

一测多评法测定川芎、当归中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量

杨艳^{1,2}, 刘云华², 黄志芳², 刘玉红², 陈燕², 杨昌林², 易进海^{2*}

(1. 泸州医学院, 四川 泸州 646000; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041)

[摘要] 目的:建立 HPLC 一测多评法测定川芎、当归中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的分析方法。方法:以丁苯酞作为洋川芎内酯 A 和藁本内酯的内标,在不同条件下测定相对校正因子,利用校正因子和内标测定川芎、当归中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量。结果:丁苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯进样量分别在 0.199 4 ~ 3.988 ($r = 0.999 9$), 0.043 46 ~ 0.869 2 ($r = 0.999 9$) 和 0.080 67 ~ 1.613 4 μg ($r = 0.999 9$) 与峰面积呈良好的线性关系,测得洋川芎内酯 A、藁本内酯对丁苯酞的校正因子分别为 0.490 7 和 0.226 3。结论:用丁苯酞作为内标,测定川芎、当归中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量,解决了对照品不稳定的难题,该方法简便可行,可用于川芎、当归的质量控制。

[关键词] 校正因子; 含量测定; 洋川芎内酯 A; 藁本内酯; 川芎; 当归; 一测多评

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0058-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030058

Determination of Senkyunolide A and Ligustilide in Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix by QAMS

YANG Yan^{1,2}, LIU Yun-hua², HUANG Zhi-fang², LIU Yu-hong², CHEN Yan², YANG Chang-lin², YI Jin-hai^{2*} (1. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Sichuan Provincial Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of senkyunolide and ligustilide in Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix by QAMS. **Method:** To measure the correction factor of ligustilide and senkyunolide under different conditions using the butylphalide as the internal reference standard, and the ligustilide and senkyunolide in Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix were determined by the internal reference standard and the relative correction factor. **Result:** The linear response ranges of butylphalide, senkyunolide and ligustilide were 0.199 4-3.988 ($r = 0.999 9$), 0.043 46-0.869 2 ($r = 0.999 9$) and 0.080 67-1.613 4 μg ($r = 0.999 9$) respectively. Relative correction factors of senkyunolide and ligustilide with reference to butylphalide were 0.490 7 and 0.226 3. **Conclusion:** The internal reference standard is adopted to determine senkyunolide and ligustilide in Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix. This accurate method is available and applied for quality of Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix.

[Key words] correction factor; assay; senkyunolide; ligustilide; Chuanxiong Rhizoma; Angelicae Sinensis Radix; QAMS

川芎具有活血行气、祛风止痛的功效;当归具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效;藁本具有祛风、散寒、除湿、止痛的功效。川芎、当归和藁本均属于伞形科植物,三者的化学成分和功效有相似之处,其挥发油成分为苯酞类衍生物,与川芎、当归和藁本

的功能主治密切相关,其主要代表性有效成分为藁本内酯和洋川芎内酯 A^[1-2],故应测定该类成分的含量以便客观评价和控制川芎、当归、藁本的内生质量。目前文献报道均是以洋川芎内酯 A 和藁本内酯为对照品,采用外标法测其二者的含量^[3-4];但洋

[收稿日期] 20140522(007)

[基金项目] 2015 年版《中国药典》科研计划项目;中国科学院重点部署项目(KSZD-EW-Z-004)

[第一作者] 杨艳,在读硕士,从事中药化学成分与质量标准研究, Tel:18782125117, E-mail:154984840@qq.com

[通讯作者] * 易进海,研究员,从事中药化学成分与质量评价研究, Tel:028-85210843, E-mail:yijinhai63@163.com

川芎内酯 A 和藁本内酯稳定性差,不宜作为法定的含量测定用对照品,现行 2010 年版《中国药典》还没有收载洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量测定方法。本课题组前期报道了以稳定的丁苯酞作为替代对照品,采用双波长检测,同时测定川芎中丁苯酞和藁本内酯的含量,但丁苯酞的含量比较低^[5];本文进一步改进分析方法,以丁苯酞作为内标,采用单波长检测,同时测定主要有效成分洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量,为川芎、当归和藁本的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1200 和 1100 系列高效液相色谱系统(色谱仪 1,2,美国 Agilent),1525-2487 型高效液相色谱系统(Breeze 液相色谱工作站色谱仪 3,美国 Waters); Agilent Eclipse XDB-C₁₈, Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)(色谱柱 1,2), Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)(色谱柱 3), AUW220D 型 1/10 万电子天平(日本岛津)。

川芎、当归和藁本购自中药房、药店、药材市场等,经本院舒光明研究员鉴定,分别为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎、当归 *Angelica sinensis* 的干燥根、藁本 *Ligusticum sinense* 或辽藁本 *L. jeholense* 的干燥根茎和根。丁苯酞对照品(批号 101035-200901)购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用;洋川芎内酯 A 和藁本内酯对照品由本实验室自制,经核磁共振波谱法^[6-7]测定其绝对含量分别为 90.61% 和 92.80% (HPLC 峰面积纯一化法测得含量均 > 98.0%)。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

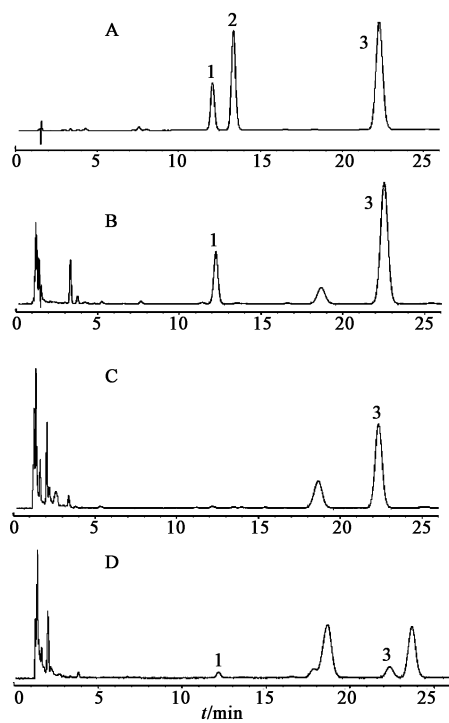
2.1.1 对照品溶液 精密称取丁苯酞对照品 49.85 mg,置 25 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得丁苯酞对照品储备溶液;精密称取藁本内酯对照品 21.73 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得藁本内酯对照品储备溶液;精密称取洋川芎内酯 A 对照品 11.99 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得洋川芎内酯 A 对照品储备溶液。分别精密量取上述对照品储备溶液各 1 mL,置同一 10 mL 棕色量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(每 1 mL 含丁苯酞 199.4 μg,含藁本内酯 80.67 μg,含洋川芎内酯 A 43.46 μg)。

2.1.2 供试品溶液 取川芎、当归、藁本粉末(过

三号筛)各约 0.2 g,精密称定,分别置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(100 W,40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,置棕色瓶中,即得。

2.2 测定波长的选择 取丁苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯对照品,在 200 ~ 400 nm 扫描,测得丁苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯三者共同的吸收波长为 280 nm。

2.3 色谱条件与系统适用性 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 甲醇-水(52:48),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 5 μL,检测波长 280 nm。理论板数按藁本内酯峰计算不低于 3 000。见图 1。



1. 洋川芎内酯 A; 2. 丁苯酞; 3. 藁本内酯; A. 混合对照品
图 1 川芎(B)、当归(C)和藁本(D) HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of Chuanxiong Rhizoma (B), Angelicae Sinensis Radix(C) and Ligustici Rhizoma et Radix (D)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察、检测限和定量限测定 精密吸取上述混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL, 按 2.3 项下色谱条件分别测定丁苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯的峰面积,重复 3 次,取平均值。以进样量 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,计算标准曲线,结果见表 1。当信噪比(S/N)为 3 时的被测物浓度为检测限,信噪比(S/N)为 10 时的被测浓度为定量

限,据此测得丁苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯的检测限和定量限见表 1。

表 1 3 个成分的标准曲线、检测限和定量限

Table 1 Liner correlation, limit of detection and limit of quantitation of three components

成分	线性方程	r	线性范围/ μg	检测限/ng	定量限/ng
丁苯酞	$Y = 539.52X - 0.266$	0.999 9	0.199 4 ~ 3.988	2.0	6.2
藁本内酯	$Y = 2\ 389X - 2.067\ 1$	0.999 9	0.080 67 ~ 1.613 4	0.8	2.5
洋川芎内酯 A	$Y = 1\ 101.5X - 0.644\ 4$	0.999 9	0.043 46 ~ 0.869 2	0.9	3.0

2.4.2 相对校正因子的测定及测定方法耐用性考察 以丁苯酞作为内标,按照公式相对校正因子(f) = $(A_i \times C_r) / (A_r \times C_i)$ [A_i 为内标的峰面积; A_r 为真实对照品的峰面积; C_i 为内标的浓度; C_r 为真实对照品的浓度),计算不同进样量时洋川芎内酯 A 对丁苯酞的校正因子 f_1 和藁本内酯对丁苯酞的校正因子 f_2 的平均值分别为 0.490 7, 0.226 3, RSD 分别为 0.2%, 0.2%。结果见表 2。

2.4.2.1 仪器波长对 f 测定的影响 精密吸取 2.1.1 项下的混合对照品溶液,分别在 278, 279, 280, 281, 282 nm 波长处测定丁苯酞、藁本内酯和洋川芎内酯 A 对照品的峰面积,计算校正因子 f_1 的平均值为 0.501 5, f_2 的平均值为 0.2301, RSD 分别为 0.8% 和 1.5%。结果表明在同一台高效液相色谱仪(色谱仪 1)上,波长变化对 f_1 和 f_2 的影响不大。

表 2 洋川芎内酯 A 与藁本内酯对丁苯酞的相对校正因子 ($n = 3$)
Table 2 Relative correction factors of senkyunolide A and ligustilide with reference to butylphalide ($n = 3$)

进样体积 / μL	f_1	f_2
1	0.489 4	0.227 0
2	0.491 8	0.226 8
5	0.492 0	0.226 2
10	0.491 1	0.226 1
15	0.490 0	0.226 0
20	0.490 0	0.225 9

2.4.2.2 仪器流速对 f 测定的影响 用同一台液相色谱仪(色谱仪 1),分别在 0.9, 0.98, 1.0, 1.02, 1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 测定丁苯酞、藁本内酯和洋川芎内酯 A 对照品的峰面积,计算校正因子 f_1 的平均值为 0.491 0, f_2 的平均值为 0.229 0, RSD 分别为 0.07% 和 0.05%。结果表明在同一台高效液相色谱仪上,流速变化对 f_1 和 f_2 的影响不大。

2.4.2.3 仪器柱温对 f 值测定的影响 用同一台

液相色谱仪(色谱仪 1),分别在 26, 29, 32, 35, 38 $^{\circ}\text{C}$ 测定丁苯酞、藁本内酯和洋川芎内酯 A 对照品的峰面积,计算校正因子 f_1 的平均值为 0.492 5, f_2 的平均值为 0.228 6, RSD 分别为 0.5% 和 0.3%。结果表明在同一台高效液相色谱仪上,温度变化对 f_1 和 f_2 的影响不大。

2.4.2.4 流动相组成比例对 f 测定的影响 用同一台液相色谱仪(色谱仪 1),在流动相以甲醇-水的比例为 50:50, 52:48, 54:46 时,分别测定丁苯酞、藁本内酯和洋川芎内酯 A 对照品的峰面积,计算校正因子 f_1 的平均值为 0.493 8, f_2 的平均值为 0.229 5, RSD 分别为 1.7% 和 0.3%。结果表明在同一台高效液相色谱仪上,流动相比例变化对 f_1 和 f_2 的影响不大。

2.4.2.5 不同品牌或不同批号的同类型色谱柱对 f 值测定的影响 用同一台液相色谱仪(色谱仪 1),分别用不同品牌或不同批号的同类型色谱柱,测定丁苯酞、藁本内酯和洋川芎内酯 A 对照品的峰面积,计算校正因子 f_1 的平均值为 0.497 7, f_2 的平均值为 0.229 4, RSD 分别为 1.1% 和 0.2%。结果表明在同一台高效液相色谱仪上,不同品牌或不同批号的同类型色谱柱对 f_1 和 f_2 的影响不大。

2.4.2.6 不同液相色谱仪对 f 测定的影响 用 Agilent Eclipse XDB- C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm) 色谱柱,分别在 Agilent1200 (色谱仪 1); Agilent1100 (色谱仪 2); Waters1525-2487 (色谱仪 3) 3 台高效液相色谱仪上测定。计算校正因子 f_1 的平均值为 0.494 1, f_2 的平均值为 0.229 4, RSD 分别为 1.3% 和 1.7%。结果表明不同高效液相色谱仪对 f_1 和 f_2 的影响不大。

2.4.3 待测组分色谱峰的定位 经研究发现,只使用丁苯酞作为对照品时,引入两组分的相对保留时间值并结合色谱峰的紫外吸收光谱特征可以作为定位藁本内酯峰和洋川芎内酯 A 峰的标准。本文考察了在不同品牌仪器和不同规格色谱柱中的重复性,得

到洋川芎内酯 A 对丁苯酞的相对保留时间的平均值为 0.91, 藁本内酯对丁苯酞的相对保留时间的平均值为 1.64, RSD 分别为 0.4% 和 1.3% ($n=6$)。表明不同品牌色谱仪和不同规格的色谱柱对相对保留时间值的影响不大, 因此, 可以根据相对保留时间值来定位藁本内酯峰和洋川芎内酯 A 色谱峰。

2.4.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 按 2.3 项下连续进样 6 次, 记录峰面积, 洋川芎内酯 A 和藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 1.1% 和 0.06%, 表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样测定峰面积, 洋川芎内酯 A 和藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和

0.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内测定, 结果稳定。

2.4.6 重复性试验 取川芎药材粉末(批次 No. 1) 0.2 g, 精密称定, 共 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备样品, 测定, 洋川芎内酯 A 和藁本内酯的平均含量分别为 0.581 4% 和 1.111 4%, RSD 均为 0.7%。表明该方法的重复性良好。

2.4.7 加样回收率 取川芎药材粉末(批次 No. 1) 0.1 g, 精密称定, 共 6 份, 分别精密加入含洋川芎内酯 A ($0.391 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和藁本内酯 ($0.742 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的对照品溶液各 1.5 mL, 照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 测定并计算加样回收率, 洋川芎内酯 A 和藁本内酯的平均回收率分别为 100.2% 和 97.4%, RSD 均为 1.2%。结果见表 3。

表 3 川芎药材中 2 种成分的加样回收率试验

Table 3 Recovery tests of two components of Chuanxiong Rhizoma

测定成分	称样量/mg	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
洋川芎内酯 A	101.9	0.592 4	0.586 7	1.171 7	98.7	100.2	1.2
	102.3	0.594 8	0.586 7	1.180 2	99.8		
	99.1	0.576 2	0.586 7	1.165 8	100.5		
	102.4	0.595 4	0.586 7	1.193 3	101.9		
	101.4	0.589 5	0.586 7	1.173 0	99.5		
	102.0	0.593 0	0.586 7	1.186 1	101.1		
藁本内酯	101.9	1.132 5	1.113 2	2.205 7	96.4	97.4	1.2
	102.3	1.137 0	1.113 2	2.230 6	98.2		
	99.1	1.101 4	1.113 2	2.177 2	96.6		
	102.4	1.138 1	1.113 2	2.245 2	99.5		
	101.4	1.127 0	1.113 2	2.208 8	97.2		
	102.0	1.133 6	1.113 2	2.208 4	96.5		

2.5 一测多评法与外标法测定结果比较研究 为验证一测多评法测定结果的准确性, 本文采用常规对照品作为外标的方法和一测多评法分别测定了 10 批川芎、10 批当归和 10 批藁本中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量, 见表 4。结果显示, 两种方法所测得的含量无明显差异。

3 讨论

根据对照品的紫外吸收光谱, 可知丁苯酞、洋川芎内酯 A 和藁本内酯的最大吸收波长分别为 228, 280, 330, 280 nm 为三者共同的吸收波长, 故选择 280 nm 单波长检测进行含量测定。由于样品中丁苯酞的含量较低, 且在 280 nm 吸收强度弱, 低于定量限, 故 280 nm 检测波长不能同时测定丁苯酞的含量。

采用对照品丁苯酞作为内标, 测定川芎、当归和

藁本中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量, 该方法简便可行, 解决了对照品不稳定的难题。本文研究结果表明, 川芎中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量较高, 而当归不含洋川芎内酯 A, 可作为二者的特征性鉴别成分, 藁本中洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量差异很大, 尚需进一步积累数据。

洋川芎内酯 A 和藁本内酯对照品不稳定, 制备后应立即使用或置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 短期保存, 临用时应重新标定其含量。由于二者稳定性差, 为油状物质, 在制备过程中常残留部分溶剂或降解产物, HPLC 峰面积归一化法测得的含量往往偏高^[6], 因此, 本文采用核磁共振波谱法测得洋川芎内酯 A、藁本内酯对照品的绝对含量分别为 90.61% 和 92.80%, 进行相对校正因子测定, 保证测定结果的准确可靠。

表 4 两种方法测得的川芎、当归和藁本药材含量

Table 4 Contents of Chuanxiong Rhizoma, Angelicae Sinensis Radix and Ligustici Rhizoma et Radix by two methods

%

川芎				当归			藁本	
川芎内酯		藁本内酯		川芎内酯	藁本内酯		川芎内酯	藁本内酯
外标法	一测多评法	外标法	一测多评法		外标法	一测多评法		
0.584	0.578	1.127	1.117	-	0.481	0.471	0.029	0.046
0.573	0.566	1.039	1.030	-	0.264	0.259	0.020	0.011
0.571	0.564	1.070	1.060	-	0.034	0.033	0.730	0.180
0.571	0.565	0.947	0.938	-	0.315	0.309	0.027	0.021
0.641	0.634	1.138	1.128	-	0.458	0.449	0.163	0.172
0.489	0.484	1.049	1.040	-	0.488	0.479	-	-
0.593	0.586	1.041	1.032	-	0.925	0.907	-	0.022
0.609	0.603	0.834	0.826	-	0.350	0.343	0.035	0.076
0.465	0.459	1.001	0.992	-	0.470	0.461	-	-
0.589	0.582	0.997	0.988	-	0.296	0.290	0.030	-

[参考文献]

[1] 王珂,马逾英,张利,等. 三个不同产地的川芎与其近缘植物藁本的挥发油成分对比分析[J]. 中国现代中药,2009,11(7):20-22.

[2] 陈凌霞,王玲. 当归川芎的挥发油成分和药用功效对比研究[J]. 河南师范大学学报,2012,40(1):103-107.

[3] 项海燕. 川芎 6 种活性成分的含量测定[J]. 亚太传统医药,2009,5(11):37-39.

[4] 郭小藤,赵睁睁,容蓉,等. 两种方法测定川芎油中藁

本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酐的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):95-98.

[5] 刘云华,易进海,邵华武,等. 替代对照品法同时测定川芎中丁苯酐和藁本内酯的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(5):758-762.

[6] 易进海,刘云华,陈燕,等. 核磁共振波谱法测定藁本内酯对照品的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(4):680-682.

[7] 郝红娟,靳岚. 核磁共振波谱法在药物分析中的应用[J]. 药物生物技术,2013,20(5):453-457.

[责任编辑 顾雪竹]