

新老产地川芎中 3 种内酯成分的含量测定

银玲, 彭月, 陈鸿平, 刘荣, 樊丹青, 刘友平*

(成都中医药大学药学院 中药资源系统研究与
开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立同时测定川芎中主要内酯成分(洋川芎内酯 A、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯)的方法, 比较新老产地川芎药材中 3 种内酯成分的含量差异。方法: 采用单因素考察同时提取 3 种内酯成分的最佳条件, 采用反相高效液相色谱法测定 3 种内酯成分含量。结果: 新老产地川芎中 3 种内酯成分含量差异较大, 其中差异最大为阿魏酸松柏酯, 其次是洋川芎内酯 A、藁苯内酯。通过聚类分析发现 3 种内酯成分没有地域分布规律。结论: 所建立的方法操作简便、灵敏快速、重复性好, 可用于川芎药材的质量控制; 新老产地川芎的内酯含量比较为川芎的引种栽培、品质评价供依据。

[关键词] 川芎; 洋川芎内酯 A; 阿魏酸松柏酯; 藁苯内酯; 新老产地

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)07-0120-04

[doi] 10.11653/zgsyxfjxzz2013070120

Determination and Comparison of the Three Lactones in *Rhizoma Ligusticum chuanxiong* from New and Traditional Producing Areas

YIN Ling, PENG Yue, CHEN Hong-ping, LIU Rong, FAN Dan-qing, LIU You-ping*

(Department of Pharmacy, Chengdu University of Tradition Chinese Medicine, Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines Co-constructed by the Ministry of Science and Technology of the PRC and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of determining the main lactones (senkyunolide A, coniferyl ferulate and ligustilide) in *Ligusticum chuanxiong* simultaneously, and to compare the content of them in *L. chuanxiong* from new and traditional producing areas. **Method:** The optimum condition of extracting three lactones was confirmed by single factor experiments. The content of the three was determined by RP-HPLC. **Result:** The content of the three lactones had significant differences between new and traditional producing areas, of which coniferyl ferulate was the most different, then senkyunolide A and ligustilide. Clustering analysis showed that there were no geographical distribution laws of the three lactones. **Conclusion:** The method was simple for operation, sensitive with good reproducibility and can be used for quality control of *L. chuanxiong*. The comparison of the three lactones from new and traditional producing areas can provide theoretical basis for introduction cultivation and quality evaluation of *L. chuanxiong*.

[Key words] *Ligusticum chuanxiong*; senkyunolide A; coniferyl ferulate; ligustilide; new and traditional producing areas

[收稿日期] 20121015(010)

[基金项目] 四川省教育厅科技支撑计划项目(2011SZ0068)

[第一作者] 银玲, 在读硕士研究生, 从事中药化学成分与质量标准化研究. Tel: 13880634702, E-mail: yinling81819@163.com

[通讯作者] * 刘友平, 研究员, 博士生导师, 从事中药质量标准化及药效物质基础研究, Tel: 028-61800158, E-mail: liuyou_ping@yeah.net

川芎是伞形科植物川芎的干燥根茎,具有活血行气、祛风止痛之功效,主要含挥发油类、内酯类、酚酸类、生物碱类等多种成分^[1-2]。川芎内酯类属于苯酞衍生物,是川芎药材的重要有效成分,现代药理研究表明洋川芎内酯 A 具有抑制血栓形成、增加脑部血流量、减少脑血管阻力等作用^[3];阿魏酸松柏酯具有抑菌、抗氧化、舒张血管等作用^[4],藁苯内酯具有镇痛抗炎、解痉、镇定、平喘作用,同时对心脑血管、循环系统等也有一定活性^[5]。2010年版《中国药典》一部川芎^[6]项下,仅以阿魏酸作为含量测定指标成分,很难全面反应川芎药材质量。但由于内酯类成分性质不稳定,对内酯成分研究尚不够深入,有关川芎内酯类成分的定量分析报道较少^[7-10],所以尚未将内酯成分作为川芎质控指标。本试验在自制藁苯内酯对照品的基础上,同时买了洋川芎内酯 A 对照品、阿魏酸松柏酯对照品,采用反相高效液相色谱法,建立了同时测定3种内酯类化合物的含量测定方法。通过比较四川都江堰、新都、彭州(川芎传统产地)和彭山、什邡(川芎新产地)的25批药材中3种内酯成分含量,比较川芎新老产地药材品质差异,为川芎引种栽培提供参考。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪岛津 LC-20A、SPD-20A 检测器、CTO-20A 柱温箱、SIL-20A 自动进样器;色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特分析仪器有限公司), BP211D (1/10 万)、BP121S (1/万) 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

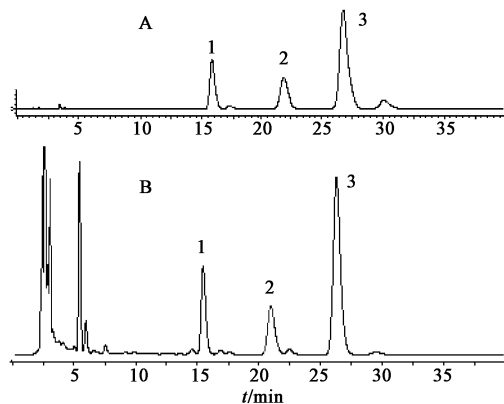
1.2 试剂 藁苯内酯对照品(自制,经 HPLC 检测纯度 >98%)洋川芎内酯 A 对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 110629,经 HPLC 检测纯度 >98%);阿魏酸松柏酯对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 111024,经 HPLC 检测纯度 >98%);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 样品 药材采自新老产地,共计 25 批,经成都中医药大学标本馆卢先明教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特分析仪器有限公司),流动相甲醇-水(55-45),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,检测时间 40 min。洋川芎内酯 A、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯的检测波长分别为 281,

299, 320 nm。对照品溶液、样品溶液的色谱图见图 1。



1. 洋川芎内酯 A; 2. 阿魏酸松柏酯; 3. 藁苯内酯

A. 混合对照品; B. 样品

图 1 HPLC (281 nm)

2.2 对照品溶液的制备 取藁苯内酯对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升含藁苯内酯 0.440 0 mg 的对照品溶液。取洋川芎内酯 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升含洋川芎内酯 A 0.239 0 mg 的对照品溶液。取阿魏酸松柏酯对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升含阿魏酸松柏酯 0.800 0 mg 的对照品储备液,取对照品储备液稀释 4 倍,制成每毫升含阿魏酸松柏酯 0.200 0 mg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 经单因素试验考察乙醇体积分数、液固比、超声时间对 3 种内酯成分提取率的综合影响,确定其供试品溶液制备方法为:取药材粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声 45 min,放冷,用乙醇补重,摇匀,静置,取上清液,滤过,取续滤液,即得。

2.4 标准曲线绘制 在上述色谱条件下,分别精密吸取 3 种对照品溶液 3, 5, 8, 10, 12, 15 μL 进样,记录各自峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,对照品含量为横坐标,绘制标准曲线,洋川芎内酯 A、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯的回归方程分别为 $Y = 1 \times 10^6 X - 146\ 516$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 1 \times 10^6 X - 74\ 296$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 1 \times 10^6 X - 272\ 819$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明洋川芎内酯 A、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯含量分别在 0.717 ~ 3.585, 0.600 ~ 3.000, 1.320 ~ 6.600 μg 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取 3 种内酯对照品溶液,各重复进样 6 次,每次 10 μL,计算洋川芎内酯、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯峰面积积分值的 RSD 分别为

0.662% ,0.779% ,0.604% ,表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取川芎药材粉末约 0.5 g,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,室温放置,在 0,2,4,8,16,20 h 分别进样 10 μL ,计算洋川芎内酯、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯峰面积积分值的 RSD 分别为 1.055% ,2.269% ,1.327% ,表明样品溶液在 20 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验 取川芎药材粉末 0.5 g,精密称取 6 份,分别按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,计算洋川芎内酯 A、阿魏酸松柏酯、藁苯内酯含量的 RSD 分别为 2.844% ,2.638% ,2.298% ,表明方法重复性较好。

2.8 回收率试验 取已知含量的同批药材粉末 6 份,每份 0.25 g,精密称定,精密加入洋川芎内酯 A 对照品 2.15 mg,阿魏酸松柏酯对照品储备液 1.9 mL,藁苯内酯对照品 10.68 mg,分别按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表 1~3。

表 1 洋川芎内酯 A 加样回收率

No.	取样量 /g	样品含有量 /mg	标样加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	$\bar{x}/\%$	RSD /%
1	0.249 6	2.154 1	2.15	4.280 2	98.89	99.64	1.012
2	0.251 2	2.167 9	2.15	4.301 2	99.22		
3	0.250 6	2.162 8	2.15	4.329 7	100.79		
4	0.251 7	2.172 2	2.15	4.324 8	100.12		
5	0.250 1	2.158 4	2.15	4.270 6	98.24		
6	0.251 5	2.170 5	2.15	4.332 4	100.55		

表 2 阿魏酸松柏酯加样回收率

No.	取样量 /g	样品含有量 /mg	标样加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	$\bar{x}/\%$	RSD /%
1	0.249 6	1.508 4	1.52	3.012 1	98.93	97.59	1.794
2	0.251 2	1.518 0	1.52	3.005 6	97.87		
3	0.250 6	1.514 4	1.52	2.973 4	95.99		
4	0.251 7	1.521 0	1.52	2.965 2	95.01		
5	0.250 1	1.511 4	1.52	3.024 9	99.57		
6	0.251 5	1.519 8	1.52	3.011 8	98.16		

2.9 样品含量测定 按 2.3 所述方法制备供试品溶液,照上述色谱条件测定峰面积,按外标一点法计算 3 种内酯成分含量,结果见表 4。

3 讨论

3.1 供试品制备方法选择 先后采用回流提取法

表 3 藁苯内酯加样回收率

No.	取样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.249 6	10.658 4	21.398 5	100.56	98.77	1.554
2	0.251 2	10.726 7	21.331 9	99.30		
3	0.250 6	10.701 1	21.294 3	99.19		
4	0.251 7	10.748 1	21.018 6	96.17		
5	0.250 1	10.679 7	21.309 5	99.53		
6	0.251 5	10.739 5	21.194 1	97.89		

注:加入量均为 10.68 mg

和超声提取法,但经回流提取法时,3 种内酯成分大量减少,表明 3 种内酯成分对热不稳定,因此选用超声提取法。结合内酯成分化学性质,选择了甲醇、乙醇两种溶媒,发现两者无显著性差异,考虑安全、绿色、经济因素,故选用了乙醇作为提取溶媒。其次对影响提取率的乙醇体积分数、液固比、超声时间分别进行了单因素考察,结果显示 3 种内酯成分提取率随乙醇体积分数减低呈明显下降趋势,当用乙醇提取时三者提取率均较高;而受超声时间、液固比的影响较小,3 种内酯成分随超声时间、液固比增加变化趋势不尽相同,最终以 3 种内酯成分提取率总和为指标确定超声时间为 45 min、液固比为 50 倍。

3.2 色谱条件选择 为建立同时测定川芎中 3 种内酯成分的含量测定方法,选择 3 种内酯成分的检测波长成为了难点。采用二极管阵列紫外全波长扫描,分析样品的 3D 图谱确定 281 nm 为洋川芎内酯 A 吸收峰的检测波长,299 nm 为阿魏酸松柏酯吸收峰的检测波长,320 为藁苯内酯吸收峰的检测波长。在考察了乙腈-水、甲醇-水及甲醇-醋酸溶液 3 种流动相后,发现以甲醇-水为流动相得到色谱图较好。在考察了甲醇-水比例及流动相流速后,确定流动相为甲醇-水(55:45),流速 0.8 mL \cdot min⁻¹时分离效果较好,但在谱图中紧跟洋川芎内酯 A、藁苯内酯峰之后均有 1 个小峰不能完全分开,分析原因可能是存在同分异构体,故不能完全分离开。

3.3 新老产地含量比较 25 批新老产地川芎药材中洋川芎内酯 A 含量差异较大,其 RSD 26.285%,最大为彭山县谢家镇石山村 11.081 2 mg \cdot g⁻¹,最低为都江堰柳街镇民安村 4.625 4 mg \cdot g⁻¹。阿魏酸松柏酯含量差异最大,其 RSD 32.410%,最大为什邡市隐丰镇杨寨村 9.549 7 mg \cdot g⁻¹,最小为都江堰沿江镇同乐村 2.467 2 mg \cdot g⁻¹。藁苯内酯含量差异最小,其 RSD 15.522%,最大为什邡市师古镇思源村

表4 25批样品3种内酯成分含量测定

mg·g⁻¹

No.	产地	洋川芎内酯 A	阿魏酸松柏酯	藁苯内酯	3种内酯总含量
1	什邡市隐丰镇欢喜村	7.558 8	3.310 2	70.728 2	81.597 3
2	什邡市隐丰镇杨寨村	10.169 8	9.549 7	72.227 1	91.946 7
3	什邡市师古镇思源村	9.521 4	6.539 3	73.686 4	89.747 1
4	彭州市葛仙山华南村	8.858 4	8.967 1	59.404 7	77.230 1
5	彭州市敖平镇兴泉村	5.732 1	5.879 0	69.179 9	80.791 0
6	彭州市敖平镇紫泉村	7.685 1	4.490 4	70.560 9	82.736 4
7	彭州市敖平镇星河村	7.850 7	6.434 9	64.832 1	79.117 8
8	彭州市红岩镇九田村	9.122 5	6.097 6	64.749 5	79.969 6
9	新都区新繁镇李元村	7.902 2	7.811 5	53.907 8	69.621 5
10	新都区新繁镇和平村	7.028 3	7.985 8	52.207 6	67.221 7
11	新都区新民镇东林村	5.951 0	5.651 8	51.651 0	63.253 8
12	新都区斑竹园莲塘社区	6.995 7	5.420 8	54.213 6	66.630 1
13	彭山县谢家镇石山村	11.081 2	6.010 6	42.716 5	59.808 4
14	彭山县公义镇马林村	10.041 7	3.251 7	45.935 9	59.229 3
15	彭山县凤鸣镇金镞村	13.429 8	5.603 8	48.199 8	67.233 4
16	彭山县谢家镇吴埝村 2	10.918 4	9.123 5	60.796 5	80.838 4
17	彭山县谢家镇吴埝村 1	10.687 4	4.694 5	50.364 0	65.745 9
18	彭山县灵石镇宝珠村	8.213 3	5.274 9	41.171 5	54.659 7
19	都江堰柳街镇民安村	4.625 4	4.141 8	53.417 0	62.184 2
20	都江堰柳街镇水月村	6.085 8	8.708 2	65.092 5	79.886 5
21	都江堰沿江镇同乐村	7.298 6	2.467 2	58.906 1	68.671 9
22	都江堰徐渡乡金羊村	5.227 3	4.065 0	60.563 7	69.856 0
23	都江堰石羊镇皂角村	6.412 0	5.286 5	65.696 9	77.395 5
24	都江堰徐渡乡 GAP 基地	5.467 0	5.001 4	59.170 1	69.638 5
25	都江堰石羊镇同心村	7.438 4	4.287 5	54.106 7	65.832 5

73.686 4 mg·g⁻¹,最小为彭山县灵石镇宝珠村 41.171 5 mg·g⁻¹。采用聚类分析发现 3 种内酯成分含量无显著性地域差异,所选产地(彭山、都江堰、新都、彭州、什邡)均适宜川芎栽培,而影响川芎内酯含量差异的因素可能与产地土壤养分、栽培管理方式等有关,具体因素正在研究中。

[参考文献]

- [1] 李秋怡,干国平,刘焱文. 川芎化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7):1298.
- [2] 常新亮,马云保,张雪梅,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15):1533.
- [3] 吴巍,滕厚雷,邵萌,等. 洋川芎内酯 A 的制药用途及含有它的药物组合物与制备方法,中国:CN1977838A[P], 2007-06-13.
- [4] 李韶菁,张迎春,苏培渝,等. 阿魏酸松柏酯的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):229.

- [5] 林乔,赵爱国,陈建南,等. 藁苯内酯的镇痛抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):165.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:38.
- [7] 郭小藤,赵睁箜,容蓉,等. 两种方法测定川芎油中藁苯内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯胺的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):95.
- [8] 张玲,刘友平,李旻,等. 川芎化学成分分离鉴定与藁苯内酯的含量测定[J]. 中国药房, 2010, 21(15):1381.
- [9] 吴平丽,刘雯,张继全,等. 川芎中洋川芎内酯 A 和 Z-藁苯内酯的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(4):290.
- [10] 曹建敏,王宗花,丁明玉,等. 反相高效液相色谱法同时测定川芎中的四种内酯类化合物[J]. 色谱, 2005, 23(5):531.

[责任编辑 顾雪竹]