

文章编号:1001-6880(2018)6-0997-05

UPLC 法测定川芎生长过程中 6 种主要成分的含量变化

陈 隘,吴 燕,李 彬,吴 萍,郭俊霞,王晓宇,李青苗*

四川省中医药科学院,成都 610041

摘要:采用 UPLC 法测定川芎生长过程中主要酚酸类和苯酞类成分的含量变化。色谱条件为色谱柱 Waters BEH C₁₈ (50 × 2.1 mm i. d., 1.7 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水,梯度洗脱,流速 0.4 mL/min,检测波长 280、320 nm,柱温 35 ℃。绿原酸 0.78 ~ 113.64 μg/mL、阿魏酸 0.19 ~ 5.99 μg/mL、洋川芎内酯 I 0.59 ~ 25.78 μg/mL、阿魏酸松柏酯 5.49 ~ 175.77 μg/mL、洋川芎内酯 A 5.93 ~ 189.82 μg/mL、Z-藁本内酯 15.88 ~ 508.18 μg/mL 范围内线性关系良好;平均回收率 98.72% ~ 109.63%,RSD < 3%。川芎根茎的平均干重在倒苗期达到一个高峰,但此时总苯酞和总酚酸含量均较低;在二次茎叶发生生长期根茎干重下降,总苯酞含量逐渐增高,而总酚酸含量逐渐降低;在根茎膨大期,根茎干重快速增加,单株根茎的平均干重在 6 月初达到最大值 26.51 ± 2.94 g,此时总酚酸和总苯酞的含量分别达到 11.61 mg/g 和 31.08 mg/g,之后便迅速降低。综合考虑根茎干重和主要药效成分含量,四川彭州产区的川芎药材的采挖时间以 5 月底至 6 月初为宜。

关键词:川芎;酚酸类;苯酞类;含量测定;UPLC

中图分类号:R93;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.014

Contents Determination for 6 Main Compounds from *Ligusticum chuanxiong* during Growing Period by UPLC

CHEN Chu, WU Yan, LI Bin, WU Ping, GUO Jun-xia, WANG Xiao-yu, LI Qing-miao*

Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: To determine the contents of the main phenolic acids and phthalides from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* during growth period. Contents of six compounds were simultaneously determined by UPLC. The conditions were as follows: column Waters BEH C₁₈ (50 × 2.1 mm i. d., 1.7 μm), mobile phase 0.1% phosphoric acid and acetonitrile using a gradient program, flow rate 0.4 mL/min, wavelength 280 and 320 nm, column temperature 35 ℃. The results of the good linear ranges were chlorogenic acid 0.78-113.64 μg/mL, ferulic acid 0.19-5.99 μg/mL, senkyunolide I 0.59-25.78 μg/mL, coniferyl ferulate 5.49-175.77 μg/mL, senkyunolide A 5.93-189.82 μg/mL and Z-ligustilide 15.88-508.18 μg/mL. The average recoveries were ranged from 98.72% to 109.63% with RSD < 3%. The method is accurate, convenient and reproducible, and it can be used for rapid determination of the main phenolic acids and phthalides from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. In withering period, the average dry weight of rhizome was in the secondary peak, but the contents of main phenolic acids and phthalides were relatively low. In the secondary growth period of stem and leaf, the average dry weight of rhizome and the contents of main phenolic acids decreased, but the contents of main phthalides increased. In the rhizome expanding period, the average dry weight of rhizome increased quickly and reached its maximum value 26.51 ± 2.94 g at beginning of June, while the contents of the total phenolic acids and total phthalides were in relatively high levels. After that, the contents of main phenolic acids and phthalides decreased quickly. Considering the dry weight and the contents of the main compounds, the optical harvest period is from the end of May to the beginning of June in Pengzhou, Sichuan.

Key words: *Ligusticum chuanxiong*; phenolic acid; phthalide; content determination; UPLC

收稿日期:2017-10-31 接受日期:2018-03-14

基金项目:四川省中药研究所基本科研项目(A-2016N-38);四川省青年科技基金(2017JQ0014);国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-SC-40);四川省科技厅应用基础项目(2017JY0311)

*通信作者 Tel:86-28-85255011;E-mail:qingmiaoli@sina.com

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 干燥根茎,具有行气活血、祛风止痛的功效,用于胸痹心痛,胸部刺痛,风湿痹痛等症^[1]。川芎主要含有酚酸类和苯酞类等成分。这些成分大多具有抗炎、镇痛、抗血栓、抗氧化等药理活性^[2-5]。其中,

阿魏酸松柏酯具有抗氧化、舒张血管、抗抑郁作用，能够有效抑制谷氨酸造成的细胞损伤^[6]；绿原酸具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节、心血管保护等作用^[7]。然而，川芎中的阿魏酸松柏酯、绿原酸含量此前报道较少。超高效液相色谱(Ultra-Performance Liquid Chromatography, UPLC)是基于亚二微米填料的液相色谱，其分离速度更快，柱效更高，能明显提升分析效率、改善分离效果、节省色谱溶剂。作者首次建立了UPLC法同时测定川芎药材中主要酚酸类成分(绿原酸、阿魏酸、阿魏酸松柏酯)以及主要苯酞类成分(洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、Z-藁本内酯)含量的方法，为完善川芎药材的质量评价方法，科学确定川芎药材的适宜采收期提供了科学依据。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC 色谱系统(包括二元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、Empower 2 工作站)，Mettler MS205DU 电子天平；乙腈为 TEDIA 色谱纯，超纯水由 Millipore Milli-Q 制备，其余试剂均为分析纯。

采样地点：四川省彭州市敖平镇；采样方法：川

芎样品于 2015 年 12 月至 2016 年 7 月在固定采样区域每隔 1 个月定期采集 1 次，每次随机采集 15 株代表性植株，采后于通风干燥处自然风干，干燥后称重。样品经四川省中医药科学院方清茂研究员鉴定为川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。绿原酸(批号：MUST-16031610)、阿魏酸(批号：MUST-13112204)对照品购自成都曼斯特生物技术有限公司，洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 A、Z-藁本内酯对照品均为自制(经核磁和质谱鉴定，采用峰面积归一化法计算，纯度均大于 97%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters BEH C₁₈(50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm)；流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)；梯度洗脱 0~0.2 min(5% A), 0.2~7.5 min(5% A ~ 80% A), 7.5~8.0 min(80% A ~ 100% A), 8.0~8.5 min(100% A), 8.5~9.0 min(100% A ~ 5% A), 9.0~10.0 min(5% A)；流速 0.4 mL/min；柱温 35 °C；检测波长 280 nm(洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A), 320 nm(绿原酸、阿魏酸、阿魏酸松柏酯、Z-藁本内酯)；进样体积 1 μL。结果见图 1。

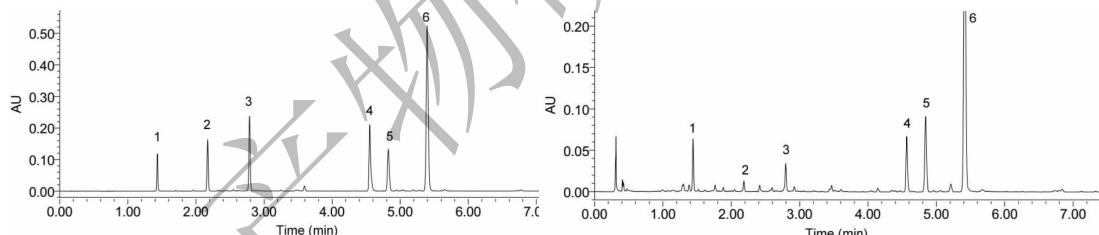


图 1 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed standards (A) and sample (B)

注：1 绿原酸、2 阿魏酸、3 洋川芎内酯 I、4 阿魏酸松柏酯、5 洋川芎内酯 A、6 Z-藁本内酯。

Note: 1 chlorogenic acid, 2 ferulic acid, 3 senkyunolide I, 4 coniferyl ferulate, 5 senkyunolide A, 6 Z-ligustilide.

2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯对照品各 10 mg，精密称定，分别置于 25 mL 量瓶中，用甲醇-甲酸(95:5)溶解并定容至刻度，配成对照品储备液。分别吸取各对照品储备液适量，置于同一 10 mL 量瓶中，用甲醇-甲酸(95:5)定容至刻度，配制成含绿原酸 227.27 μg/mL、阿魏酸 5.99 μg/mL、洋川芎内酯 I 25.78 μg/mL、阿魏酸松柏酯 175.77 μg/mL、洋川芎内酯 A 189.82 μg/mL、Z-藁本内酯 508.18 μg/mL

的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取川芎粉末(过 60 目筛)约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇-甲酸(95:5)25 mL，称定重量，超声(功率 180 W，频率 40 KHz)提取 60 min，放冷，再称定重量，用甲醇-甲酸(95:5)补足减失的重量，摇匀。溶液经 0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，用甲醇-

甲酸(95:5)稀释成不同浓度的系列混合对照品溶液,分别按“2.1”项下的色谱条件测定峰面积,进样

体积 1 μL 。以浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of the analytes

成分 Analyte	回归方程 Calibration curve	相关系数 r	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 7366.8X - 6593.6$	0.9999	0.78 ~ 113.64
阿魏酸 Ferulic acid	$Y = 13054.3X - 88.7$	0.9998	0.19 ~ 5.99
洋川芎内酯 I Senkyunolide I	$Y = 9190.0X + 3088.6$	0.9996	0.59 ~ 25.78
阿魏酸松柏酯 Coniferyl ferulate	$Y = 8151.2X - 11287.9$	0.9996	5.49 ~ 175.77
洋川芎内酯 A Senkyunolide A	$Y = 2781.5X - 2036.7$	0.9999	5.93 ~ 189.82
Z-藁本内酯 Z-ligustilide	$Y = 6978.6X - 17638.8$	0.9999	15.88 ~ 508.18

2.5 精密度

取“2.2”项下混合对照品溶液连续进样 5 次,以峰面积计算, RSD 分别为绿原酸 0.46%、阿魏酸 1.53%、洋川芎内酯 I 1.01%、阿魏酸松柏酯 0.56%、洋川芎内酯 A 0.47%、Z-藁本内酯 0.35%。结果表明,仪器精密度良好。

2.6 重复性

精密称取同一批次供试品 5 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,测定含量, RSD 分别为绿原酸 1.46%、阿魏酸 3.48%、洋川芎内酯 I 4.87%、阿魏酸松柏酯 1.36%、洋川芎内酯 A 1.75%、Z-藁本内酯 1.84%。结果表明,本方法重复性较好。

2.7 稳定性

取同一供试品溶液分别于制备后 0、1、2、4、8 h 进样测定,以峰面积计算稳定性, RSD 分别为绿原酸 0.87%、阿魏酸 3.80%、洋川芎内酯 I 4.80%、阿魏酸松柏酯 0.71%、洋川芎内酯 A 0.68%、Z-藁本内酯 0.53%。结果表明,供试品溶液在 8 h 内基本

稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取同一样品(2016.05.04)6 份,每份约 0.25 g,分别加入相当于已知含量 80%,100% 和 120% 的对照品储备液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,测定含量,计算加样回收率。结果显示,平均回收率($n = 9$)分别为绿原酸 103.34% ($\text{RSD} = 1.08\%$)、阿魏酸 109.63% ($\text{RSD} = 1.95\%$)、洋川芎内酯 I 105.58% ($\text{RSD} = 2.83\%$)、阿魏酸松柏酯 98.72% ($\text{RSD} = 1.11\%$)、洋川芎内酯 A 101.51% ($\text{RSD} = 1.26\%$)、Z-藁本内酯 102.03% ($\text{RSD} = 0.95\%$)。

2.9 样品测定

取不同生长期的川芎样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,注入液相色谱仪测定,进样量 1 μL 。采用外标标准曲线法,以峰面积计算 6 种成分的含量,结果见表 2。

表 2 川芎中 6 种成分的含量测定结果($n = 3, \text{mg/g}$)Table 2 Contents of 6 compounds in the rhizoma of *Ligusticum chuanxiong* ($n = 3, \text{mg/g}$)

采集日期 Collection date	根茎干重 Dry weigh ($\text{g}, n = 15$)	绿原酸 Chlorogenic acid	阿魏酸 Ferulic acid	洋川芎内酯 I Senkyunolide I	阿魏酸松柏酯 Coniferyl ferulate	洋川芎内酯 A Senkyunolide A	Z-藁本内酯 Z-ligustilide
2015.12.04	8.05 ± 1.07	8.39	0.12	0.12	2.36	4.46	15.93
2016.01.04	10.53 ± 2.26	1.82	0.19	0.35	1.64	6.01	14.35
2016.02.04	16.58 ± 1.83	6.10	0.08	0.23	2.19	4.86	13.90
2016.03.04	14.11 ± 1.54	7.26	0.08	0.18	4.13	5.47	24.94
2016.04.04	11.15 ± 1.52	0.32	0.47	0.74	3.92	6.24	27.28
2016.05.04	18.51 ± 2.75	7.87	0.16	0.13	4.54	7.24	23.23
2016.06.04	26.51 ± 2.94	6.57	0.10	0.11	4.94	5.67	25.30
2016.07.12	24.64 ± 2.28	0.20	0.52	0.84	2.26	5.54	19.68

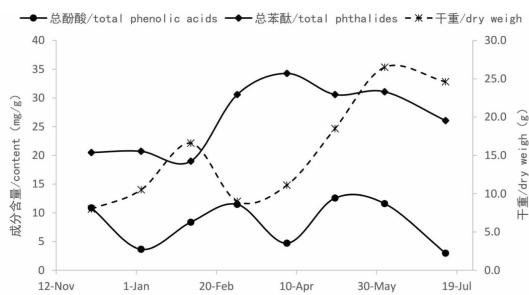


图 2 川芎药材干重与成分含量变化图

Fig. 2 Trend chart of dry weigh and compound contents of the rhizoma of *Ligusticum chuanxiong*

注:总酚酸 = 绿原酸 + 阿魏酸 + 阿魏酸松柏酯、总苯酞 = 洋川芎内酯 I + 洋川芎内酯 A + Z-藁本内酯

Note: total phenolic acids = chlorogenic acid + ferulic acid + coumarinifer ferulate, total phthalides = senkyunolide I + senkyunolide A + Z-ligustilide

3 分析与讨论

UPLC 是基于亚二微米粒径填料的液相色谱。与常规的 HPLC 相比, UPLC 的分离速度更快, 柱效和灵敏度更高, 在分离效果、分析效率、节省溶剂等方面具有显著优势。本文采用 UPLC 完成样品分析和色谱柱再平衡仅需 10 min, 而采用 HPLC 则需耗时近 60 min^[8]。川芎中的阿魏酸由游离型和结合型(主要为阿魏酸松柏酯)共同构成^[9]。由于阿魏酸松柏酯在中性或碱性环境中以及加热时均不稳定, 故不宜采用回流提取。以纯甲醇为溶剂超声提取时阿魏酸松柏酯大部分分解, 生成阿魏酸和松柏醇。经过比较, 最终采用 50 倍量甲醇-甲酸(95:5)混合溶剂超声提取 60 min, 在此条件下阿魏酸松柏酯基本稳定, 能够更准确反映川芎中游离型阿魏酸和结合型阿魏酸的含量。测定结果表明, 川芎中的阿魏酸以结合型为主, 游离型相对较少, 二者的含量分别为 1.64~4.94 mg/g 和 0.08~0.52 mg/g。

比较了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1% 磷酸为流动相的分离效果, 最终选择乙腈-0.1% 磷酸为流动相并优化了梯度洗脱程序。弱酸性的流动相能够抑制绿原酸、阿魏酸等酚酸类成分的解离, 减少峰拖尾; 也有利于保持阿魏酸松柏酯的稳定。在此条件下各待测成分的分离度较好, 峰形对称, 基线也较为平稳。由于所测的洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 A 在 280 nm 附近有最大吸收, 而绿原酸、阿魏酸、阿魏酸松柏酯、Z-藁本内酯则在 320 nm 附近有最大吸收, 因此分别采用 280 nm 和 320 nm 两个检测波长进行

含量测定。

川芎的生长期为 280~290 天, 生育期可划分为育苓期(每年 12 月底至次年 7 月)、苗期(8 月中旬栽种至 9 月底)、茎发生生长期(9 月底至 12 月中旬)、倒苗期(12 月下旬至次年 2 月初)、二次茎叶发生生长期(2 月初至 4 月中旬)、根茎膨大期(4 月中旬至 5 月下旬)。各生育期之间存在明显的重叠现象。川芎苓种栽种后在苗期和茎发生生长期的生物量尚小, 没有利用价值。如图 2 所示, 单株根茎的平均干重在倒苗期达到一个小高峰, 但此时总苯酞和总酚酸含量均较低; 在二次茎叶发生生长期根茎干重下降, 其储存的营养物质主要供给地上部分生长, 总苯酞含量逐渐增高, 而总酚酸含量逐渐降低; 在根茎膨大期, 根茎的干物质积累迅速增加, 单株根茎的平均干重在 6 月初达到最大值 26.51 ± 2.94 g, 川芎中的酚酸类和苯酞类成分此时也都处于较高水平, 总酚酸和总苯酞的含量分别达到 11.61 mg/g 和 31.08 mg/g, 之后便迅速降低。此外, 川芎根茎在 6 月后的烂根现象会明显增加。综合考虑根茎干重和主要药效成分含量, 四川彭州产区川芎药材采挖时间以 5 月底至 6 月初为宜。这与传统的小满至芒种间采收川芎的时间基本相符^[10]。有报道称, 都江堰产川芎中的阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 A 和藁本内酯的含量在 4 月底至 5 月初达到峰值^[8]。这与本文结果相近。但考虑到 4 月底至 5 月初川芎根茎仍处于迅速增长阶段, 故不宜过早采收, 而应综合考虑根茎干重和主要药效成分含量加以确定。

川芎中的绿原酸含量此前少有报道。虽然绿原酸含量在川芎生长过程中的波动很大(0.20~8.39 mg/g), 但在 5、6 月的采收期, 绿原酸含量(6.57~7.87 mg/g)高于阿魏酸和阿魏酸松柏酯的含量之和(4.70~5.04 mg/g), 可见绿原酸也是川芎中主要的酚酸类成分之一。

4 结论

本文建立了 UPLC 快速测定川芎中绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 A 和 Z-藁本内酯的方法, 该方法准确、简便、重复性好。对四川彭州主产区的 2015 年 12 月至 2016 年 7 月的川芎生长过程的检测结果表明, 综合考虑根茎干重和主要药效成分含量, 川芎药材的采挖时间以 5 月底至 6 月初为宜。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China Vol I (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:40-41.
- 2 Shu B(舒冰), Zhou CJ(周重建), Ma YH(马迎辉), et al. Research progress on pharmacological activities of the available compositions in Chinese medicinal herb *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2006, 22: 1043-1047.
- 3 Wang Y(王月), Liu LS(刘露丝), Liu J(刘娟), et al. Protective effects of *Ligusticum chuanxiong* oil on PC12 cells injured by CoCl₂ and its active components [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1940-1945.
- 4 Shi MQ(史梦琪), Kuang X(旷喜), Liu XJ(刘晓娇), et al. Z-ligustilide inhibits LPS-induced neuroinflammation via PPAR γ -dependent suppression of TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 387-392.
- 5 Long R(龙锐), Du JR(杜俊蓉), Wang B(王蓓). Antilipoperoxidant properties of ligustilide [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 206-208.
- 6 Gong WX(宫文霞), Zhou YZ(周玉枝), Li X(李肖), et al. Antidepressive constituents from *Angelica sinensis* Radix in Xiaoyao powder [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46: 2856-2862.
- 7 Wu WH(吴卫华), Kang Z(康桢), Ouyang DS(欧阳冬生), et al. Progresses in the pharmacology of chlorogenic acid [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 691-694.
- 8 Liu JL(刘金亮), Fan QJ(范巧佳), Zheng SL(郑顺林), et al. Quantitative determination of 5 active ingredients in different harvest periods of *Ligusticum chuanxiong* by HPLC [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 1650-1655.
- 9 Lv GH(吕光华), Cheng SQ(程世琼), Chan K(陈金泉), et al. Determination of free ferulic acid and total ferulic acid in Chuan xiong by high-performance liquid chromatography for quality assessment [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 194-198.
- 10 Jiang GH(蒋桂华), Jia MR(贾敏如), Ma YY(马渝英), et al. Appropriate collecting time and different productive processing method of *Ligusticum chuanxiong* [J]. *West China Pharm Sci* (华西药学杂志), 2008, 23: 312-314.

(上接第 989 页)

- 17 Zhang HY(张海英), Han T(韩涛), Wang YN(王有年), et al. Selection of factors for evaluating peach (*Prunus persica*) fruit quality [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng* (农业工程学报), 2006, 8: 235-239.
- 18 Xu JH(徐吉花), Zhao ZY(赵政阳), Wang LC(王雷存), et al. Selection of factors for apple fruit quality evaluation [J]. *Agric Res Arid Areas* (干旱地区农业研究), 2011, 29: 269-274.
- 19 Xin M(辛明), Zhang EZ(张娥珍), He QG(何全光), et al. Selection of evaluation factors for mango fruit quality [J]. *Southern Chin J Agri Sci* (南方农业学报), 2014, 45: 1818-1824.
- 20 Ma QH(马庆华), Li YH(李永红), Liang LS(梁丽松), et al. Factor analysis and synthetical evaluation of the fruit quality of Dongzao (*Ziziphus jujuba* Mill. 'Dongzao') Advanced selections [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43: 2491-2499.