

· 化学与分析 ·

基于化学指纹图谱和多指标成分含量测定的白芷质量评价

雷云^{1,2}, 王威², 史洋^{1,3}, 翟华强², 杨洪军^{1*}, 许海玉^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法建立白芷中香豆素类成分的指纹图谱,并同时测定欧前胡素和异欧前胡素的含量。方法:采用 Platisil DOS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,检测波长254 nm。共收集了10批白芷进行测定,运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”2004A版进行评价,并对2种成分进行含量测定。结果:建立了白芷香豆素类成分 HPLC 指纹图谱,标定了10个共有色谱峰。含量测定条件通过方法学验证,平均加样回收率分别为102.52%, 98.23%。结论:该法所建立的白芷香豆素类成分指纹图谱特征性强、方法简便,结合欧前胡素和异欧前胡素含量测定可更好地控制其质量,对白芷的鉴定及质量控制具有指导意义和参考价值。

[关键词] 白芷; 指纹图谱; 欧前胡素; 异欧前胡素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0036-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020036

HPLC Fingerprints Integrated with Quantitative Determination of Multi-components for Quality Control of Angelicae Dahuricae Radix LEI Yun^{1,2}, WANG Wei², SHI Yang^{1,3}, ZHAI Hua-qiang², YANG Hong-jun^{1*}, XU Hai-yu^{1*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** A method of HPLC-DAD was developed to evaluate the quality of Angelicae Dahuricae Radix through multi-target ingredient determination and finger printing analysis technologies. **Method:** The optimal conditions of separation and detection were achieved on a Platisil DOS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with linear gradient elution of acetonitrile-water. The detection wavelength was 254 nm. Collect 10 batches from different origins in China to assess the similarities according to similarity evaluation for ‘chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine’ (2004A). **Result:** In quantitative analysis, the two components showed good regression with linear ranges, and their recoveries were 102.52% and 98.23%. **Conclusion:** This study indicated that the combination of quantitative and chromatographic fingerprint analysis can be readily utilized as a quality control method for Angelicae Dahuricae Radix.

[Key words] Angelicae Dahuricae Radix; finger printing; imperatorin; iso imperatorin

白芷为伞形科植物白芷或杭白芷的干燥根^[1]。现有对白芷质量控制的研究多在多成分含量测定和指纹图谱。多成分含量测定不足以表明中药整体质

量信息,也不能反应中药有效性和安全性状况^[2-4]。中药化学指纹图谱分析具有全息性、客观性、准确性、整体性、模糊性的特征^[4-5],是一种综合的,可量

[收稿日期] 20140418(002)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI51B03);国家自然科学基金青年基金项目(81202793);中国中医科学院基本业务费自助选题项目(Z02063);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ070819)

[第一作者] 雷云,在读硕士, Tel:18810467104, E-mail: leiyun_1102@163.com;

[通讯作者] * 杨洪军, 博士, 研究员, 从事中药新药设计的方法与技术研究, Tel:010-84035184, E-mail: hongjun0420@vip.sina.com;

* 许海玉, 博士, 副研究员, 从事中药新药设计的方法与技术研究, Tel:010-84035184, E-mail: hy_xu627@163.com

化的鉴别手段,更符合中医药传统理论,能较好地表征中药物质组成的整体性和复杂性。通过指纹图谱分析并明确较多的成分含量信息可以为中药材质量评价提供重要参考^[6-7]。本实验拟建立 HPLC 指纹图谱技术结合多成分定量分析对不同批次白芷进行质量控制及稳定性研究,为白芷的质量控制提供参考和依据^[8-9]。

1 仪器与试药

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent,包括 G1315B 型二极管阵列检测器),XS105 Dual Range 型 1/10 万电子分析天平(Mettler Toledo),BP110S 型 1/1 万电子分析天平(Sartorius)。

乙腈(色谱纯,Merck 公司),纯净水(娃哈哈),甲醇(分析纯,北京化工厂)。欧前胡素对照品(成都普思生物科技有限公司,批号 PS101228,纯度 98%),异欧前胡素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110827-201109,纯度 98%)。

不同来源白芷经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,为伞形科植物白芷或杭白芷的干燥根。10 批白芷药材来源见表 1。

表 1 白芷样品来源

Table 1 Origins of *Angelicae Dahuricae Radix* samples

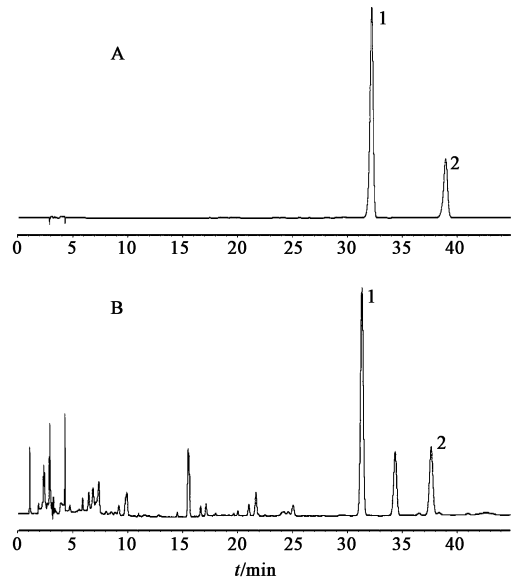
| No. | 批号 | 产地 | 基源 |
|-----|--------|------|--|
| 1 | 130803 | 四川 | <i>Angelica dahurica</i> |
| 2 | 130802 | 四川 | <i>A. dahurica</i> |
| 3 | 130801 | 四川 | <i>A. dahurica</i> |
| 4 | 130701 | 四川 | <i>A. dahurica</i> |
| 5 | 130702 | 四川 | <i>A. dahurica</i> |
| 6 | 131001 | 安徽亳州 | <i>A. dahurica</i> |
| 7 | 131002 | 安徽亳州 | <i>A. dahurica</i> |
| 8 | 131003 | 河北安国 | <i>A. dahurica</i> |
| 9 | 131004 | 山东 | <i>A. dahurica</i> |
| 10 | 131005 | 河南长葛 | <i>A. dahurica</i> var. <i>formosana</i> |

2 方法和结果

2.1 白芷指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 Agilent 1200 Platisil DOS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0 ~ 16 min, 10% ~ 57% A; 16 ~ 22 min, 57% A; 22 ~ 45 min, 57% ~ 63% A),检测波长 254 nm,柱温 15 °C,流速 1 mL·min⁻¹。见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取欧前胡素对照品 5.95 mg,异欧前胡素对照品 4.72 mg,分别置 25 mL 量瓶中,甲醇定容,再分别吸取欧前胡素、异



1. 欧前胡素; 2. 异欧前胡素

图 1 对照品(A)和白芷样品(B) HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample *Angelicae Dahuricae Radix* (B)

欧前胡素对照品溶液 9.21, 4.86 mL 于同一 25 mL 量瓶中,以甲醇定容至刻度,即得欧前胡素、异欧前胡素分别为 0.087 7, 0.036 7 g·L⁻¹ 的混合对照品储备液,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取白芷粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,称定质量,超声处理 40 min,取出,补足减失,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

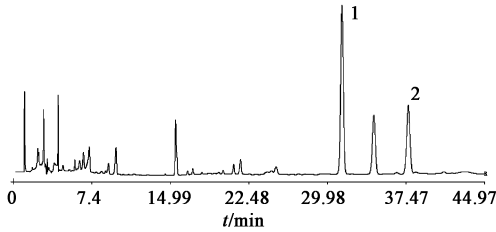
2.1.4 精密度试验 取同一供试品溶液,在 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积(参比峰为欧前胡素峰)的 RSD 均 < 3%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,在 2.1.1 项下色谱条件,分别在 0, 1, 2, 4, 6, 12 h 进样,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 12 h 稳定。

2.1.6 重复性试验 取同一批药材 6 份,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1.1 项下色谱条件,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.1.7 指纹图谱建立及相似度分析 取 10 批白芷样品,分别按供试品溶液的制备与检测方法进行检测,记录指纹图谱。因欧前胡素(峰 1)面积大且峰

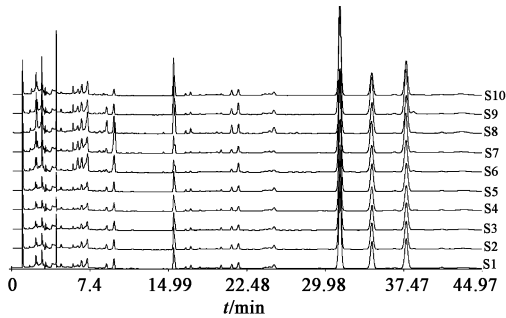
形最稳定故以其为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间,10 批样品共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.3%,符合指纹图谱的要求。运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版对 10 批样品的指纹图谱进行分析,设定样品 1 为参照图谱,选取“时间窗宽度”为 0.1 min,采用中位数法计算,选定 10 个特征峰进行多点校正,自动匹配,生成白芷香豆素类成分的对照指纹图谱,见图 2。匹配后的 10 批样品谱图见图 3。然后进行各样品的相似度评价,样品 S1 ~ S10 的相似度分别为 0.998, 0.998, 0.997, 0.995, 0.997, 0.986, 0.979, 0.951, 0.996, 0.989。10 批药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 > 0.95,说明各产地的药材具有较高的均一性。



1. 欧前胡素; 2. 异欧前胡素

图 2 白芷药材香豆素类化合物的 HPLC 对照指纹谱

Fig. 2 HPLC standard fingerprint of Angelicae Dahuricae Radix



S1 ~ S10. 10 批白芷样品

图 3 10 批白芷药材香豆素类化合物的 HPLC 指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of 10 batches of Angelicae Dahuricae Radix

2.2 白芷中欧前胡素和异欧前胡素的含量测定

色谱条件、对照品溶液制备、供试品溶液制备同 2.1 项下方法。

2.2.1 线性关系的考察 取 2.1.2 项下对照品储备液稀释 1, 2, 4, 8, 16, 32 倍。取对照品储备液和稀释液分别进样 20 μL , 测定峰面积, 以各对照品进样量对峰面积进行线性回归, 得标准曲线, $Y_{\text{欧前胡素}} = 85\ 149X + 10.867$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范

围 2.740 ~ 87.679 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $Y_{\text{异欧前胡素}} = 72\ 152X + 2.456$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 1.147 ~ 36.703 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果表明各化合物在相应浓度范围内线性关系良好。

2.2.2 精密度试验 取稀释 8 倍的混合对照品溶液, 在 2.1 项下的色谱条件下, 进样 20 μL , 连续进样 6 次, 测定欧前胡素和异欧前胡素的色谱峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 0.3%。

2.2.3 重复性试验 称取同一批白芷药材粉末 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 欧前胡素和异欧前胡素平均质量分数的 RSD 分别为 0.6%, 2.1%。结果表明方法重复性良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一批样品制备供试品溶液, 室温放置 0, 1, 3, 6, 12, 24 h 后进样测定, 欧前胡素和异欧前胡素峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.2.5 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 精密加入 2 种对照品适量, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 依 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 计算各自的加样回收率。结果见表 2。

表 2 白芷中 2 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery test of two components in Angelicae Dahuricae Radix

| 成分 | 样品 中量 / μg | 加入量 / μg | 测得量 / μg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-------|-----------------------------|------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 欧前胡素 | 233.59 | 230.34 | 466.26 | 101.01 | 102.52 | 1.1 |
| | 233.16 | 230.34 | 468.50 | 102.17 | | |
| | 233.80 | 230.34 | 471.55 | 103.21 | | |
| | 233.37 | 230.34 | 467.71 | 101.74 | | |
| | 233.48 | 230.34 | 469.87 | 102.63 | | |
| | 233.27 | 230.34 | 473.60 | 104.34 | | |
| 异欧前胡素 | 134.48 | 140.58 | 274.99 | 99.95 | 98.23 | 1.6 |
| | 134.29 | 140.58 | 270.57 | 96.94 | | |
| | 134.57 | 140.58 | 270.42 | 96.63 | | |
| | 134.38 | 140.58 | 271.52 | 97.55 | | |
| | 134.43 | 140.58 | 275.64 | 100.45 | | |
| | 134.33 | 140.58 | 271.86 | 97.83 | | |

2.2.6 10 批次白芷的含量测定 精密称取 10 批白芷样品, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件测定, 结果见表 3。结果显示不同样品中 2 种白芷香豆素成分的含量差异较大, 为原料的优选提供依据。

表3 10批白芷样品中2种成分的含量测定

Table 3 Two components determination of ten batches in Angelical Dahuricae Radix

| No. | 欧前胡素 | 异欧前胡素 |
|-----|-------|-------|
| 1 | 0.880 | 0.494 |
| 2 | 0.856 | 0.467 |
| 3 | 0.792 | 0.453 |
| 4 | 0.751 | 0.417 |
| 5 | 0.820 | 0.460 |
| 6 | 1.014 | 0.519 |
| 7 | 0.956 | 0.645 |
| 8 | 0.738 | 0.631 |
| 9 | 1.372 | 0.725 |
| 10 | 0.895 | 0.568 |

3 讨论

3.1 流动相的选择^[10-11] 根据白芷指纹图谱的文献报道,比较了乙睛-水、乙睛-0.2%冰乙酸水溶液、乙睛-0.1%冰乙酸水溶液、乙睛-0.05%冰乙酸水溶液和甲醇-水4种流动相梯度洗脱程序,发现乙睛-水出峰时间和分离度较好,故最终选择了乙睛-水进行梯度洗脱。

3.2 色谱柱的选择 实验选择了以下8种色谱柱: Platisil DOS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Aglient zorbax sb-aq (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Dikma diamonsil C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Dikma diamonsil C₁₈ (2) (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent sec-3 150A (4.6 mm × 300 mm, 3 μm), Dikma spurcil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Welch Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。比较各色谱图,其中Platisil DOS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,分离效果好。

3.3 柱温的选择 考察了15, 20, 25, 30, 35, 40℃6个不同温度。发现15℃时,对各成分的分离度最优,因此选择15℃为白芷的HPLC指纹图谱的测定柱温。

3.4 流速的选择 考察了0.5, 0.8, 1, 1.2 mL·min⁻¹4个不同流速。发现1 mL·min⁻¹时,对各成分的分离度最优,因此选择1 mL·min⁻¹为白芷HPLC指纹图谱的测定流速。

本实验采用高效液相色谱法建立白芷中香豆素类成分的指纹图谱,并对白芷中主要的2种香豆素成分欧前胡素和异欧前胡素进行了含量测定,方法简便,具备了定性和定量双重作用。可以作为本产品质量控制的依据。

[参考文献]

[1] 张萍,杨燕,鄢丹,等. 多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(1): 120-123.

[2] 王海南. 中药有效成分研究与中药新药研发[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(5): 268-270.

[3] 韩晔华,霍飞凤,杨悠悠,等. 中药指纹图谱研究的某些进展与展望[J]. 色谱, 2008, 26(2): 142-152.

[4] 张霞,蓝苑元,任萃文. 中药复方制剂制备工艺研究进展[J]. 中国现代中药, 2007, 9(4): 38-40.

[5] 李建银,刘文,邱德文. 中药复方指纹图谱的研究现状及其前景[J]. 武警医学, 2004, 15(1): 59-61.

[6] 张欢,刘祯. 中药有效成分研究[J]. 黑龙江科技信息, 2009, 11(10): 260-261.

[7] 胡爱萍. 关于中药药性理论现代化研究的思考[J]. 光明中医, 2006, 21(10): 20-22.

[8] 马壮,闫凤. 中药有效成分研究现状分析[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(4): 380-381.

[9] 周启仲. HPLC在中药有效成分分析中的应用[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(18): 25-26.

[10] 朱桃花,范璐,钱向明,等. HPLC分析植物油甘油三酯结构组成的研究现状[J]. 中国油脂, 2011, 36(5): 59-63.

[11] 李南薇,钟银链. 木瓜叶氨基酸提取工艺优化及组成成分的HPLC分析[J]. 广东农业科学, 2012, 11(11): 119-121.

[责任编辑 顾雪竹]