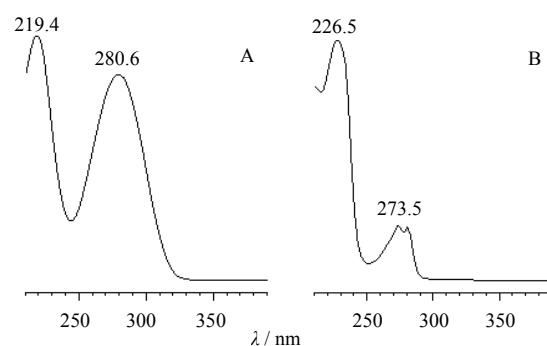


图 3 洋川芎内酯 A (A) 和新化合物 (B) 的紫外光谱图
Fig. 3 UV spectra of senkyunolide A (A) and new compound (B)

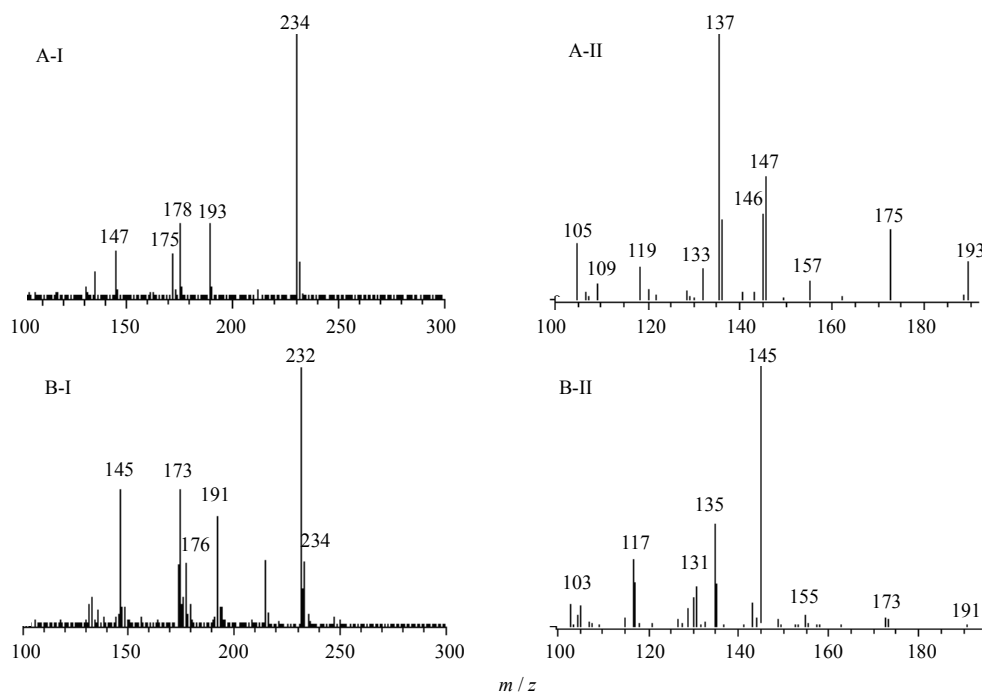


图 4 洋川芎内酯 A (A) 和新化合物 (B) 的一级 (I)、二级 (II) 质谱图
Fig. 4 MS (I) and MS² (II) spectra of senkyunolide A (A) and new compound (B)

对分子质量 192 小 2。二级质谱图中, 存在 m/z 173 $[M+H-H_2O]^+$ 、145 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、135 $[M+H-C_4H_8]^+$ 和 117 $[M+H-C_4H_8-H_2O]^+$ 等碎片离子峰。由图可见, 新化合物同洋川芎内酯 A 有类似质谱碎裂规律, 推测其为丁基苯酞, 经过与丁基苯酞对照品对比, 确定该化合物为丁基苯酞。与洋川芎内酯 A 对比, 丁基苯酞含有相对稳定的苯环结构, 表明洋川芎内酯 A 含有的不饱和环, 易于通过脱氢反应形成更加稳定的苯环结构。洋川芎内酯 A 的降解途径见图 5。

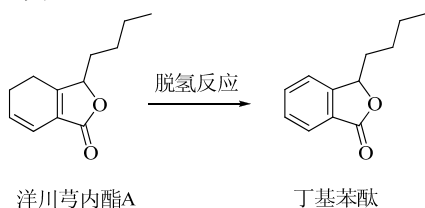


图 5 洋川芎内酯 A 的降解途径

Fig. 5 Degradation pathway of senkyunolide A

3.3 洋川芎内酯 I 降解产物的结构鉴定

在室温自然光照 2 个月后的洋川芎内酯 I 的 HPLC 图中 (图 6), 不仅存在洋川芎内酯 I 的色谱峰 (保留时间 23.41 min), 还出现 1 个新的色谱峰 (保留时间 22.29 min), 其紫外光谱与洋川芎内酯 I 稍有不同, 最大紫外吸收波长是 278.2 nm (图 7)。经 HPLC 峰面积归一化, 新化合物色谱峰面积占 20%, 洋川芎内酯 I 峰面积占 75%, 表明 20% 洋川芎内酯 I 已经转化为新的化合物。新化合物同洋川芎内酯 I 的一级、二级质谱图相似, 都存在强的 m/z 207 $[M+H-H_2O]^+$ 和 248 $[M+H-H_2O+CH_3CN]^+$, 以及 m/z 189 $[M+H-2H_2O]^+$ 、165 $[M+H-H_2O-C_3H_6]^+$ 、145 $[M+H-2H_2O-CO]^+$ 等特征碎片离子, 表明新化合物是洋川芎内酯 I 的同分异构体。

在此基础上, 考察放置室温自然光照 5 个月后

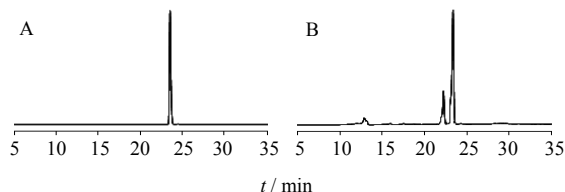


图 6 洋川芎内酯 I (A) 及其室温自然光照 2 个月后的样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chromatograms of senkyunolide I (A) and sample kept at room temperature under sunlight for 2 months (B)

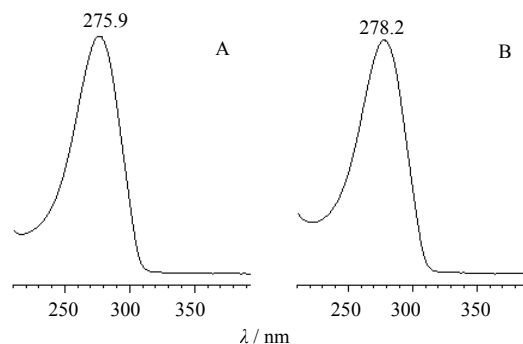


图 7 洋川芎内酯 I (A) 和新化合物 (B) 紫外光谱图

Fig. 7 UV spectra of senkyunolide I (A) and new compound (B)

的洋川芎内酯 I 的 HPLC 图, 经 HPLC 峰面积归一化, 新化合物峰面积由 2 个月时 20% 仅仅变为 30%, 说明洋川芎内酯 I 的转化过程比较缓慢, 由于两者是同分异构体, 初步推断洋川芎内酯 I 只能部分转化为其同分异构体。

由于 UV、MS 和 MS^2 无法准确鉴定该降解产物, 分离纯化后进行核磁共振。取一定量洋川芎内酯 I 置于室温自然光照下 3 个月后用于降解产物的制备, 采用半制备 HPLC 进行分离纯化。由于洋川芎内酯 I 与其降解产物为同分异构体, 保留时间比较接近, 优化流动相条件, 最后采用甲醇-水 (50:50) 为流动相进行制备, 多次进样, 收集所在部位洗脱液, 减压浓缩后得到化合物, 经 HPLC 峰面积归一化, 质量分数在 95% 以上。

洋川芎内酯 I 和新化合物的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据见表 2。同洋川芎内酯 I 相比, 除 4 位和 10 位的氢谱、碳谱位移值相差较大外, 其他数据均非常相似。结合文献, 推断降解产物为 (*E*)-6, 7-反式-二羟基萆本内酯^[9]。洋川芎内酯 I 的降解途径见图 8。

4 讨论

本实验先考察空气中的氧、光照和温度对洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 稳定性的影响, 在无氧条件下, 光照和温度对其稳定性影响不大, 说明可以保存在正常温度中。但是在有氧的条件下, 光照及随之升高的温度对其稳定性影响较大, 说明氧是影响其稳定性的主要因素, 光照和温度能加速有氧条件下洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 降解。因此对洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 要尽量保存在低温和避光环境中, 并尽可能地避免氧的影响。而对中药川芎的保存也可参照此条件, 尽量避免空气中氧的影响, 能减少其化学成分的降解。

表2 洋川芎内酯 I 和新降解产物的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据
Table 2 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data for senkyunolide I and new degradation products

碳位	洋川芎内酯 I		新降解产物	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	—	169.1	—	168.6
3	—	152.8	—	150.8
4	2.45~2.59 (2H, m)	19.1	2.67~2.82 (2H, m)	22.9
5	1.85~1.93 (1H, m)	26.6	1.87~1.94 (1H, m)	27.2
	2.08~2.10 (1H, m)		2.12~2.17 (1H, m)	
6	3.98 (1H, brs)	71.7	3.93 (1H, m)	71.4
7	4.48 (1H, brs)	67.8	4.49 (1H, brd, $J = 6.1$ Hz)	68.5
8	—	125.9	—	128.3
9	—	148.0	—	147.6
10	5.25 (1H, t, $J = 7.9$ Hz)	114.3	5.80 (1H, t, $J = 8.6$ Hz)	118.3
11	2.35 (2H, q, $J = 7.5$ Hz)	28.1	2.31 (2H, q, $J = 7.7$ Hz)	28.0
12	1.49 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz)	19.1	1.53 (2H, sext, $J = 7.3$ Hz)	23.0
13	0.95 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)	13.8	0.97 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)	13.7

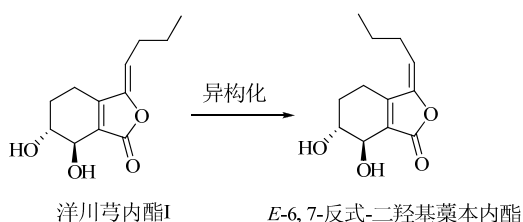


图8 洋川芎内酯 I 的降解途径
Fig. 8 Degradation pathway of senkyunolide I

另外,对室温自然光照下的降解产物进行分离制备和结构鉴定,可以看出,室温自然光照2个月后,洋川芎内酯 A 已经完全转化为相对稳定的丁基苯酞。而丁基苯酞目前已经开发为临床用于治疗脑血管疾病的新药,这同川芎传统的临床用药具有一定的相关性,但由于洋川芎内酯 A 的药理研究相对较少,目前还无法比较洋川芎内酯 A 与其转化产物丁基苯酞的药理活性。而洋川芎内酯 I 由于六元环上不存在双键,相对比较稳定,仅有部分转化为其同分异构体,且转化过程缓慢,5个月后也无法完全转化,经进一步的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 鉴定,确定其同分异构体为 (E)-6,7-反式-二羟基茺本内酯,而对于这两者药理活性的研究也在进行中。针对目前川芎化学成分不稳定及不能准确控制其质量的问题,可以考虑通过测定苯酞类成分总量的方法来控制川芎中苯酞类成分,至于不同苯酞类成分转化后化合物的活性大小,还有待进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1997.
- [2] Li T, Leung K S, Lu G H, *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative analyses of the major constituents in the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* using HPLC-DAD-MS [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(2): 255-259.
- [3] 孙广平. 川芎内酯类成分制备工艺与分析方法研究 [D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [4] Chan S S, Cheng T Y, Lin G. Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111(3): 677-680.
- [5] Wang Y H, Liang S, Xu D S, *et al.* Effect and mechanism of senkyunolide I as an anti-migraine compound from *Ligusticum chuanxiong* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(2): 261-266.
- [6] 李其生, 姚松琳. 苯酞类成分的研究进展 [J]. 江西医学院学报, 1996, 8(1): 46-47.
- [7] Cui F, Feng L, Hu J. Factors affecting stability of Z-ligustilide in the volatile oil of *Radix Angelicae Sinensis* and *Ligusticum chuanxiong* and its stability prediction [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2006, 32(6): 747-755.
- [8] 李桂生, 马成俊, 李香玉, 等. 茺本内酯的稳定性研究及异构化产物的 GC-MS 分析 [J]. 中草药, 2000, 31(6): 405-407.
- [9] 路新华, 梁鸿, 赵玉英. 当归中茺本内酯类化合物的分离和结构鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(5): 423-425.