

两种方法测定川芎油中藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞的含量

郭小藤, 赵铮铮, 容蓉*, 吕青涛, 蒋海强
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 建立同时测定川芎油中藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞含量的方法, 比较两种方法分析结果的差异。方法: 采用超临界 CO₂ 萃取法和水蒸气蒸馏法提取川芎油, 分别采用气相色谱质谱联用 (GC-MS) 内标法和高效液相色谱 (HPLC) 外标法测定, 并进行方法学考察。结果: SFE-CO₂ 萃取法和水蒸气蒸馏法的出油率分别为 10.49%, 1.54%, 以每克药材中提取得到的藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞的量计算, SFE-CO₂ 萃取法分别可得 19.676, 15.56, 0.957 4 mg, 水蒸气蒸馏法提取可得 2.16, 1.56, 0.11 mg。GC-MS 法测定结果较 HPLC 法低 1%~4%, 平均精密度高 10%、检测限低 10 倍。结论: GC-MS 内标法精密度、灵敏度都较好, 对川芎油的含量的分析较为准确; HPLC 法是一种相对方便、经济的方法。

[关键词] 川芎油; 藁本内酯; 洋川芎内酯 A; 正丁基苯酞; 气相色谱-质谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0095-04

Simultaneous Determination of Ligustilide, Senkyunolide A And *N*-Butylphthalide in the Essential Oil of Chuanxiong Rhizoma by GC-MS and HPLC

GUO Xiao-teng, ZHAO Zheng-zheng, RONG Rong*, LV Qing-tao, JIANG Hai-qiang
(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the simultaneous determination method for ligustilide, senkyunolide A and *n*-butylphthalide in the essential oil of Chuanxiong Rhizoma, and to compare the results of HPLC and GC-MS method. **Method:** The oil was obtained through supercritical CO₂ extraction and steam distillation, and the contents of the above three compounds were determined by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) with internal standard method and high performance liquid chromatography (HPLC) with external standard method respectively and methodology was also inspected. **Result:** The oil yields were 10.49% and 1.54% respectively. The contents of the three compounds were 19.676, 15.56, 0.957 4 mg per gram crude drug in SFE-CO₂ extraction and 2.16, 1.56 and 0.11 mg in volatile oil which measured by GC-MS was 1%~4% less than the value which obtained by HPLC. Compared with the result by HPLC, GC-MS is more scientific with 10% higher precision and tenfold detection limit. **Conclusion:** In the determination of components in the essential oil of Chuanxiong Rhizoma, GC-MS internal standard method is a more accurate and sensitive method whereas HPLC is a relatively convenient and economical method.

[Key words] *Ligusticum chuanxiong* oil; ligustilide; senkyunolide A; *n*-butylphthalide; GC-MS; HPLC

川芎为伞形科蒿本属植物川芎的根茎, 性温、味辛、微苦, 具有活血行气、祛风止痛之功效。川芎主

[收稿日期] 20111209(001)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2009CM055)

[第一作者] 郭小藤, 硕士研究生, 从事药物化学专业, E-mail: ghaut@126.com, Tel: 15275124805

[通讯作者] * 容蓉, 教授, 从事中药复方活性与质量控制研究, Tel: 0531-89628593, E-mail: r.rong@sducm.edu.cn

要含有挥发油、生物碱、酚类、有机酸类和苯酞内酯类成分。川芎挥发油是川芎中起心脑血管疾病治疗作用的主要成分^[1],其中洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯含量较高^[2],正丁基苯酞也是其重要活性成分^[3],但由于该 3 种物质均具有易氧化、易水解等不稳定特性,分离、保存和测定都具有一定的难度^[4]。有文献报道采用紫外分光光度法^[5]、气相色谱归一化法^[6]、高效液相色谱法等对藁本内酯进行测定^[7],但在 2010 年版《中国药典》中未见收录。本文采用气相色谱质谱联用(GC-MS)内标法和高效液相色谱(HPLC)外标法,分别对川芎超临界 CO₂(SFE-CO₂)萃取物及水蒸汽蒸馏挥发油中的藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞的含量进行测定,为川芎药材的质量控制研究以及该 3 种成分在体内的吸收、代谢分析提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 6890-5973N 型气质联用仪(美国 Agilent 公司),Applied separations spre-end 型超临界萃取装置(美国 ASF 公司),AF240 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. (购自济南建联中药店,批号 20100911),藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 110773-200912, 110773-201002, 110773-201010),正十八烷(色谱纯,上海第一试剂厂),乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 SFE-CO₂ 萃取物及挥发油的制备 称取川芎粉末(过 40 目筛)50 g 投入萃取釜中,萃取压力 20 MPa、萃取温度 45 °C、CO₂ 流速 1.5 L·min⁻¹ 进行萃取。收集萃取液,用无水乙醇洗涤转移,N₂ 吹干,测得出油率为 10.49%, -20 °C 低温保存。

称取上述川芎粉末 100 g,加 10 倍量蒸馏水,摇匀,按《中国药典》2010 年版(一部)附录 XD 挥发油测定法(甲法)项下连接装置,加热提取 6 h,测得出油率为 1.54%, -20 °C 低温保存。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞对照品,精密称定,加乙腈溶解制得质量浓度分别为 6.050, 3.695, 1.520 g·L⁻¹ 的混合对照品储备液。精密移取对照品储备液 0.5 mL 置 5 mL 量瓶内,用乙腈定容至刻度作为 GC-MS 对照品母液;精密移取混合对照品储备液 0.15 mL

置 10 mL 量瓶内,用乙腈定容至刻度,作为 HPLC 对照品母液。取正十八烷适量,精密称定,加乙腈配制成 101.5 mg·L⁻¹ 的内标溶液。以上溶液 4 °C 保存,备用。

2.2.2 GC-MS 供试品溶液制备 取 2.1 项下川芎 SFE-CO₂ 萃取物 0.2 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用乙腈定容至刻度,作为 SFE-CO₂ 供试品母液,精密量取 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中,精密加入内标液 1.0 mL,乙腈定容,作为供试液 1。

取 2.1 项下水蒸气挥发油 0.5 g,精密称定,转移至 1 mL 量瓶中,乙腈定容至刻度,从中精密量取 0.2 mL 置 10 mL 量瓶中,用乙腈定容至刻度,作为供试液 2。

2.2.3 HPLC 供试品溶液的制备 取 2.2.2 项下 SFE-CO₂ 供试液 1,精密量取 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加乙腈定容至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试液 3。

精密量取 2.2.2 项下 100 μL 供试液 2 于 10 mL 量瓶中,乙腈定容至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液 4。

2.3 色谱条件 GC 条件 色谱柱 Agilent HP-5 MS (0.25 μm × 250 μm × 30 m),载气 He,流量 1 mL·min⁻¹,程序升温(初始温度 180 °C,保持 7 min,以 20 °C·min⁻¹ 的速度升温至 250 °C,保持 5 min);进样口温度 250 °C,检测器温度 300 °C;进样量 2 μL,不分流进样。MS 条件 EI 源,自动调节,接口温度 280 °C,溶剂延迟 2 min,选择离子监测(SIM),选取的监测离子见表 1。

表 1 GC-MS 法 SIM 监测离子

t/min	组别	监测离子		
2.0	1	77.0	105.0	133.0
4.8	2	77.1	107.0	192.1
5.7	3	148.0	161.1	190.1
6.2	4	57.0	71.0	85.0

HPLC 条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.085% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 50% A; 10 ~ 20 min, 50% ~ 60% A);流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长藁本内酯 328 nm、洋川芎内酯 A 280 nm、正丁基苯酞 228 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。

2.4 线性关系考察 GC-MS 标准曲线 精密移取 GC-MS 对照品母液 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中,精密加入内标溶液 0.1 mL,乙

臍定容至刻度,即得系列混合对照品溶液,按 2.2 项下 GC-MS 条件测定。分别以对照品与内标峰面积为纵坐标(Y),各对照品量(μg)为横坐标 X 进行线性回归,藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞回归方程分别为 $Y = 0.024X - 0.157 (r = 0.9999)$, $Y = 0.019X + 0.045 (r = 0.9999)$, $Y = 0.168X - 0.031 (r = 0.9999)$,表明其分别在 $0.0484 \sim 1.21 \mu\text{g}$, $0.01478 \sim 0.3696 \mu\text{g}$, $0.00122 \sim 0.0304 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

HPLC 标准曲线 精密移取 HPLC 对照品母液 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,乙臍定容至刻度,按 2.2 项下 HPLC 条件测定。分别以峰面积为纵坐标(Y),各对照品量(μg)为横坐标(X)进行线性回归,藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞回归方程分别为 $Y = 1.2276X - 4.2125 (r = 1)$, $Y = 0.5814X + 11.806 (r = 0.9996)$, $Y = 2.9461X - 48.692 (r = 0.9999)$,表明其分别在 $0.26 \sim 4.16$, $0.1672 \sim 4.18$, $0.063 \sim 3.36 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.1 项下 GC-MS 对照品母液和 HPLC 对照品母液,连续重复进样 6 次,GC-MS 法测得藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞 RSD 分别为 0.042%, 0.090%, 0.032%, HPLC 法测得 3 种成分 RSD 分别为 0.068%, 0.095%, 0.237%。

2.6 重复性试验 取同一批 SFE- CO_2 萃取物 6 份,精密称定,按 2.1.3 和 2.1.4 项下制备分别制备用于 GC-MS 和 HPLC 的 SFE- CO_2 萃取物供试液,重复取样测定 5 次,GC-MS 测定的藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞的 RSD 分别为 0.65%, 0.74%, 0.33%, HPLC 测定 3 种成分的 RSD 分别为 3.60%, 1.50%, 0.39%。结果表明两种方法重复性良好。

2.7 回收率试验 取已知含量的 SFE- CO_2 萃取物样品 6 份,每份约 0.1 g,精密称定,按样品中各成分含有量精密加入混合对照品储备液适量,按 2.1.3 和 2.1.4 项下制备供试品溶液,按 2.2 项下方法测定,结果见表 2。

2.8 检测限和定量限 将低浓度样品用逐步稀释法稀释,以信噪比 3:1 为检测限、10:1 为定量限进行测定。GC-MS 法测得藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞的定量限分别为 0.159, 0.838, 0.119 ng,最低检测限分别为 0.052, 0.126, 0.0216 ng; HPLC 法测得定量限分别为 3.70, 9.70, 2.02 ng,最低检测限分别为 1.58, 1.46, 0.378 ng。

表 2 藁本内酯、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞加样回收率试验 ($n = 9$) %

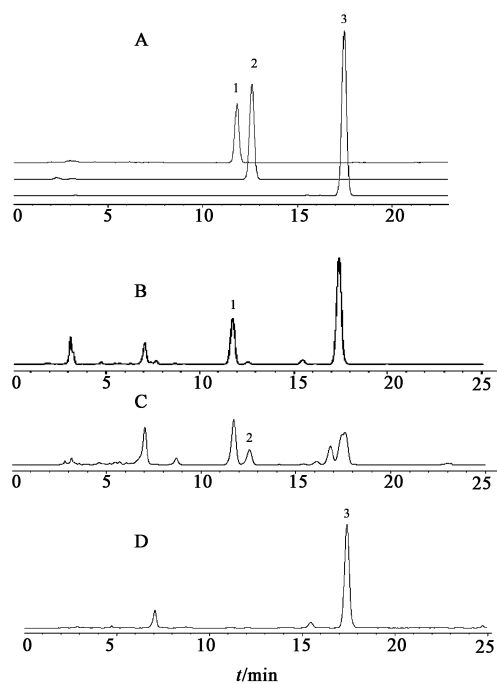
成分	GC-MS		HPLC	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
藁本内酯	97.52	0.90	98.29	1.26
洋川芎内酯 A	97.97	0.89	99.01	1.24
正丁基苯酞	97.30	0.67	98.78	0.87

2.9 3 种成分的含量测定 任取超临界 CO_2 萃取和水蒸汽蒸馏川芎油样品 7 个,分别按照 2.2 项下两种方法测定供试品溶液 1~4,结果见表 3、图 1, 2。数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析处理;采用 χ^2 检验, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

表 3 两种方法测定的川芎油中 3 种成分的含量 %

成分	SFE- CO_2 萃取物				挥发油			
	HPLC	RSD	GC-MS	RSD	HPLC	RSD	GC-MS	RSD
藁本内酯	14.65	3.34	14.05	2.53	23.25	3.85	22.56	2.84
洋川芎内酯 A	10.14	3.59	10.14	2.95	1.033	4.05	1.016	3.01
正丁基苯酞	0.7129	4.63	0.7129	3.68	5.695	4.23	5.478	3.89

注:两种方法测定含量的结果比较 $P_{\text{均}} > 0.01$ 。

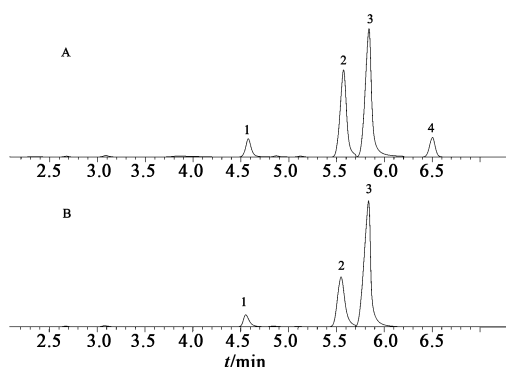


1. 洋川芎内酯 A (280 nm); 2. 正丁基苯酞 (228 nm); 3. 藁本内酯 (328 nm)

图 1 对照品 (A) 及供试品溶液 (B, C, D) 的 HPLC

3 讨论

建立了 GC-MS 内标法及 HPLC 外标法同时测定川芎油中藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞



1. 正丁基苯酞; 2. 洋川芎内酯 A; 3. 藁本内酯; 4. 正十八烷

图 2 对照品(A)及供试品溶液 1(B)的 GC-MS

的含量,并分别对这两种方法进行了方法学考察。结果表明,GC-MS 法测定样品中 3 种成分的检测限、定量限均低于 HPLC,说明 GC-MS 法具有较高的灵敏度。

GC-MS 中利用 SIM 检测时,通过选择待测化合物丰度较大的特征离子作为定量目标离子及定性离子,可消除共存组分的干扰,从而获得较高的选择性及灵敏度,因此在样品分离度不佳或背景干扰较大时,GC-MS 的 SIM 检测法比 HPLC-DAD 法具有较大优势。

通过比较川芎 SFE-CO₂ 萃取物和挥发油中两种方法测得的 3 种成分的含量,结果基本一致,GC-MS 法测定结果较 HPLC 低 1% ~ 4%。经统计学分析,两种方法测定的含量结果无显著性差异($P_{均} > 0.01$),说明两种方法都具有较高的准确性和同样的可靠性。由于 GC-MS 测定的选择性更高,故认为其结果更接近于真实值。

相较于 GC-MS 法,HPLC 仪器造价与运行成本相对较低,是一种较为经济实用的测定方法,适宜于常量成分的含量测定。GC-MS 法选择性高、灵敏度高,测定结果更接近于真实值,适宜于痕量成分的含量分析,尤其适用于药代动力学研究中对复杂的生物样品中活性成分的检测分析。

研究结果显示,挥发油中的藁本内酯和正丁基苯酞的含量高于 SFE-CO₂ 萃取物中的含量,而洋川

芎内酯 A 的含量远远低于 SFE-CO₂ 萃取物,可能是由于水蒸汽蒸馏过程中的开放体系及高温过程会导致洋川芎内酯 A 产生异构化反应^[8],导致含量降低。但是由于 SFE-CO₂ 萃取物的出油率(10.49%)比挥发油(1.54%)高,以每克药材中提取得到的藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞的量计算,SFE-CO₂ 萃取法分别可得 19.676, 15.56, 0.957 4 mg,水蒸气蒸馏法提取可得 2.16, 1.56, 0.11 mg;结果表明,SFE-CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法相比,具有提取时间短、提取效率高、活性组分含量高的优点,且萃取过程温度低,系统密闭,可避免对小分子易挥发物质、热不稳定及易氧化成分的破坏,能更真实的反映出药材中的化学组分。从出油率和总含量两方面综合考虑,SFE-CO₂ 萃取法是一种更适合提取川芎油的方法。

[参考文献]

- [1] 龚彦胜, 李晓宇, 孙蓉. 基于功效与药理作用川芎抗冠心病心绞痛的物质基础研究进展[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(11): 675.
- [2] 迈小敏, 王宏洁, 司南, 等. 川芎、杭黄菊药材单提与合提挥发油成分的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 92.
- [3] 袁晓勇. 丁苯酞的药理作用与药动力学研究及临床评价[J]. 中国社区医师:医学专业, 2011, 13(15): 6.
- [4] 田雅琴, 王新霞, 高丽红. 川芎挥发油稳定性考察[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(7): 49.
- [5] 胡长鹰, 丁霄霖. 当归油中藁本内酯含量测定的两种方法及比较[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(3): 152.
- [6] 张达磊, 李桂生, 任召言, 等. 气相色谱法测定川芎挥发油中 Z-藁本内酯及川芎内酯 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 895.
- [7] 张玲, 刘友平, 李昱, 等. 川芎化学成分分离鉴定与藁本内酯的含量测定[J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1381.
- [8] 汪洋. 不同提取方法对川芎挥发油成分的影响[J]. 河南农业科学, 2010, 23(8): 114.

[责任编辑 顾雪竹]