

川芎晒干过程中阿魏酸和阿魏酸松柏酯含量的变化

王涛¹, 林良斌², 张巧玲², 李乐², 刘世勇¹, 李亚波¹, 张利^{2*}

(1. 四川农业大学生命科学学院, 四川雅安 625014; 2. 四川农业大学理学院, 四川雅安 625014)

摘要: 为了解新鲜川芎采后干燥过程中阿魏酸和阿魏酸松柏酯含量的动态变化规律, 采用高效液相色谱法测定了川芎晒干过程中总阿魏酸、游离阿魏酸和阿魏酸松柏酯的含量。结果显示, 在整个晒干过程中(30 d), 总阿魏酸、游离阿魏酸和阿魏酸松柏酯含量呈先升高后下降的变化趋势, 晾晒第3 d时总阿魏酸含量最高(0.23%), 因此在晾晒的第3 d利用快速干燥技术能较好地保留川芎药材中总阿魏酸含量, 使其发挥更佳的药效。川芎药材中的阿魏酸松柏酯能水解产生阿魏酸, 因此研究川芎干燥过程中的生理响应与含水量的关系对阿魏酸积累有重要意义。由于川芎在用药过程中是以总阿魏酸含量发挥药效的, 所以以总阿魏酸含量作为川芎药材质量控制指标更加科学。

关键词: 川芎; 晒干; 阿魏酸; 阿魏酸松柏酯

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)02-0259-05

Dynamic Changes of Ferulic Acid and Coniferyl Ferulate in Chuanxiong Rhizoma during the Sun-drying Process

WANG Tao¹, LIN Liang-Bin², ZHANG Qiao-Ling², LI Le², LIU Shi-Yong¹, LI Ya-Bo¹, ZHANG Li^{2*}

(1. College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2. College of Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: To investigate the dynamic changes of ferulic acids (total ferulic acid and free ferulic acid) and coniferyl ferulate in fresh Chuanxiong Rhizoma during the sun-drying process, the contents of both were determined by high performance liquid chromatography. Results revealed that the contents of total ferulic acid, free ferulic acid and coniferyl ferulate showed an increasing trend at first and then a decreasing trend during the drying process (30 d). The maximum total ferulic acid content (0.23%) was found on the third day after drying. To retain the contents of total ferulic acid, quick drying technology should be used on the third day after drying. The results also suggested that coniferyl ferulate might serve as a storage of free ferulic acid, and the relationship between of physiological response and water content of ferulic acid accumulation in Chuanxiong Rhizoma during the drying process has important significance. Coniferyl ferulate was hydrolyzed into ferulic acid and coniferyl alcohol during processing. Ferulic acid was found to be the efficacy component of Chuanxiong Rhizoma, so total ferulic acid content as an index of Chuanxiong Rhizoma quality is scientific and reasonable.

Key words: Chuanxiong Rhizoma; Sun-dried; Ferulic acid; Coniferyl ferulate

干燥是中药材采后加工过程中最普遍、最关键
的步骤, 是影响中药材质量和经济价值的重要环

节^[1]。有研究表明中药材干燥过程实际就是一个
强烈干旱胁迫的过程, 而作为中药材有效成分的植

收稿日期: 2014-06-30, 退修日期: 2014-07-30。

基金项目: 国家星火计划项目(2014GA810004); 四川省科技支撑计划项目(2015FZ0002, 2015SZ0102)。

作者简介: 王涛(1986-), 男, 博士研究生, 研究方向为植物化学(E-mail: wangtaotjau@hotmail.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhang8434@sina.com)。

物次生代谢产物通常是在水分、温度等环境胁迫下产生的^[2]。基于此,有人提出了“中药材有效成分是采后干燥胁迫诱导的产物”的假设,并且通过对丹参^[3]和黄芩^[4]的研究证实了这一假设的合理性。

中药川芎(*Chuanxiong Rhizoma*)为伞形科(*Umbelliferae*)藁本属(*Ligusticum*)多年生草本植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的根茎,主产于四川省,此外云南、贵州、甘肃等省均有栽培^[5]。川芎具有活血行气、祛风止痛等功效,常用于胸痹心痛、胸胁刺痛、月经不调等的治疗^[6]。现代化学和药理研究表明,川芎的活性成分主要包括挥发油、酚酸类、生物碱类和内酯类等^[7-10],其中阿魏酸和阿魏酸松柏酯是川芎中重要的活性成分。阿魏酸在川芎药材中以游离型和结合型共同存在,二者含量的总和以总阿魏酸含量表示,总阿魏酸是评价川芎质量的重要标准之一^[6,11,12];阿魏酸松柏酯作为一种非常有开发前景的化合物已成为当今国内外研究的热点^[13],由于其在光照和高温下易分解成阿魏酸^[1,14],所以在川芎采后有效成分研究中不能忽略。目前对川芎采后干燥过程中有效成分动态变化的研究还未见报道,本实验通过对川芎采后干燥过程中阿魏酸和阿魏酸松柏酯含量的动态变化研究,希望为中药材采后有效成分含量变化规律研究提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 植物材料及处理

川芎植株于2014年5月采自四川省中江县川芎优质高效栽培示范基地,经四川农业大学生命科学学院杨瑞武教授鉴定为川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)。新鲜川芎除去茎叶和须根保留根茎,洗净后置于室外通风处晾晒干燥。从采挖当日开始每隔一定时间(0、1、2、3、4、6、8、10、12、16、20、24、30 d)随机取川芎约500 g,其中一部分样品立即测定含水量,另一部分样品放入-20℃冰箱冷藏,如此重复处理样品共30 d。采样完成后将冷藏样品冻干、粉碎、过四号筛(65目),粉末备用。

1.2 仪器和试剂

LC-20A高效液相色谱仪(Shimadzu Corpora-

tion, Japan),配备DGU-20A3在线脱气机、SPD-20A紫外检测器、LC-20AB高压输液泵、CTO-10AS柱温箱和SIL-20A自动进样器。KQ-300GDV恒温数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。BT124s电子天平(Sartorius, Germany)。LGJ-12冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

阿魏酸标准品购自成都曼斯特生物科技有限公司,批号MUST-11112204(纯度≥98%);阿魏酸松柏酯标准品购自成都植标化纯生物技术有限公司,批号PCS0003(纯度≥98%);甲醇(色谱纯, Fisher Scientific, USA);磷酸(分析纯, 成都市科龙化工试剂厂);超纯水(Millipore, USA)自制。

1.3 有效成分测定

1.3.1 色谱条件

高效液相色谱仪HPLC采用Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm),保护柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6×12.5 mm, 5 μm)。流动相A为0.1%磷酸水溶液,B为甲醇。二元梯度洗脱程序为:0~25 min, 20%~50% B; 25~30 min, 50%~100% B; 30~35 min, 100% B; 35~40 min, 100%~20% B; 40~50 min, 20% B。流速1 mL/min,检测波长321 nm,柱温30℃,进样量10 μL。

1.3.2 标准品溶液的制备

精密称取阿魏酸标准品7.5 mg,置50 mL棕色量瓶中,加入甲醇溶解并定容,摇匀,过0.22 μm滤膜,即得阿魏酸标准品储备液(浓度为0.15 mg/mL)。阿魏酸松柏酯标准品储备液制备方法同阿魏酸,浓度为0.27 mg/mL。

1.3.3 川芎游离阿魏酸和阿魏酸松柏酯供试液制备

参考李松林等^[15]的方法稍作改进。精密称取川芎药材粉末0.5 g,加甲醇15 mL,超声波提取2次,每次20 min(300 W, 30℃),合并2次提取液,过0.22 μm滤膜,即得供试液。

1.3.4 川芎总阿魏酸供试液制备

提取方法同1.3.3,提取溶剂为:甲醇:0.24 mol/L碳酸氢钠水溶液=95:5(V:V)^[12]。

1.4 方法学考察

采用李松林等^[15]和吕光华等^[12]的方法测定游

离阿魏酸和总阿魏酸的含量, 得到标准品和样品色谱图(图1), 阿魏酸和阿魏酸松柏酯色谱峰分离度和峰型能较好地达到定性定量要求。在测定总阿魏酸样品的色谱图中未检测出含阿魏酸松柏酯的色谱峰, 表明该制备方法能彻底水解样品中的阿魏酸松柏酯, 所得结果准确可靠。

(1) 线性范围: 以峰面积(Y)与进样量(X)进行线性回归, 阿魏酸的回归方程为 $Y = 6 \times 10^9 X + 8916.8$ ($R^2 = 1$), 线性范围 $0.075 \sim 2.32 \mu\text{g}$ 。阿魏酸松柏酯的回归方程为 $Y = 2 \times 10^9 X + 60670$ ($R^2 = 0.9998$), 线性范围 $0.27 \sim 4.05 \mu\text{g}$ 。

(2) 精密度试验: 取标准品储备液, 重复6次进样, 按上述色谱条件测定, 测得阿魏酸色谱峰面积 RSD 为 0.13%, 阿魏酸松柏酯色谱峰面积 RSD 为 0.11%, 符合 HPLC 定量要求。

(3) 重现性试验: 取同一川芎供试品溶液(按 1.3.3 的方法)重复6次进样, 测得游离阿魏酸和阿魏酸松柏酯色谱峰面积 RSD 分别为 0.84% 和 1.98%; 取同一川芎供试品溶液(按 1.3.4 的方法)重复6次进样, 测得总阿魏酸色谱峰面积 RSD 为 1.18%, 表明本方法重复性良好。

(4) 样品稳定性试验: 取同一川芎供试品溶液(按 1.3.3 的方法), 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测得游离阿魏酸和阿魏酸松柏酯色谱峰面积 RSD 分别为 1.22% 和 2.30%; 取同一川芎

供试品溶液(按 1.3.4 的方法), 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测得总阿魏酸色谱峰面积 RSD 为 2.20%, 表明样品在 24 h 内稳定。

(5) 回收率试验: 准确称取已知游离阿魏酸、总阿魏酸和阿魏酸松柏酯含量的川芎药材粉末 0.5 g, 加入一定量阿魏酸(1.55 mg)和阿魏酸松柏酯(2.70 mg)标准品储备液, 重复测定 6 次。测定游离阿魏酸含量平均回收率为 $99.83 \pm 1.85\%$, 总阿魏酸的含量平均回收率为 $100.28 \pm 2.00\%$, 阿魏酸松柏酯含量的平均回收率为 $100.54 \pm 1.98\%$, RSD 均小于 2%。

1.5 数据分析

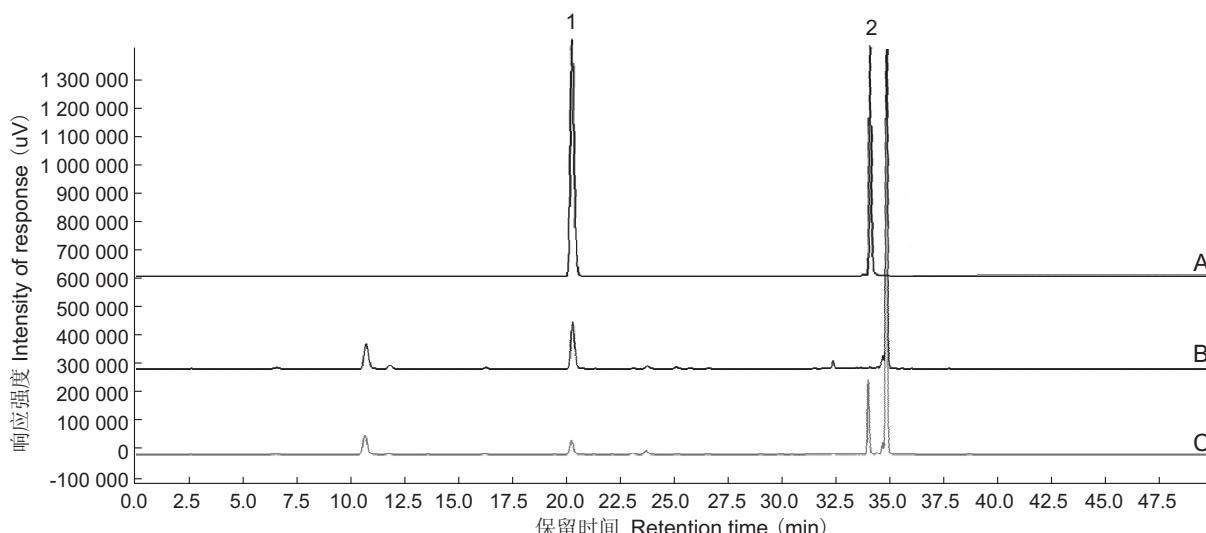
数据用 Excel 2013 进行均值计算, 用 SPSS 19.0 进行相关分析。

2 结果和分析

中药材有效成分是植物在生长过程中缓慢积累形成的, 并在采收期达到峰值, 采后又逐步降解^[16,17], 但本研究发现川芎采后 30 d 的总阿魏酸、游离阿魏酸和阿魏酸松柏酯含量动态变化与前者有所不同。

2.1 川芎药材含水量

测定结果显示, 川芎药材晒干过程中含水量逐渐降低, 到晾晒第 10 d 时含水量趋于稳定不再变化(表 1), 表明川芎已经晒干。



1: 阿魏酸; 2: 阿魏酸松柏酯。A: 标准品; B: 样品总阿魏酸; C: 样品游离阿魏酸。

1: Ferulic acid; 2: Coniferyl ferulate. A: Reference standard; B: Total ferulic acid in samples; C: Free ferulic acid in samples.

图 1 标准品及供试样品总阿魏酸、游离阿魏酸含量的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of total ferulic acid and free ferulic acid for reference compounds and samples

表 1 干燥时间对川芎总阿魏酸、游离阿魏酸、阿魏酸松柏酯和含水量的影响
Table 1 Effect of drying time on the contents of total ferulic acid, free ferulic acid, coniferyl ferulate and water of Chuanxiong Rhizoma

干燥时间(d) Drying time	总阿魏酸含量(%) Content of total ferulic acid	游离阿魏酸含量(%) Content of free ferulic acid	总游比 Ratio of total to free	阿魏酸松柏酯含量(%) Content of coniferyl ferulate	含水量(%) Content of water
0	0.146	0.045	3.25	0.260	64.54
1	0.206	0.057	3.58	0.529	49.04
2	0.210	0.065	3.26	0.546	43.55
3	0.230	0.065	3.55	0.489	28.06
4	0.191	0.082	2.35	0.484	19.56
6	0.184	0.086	2.13	0.401	15.57
8	0.180	0.117	1.54	0.387	12.59
10	0.179	0.099	1.80	0.385	11.86
12	0.177	0.104	1.70	0.315	11.58
16	0.176	0.085	2.06	0.326	11.36
20	0.174	0.077	2.25	0.229	11.28
24	0.173	0.077	2.25	0.223	11.35
30	0.172	0.077	2.25	0.219	11.29

注: 总游比 = 总阿魏酸含量/游离阿魏酸含量。

Note: Ratio of total to free = Content of total ferulic acid/Content of free ferulic acid.

2.2 总阿魏酸含量动态变化

从测定结果可看出, 川芎在干燥过程中总阿魏酸含量呈先增高后下降的趋势(表1)。总阿魏酸含量变化可以分为3个阶段: 第一阶段(0~3 d)快速积累, 第3 d时达到峰值; 第二阶段(3~6 d)又迅速下降; 第三阶段下降速率逐渐变缓, 直至第30 d含量基本没有变化。

2.3 游离阿魏酸含量和总游比动态变化

游离阿魏酸含量在川芎采后干燥过程中的变化与总阿魏酸相似, 也呈先升高后下降最后趋于平稳的趋势(表1)。第一阶段(3~8 d)游离阿魏酸含量逐渐升高, 但升高速率小于总阿魏酸; 第二阶段(8~20 d)含量缓慢下降; 第三阶段(20~30 d)含量基本无变化, 维持在0.077%。

总阿魏酸与游离阿魏酸含量的比值(简称总游比)显示出川芎体内不同形态阿魏酸的分布情况。由表1可见, 总游比在干燥过程中也是不断变化的, 表现出先下降(0~8 d)后升高(8~20 d)最后趋于平稳(20~30 d)的趋势。

2.4 阿魏酸松柏酯含量动态变化

由于阿魏酸松柏酯在川芎干燥和储存过程中易水解成阿魏酸和松柏醇, 所以其含量变化就显得尤为重要。测定结果表明, 阿魏酸松柏酯也呈现出先升高后下降最后趋于平稳的变化趋势: 0~2 d(第

一阶段)含量迅速升高, 到第2 d时达到峰值; 2~20 d时(第二阶段)又缓慢下降; 到第20 d以后(第三阶段)含量基本无变化, 维持在0.22%左右。

2.5 相关分析

通过对总阿魏酸含量、游离阿魏酸含量、总游比、阿魏酸松柏酯含量和含水量进行两两相关分析, 结果表明游离阿魏酸含量与总游比呈极显著的负相关(相关系数达到-0.91), 说明在川芎干燥过程中阿魏酸松柏酯不断水解产生阿魏酸导致游离阿魏酸的实测含量不断升高。总阿魏酸含量与阿魏酸松柏酯含量呈极显著正相关(相关系数达到0.95), 该结果也印证了阿魏酸松柏酯的水解产物为阿魏酸。阿魏酸松柏酯含量与含水量呈极显著正相关(相关系数为0.73), 表明随含水量下降阿魏酸松柏酯含量也随之降低。总游比与含水量呈显著正相关但相关系数较低, 因此说明总游比与含水量在变化趋势上存在较强的一致性。

3 讨论

中药材活性成分在植物体生长发育和抵御不良环境因素中起着重要作用^[4]。研究表明, 阿魏酸可以提高植物在干旱胁迫中抗氧化系统的活性和脯氨酸、可溶性糖的含量, 从而减轻植物在干旱胁迫中的伤害^[18]。本研究发现, 川芎干燥过程中阿魏

酸松柏酯和总阿魏酸含量出现最大值的时间和下降时间(2~3 d)都早于游离阿魏酸, 表明川芎在干燥前期受到干旱刺激迅速合成阿魏酸和阿魏酸松柏酯, 而后随着干旱胁迫时间的延长阿魏酸松柏酯又迅速水解成阿魏酸以补充植物体对阿魏酸的需求, 缓解干旱胁迫对植物体的伤害; 又因为总阿魏酸峰值出现时间早于游离阿魏酸, 所以阿魏酸松柏酯可以视为川芎体内阿魏酸的“储备库”。这一点与黄芩干燥过程中黄芩苷元和黄芩苷含量的变化^[4]情况类似。故阿魏酸松柏酯是川芎植物体内游离和结合阿魏酸生物合成过程中的重要纽带, 今后应进一步对其深入研究。

《中华人民共和国药典》一部^[6]对川芎药材的质量控制标准规定游离阿魏酸含量不低于0.1%, 但是很多学者对此提出异议^[11,12], 因为在川芎干燥、储存和煎煮过程都有可能引起阿魏酸松柏酯水解成阿魏酸, 并且川芎以总阿魏酸含量发挥药效, 故认为总阿魏酸能更好的反映出川芎药材的质量。本文以川芎晒干过程中总阿魏酸含量作为指标, 发现晾晒至第3 d时总阿魏酸含量最高(达到0.23%), 所以在晾晒的第3 d利用快速干燥技术(如冻干、烘干等)能较大限度地保留药材中总阿魏酸含量, 使其具有更佳的药效。

参考文献:

- [1] Li SL, Yan R, Tam YK, Lin G. Post-harvest alteration of the main chemical ingredients in *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Rhizoma Chuanxiong) [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(1): 140–144.
- [2] Hartmann T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(22–24): 2831–2846.
- [3] Li XB, Wang W, Zhou GJ, Li Y, Xie XM, Zhou TS. Production of salvianolic acid B in roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) during the post-harvest drying process [J]. *Molecules*, 2012, 17(3): 2388–2407.
- [4] 张榕, 李焱, 周铜水. 晒干过程中黄芩药材黄酮类成分的动态变化 [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2010, 49(5): 575–581.
- [5] 单人骅, 余孟兰. 中国植物志: 第55卷, 第2分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 239–242.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 38.
- [7] 常新亮, 马云保, 张雪梅, 江志勇, 陈纪军. 川芎化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1533.
- [8] 杨扬, 潘勤, 丁黎, 吴晓磊. QNMR法测定川芎药材中的有效成分 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(2): 192–194.
- [9] 徐晓芳, 孙东东, 李祥, 陈建伟, 崔九成. 川芎水提部位化学成分的UPLC-ESI-Q-TOF-MS分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 382–386.
- [10] 田璐, 闫海霞, 傅欣彤, 王京辉, 郭洪祝, 陈有根. 一测多评法同时测定川芎当归饮片中多种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 848–854.
- [11] 余昕, 朱烨, 张春, 袁叶飞. 不同干燥方法对川芎不同部位阿魏酸含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 100–103.
- [12] 吕光华, 程世琼, 陈金泉, 梁士贤, 赵中振. HPLC测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 194–198.
- [13] 李韶菁, 张迎春, 苏培瑜, 陈畅, 李德凤, 杨洪军. 阿魏酸松柏酯的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 229–231.
- [14] Lu GH, Chan K, Leung K, Chan CL, Zhao ZZ, Jiang ZH. Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis* [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1068(2): 209–219.
- [15] 李松林, 林鸽, 钟凯声, 谭润球. 应用HPLC-DAD-MS联用技术研究中药川芎指纹图谱 [J]. 药学学报, 2004, 39(8): 621–626.
- [16] Yábar E, Pedreschi R, Chirinos R, Campos D. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying [J]. *Food Chem*, 2011, 127(4): 1576–1583.
- [17] 刘金亮, 范巧佳, 郑顺林, 谭杰, 周娟, 袁继超, 杨世民, 孔凡磊. HPLC测定不同采收期川芎药材中5种药效成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1650–1655.
- [18] Li DM, Nie YX, Zhang J, Yin JS, Li Q, Wang XJ, Bai JG. Ferulic acid pretreatment enhances dehydration-stress tolerance of cucumber seedlings [J]. *Biol Plantarum*, 2013, 57(4): 711–717.