

· 基础研究 ·

川芎中 1-(3', 4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2, 3-二醇
分离鉴定及含量测定[△]罗镭¹, 邵喜英^{2*}

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

[摘要] 目的: 分离鉴定川芎中指标性成分 1-(3', 4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2, 3-二醇(DC), 并建立其含量测定方法。方法: 采用色谱和光谱技术首次从川芎中分离得到 DC, 采用高效液相色谱法对川芎中 DC 进行定量分析, Inertsil ODS-3 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长为 325 nm, 柱温为 30 ℃。结果: DC 的定量测定在 0.023 36 ~ 1.168 0 μg($r=1.000 0$)呈良好的线性关系, 平均回收率为 98.84%, RSD=1.45%。结论: 该分离方法得到的 DC 纯度高, 可作为含量测定用对照品。建立的定量方法简便、准确、重复性好, 可为川芎药材的质量控制提供参考。

[关键词] 川芎; 1-(3', 4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2, 3-二醇; 结构鉴定; 高效液相色谱; 含量测定

Isolation, Identification and Determination of 1-(3', 4'-dihydroxycinnamoyl)
cyclopentane-2, 3-diol in Rhizoma ChuanxiongLUO Lei¹, SHAO Xi-ying^{2*}

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;

2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

[Abstract] **Objective:** To separate and identify chemical marker 1-(3', 4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2, 3-diol(DC) in the rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* and establish an HPLC method for determination the content of DC in Rhizoma Chuanxiong. **Methods:** DC was separated and identified from Rhizoma Chuanxiong by chromatographic technique and spectroscopic method for the first time. The content of DC was determined by HPLC analysis on an Inertsil ODS-3 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.05% trifluoroacetic acid aqueous solution as the mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 325 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results:** The HPLC method showed good linearity within the range of 0.023 36-1.168 0 μg($r=1.000 0$) for DC. The average recovery was 98.84%, and the RSD was 1.45%. **Conclusion:** DC obtained by this separation method was with high purity, and it can be adopted as the reference substance. The established quantitative method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of Rhizoma Chuanxiong.

[Keywords] Rhizoma Chuanxiong; 1-(3', 4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2, 3-diol; structure identification; HPLC; content determination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180419001

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 为临床常用中药, 具有活血行气、祛风止痛之功效, 主治胸痹心痛、胸肋刺痛、跌扑肿痛、月经不调、经闭痛经、癥瘕腹痛、头痛、风湿痹痛^[1]。现代药理研究表明, 川芎具改善血管内皮功能及冠状动脉血流量、降低血流阻力及血压、抗氧自由基、抗炎、抗癌、抗血小板聚集、抗血栓

形成、保护视神经等多种药理活性^[2]。目前, 研究人员对川芎中挥发油类脂溶性成分研究较多, 从中分离得到藁本内酯、洋川芎内酯、川芎三萜等许多脂溶性成分^[3-5], 鲜有对川芎中水溶性化学成分研究的报道。然而近年来研究发现, 川芎水提液具有治疗和保护脑缺血、冠心病、心绞痛等心脑血管疾病的功能。李喆等^[6]发现川芎水提液具有抗氧化作用,

[△] [基金项目] 浙江省中医药科技计划(2017ZA097)

* [通信作者] 邵喜英, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中药抗肿瘤; Tel: (0571)88122061, E-mail: 15824113524@163.com

能降低一氧化碳、丙二醛的含量,提高超氧化物歧化酶的活性。张晶晶等^[7]研究表明,川芎水提液在体外具有较明显的抗氧化活性,其抗氧化效果与浓度呈显著的线性相关。

基于川芎水提液具有显著的抗氧化活性,笔者尝试分离鉴定川芎水提液中抗氧化活性的单体成分。笔者采用反相硅胶、凝胶等柱色谱分离方法,从川芎水提液中分得一水溶性成分1-(3',4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2,3-二醇[1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol, DC]。DC化学结构新颖,不同于以往报道的洋川芎内酯、藁本内酯等骨架类型,系首次从该植物中分离得到。Wang等^[8]从酸樱桃中分离得到该化合物,并经生物活性检测表明该化合物具有很强的抗氧化活性,其抗氧化活性与合成抗氧化剂BHA、BHT的抗氧化活性相当。基于该化合物显著的抗氧化生物活性,本文报道了川芎中DC的含量测定方法,实验表明该方法简便、准确、重复性好,可为川芎药材的质量控制及新药研发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DPX 500型核磁共振波谱仪(德国Bruker公司),LC-20AD型高效液相色谱仪(日本岛津公司),XPE205型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Elmasonic P超声波清洗器(德国Elma公司)。

1.2 试剂

收集了5批川芎药材,购自成都市荷花池中药材市场,经浙江省食品药品检验研究院中药所郭增喜主任中药师鉴定为伞形科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎,标本保存于浙江省食品药品检验研究院中药所。

反相硅胶ODS填料(日本YMC公司);Sephadex LH-20凝胶(瑞典Pharmacia公司)。DC对照品为实验室自制,经¹H-NMR、¹³C-NMR确证结构,经HPLC归一化法测定其纯度>98%,满足定量要求。三氟乙酸、甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 DC的提取、分离和结构鉴定

2.1.1 提取与分离 川芎药材10 kg,用70%乙醇水回流提取(3×2 h),减压回收溶剂至无醇味,加适量水分散,搅拌,静止,除去沉淀。所得水溶性部位经大孔吸附树脂柱色谱分离,以水-乙醇梯度洗

脱,共得到4个部分,分别为Fr.1(水)、Fr.2(30%乙醇)、Fr.3(70%乙醇)和Fr.4(95%乙醇)。Fr.2(95 g)经ODS反相柱色谱,用甲醇-水进行梯度洗脱,共得到50个部分(Fr.2-1~Fr.2-50),其中Fr.2-9~Fr.2-14合并,再经Sephadex LH-20凝胶柱色谱纯化,得到单体化合物DC(250 mg)。

2.1.2 结构鉴定 浅黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z 281.1 [M+H]⁺; 279.1 [M-H]⁻,得出化合物分子量为280.1,结合¹H和¹³C-NMR数据信息,确定化合物分子式为C₁₄H₁₆O₆。

¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD) δ: 7.04(1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), 6.77(1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.93(1H, dd, J=8.0 Hz, 1.8 Hz, H-6'), 7.55(1H, d, J=16.0 Hz, H-7'), 6.25(1H, d, J=16.0 Hz, H-8'), 5.34(1H, m, H-1), 3.73(1H, m, H-2), 4.18(1H, m, H-3), 2.15(2H, m, H-4), 1.95(2H, m, H-5); ¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD) δ: 128.1(C-1'), 115.3(C-2'), 149.8(C-3'), 147.4(C-4'), 116.8(C-5'), 123.3(C-6'), 147.1(C-7'), 115.6(C-8'), 169.1(C-9'), 72.3(C-1), 74.0(C-2), 71.9(C-3), 38.5(C-4), 39.4(C-5)。以上数据与文献报道一致^[9],故鉴定为1-(3',4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2,3-二醇。结构式见图1。

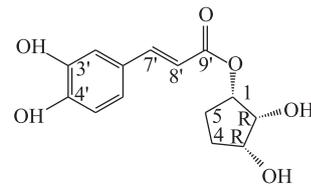


图1 1-(3',4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2,3-二醇的化学结构

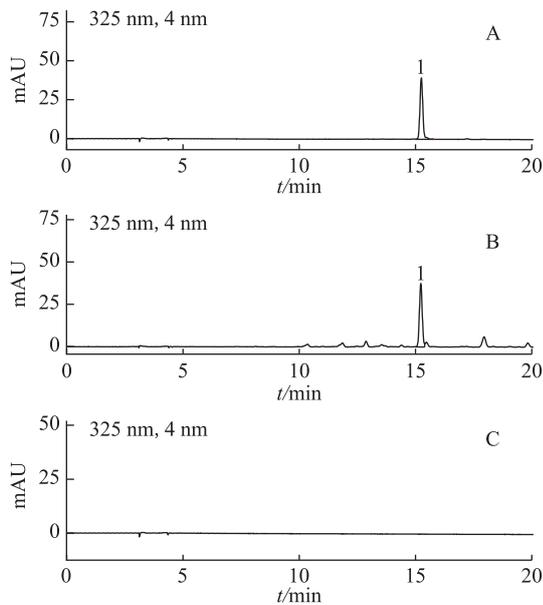
2.2 DC含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.05%三氟乙酸水溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 5%→20% A),流速为1.0 mL·min⁻¹;检测波长为325 nm,柱温为30℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取经减压干燥后的DC对照品5.84 mg,置50 mL量瓶中,用70%甲醇水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得0.116 8 mg·mL⁻¹对照品储备液。精密吸取对照品储备液3 mL,置于15 mL量瓶中,加70%甲醇水稀释至刻度,摇匀,即得0.023 36 mg·mL⁻¹对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇水 25 mL,密塞,称定质量,超声处理45 min(功率250 W,频率35 kHz),放冷,再称定质量,加70%甲醇水补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 系统适用性及专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂各10 μL ,按2.1.1项下色谱条件进样,记录色谱图,见图2。在该色谱条件下,供试品溶液色谱图中具有与对照品溶液色谱图中DC对照品相同保留时间的色谱峰,空白溶剂在此峰位无吸收,证明阴性无干扰。样品中待测目标物与其他成分均可达到基线分离,分离度均大于1.5,分离效果好。



注: A. 对照品; B. 供试品; C. 空白溶剂; 1.1-(3', 4'-二羟基肉桂酰基)环戊烷-2, 3-二醇。

图2 川芎供试品和对照品液相色谱图

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取2.2.2项下0.023 36 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液1、3、5、10 μL 及0.116 8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品贮备液3、5、10 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标,对照品进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为 $Y = 1\ 481.35 X - 3\ 172.54$ ($r = 1.000\ 0$),结果表明DC进样量在0.023 36 ~ 1.168 0 μg 范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 仪器精密度试验 精密吸取0.023 36 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DC对照品溶液10 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定色谱峰面积,结果RSD为0.11%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批(批号:160606)川芎药材粉末,按2.2.3项下方法平行制备6份供试品溶液,依法测定含量,结果川芎中DC的平均含量为1.082 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD为1.61%,表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取2.2.7项下同一供试品溶液,分别在0、2、6、10、14、20 h进样,计算DC峰面积的RSD为0.51%,表明供试品溶液在20 h内稳定性良好。

2.2.9 加样回收试验 称取已知含量的川芎药材粉末(批号:160606)6份,每份约0.25 g,精密称定,分别加入DC对照品贮备液2 mL,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定含量,计算回收率,结果见表1。

表1 川芎中DC加样回收试验结果($n=6$)

编号	取样量/ g	样品中 含量/ mg	对照加 入量/ mg	测得量/ mg	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
1	0.267 8	0.289 8	0.233 6	0.519 8	98.47	98.84	1.45
2	0.251 2	0.271 8	0.233 6	0.505 5	100.03		
3	0.255 2	0.276 1	0.233 6	0.505 4	98.13		
4	0.260 6	0.282 0	0.233 6	0.516 6	100.43		
5	0.263 0	0.284 6	0.233 6	0.516 9	99.48		
6	0.256 0	0.277 0	0.233 6	0.502 5	96.53		

2.2.10 样品测定 取不同批号的川芎样品0.5 g,每批样品平行3份,精密称定,按2.2.3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,并用外标法计算样品中DC的含量,结果见表2。

表2 川芎样品中DC含量测定结果($n=3$)

编号	批号	质量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	160606	1.068
2	160817	1.229
3	201411	1.060
4	201315	1.204
5	200809	3.694

3 讨论

本实验通过色谱、波谱方法,从川芎水提液中分离鉴定水溶性化学成分DC,该成分系首次从川芎中分离得到。文献报道DC具有很强的抗氧化活性,与合成抗氧化剂BHT、TBHQ活性相当,但合成抗氧化剂存在安全性问题,使其应用受到很大限制,故从传统中药川芎中分得高效无毒的天然抗氧化活性物质DC具有十分重要的意义。

(下转第1086页)

4 小结与讨论

本研究结果显示,在 25.00 ~ 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,文冠果壳各提取物中除水提物、10% 乙醇水溶液的 XSHE 对 HepG₂ 细胞活力没有明显抑制作用外,文冠果壳其余溶剂提取物均对 HepG₂ 细胞活力有抑制作用,相较于空白组而言,皆有统计学差异 ($P < 0.01$)。其中,95% XSHE 抑制 HepG₂ 细胞活力效果最强,当 95% XSHE 的给药质量浓度为 75.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用能达到 (80.44 ± 2.67)%,高于等质量浓度的阳性对照 MMc。此外,研究还发现,质量浓度为 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 95% XSHE 对 HepG₂ 细胞的抑制作用不如 75.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 95% XSHE 强;分析认为,可能是由于 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XSHE 对 HepG₂ 细胞呈现了一定的促增殖作用,也可能是药物质量浓度过大,在酶标仪下有较大的吸收,从而干扰了测量结果。HepG₂ 细胞在 95% XSHE 干预下形态发生变化,具体表现为细胞皱缩,细胞间隙变大,从培养板脱落等作用。

综上所述,冠果壳提取物在体外具有良好的抑制 HepG₂ 增殖的生物活性,为我们进一步探索文冠果壳提取物抗肿瘤作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 周荣汉. 中药资源学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:331-339.
- [2] 马养民,王佩,文冠果叶化学成分的研究[J]. 中成药,2010,32(10):1750-1753.
- [3] 赵丹丹,李丹毅,华会明,等. 文冠果花中一个新的单萜类化合物[J]. 中草药,2013,44(1):11-15.
- [4] 李占林,李丹毅,李铤,等. 文冠果果壳中一个新生物碱[J]. 药学学报,2006,41(12):1197-1200.
- [5] 李巍,李铤. 文冠果果柄的化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(3):334-337.
- [6] 王颖,潘英,邢亚超,等. 文冠果种皮化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2013,23(5):397-399.
- [7] 纪雪飞,刘新霞,吴喆,等. 文冠果壳提取物对 β -淀粉样蛋白致动物学习记忆障碍的改善作用[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(4):232-237,253.
- [8] 商辉,孙妍. 文冠果的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药房,2015,26(30):4316-4320.
- [9] 暴雪,高英,玉荣,等. 柱前衍生化-HPLC 法测定文冠果种仁油中脂肪酸含量[J]. 北方药学,2012,9(1):3-4.
- [10] 申登峰. 甘肃省文冠果产业发展分析[J]. 草业科学,2010,27(5):157-160.
- [11] 张严磊,施欢贤,雷莉妍,等. 文冠果叶抑制人肝癌细胞 HepG₂ 增殖和抗氧化活性部位的筛选[J]. 中国现代中药,2016,18(11):1451-1453,1469.
- [12] 张严磊,施欢贤,雷莉妍,等. 文冠果叶多糖超声辅助提取工艺及其药效学初步研究[J]. 中国现代中药,2016,18(12):1636-1640.

(收稿日期 2017-11-15)

(上接第 1082 页)

本文比较过超声提取和热回流提取对 DC 含量测定的影响,结果显示无统计学差异,因超声提取操作方便,故最终选择超声提取。考察过甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇作为提取溶剂,超声时间分别为 30、45、60 min 时的提取效率,实验结果表明最佳提取工艺为 70% 甲醇超声 45 min。本文建立的含量测定方法简便、准确、重复性好,含量测定结果表明川芎中均含有较高含量的 DC,可为川芎药材质量标准的制定及资源的开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:40-41.
- [2] 金玉青,洪远林,李建蕊,等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床,2013,4(3):44-48.
- [3] 郝淑娟,张振学,田洋,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国

现代中药,2010,12(3):22-25.

- [4] 常新亮,马云保,张雪梅,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(15):1533-1536.
- [5] 杜旌物,谢晓芳,熊亮,等. 川芎挥发油的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(23):4328-4333.
- [6] 李喆,刘娜,王磊,等. 不同浓度川芎水提取物对化学缺氧细胞的作用比较[J]. 蚌埠医学院学报,2017,41(2):151-153.
- [7] 张晶晶,杨占峰. 川芎水提物体外抗氧化活性的研究[J]. 唐山师范学院学报,2016,38(2):38-40.
- [8] Wang H B, Ji G, MARK. , et al. Novel antioxidant compounds from Tart Cherries[J]. J Nat Prod, 1999, 62(1): 86-88.
- [9] Cardoso C L, Bolzani V D S, Silva D H S, et al. The absolute configuration of 1-(3', 4'-dihydroxycinnamoyl) cyclopentane-2, 3-diol from the Amazonian tree *Chimarrhis turbinata*[J]. J Nat Prod, 2006, 69(7):1046-1050.

(收稿日期 2018-04-19)