

· 化学与分析 ·

# HPLC-DAD 同时测定川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物中阿魏酸、 洋川芎内酯 A 和藁本内酯含量

刘芳<sup>1</sup>, 吴萍<sup>1</sup>, 王宇红<sup>2</sup>, 蔡光先<sup>2\*</sup>, 柳绍龙<sup>1</sup>, 沈晓明<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 中药粉体关键技术及装备国家地方联合工程实验室, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 建立川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物中药效组分的定性及定量分析方法。方法: 采用 HPLC-DAD, Elipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.3% 乙酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min, 40%~41.5% B; 4~10 min, 41.5%~70% B; 10~15 min, 70% B), 阿魏酸、藁本内酯和洋川芎内酯 A 检测波长分别为 325, 328, 280 nm。结果: 川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物中 3 种药效组分在 15 min 内能实现分离, 阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯的线性范围分别为 0.024~2.4, 0.15~15, 0.3~30 μg; 平均加样回收率分别为 95.87% (RSD 0.99%), 96.85% (RSD 1.04%), 102.2% (RSD 1.29%)。3 种药效组分在川芎药材中质量分数分别为 0.35%, 3.13%, 7.17%。结论: 该方法快速简单、客观可靠, 适用于川芎 CO<sub>2</sub> 超临界萃取物的综合质量评价。

**[关键词]** 川芎; CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取; 阿魏酸; 洋川芎内酯 A; 藁本内酯

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0048-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100048

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000093.html>

**[网络出版时间]** 2014-03-07 11:01

## HPLC-DAD Simultaneous Determination of Ferulic Acid, Senkyunolide A and Ligustilide in CO<sub>2</sub> Supercritical Fluid Extract of Chuanxiong Rhizoma

LIU Fang<sup>1</sup>, WU Ping<sup>1</sup>, WANG Yu-hong<sup>2</sup>, CAI Guang-xian<sup>2\*</sup>, LIU Shao-long<sup>1</sup>, SHEN Xiao-ming<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Breeding Base of Key Laboratory Between Ministry and Province for Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs, Engineering Laboratory Between State and Local of Key Technology of Chinese Materia Medica and Equipment, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC-DAD method for qualitative and quantitative analysis of pharmacodynamic components in CO<sub>2</sub> supercritical fluid extract of Chuanxiong Rhizoma. **Method:** HPLC-DAD was employed by Elipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with 0.3% acetic acid solution (A) - acetonitrile (B) as mobile phase for gradient elution (0-4 min, 40% -41.5% B; 4-10 min, 41.5% -70% B; 10-15 min, 70% B), detection wavelengths of ferulic acid, senkyunolide A and ligustilide were set at 325, 328, 280 nm, respectively. **Result:** Three compounds from CO<sub>2</sub> supercritical fluid extract of Chuanxiong Rhizoma could be separate well within 15 min, linear range of these three ingredients were 0.024-2.4, 0.15-15, 0.3-30 μg,

**[收稿日期]** 20130903(011)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB723503); 湖南省教育厅科研项目(13C672; 13C683); 湖南省“十二五”中药学重点学科项目(湘教发[2011]76号)

**[第一作者]** 刘芳, 讲师, 从事中药防治脑缺血病相关研究, Tel: 13548986430, E-mail: liu0825@126.com

**[通讯作者]** \* 蔡光先, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治心脑血管研究与中药创新药物研究, Tel: 13723868000, E-mail: 366620183@qq.com

average recoveries were 95.8% (RSD 0.99%), 96.85% (1.04%) and 102.2% (RSD 1.29%), contents of these three compounds in Chuanxiong Rhizoma were 0.35%, 3.13% and 7.17%, respectively. **Conclusion:** This established method was simple, rapid, objective and reliable, which was suitable for overall quality evaluation of CO<sub>2</sub> supercritical fluid extract of Chuanxiong Rhizoma.

[**Key words**] Chuanxiong Rhizoma; CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction; ferulic acid; senkyunolide A; ligustilide

川芎辛散温通、活血祛瘀,主要活性成分为生物碱、阿魏酸、挥发油等,其中挥发油中洋川芎内酯 A 和藁本内酯含量较高<sup>[1]</sup>。研究表明提取工艺对川芎中有效成分的溶出度影响较大,而利用 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取装置可有效避免挥发油中热敏性物质分解、异构化,提高川芎中有效成分的提取率<sup>[2-3]</sup>。药理研究认为川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物(CO<sub>2</sub>-SFE)在脑缺血方面作用显著,对脑水肿、脑指数具有良好的抑制作用,效果明显优于川芎乙醇提取物;川芎挥发油具有改善微循环、增加脑血流量及镇痛、调节心血管功能、抗凝血等作用,而保障其药理作用的前提是对川芎 CO<sub>2</sub>-SFE 实现质量控制<sup>[4-6]</sup>。

仅用单一指标成分含量变化来判断中药质量存在明显局限性,现有研究<sup>[7]</sup>对川芎 CO<sub>2</sub>-SFE 的质量控制往往仅以阿魏酸或藁本内酯含量为评价指标,多成分的同时测定亦仅局限于同类成分<sup>[8]</sup>,忽略了对不同类药效成分的考察。本实验采用 HPLC-DAD 测定阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯 3 种极性差别较大的药效成分含量,从多种药效组分入手<sup>[9]</sup>,体现量效关系,为川芎 CO<sub>2</sub>-SFE 的质量控制提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),JA-3003 型分析天平(上海恒平科学仪器有限公司),SB-3200D 型超声波震荡仪(宁波新其生物科技股份有限公司),HA220-50-07 型超临界萃取装置(江苏南通市华安超临界萃取有限公司)。

阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 A 对照品(北京盈泽纳新化工技术研究院,批号分别为 MUST-12112204, MUST-12082702, MUST-12121202),川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物(川芎 CO<sub>2</sub>-SFE,湖南中医研究院中药所),乙腈、甲醇为色谱纯,水为怡宝纯净水,其他试剂均为分析纯。

川芎药材购自湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医研究院中药所张水寒教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Elipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm ×

250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相 0.3% 乙酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min, 40%~41.5% B; 4~10 min, 41.5%~70% B; 10~15 min, 70% B),进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,阿魏酸、藁本内酯和洋川芎内酯 A 检测波长分别为 325, 328, 280 nm。

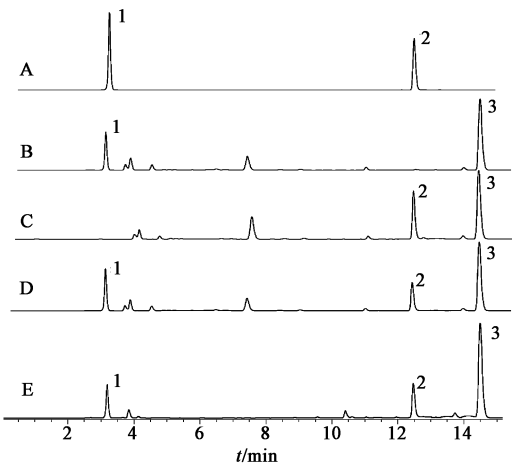
**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称量阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯对照品,加甲醇制成 0.8, 5.0, 10.0 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。其中阿魏酸对照品溶液中含 5% 乙酸,4 °C 避光保存;藁本内酯对照品溶液 -20 °C 避光保存。

**2.3 供试品溶液的制备** 萃取条件为压力 32 MPa,温度 50 °C,CO<sub>2</sub> 循环流量 2~4 L·min<sup>-1</sup>,以 30% 乙醇为夹带剂,萃取 4 h,加压力 10 MPa,温度 60 °C 进行解析,得红色或浅红棕色澄明油状物。上样前用甲醇稀释至适当浓度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 色谱行为** 精密量取 2.2 项下对照品溶液适量,分别制成缺阿魏酸、缺洋川芎内酯 A、缺藁本内酯和含 3 种对照品的混合液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果在 15 min 内 3 种对照品完全分离,峰形佳且分离度好,阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯保留时间分别为 3.206, 12.463, 14.499 min,依次记为 1, 2, 3 号峰。精密量取 2.3 项下供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件测定,通过将此 3 个色谱峰的紫外光谱图与对照品的紫外光谱图进行比对,并结合色谱的定性参数保留时间,判断供试品溶液中 3.193, 12.470, 14.494 min 的色谱峰分别归属于阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯,见图 1。

**2.4.2 线性关系考察** 精密量取阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯对照品溶液 60 μL,分别加甲醇补足至 200 μL,各对照品的终质量浓度分别为 0.24, 1.5, 3.0 g·L<sup>-1</sup>,混合均匀,设定进样体积分别 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程依次为  $Y = 5141.5X + 96.385$  ( $R^2 = 0.9996$ ),  $Y = 726.19X + 94.42$  ( $R^2 = 0.9998$ ),  $Y = 1051.3X +$



A. 缺藁本内酯的混合对照品; B. 缺洋川芎内酯 A 的混合对照品;  
C. 缺阿魏酸的混合对照品; D. 3 种对照品混合液; E. 供试品;  
1. 阿魏酸; 2. 洋川芎内酯 A; 3. 藁本内酯

图 1 川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物 HPLC

507.43 ( $R^2 = 0.9991$ ), 线性范围分别为 0.024 ~ 2.4, 0.15 ~ 15, 0.3 ~ 30  $\mu\text{g}$ 。

**2.4.3 精密度试验** 精密量取供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 连续进样 5 次, 结果阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 1.04%, 1.08%, 0.75%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 1.82%, 1.56%, 2.87%, 表明日内稳定性良好。取同一供试品溶液, 分别于第 1, 2, 3, 4, 5 d 进样分析, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 1.44%, 0.93%, 2.70%, 表明日间稳定性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密量取 6 份供试品溶液, 每份 100  $\mu\text{L}$ , 各精密加入 2.2 项下制备的阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 加甲醇补足至 200  $\mu\text{L}$ , 混合均匀, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果见表 1。

**2.4.6 重复性试验** 精密量取同一批次川芎 CO<sub>2</sub>-SFE 供试液 5 份, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算阿魏酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯平均质量分数分别为 0.35%, 3.13%, 7.17%, RSD 分别为 1.33%, 1.80%, 1.97%, 表明该方法重复性良好。

### 3 讨论

中药超临界萃取物的化学成分分析常采用 GC 和 HPLC, 但由于 GC 中样品需要气化, 具备活泼丁烯基的热不稳定性物质藁本内酯易发生异构化反应, 会导致测定结果的不准确性, 故选用 HPLC-DAD

表 1 川芎 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取物中 3 种指标成分的

药效成分	加样回收率试验					
	样品中 质量 / $\mu\text{g}$	添加量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
阿魏酸	1.068	1.143	2.117	95.75	95.87	0.99
	1.046	1.143	2.066	94.38		
	1.082	1.143	2.148	96.54		
	1.085	1.143	2.140	96.05		
	1.051	1.143	2.093	95.40		
	1.093	1.143	2.171	97.11		
洋川芎内酯 A	9.565	7.143	16.05	96.06	96.85	1.04
	9.548	7.143	16.00	95.86		
	9.932	7.143	16.78	98.27		
	9.904	7.143	16.64	97.61		
	9.785	7.143	16.47	97.29		
	9.638	7.143	16.11	96.00		
藁本内酯	15.23	16.65	33.12	103.9	102.2	1.29
	15.34	16.65	33.15	103.6		
	15.88	16.65	32.88	101.1		
	15.75	16.65	32.60	100.6		
	15.40	16.65	32.66	101.9		
	15.79	16.65	33.12	102.1		

对川芎 CO<sub>2</sub>-SFE 中 3 种药效组分进行分析。测定过程中藁本内酯含量基本稳定, 未出现纯品状态下的脱氢、氧化、水解、降解等异构化反应, 这除了与 HPLC 条件温和有关, 还可能因川芎 CO<sub>2</sub>-SFE 中本身含有一定比例的异构化产物(E 型), 使异构化反应趋于平衡所致<sup>[10-11]</sup>。藁本内酯具有 Z 型和 E 型 2 种异构体, 由于 Z 型结构具有空间优势构象, 使其在中药材中含量约为 E 型的 10 倍<sup>[12]</sup>。

预试验比较了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.3% 乙酸水共 3 种流动相系统, 结果发现以乙腈-0.3% 乙酸水为流动相时分离效果较好。同时考察了不同梯度洗脱程序和洗脱时间, 结果发现 2.1 项下色谱条件能使药效成分达基线分离, 无干扰且重复性好。通过 DAD 检测器获取各指标成分的紫外光谱图, 确定了阿魏酸、洋川芎内酯 A 和藁本内酯的最大吸收波长, 相对于多种成分在同一检测波长下的测定更为客观准确。

### [参考文献]

[1] 钟凤林, 杨连菊, 吉力, 等. 不同产地和品种川芎中挥发油成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(3): 147.  
[2] 王平, 陈锡林, 李丽, 等. 川芎、高良姜等挥发油的水蒸汽蒸馏法和超临界流体萃取法比较研究[J]. 中成药, 2004, 26(6): 440.

## UPLC 测定香鳞毛蕨中绵马素 BB 的含量

汤文伟, 沈志滨\*, 尹永芹, 吴洁莹, 张慧, 黄永昌  
(广东药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 建立超高效液相色谱法测定香鳞毛蕨药材中绵马素 BB 的含量。方法: 采用 XBridge™ BEH C<sub>18</sub> (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 三氟乙酸水溶液 (90:10) 为流动相, 流速 0.80 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 290 nm, 柱温 40 °C, 进行测定。结果: 绵马素 BB 在 0.050 28 ~ 0.301 68 μg 线性关系良好 ( $r = 0.999\ 8$ ), 平均回收率为 98.87% (RSD 0.44%)。结论: 该方法快速、准确、重复性好, 可用于香鳞毛蕨的含量测定和质量控制。

**[关键词]** 超高效液相色谱; 香鳞毛蕨; 绵马素 BB; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 10-0051-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100051

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000091.html>

**[网络出版时间]** 2014-03-07 10:59

## Determination of Aspidin BB in *Dryopteris fragrans* by UPLC

TANG Wen-wei, SHEN Zhi-bin\*, YIN Yong-qin, WU Jie-ying, ZHANG Hui, HUANG Yong-chang  
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an UPLC method for the content determination of aspidin BB in *Dryopteris fragrans*. **Method:** Determination was performed on XBridge™ BEH C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid with detection wavelength at 290

**[收稿日期]** 20131120(009)

**[基金项目]** 国家“十二五”重大新药创制专项 (2011zx09102-007-03); 国家自然科学基金项目 (81202885); 广东省科技计划项目 (2011A030100013); 广州市科技计划项目 (12A062131631); 广东省教育厅高层次人才项目 (2010)

**[第一作者]** 汤文伟, 硕士生, 从事中药及复方化学成分研究, Tel: 15919659800, E-mail: tanyweit@163.com

**[通讯作者]** \* 沈志滨, 博士, 教授, 从事中药及复方化学成分研究, Tel: 13724866019, E-mail: szb8113@126.com

- [3] 原永芳, 周践, 郑晓梅, 等. 超临界流体 CO<sub>2</sub> 萃取川芎挥发油化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35 (2): 84.
- [4] 王聪, 刘勇, 王曙. 川芎超临界萃取物及其乙醇提取物的药理作用比较 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24 (3): 250.
- [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.
- [6] 张永祥. 中药药理学新论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 331.
- [7] 李莉, 窦春菊, 姚兰. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取、HPLC 法测定川芎中阿魏酸 [J]. 化学分析计量, 2006, 15 (2): 42.
- [8] 银玲, 彭月, 陈鸿平, 等. 新老产地川芎中 3 种内酯成分的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (7): 120.
- [9] 张贵君, 罗容, 王奕洁. 中药药效组分理论与中药组分子学 [J]. 中药材, 2007, 30 (2): 125.
- [10] 李桂生, 马成俊, 李香玉, 等. 藜本内酯稳定性研究及异构化产物的 GC-MS 分析 [J]. 中草药, 2000, 31 (6): 405.
- [11] 左爱华, 王莉, 肖红斌. 洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的降解产物研究 [J]. 中草药, 2012, 43 (11): 2127.
- [12] Zhang X Z, Xiao H B, Xu Q, et al. Characterization of phthalides in *Ligusticum chuanxiong* by liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41 (8): 428.

[责任编辑 刘德文]