# RP-HPLC 法测定川芎愈伤组织中阿魏酸的含量

张蓓蕾，夏醒醒，陈　勤

（安徽大学生命科学学院，安徽省中药研究与开发重点实验室，安徽　合肥　230039）

**摘要：目的**　建立高效液相色谱法测定川芎愈伤组织中阿魏酸含量的方法。**方法**　利用 ZORBAX 300SB－$C_{18}$（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，乙腈-1%三乙胺（15∶85）为流动相，检测波长为 320 nm，流速 1.0 mL/min，柱温为 27 ℃，进样量 20 μL。**结果**　阿魏酸在 0.93～4.67 μg/mL 范围内线性关系良好，$r$=0.9998，平均加样回收率为 99.98%，RSD＝1.63%。**结论**　该方法快速简便、准确可靠，可用于川芎愈伤组织中阿魏酸的含量测定。

**关键词：**川芎；愈伤组织；阿魏酸；高效液相色谱法

**中图分类号：**R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1005-5304(2007)11-0043-02

**Determination of Ferulic Acid in Callus of Ligusticum Chuanxiong by HPLC**

ZHANG Bei-lei, XIA Xing-xing, CHEN Qin *(School of Life Science, Anhui University, Anhui Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, Hefei 230039, China)*

**Abstract：Objective** To establish a HPLC method for the determination of Ferulic acid in callus of Ligusticum chuanxiong. **Methods** The separation was performed on ZORBAX 300SB-$C_{18}$ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, using acetonitrile-1% triethylamine (15∶85) as mobile phase, detected at 320 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 27 ℃. **Results** The linear range of Ferulic acid was 0.93～4.67 μg/mL, $r$=0.9998, the average recovery was 99.98% and RSD was 1.63%. **Conclusion** The method was rapid, simple, accurate and stability, and can be used for the quantitiative determination of Ferulic acid in Ligusticum chuanxiong callus.

**Key words：**Ligusticum chuanxiong；callus；Ferulic acid；HPLC

阿魏酸是药用植物川芎（*Ligusticum chuanxiong* Hort.）的主要成分。我们进行了川芎的组织培养，并利用 HPLC 法对愈伤组织中的阿魏酸进行含量测定，从而为利用细胞工程方法生产阿魏酸提供一定的试验依据。

## 1　实验材料

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪。川芎愈伤组织为本研究室自培养，继代次数分别为第 8 代、第 9 代、第 10 代；阿魏酸对照品（中国药品生物制品检定所，供含量测定用，批号 0773-9910）。试剂：甲醇、乙腈均为色谱纯，水为重蒸馏水，其余试剂均为分析纯。

## 2　方法与结果

### 2.1　色谱条件

ZORBAX 300SB-$C_{18}$ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-1%三乙胺溶液（用磷酸将 pH 值调至 3.0，15∶85）；检测波长：320 nm；流速：1.0 mL/min；柱温：27 ℃；进样 20 μL。

### 2.2　阿魏酸对照品溶液的配制

精密称取阿魏酸对照品 0.93 mg 于 100 mL 容量瓶中，以甲醇溶解并定容，摇匀，配成 9.3 μg/mL 的溶液。

### 2.3　供试品溶液的制备

川芎愈伤组织供试品溶液制备：取川芎经粉碎的干燥愈伤组织 0.5 g，精密称取，加甲醇-甲酸（95∶5）溶液 20 mL，超声处理（功率 250 W，频率 50 kHz）50 min，取出，放冷，过滤，收上清液，水浴蒸干，残渣用 3 mL 甲醇溶解，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，备用。另取川芎对照药材 0.5 g，同法制成对照药材溶液。

### 2.4　检测波长的选择

取阿魏酸对照品溶液，置于紫外分光光度计中，在 200～400 nm 范围内进行扫描，结果在 320 nm 处有较大吸收峰，吸收度较强且不受溶剂峰的干扰，故选择 320 nm 处测定吸收波长。

### 2.5　线性关系考察

精密吸取对照品溶液 100、126、167、251、502 μL，加甲醇定容至 1 mL，摇匀，进样量为 20 μL，以对照品峰面积 Y 为纵坐标，以进样浓度 X（μg/mL）为横坐标进行线性回归，得回归方程为：$Y$＝416 126$X$－23.959，相关系数 $r$＝0.9998。表明阿魏酸在 0.93～4.67 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。

### 2.6　精密度试验

精密吸取上述对照品溶液 20 μL，重复进样 5 次，测得阿魏酸峰面积积分值分别为 933.6、940.2、964.6、965.6、953.1，RSD＝1.51%，表明仪器精密度良好。

### 2.7　稳定性试验

将待测样品溶液在室温下贮存，在相同的色谱条件下，每隔 1 h 进样 1 次，共 5 次，测得阿魏酸峰面积积分值分别为 504.7、503、507.6、514.2、506.2，RSD＝0.85 %，表明样品溶液在 5 h 内基本稳定。

### 2.8　重复性试验

取同一代样品 5 份，每份 0.8 g，精密称取，按“2.3”项下方法处理，残渣用 0.5 mL 甲醇溶解，测得阿魏酸峰面积积分值

**基金项目：**安徽省教育厅自然科学基金资助（2005KJ150）

**通讯作者：**陈勤，电话：0551-5108143-8006，E-mail：chenqin169@163.com

分别为 1 486.1、1 479.4、1 454.9、1 505.8、1 515.2,结果求得含量的 RSD=1.59%。表明重现性良好。

2.9 加样回收率试验

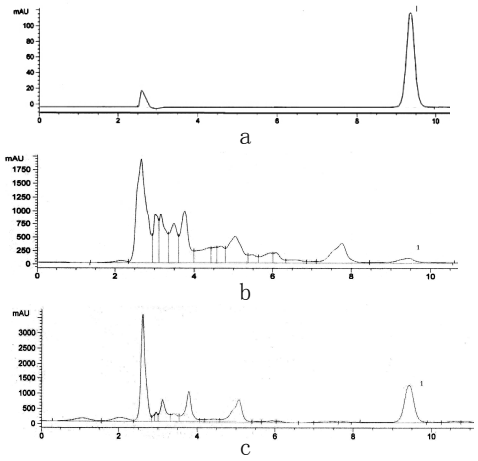
采用加样回收法。精密称取已知含量(1.276 μg/mL)的样品,分别精密加入一定量的阿魏酸(1.556 μg/mL)对照品,按正文样品溶液的制备方法及上述的色谱条件,依法测定峰面积,计算回收率,结果平均回收率为 99.98%,RSD=1.63%。结果见表 1。

**表 1 加样回收率试验结果**

| 原有量(μg) | 加入量(μg) | 实测量(μg) | 回收率(%) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.1276 | 0.1556 | 0.2818 | 99.10 | | |
| 0.2552 | 0.1556 | 0.4076 | 97.90 | | |
| 0.3828 | 0.1556 | 0.5403 | 101.22 | 99.98 | 1.63 |
| 0.1276 | 0.3112 | 0.4378 | 99.73 | | |
| 0.2552 | 0.3112 | 0.5725 | 101.96 | | |

2.10 样品的含量测定

精密称取干燥愈伤组织粉碎品 1.0 g,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,测定含量,共测定 3 代。结果见表 2,高效液相色谱图见图 1。




注:a.阿魏酸对照品;b.川芎愈伤组织;c.川芎对照药材;1.阿魏酸

**图 1 川芎愈伤组织及药材 HPLC 图谱**

**表 2 样品中阿魏酸含量测定结果($n$=3)**

| 代数 | 次数 | 阿魏酸含量(μg) | 平均含量(μg) | 百分比(%) |
|---|---|---|---|---|
| 第八代 | 1 | 72.57 | | |
| | 2 | 71.08 | 72.87 | 0.007 |
| | 3 | 72.27 | | |
| 第九代 | 1 | 76.40 | | |
| | 2 | 75.82 | 75.29 | 0.008 |
| | 3 | 73.65 | | |
| 第十代 | 1 | 83.13 | | |
| | 2 | 80.7 | 80.9 | 0.008 |
| | 3 | 79.85 | | |

## 3 讨论

流动相的优化组合直接影响着样品中成分的分离。为了得到满意的分离效果,我们以甲醇与不同浓度的冰醋酸、乙腈与不同浓度的冰醋酸及磷酸溶液、乙腈-1%三乙胺溶液(用磷酸将 pH 值调至 3.0)等多种流动相系统和配比进行样品分离,根据分离情况,选用乙腈-1%三乙胺溶液(15∶85),结果峰形较好,且无拖尾现象。

我们在试验中发现,药材和愈伤组织中的成分虽然不能逐一确定,但是通过比较愈伤组织与药材的 HPLC 图谱(见图 1),发现愈伤组织和药材中的化学成分并不完全一致。即药材中不存在的成分,培养物中有可能存在;而药材中存在的成分,培养物中不一定产生。我们推测,可能不同药用成分基因的启动时间有差异,同时也可能是在植物生长发育过程的不同时间(愈伤组织、植株生长、药材成熟期)有效成分的生成及其累积量不同而造成的。

本试验表明,川芎愈伤组织中确实含有阿魏酸,但是相比于对照药材中的含量较低。我们可以通过选择不同的外植体、筛选高产细胞系、调控物理因子和化学因子及改变培养方法等刺激代谢产物的合成与积累。本研究为利用川芎组织培养进行阿魏酸的工业化生产提供了理论空间和试验依据。

(收稿日期: 2006-12-04,编辑: 华强)

(上接第 5 页) 艾滋病、戒毒、禽流感等方面,不要将科研项目招标局限于国家事业单位和高等院校,应该允许民营单位和民间中医参与科研项目招标。

2.3.2 突出民族医药基础研究 加大投入、统筹安排,加强藏医药、蒙医药、维医药等民族医药研究机构的建设,系统研究开发民族医药,必要时集中人力和物力,组织协调攻关,突出解决临床疗效和药物开发等方面的关键问题。

2.3.3 积极开发中药和民族药产品 中药和民族药开发必须以其理论作为指导思想,遵循可持续发展、创新的原则。具体包括:①开发中成药;②大力发展中药保健品;③重视中医院内制剂的开发;④挖掘并开发民间偏方、验方。

2.4 大力弘扬中国传统文化

近百年来,中医药和民族医药的发展一直受到西方文化的冲击。发展传统医药,目前最为紧迫的任务就是尽快摆脱“唯科学主义”思潮的束缚,大力弘扬中国传统文化。要加强中医药科普宣传,定期举办中医药论坛。要建立中医药博物馆,作为弘扬优秀传统文化和爱国主义的教育基地。应广泛开展传统医药的国际交流,促进外国人认识中医药。

中医药和民族医药是我国卫生保健体系的重要组成部分,选择好适合中医药和民族医药自身发展规律的路径,才能有利于充分发挥中医药和民族医药在基本医疗中的作用,有利于解决人民群众“看病难、看病贵”的问题,有利于更好地建立具有中国特色的医疗保障体系。

**参考文献:**

[1] 王一娟.中医中药正在被“西化”[N].经济参考报,2006-06-30(4).

[2] 韦锦田.年轻中医师看不懂《内经》、《伤寒论》[N].健康报,2006-04-21(4).

(收稿日期: 2007-03-19,编辑: 梅智胜)