

超高效液相色谱法比较鲜川芎和川芎药材中6种成分含量

陈冉^{1,2}, 尹丹丹^{1,2}, 杨沫^{1,2}, 王运来^{1,2}, 尹登科^{1,2}, 许钊^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 采用超高效液相色谱法(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)比较鲜川芎和川芎药材中6种活性成分(川芎嗪、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A、藁本内酯)的含量差异,为该药材的产地加工提供实验依据。**方法** 采用75%甲醇超声提取,UPLC测定鲜川芎和川芎药材中6种活性成分,根据样品处理条件计算质量分数并进行比较。流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱,流速为0.2 mL/min,检测波长为294 nm,柱温30℃,进样体积2 μL。**结果** 经检测,阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 A 为鲜川芎和川芎药材的共有成分,鲜川芎中未检测到洋川芎内酯 I 及洋川芎内酯 H。鲜川芎样品中各成分的质量分数为阿魏酸0.003 9%、洋川芎内酯 A 0.006 4%、藁本内酯0.54%;川芎药材中各成分的质量分数为阿魏酸0.088%、洋川芎内酯 I 0.20%、洋川芎内酯 H 0.031%、洋川芎内酯 A 0.76%、藁本内酯1.3%。**结论** 川芎药材与鲜川芎中化学成分存在差异,推测在川芎的产地加工及贮藏过程中存在成分的转化。

[关键词]川芎;鲜川芎;超高效液相色谱法;化学成分

[中图分类号]R284 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.06.021

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根状茎,挥发油类是构成川芎气味雄烈的主要物质。药理研究表明,川芎的药效物质基础为内酯类成分如藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A^[1-3],芳香酸类如阿魏酸^[4-5]及生物碱如川芎嗪^[6-7]。川芎嗪、阿魏酸及洋川芎内酯类化合物在抗氧化损伤、抗炎镇痛、抗凝及抗血小板聚集、神经保护等方面具有显著作用^[8-12]。

川芎所含成分不稳定,易受到温度及光照影响发生成分损失;室温贮藏及自然光照条件下即可发生多种途径的降解行为^[13-16]。因此,不同的温度及光照条件直接影响川芎中各成分的转化及含量。

鲜川芎在产地经火炕烘干后撞去泥沙和须根即为川芎药材,烘干温度小于70℃。笔者推测,受烘干过程中温度的影响,川芎药材与鲜川芎的化学成分间存在差异。但目前较多的研究关注川芎药材贮藏期间的成分变化,本课题旨在对鲜川芎与川芎药材中的6种活性成分(川芎嗪、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A)进行测定,初步比

较二者化学成分差异,为川芎的产地加工提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters Acquity UPLC-PAD 色谱系统(包括二元泵、自动进样器、柱温箱、PAD 检测器、Empower 2 工作站);美国 Agilent 公司;ML303E 千分之一电子天平;梅特勒-托利多上海有限公司;KQ-600DB 型数控超声波清洗器;昆山市超声仪器有限公司;DFY-300 多功能高速中药粉碎机;温州鼎历医疗器械有限公司。

1.2 试剂 乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯):美国 Fisher 公司;0.22 μm 有机相针式滤器;江苏津腾公司;超纯水:自制;盐酸川芎嗪(批号 110817-201608,纯度≥98%)、阿魏酸(批号 110773-201614,纯度≥98%)、藁本内酯(批号 111737-201608,纯度≥98%);均购买于中国食品药品检定研究院;洋川芎内酯 H(批号 P12J8F39794,纯度≥98%)、洋川芎内酯 I(批号 P12J8F39795,纯度≥98%)、洋川芎内酯 A(批号 P12J8F39796,纯度≥98%);购于上海源叶生物科技有限公司。

1.3 药材 新鲜的川芎根状茎于2017年5月收获期采集自四川彭州市敖平镇凤鹤村,川芎药材(批号:161219,产地四川)购买自安徽普仁中药饮片有限公司,经安徽中医药大学金传山教授鉴定为伞形科川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的新鲜及干燥根状茎,见图1。

基金项目:国家自然科学基金项目(81573720)

作者简介:陈冉(1994-),男,硕士研究生

通信作者:许钊(1970-),男,博士,教授,845570851@

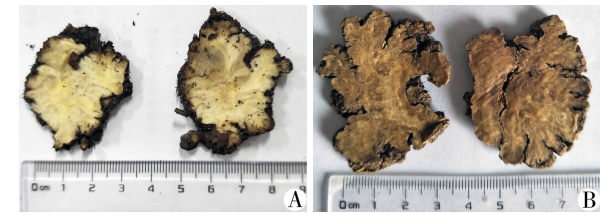


图1 鲜川芎与川芎药材切片(A. 鲜川芎;B. 川芎药材)

2 方法

2.1 样品制备

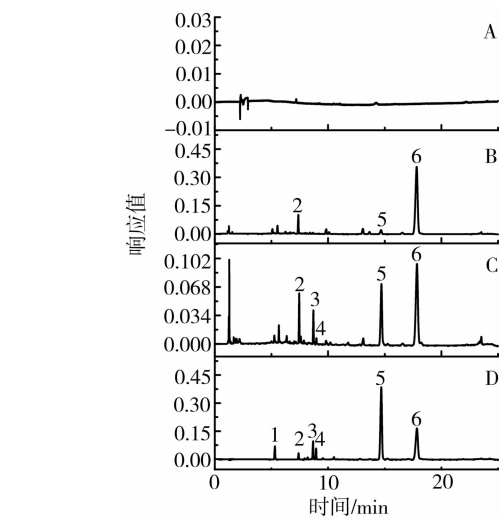
2.1.1 供试品溶液制备 川芎自产地采收后,洗净泥沙,晾干水分后,作为鲜川芎。将同一批次鲜川芎于 60 ℃烘箱中烘烤 6 h 作为川芎药材。新鲜川芎含水量较高,为降低水分对成分测定的影响,在采用超高效液相串联光电二极管阵列检测器进行含量测定前,根据 2015 年版《中华人民共和国药典》一部规定^[17],采用甲苯法测定鲜川芎及川芎药材含水量分别为 62.73%、8.73%,鲜川芎与川芎药材的质量比为 7.18。将一定质量的鲜川芎和川芎药材粉碎至过三号筛,分别取 5 g,采用 50 mL 的 75%甲醇以超声功率 80 W 超声提取(室温 25 ℃)30 min,室温放置 6 h 后分别取上清,过 0.22 μm 有机滤膜,得滤液备用。

2.1.2 对照品溶液制备 取各标准品一定量,配制盐酸川芎嗪、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A、藁本内酯浓度分别为 65、50、30、12、400、682 μg/mL 的混合标准溶液母液。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),配备有 Acquity UPLC 柱在线过滤系统。采用梯度洗脱,流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)。梯度洗脱过程:0~0.5 min,5% A;0.5~8 min,5%~45% A;8~10 min,45% A;10~11 min,45%~48% A;11~16 min,48%~50% A;16~18.5 min,50%~60% A;18.5~20 min,60%~75% A;20~22 min,75%~90% A;22~23 min,90%~5% A;23~25 min,5% A。检测波长 295 nm,流速 0.2 mL/min,进样体积 2 μL。

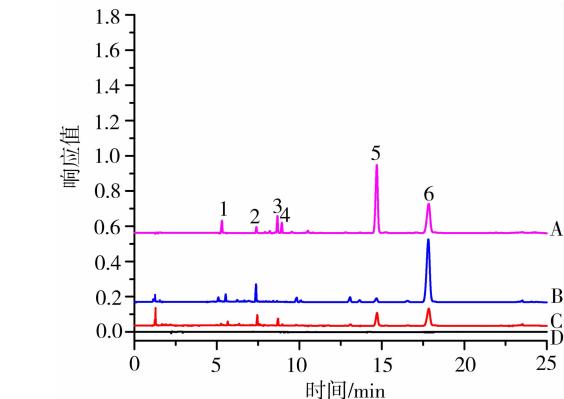
2.3 专属性考察 取标准品溶液、川芎药材及鲜川芎样品溶液,进样容积 2 μL,按照“2.2”项下色谱条

件进样分析,所得色谱图见图 2、图 3。



注:A. 空白对照品;B. 鲜川芎;C. 川芎药材;D. 混合标准品;1. 盐酸川芎嗪;2. 阿魏酸;3. 洋川芎内酯 I;4. 洋川芎内酯 H;5. 洋川芎内酯 A;6. 藁本内酯

图2 鲜川芎与川芎药材的 UPLC 图



注:A. 混合标准品;B. 鲜川芎;C. 川芎药材;D. 空白对照品;1. 盐酸川芎嗪;2. 阿魏酸;3. 洋川芎内酯 I;4. 洋川芎内酯 H;5. 洋川芎内酯 A;6. 藁本内酯

图3 鲜川芎与川芎药材的 UPLC 色谱图

2.4 线性范围考察 精密移取混合标准溶液母液 0.125、0.25、0.50、1.00、2.50、5.00 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释,定容至刻度,摇匀,配成混合对照品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样分析,以质量浓度(ρ)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线。见表 1。

表1 6种成分的回归方程及线性范围

成分	回归方程	r	ρ 的线性范围/(μg/mL)
盐酸川芎嗪	$A=1.639\ 3\times10^4\rho+8.384\ 2\times10^3$	0.999\ 0	65~1.016
阿魏酸	$A=1.292\ 85\times10^5\rho-1.866\times10^3$	1.000\ 0	50~0.781
洋川芎内酯 I	$A=3.398\ 2\times10^4\rho+6.902\ 7\times10^3$	0.999\ 8	30~0.469
洋川芎内酯 H	$A=3.506\ 1\times10^4\rho-1.442\times10^2$	1.000\ 0	8~0.125
洋川芎内酯 A	$A=8.812\ 1\times10^3\rho-4.426\ 9\times10^3$	0.999\ 6	428~6.688
藁本内酯	$A=9.342\ 4\times10^3\rho-1.264\ 4\times10^4$	0.999\ 0	704~11

2.5 精密度试验 按照“2.2”项下色谱条件,将同一混合标准品溶液重复进样 6 次,记录色谱图,计算得到川芎嗪、阿魏酸、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯的峰面积的 RSD 分别为 0.13%、0.89%、1.52%、1.68%、0.89%、0.94%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 将同一批次的供试品溶液室温下放置 0、2、4、8、12、16、24 h 后分别进样分析,计算得到各成分峰面积的 RSD,分别为阿魏酸 0.19%、洋川芎内酯 H 0.92%、洋川芎内酯 I 0.14%、洋川芎内酯 A 0.14%、藁本内酯 0.16%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同批川芎药材 6 份进样,按照供试品溶液制备方法制备后进样分析,对重复性试验进行考察,分别计算得到各成分峰面积的 RSD,分别为阿魏酸 0.34%、洋川芎内酯 I 0.67%、洋川芎内酯 H 1.32%、洋川芎内酯 A 0.46%、藁本内酯 0.27%,表明方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 精密称定 0.25 g 鲜川芎及川芎药材 6 份,加入各对照品溶液,按照“2.1”项下样品制备方法制备供试品溶液,按照“2.2”项下色谱条件,进样分析,计算 6 种成分的回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果

成 分	已知量/ μg		加入量/ μg		测得值/ μg		平均回收率/%		RSD/%	
	鲜川芎	药材	鲜川芎	药材	鲜川芎	药材	鲜川芎	药材	鲜川芎	药材
盐酸川芎嗪										
阿魏酸	498	219	500	220	997.6 $\pm$ 0.54	439.8 $\pm$ 0.64	99.94	100.30	0.108	0.289
洋川芎内酯 I		507		500		1 007.1 $\pm$ 0.43		100.02		0.085
洋川芎内酯 H		79		79		157.8 $\pm$ 0.22		100.00		0.273
洋川芎内酯 A	801	1 916	800	1 915	1 600.9 $\pm$ 0.31	3 831.1 $\pm$ 0.43	99.99	100.00	0.039	0.022
藁本内酯	7 723	3 221	7 725	3 222	15 448.0 $\pm$ 0.20	6 443.0 $\pm$ 0.27	100.00	100.00	0.003	0.085

注:空白单元格表示该项下没有检测到相应化合物

2.9 含量测定 按“2.1”项下条件制备样品溶液,按“2.2”项下条件测定。根据川芎药材与鲜川芎质量比折算,川芎药材与鲜川芎中 6 种成分质量分数见表 3。通过与 6 种物质的标准品对比,鲜川芎中检测出 3 种成分分别是阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯

A;川芎药材中,除川芎嗪外,其余 5 种成分均被检测出。本研究未在川芎药材及鲜川芎检测到川芎嗪,川芎中川芎嗪含量较低。鲜川芎中未检测到洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I。

表 3 鲜川芎及川芎药材含量测定结果

药 材	盐酸川芎嗪/ (mg/g)	阿魏酸/ (mg/g)	洋川芎 内酯 I/ (mg/g)	洋川芎 内酯 H/ (mg/g)	洋川芎 内酯 A/ (mg/g)	藁本 内酯/ (mg/g)	平均质量分数/%				
							阿魏酸	洋川芎 内酯 I	洋川芎 内酯 H	洋川芎 内酯 A	藁本 内酯
鲜川芎 1		0.278 5			0.451 2	30.893					
鲜川芎 2		0.278 0			0.451 3	30.894					
鲜川芎 3		0.269 4			0.451 4	30.892	0.003 9	—	—	0.006 3	0.54
鲜川芎 4		0.278 6			0.451 1	30.895					
鲜川芎 5		0.278 3			0.450 9	30.867					
鲜川芎 6		0.298 3			0.451 6	30.876					
川芎 1		0.877 0	2.028 4	0.314 4	7.662 0	12.882					
川芎 2		0.877 1	2.028 2	0.314 2	7.661 0	12.881					
川芎 3		0.877 3	2.028 5	0.314 5	7.664 0	12.883	0.088	0.2	0.031 0	0.76	1.30
川芎 4		0.877 4	2.027 9	0.314 6	7.663 0	12.885					
川芎 5		0.876 9	2.027 8	0.314 3	7.667 0	12.879					
川芎 6		0.877 2	2.028 8	0.313 9	7.659 0	12.880					

注:空白单元格表示该项下没有检测到相应化合物; $w(\text{川芎药材})=(m/M)\times 100\%$,式中 m 代表川芎药材中检测出该化合物的质量, M 代表川芎药材的质量; $w(\text{鲜川芎})=(m/7.18M)\times 100\%$,式中 m 代表鲜川芎中检测出该化合物的质量, M 代表鲜川芎的质量;平均质量分数分别为鲜川芎、川芎药材 6 个批次的平均值

3 讨论

3.1 提取方式及时间考察 川芎药材及鲜川芎中

富含挥发性成分,因此在提取时选取了超声提取。本研究中使用的鲜川芎未经加工处理,含水量较大,

考虑到含水量对提取率的影响,对提取时间进行了考察,分为超声提取 30 min、超声提取 30 min 后室温放置 2 h、超声提取 30 min 后室温放置 6 h、超声提取 30 min 后室温放置 12 h,结果表明超声提取 30 min 后室温放置 6 h 为最佳提取方式。

3.2 检测波长的选择 结合川芎嗪、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A、藁本内酯的光谱性质,选择了 254、270、280、295、320 nm 作为考察检测波长,实验结果表明,295 nm 下 6 种活性成分响应效果较佳,因此选择 295 nm 作为最佳检测波长。

3.3 鲜川芎与川芎药材的成分转化 本实验将同一批鲜川芎、川芎药材纳入研究,UPLC 检测结果表明鲜川芎与川芎药材间成分存在较大的差异。据报道,藁本内酯及洋川芎内酯 A 是川芎药材中含量较高的两种活性成分^[19]。内酯类成分易发生结构改变和转化,在产地加工及储藏过程中的加热、暴晒等程序会增加川芎的成分转化。藁本内酯在自然光照下可降解为洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 I^[13];洋川芎内酯 I 在阳光照射下可形成二聚体^[14]。在川芎药材的提取或贮藏过程中,阿魏酸松柏酯易水解为阿魏酸,增加川芎中游离阿魏酸的含量^[15]。贮藏两年的川芎药材,阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 的含量平均增加 46.9%,阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 A、藁本内酯的含量平均减少 48.3%^[16]。鲜川芎的产地加工有两种方式,一为阳光晾晒,一为炕床烘干。受加工过程中的光照、温度影响,鲜川芎中的成分发生转化,藁本内酯、洋川芎内酯 A 含量降低,洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 含量增加。实验结果表明,鲜川芎与川芎药材成分存在差异。

洋川芎内酯类化合物是川芎的主要活性成分及代谢成分。藁本内酯在大鼠体内的降解产物为洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 I^[20],但人体内的主要代谢产物为洋川芎内酯 I^[21]。研究表明,洋川芎内酯 I 可快速入血入脑^[22],这为川芎的临床治疗疾病提供了直接的物质基础。

本研究通过 UPLC 测定鲜川芎和川芎药材中 6 种活性成分的含量,发现鲜川芎、川芎药材中存在成分差异。鲜川芎及川芎药材中均未检测到川芎嗪;鲜川芎中内酯类化合物在产地加工中发生转化,藁本内酯含量降低,洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 含量增加。

参考文献:

[1] 谢佳宾,王媛,田梦,等. 靶细胞萃取联用 UPLC/Q-TOF-MS 方法分析川芎中的药效成分[J]. 中国现代中药,2017,19(9):1245-1248.

[2] 张翠英,章洪,童宇,等. 基于药效成分丹酚酸 B 和阿魏酸在大鼠血浆的药代动力学研究丹参与川芎配伍[J]. 中国中药杂志,2015,40(8):1589-1593.

[3] 胡立翠,伍勋,杨学东. 正交试验法优选川芎药效成分的超临界流体萃取工艺[J]. 中国中药杂志,2013,38(20):3484-3488.

[4] 姚艺新. 川芎基于抗血小板聚集作用与药效成分的质量评价[D]. 成都:成都中医药大学,2017.

[5] 陈志民,刘建清,郭莹莹,等. 川芎促血管舒张有效部位中阿魏酸的含量测定[J]. 中国药业,2018,27(7):11-13.

[6] 赖利平. 川芎有效成分(川芎嗪)提取工艺及其降血压作用的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.

[7] 朱承科,胡夏逢,周诚. Box-Behnken 效应面法优化川芎中川芎嗪的提取工艺[J]. 中药材,2016,39(9):2078-2080.

[8] ZHENG Q, HUANG Y Y, ZHU P C, et al. Ligustrazine exerts cardioprotection in animal models of myocardial ischemia/reperfusion injury: preclinical evidence and possible mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2018, 9:729[2019-05-04]. <http://nc. yuntsg. com/one1. do>. DOI: 10. 3389/fphar. 2018. 00729.

[9] YANG W J, LI Y R, GAO H P, et al. Protective effect of the ethanol extract from Ligusticum chuanxiong rhizome against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 227:166-175 [2019-05-04]. <https://www. sciencedirect. com/science/article/pii/S0378874118321639>. DOI: 10. 1016/j. jep. 2018. 08. 037.

[10] CHEN Y, XUE F, HAN C, et al. Ferulic acid ameliorated placental inflammation and apoptosis in rat with preeclampsia[J]. Clin Exp Hypertens, 2019, 41(6):524-530.

[11] HAN L, LIU D L, ZENG Q K, et al. The neuroprotective effects and probable mechanisms of Ligustilide and its degradative products on intracerebral hemorrhage in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63:43-57.

[12] ZHENG Q, TANG Y, HU P Y, et al. The influence and mechanism of ligustilide, senkyunolide I, and senkyunolide A on echinacoside transport through MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model[J]. Phytother Res, 2018,32(3):426-435.

[13] 左爱华,程孟春,卓荣杰,等. Z-藁本内酯降解产物的 UPLC-QTOF-MS 和 NMR 结构鉴定[J]. 药学学报,2013,48(6):911-916.

[14] LI S L, YAN R, TAM Y K, et al. Post-harvest alteration of the main chemical ingredients in Ligusticum chuanxiong Hort. (Rhizoma Chuanxiong)[J]. Chen

- Pharm Ball, 2007,55(1):140-144.
- [15] 吕光华,程世琼,陈金泉,等. HPLC 测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标[J]. 中国中药杂志,2010,35(2):194-198.
- [16] 金玉青,吕光华,魏伯平,等. 川芎药材贮藏期间化学成分的变化[J]. 中国中药杂志,2013,36(1):38-41.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:76-77.
- [18] DUAN F, XU W, LIU J, et al. Preparing the key metabolite of Z-ligustilide *in vivo* by a specific electrochemical reaction[J]. J Sep Sci, 2018, 41(13): 2799-2807.
- [19] ZHANG D L, TENG H L, LI G S, et al. Separation and purification of Z ligustilide and senkyunolide A from Ligusticum chuanxiong Hort. with supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography [J]. Sep Sci Technol, 2006, 41: 3397.
- [20] 唐静,陈雏,余彦,等. 顺式藁苯内酯在大鼠体内外的代谢及其代谢物的药理活性研究[J]. 四川大学学报, 2009, 40(5): 839-842.
- [21] 熊耀坤,梁爽,杜焰,等. HPLC 法测定洋川芎内酯 I 的平衡溶解度和表观油水分分配系数[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1644-1647.
- [22] 袁莹,林晓,冯怡,等. 川芎治疗偏头痛效应组分的体内移行研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 45(9): 694-697.
- (收稿日期:2019-07-30;编辑:张倩)

Comparison of Six Active Components Between Fresh and Dried Rhizoma Ligustici Chuanxiong Based on Ultra-high-performance Liquid Chromatography

CHEN Ran^{1,2}, YIN Dan-dan^{1,2}, YANG Mo^{1,2}, WANG Yun-lai^{1,2}, YIN Deng-ke^{1,2}, XU Fan^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula of Anhui Province, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the differences in the content of six active components (ligustrazine, ferulic acid, senkyunolide I, senkyunolide H, senkyunolide A, and ligustilide) between fresh and dried Rhizoma Ligustici Chuanxiong based on ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC), and to provide an experimental basis for the processing of this medicinal material in producing areas. **Methods** Ultrasonic extraction was performed with 75% methanol, and UPLC was used to measure the content of the above 6 active components in fresh and dried Rhizoma Ligustici Chuanxiong. Mass fraction was calculated based on sample treatment conditions, and a comparative analysis was performed. UPLC was performed with a mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid solution (B) for gradient elution, at a flow rate of 0.2 mL/min, a detection wavelength of 294 nm, a column temperature of 30 °C, and an injection volume of 2 μL. **Results** Ferulic acid, ligustilide, and senkyunolide A were detected in both fresh and dried Rhizoma Ligustici Chuanxiong, and senkyunolide I and senkyunolide H were not detected in fresh Rhizoma Ligustici Chuanxiong. In fresh Rhizoma Ligustici Chuanxiong, the mass fractions of ferulic acid, senkyunolide A, and ligustilide were 0.003 9%, 0.006 4%, and 0.54%, respectively; in dried Rhizoma Ligustici Chuanxiong, the mass fractions of ferulic acid, senkyunolide I, senkyunolide H, senkyunolide A, and ligustilide were 0.088%, 0.20%, 0.031%, 0.76%, and 1.3%, respectively. **Conclusion** There are differences in chemical components between dried and fresh Rhizoma Ligustici Chuanxiong, and it is speculated that component conversion occurs during processing in producing areas and storage of Rhizoma Ligustici Chuanxiong.

[Key words] Rhizoma Ligustici Chuanxiong; Fresh Rhizoma Ligustici Chuanxiong; Ultra-high-performance liquid chromatography; Chemical component