

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.07.004

川芎促血管舒张有效部位中阿魏酸的含量测定

陈志民¹, 刘建清¹, 郭莹莹¹, 林红², 谢奇恩¹, 甘惠贞¹, 王佳坤^{1△}

(1. 中国人民解放军第180医院, 福建 泉州 362000; 2. 南京军区联勤部机关幼儿园保健室, 江苏 南京 210001)

摘要:目的 建立测定川芎促血管舒张有效部位中阿魏酸含量的高效液相色谱法。方法 测定川芎促血管舒张有效部位(大孔树脂60% EtOH洗脱组分)中阿魏酸的含量。色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为冰乙酸(浓度为0.099 5%) - 甲醇(65:35), 流速为1 mL/min, 检测波长为322 nm, 柱温为20℃, 进样量为10 μL。结果 川芎促血管舒张有效部位(大孔树脂60% EtOH洗脱组分)中阿魏酸的含量为2.97% (n=3), 阿魏酸进样量在1.26~6.30 μg范围内与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率为101.37%, RSD为1.33% (n=5)。结论 该方法简单、灵敏、准确, 可用于阿魏酸的质量控制。

关键词: 川芎; AB-8大孔吸附树脂; 阿魏酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)07-0011-03

Content Determination of Ferulic Acid for Active Part Induced Vasodilation from *Ligusticum Chuanxiong*

Chen Zhimin¹, Liu Jianqing¹, Guo Yingying¹, Lin Hong², Xie Qi'en¹, Gan Huizhen¹, Wang Jiakun¹

(1. The 180th Hospital of PLA, Quanzhou, Fujian, China 362000; 2. Health Care Room of Kindergarten in the Department of Joint Logistics, Nanjing Military Region, Nanjing, Jiangsu, China 210001)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of ferulic acid for the active part induced vasodilation from *Ligusticum chuanxiong*. **Methods** The content of ferulic acid for the active part induced vasodilation (the component was extracted by macroporous resin 60% EtOH elution) from *Ligusticum chuanxiong* were determined, the column was Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was glacial acetic acid (concentration was 0.099 5%) - methanol (65:35), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 322 nm, the column temperature was 20℃, and the sample size was 10 μL. **Results** The content of ferulic acid for the active part induced vasodilation (the component was extracted by macroporous resin 60% EtOH elution) from *Ligusticum chuanxiong* was 2.97% (n=3). The linearity range of ferulic acid was from 1.26 to 6.30 μg. The average recovery of ferulic acid was 101.37%, and the RSD was 1.33% (n=5). **Conclusion** The method is simple, sensitive and accurate, which can be used for the quality control of ferulic acid.

Key words: *Ligusticum chuanxiong*; AB-8 macroporous adsorption resin; ferulic acid; HPLC

川芎为伞形科植物川芎的干燥根茎, 临床主要用于治疗胸痹心痛、胸肋刺痛、跌打肿痛、月经不调等疾病, 因此对其药理作用、质量鉴定及含量测定的研究都对川芎的临床实际应用意义重大^[1]。关于川芎有效成分的含量测定主要有气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[2-8]等方法。报道较多的是HPLC和GC-MS法, 这2种方法虽然定量比较准确, 但需要有纯度较高、稳定性较好的对照品, 且在分离较好的情况下才能进行定量测定。武亚晓等^[9]对阿魏酸的提取工艺及测定方法进行了改进, 为进一步的研究奠定了基础。目前, 国内外对川芎的化学成分及药理作用研究较多, 但关于活性部位的质量控制研究相对较少。本试验中首次采用HPLC法测定具有促血管舒张作用的川芎大孔吸附树脂洗脱物中阿魏酸的含量, 为更深入地研究川芎及其相关质量控制提供了参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200LC型高效液相色谱仪, G1311A型四元泵, G1365B/D型紫外检测器, Agilent Chemstation色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司); 电子天平(万分之一, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); KQ-500E型超声波清洗器(超声频率为40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); R-205型旋转蒸发器(转速为20~280 r/min, 上海申胜生物技术有限公司); 超纯水系统(Sartorius Germany arium 611UF S/N: 21710655); AB-8大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂)。

1.2 试剂

阿魏酸化学对照品(批号为0773-9910, 中国食品药品检定研究院); 甲醇(Product of Dikma Technologies, 色谱纯); 川芎饮片购自哈尔滨市三棵树药材, 经中国人民解放军第180医院中医科李树清主任医师鉴定为正

第一作者: 陈志民, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电话)0595-28919531(电子信箱)761352798@qq.com。

△通信作者: 王佳坤, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为临床药学, (电话)0595-28919536(电子信箱)314340493@qq.com。

品;冰乙酸(批号为1504231)、乙酸乙酯(批号为1607011)、乙醇(批号为15102602)均为分析纯,购于西陇化工股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 川芎有效部分的提取流程

提取流程见图1。

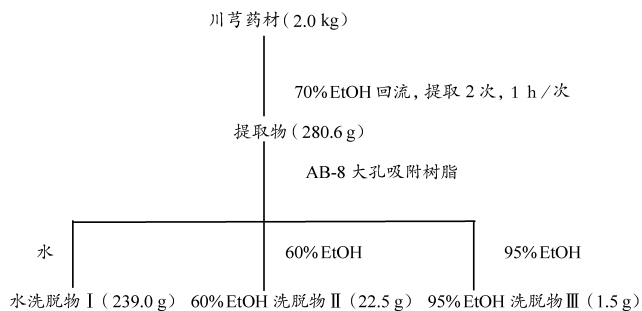


图1 川芎离体血管舒张有效部位提取流程

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:冰乙酸(浓度为0.099 5%)—甲醇(65:35);流速:1 mL/min;检测波长:322 nm;柱温:20℃;进样量:10 μL。分别进样阿魏酸对照品溶液和川芎供试品溶液各10 μL,在此色谱条件下的色谱图见图2,理论板数 $[n=5.54(t_R/W_{1/2})^2]$ 按阿魏酸峰计算应不低于4000。

2.2.2 溶液制备

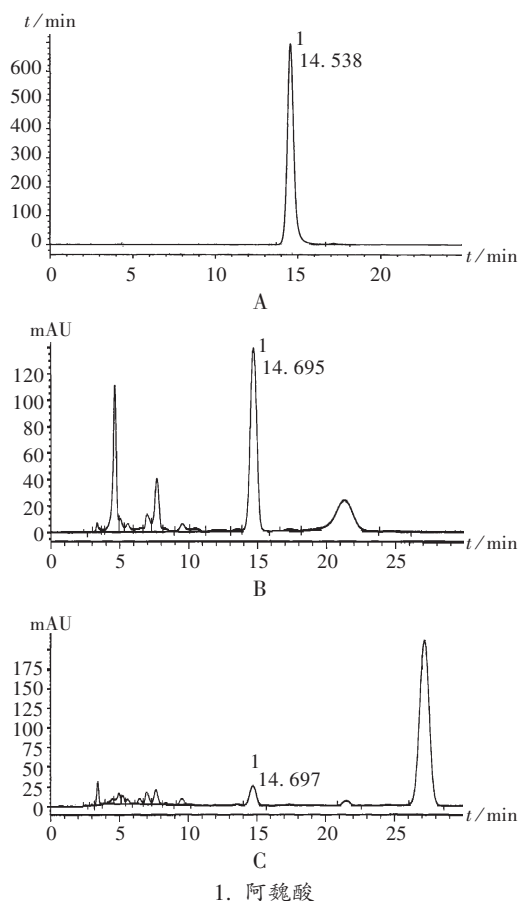
对照品溶液:取阿魏酸化学对照品6.3 mg,精密称定,置10 mL容量瓶,用甲醇溶解,定容至刻度,即得质量浓度为0.63 g/L的溶液,作为对照品贮备液A。分别精密吸取对照品贮备液4.0,3.0,2.0,1.0 mL置5 mL容量瓶,用甲醇定容至刻度,即得不同质量浓度的对照品溶液,记为B,C,D,E。

供试品溶液:取川芎-60%醇提取部位样品0.4997 g,置锥形瓶中,精密称定,加入超纯水15 mL,超声20 min,完全溶解,分别用乙酸乙酯(20,20,10 mL)萃取3次,合并萃取液,挥干提取溶剂,残渣加甲醇溶解,转移至10 mL容量瓶中并定容至10 mL,摇匀,用移液管精密移取1 mL置10 mL容量瓶,加甲醇定容至刻度,作为供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:按拟订色谱条件,精密吸取对照品溶液A,B,C,D,E各10 μL进样测定,记录峰面积,以峰面积(A)对质量浓度(C)作线性回归,得阿魏酸线性回归方程 $A=3.065 \times 10^4 C + 99.504$ ($r=0.999\ 87$)。结果表明,阿魏酸进样量在1.26~6.30 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一质量浓度阿魏酸对照品溶液(溶液E),在拟订色谱条件下进样10 μL,重复5次,测



1. 阿魏酸
A. 阿魏酸对照品溶液 B. 川芎供试品溶液
C. 川芎供试品溶液(10倍稀释)

图2 高效液相色谱图

定,记录峰面积。结果的RSD为0.27%($n=5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为170608)适量,依法制备供试品溶液,于0,2,4,8,24 h时在拟订色谱条件下分别测定,记录峰面积。结果的RSD为0.22%($n=5$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为170608)适量,依法制备供试品溶液,共5份,在拟订色谱条件下依法测定,记录峰面积。结果的RSD为0.08%($n=5$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一样品5份,精密称定0.025 g(相当于阿魏酸0.743 mg),分别加入一定量的阿魏酸对照品,依法测定,计算含量。结果见表1。

表1 阿魏酸加样回收试验结果($n=5$)

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.752	0.504	1.255	99.80	101.37	1.33
0.743	0.498	1.243	100.40		
0.738	0.490	1.238	102.04		
0.748	0.512	1.267	101.38		
0.736	0.495	1.247	103.23		

2.2.4 样品含量测定

取川芎样品3份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,计算样品中阿魏酸的含量。结果见表2。

表2 川芎中阿魏酸含量测定结果(% , $n=3$)

样品	阿魏酸含量	$\bar{X}$	RSD
1	2.91	2.97	2.2
2	3.04		
3	2.96		

3 讨论

在对流动相组成及检测器波长的选择中,分别以甲醇-冰乙酸(体积分数为0.0995%)为30:70,35:65,40:60进行试验,并记录了230,278,313,322 nm 4个波长的色谱图。结果表明,用甲醇-冰乙酸(35:65)作为流动相,波长为322 nm的色谱条件为最佳。在此色谱条件下,川芎有效部位的供试品溶液可检出4个主要色谱峰,且保留时间跨度较大,分离效果较好。

在供试品制备时发现,阿魏酸对热乙酸乙酯有较好溶解度,故采用乙酸乙酯对样品进行萃取处理^[10-12],结果得到了验证,该有效部位中的阿魏酸平均含量达2.97%,远高于文献[5]报道的川芎药材中阿魏酸0.075%~0.14%的含量。同时对阿魏酸的提取时间进行了考察,发现当提取时间大于1 h,或提取次数大于2次时,阿魏酸的提取量并未明显增加。综合考虑时间-成本关系,最后阿魏酸的提取条件定为乙酸乙酯提取2次,每次1 h。

阿魏酸有顺式和反式两种立体结构,原药材和制剂中阿魏酸以反式结构存在,但随着放置时间的延长,反式阿魏酸会慢慢转化为顺式结构。文献[6]报道了阿魏酸的稳定性问题,在48 h内,仅有约1%的反式阿魏酸转化为顺式阿魏酸,对定量分析而言,在测定误差允许范围内。为保证阿魏酸的稳定性和对川芎质量控制的准确性,本试验中考察了对照品和供试样品在24 h内的稳定性,并保证对照品与供试品在该时间内使用,保证了试验数据的可靠性。

阿魏酸作为川芎的有效成分,常用于药材及其制剂的质量控制指标。这主要是因为阿魏酸具有抗血小板凝集、抑制5-羟色胺从血小板中释放、阻止静脉旁路血栓形成、抗动脉粥样硬化、清除自由基等作用^[13-17]。今后的试验中,将在提取阿魏酸的基础上,进一步开展药效学研究,如抗心肌缺血和抗脑缺血试验,以期得到完善的药效学试验结果。

传统中药材是在传统中医药理论指导下使用,有着

几千年的用药经验,其疗效确切、可靠,特别是经典处方,在某些特定疾病中发挥着重要作用,但中药材有其自身不足,如在临床应用中存在着成分不明,易引起不良反应,且需要较大剂量的问题。本试验中提取药材的单一有效成分阿魏酸有助于后期药效学的研究,且提取后的阿魏酸临床应用更方便,可相对克服以上中药材存在的不足。

参考文献:

- [1] 张翠英,章洪,戚琼华. 川芎的有效成分及药理研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2014,41(10):2264-2266.
- [2] 卢欢,唐晓丹,李博. 超声辅助萃取川芎中阿魏酸工艺的优化[J]. 湖北农业科学,2016,55(9):2235-2238.
- [3] 何书连. HPLC法测定不同产地川芎中阿魏酸的含量[J]. 黑龙江医药,2014,27(1):20-22.
- [4] 李新贵. 高效液相色谱测定川芎配方颗粒中阿魏酸的含量[J]. 儿科药学杂志,2017,23(6):49-51.
- [5] 吕维,吴恋,叶娜,等. HPLC法同时测定川芎药材中阿魏酸和藁本内酯的含量[J]. 中药与临床,2014,5(2):13-15.
- [6] 苏秀兰,杨倚麟. 薄层析-紫外分光光度法测定川芎中阿魏酸含量[J]. 安徽农业科学,2016,44(7):142-144.
- [7] 杨丽,胡昌江,周维,等. 川芎配方颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2012,21(10):28-29.
- [8] 王虎,李文兵,胡昌江,等. 不同产地川芎主要有效成分含量比较[J]. 中国药业,2015,24(21):37-39.
- [9] 武亚晓,李希,冯建安,等. 正交试验设计优化川芎阿魏酸的提取工艺[J]. 中药与临床,2015,6(3):22-25.
- [10] 李艳清,周良芹,王蓉,等. 川芎中阿魏酸和川芎嗪的提取及检测方法研究[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版),2016,39(1):55-59.
- [11] 章洪,李振国,张翠英. 川芎中阿魏酸类效应组分的提取纯化工艺研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(17):5410-5415.
- [12] 陈倩洁,孙明,梁瑞雪,等. 煎煮时间对川芎中阿魏酸稳定性影响的研究[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(4):249-250.
- [13] 张锦霞,杜晓霞,曹凤秋,等. HPLC法同时测定川芎药材中阿魏酸、咖啡酸的含量[J]. 中国医药科学,2014,4(21):102-104.
- [14] 丁明玉,马帅武,刘德麟. 阿魏酸的稳定性及其在川芎和当归药材中的存在形式[J]. 中草药,2004,35(1):28-30.
- [15] 迟雪洁,孙蓉. 川芎基于功效物质基础的抗脑缺血药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒,2013,10(6):355-357.
- [16] 杨珍,周惠芬,周鹏,等. 川芎、黄芪有效成分配伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响[J]. 中草药,2015,46(9):1326-1332.
- [17] 刘旭,程艳芹,崔晓博,等. 中药川芎心肌缺血保护作用的谱效学研究[J]. 中国药业,2016,25(15):9-12.

(收稿日期:2017-11-22;修回日期:2018-01-12)