

当归、枳壳挥发油 HPLC 指纹图谱的研究

王元清^{1,2}, 严建业^{1*}, 李顺祥^{1*}, 罗堃¹, 谢瑜¹

(1. 湖南中医药大学药学院 中药现代化教育厅重点实验室, 长沙 410208;
2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院 生物技术与工程实验室, 长沙 410004)

[摘要] 目的:研究不同批次当归、枳壳药材经 CO₂ 超临界混合萃取的挥发油的指纹图谱,为科学评价和有效控制其质量提供实验依据。方法:采用高效液相色谱,条件为伊利特 ODS 2 C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈-水为流动相,梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 325 nm。结果:建立了 11 个不同批次的当归、枳壳混合提取挥发油的指纹图谱,以蒿本内酯峰为参照峰,共标定了 13 个共有峰,利用化学对照品指认了其中 2 个色谱峰;该指纹图谱可鉴别当归、枳壳经水蒸汽蒸馏法得的挥发油。结论:方法准确可靠,可用于控制淫藤骨痹康方中的挥发油的质量。

[关键词] 当归; 枳壳; 挥发油; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0114-05

[doi] 10.11653/syfy2013100144

[收稿日期] 20121105(010)

[基金项目] 湖南省科技厅项目(2009TP4051-1);长沙市科技计划项目(k1003034-31);湖南省高校“中药新药创制与资源综合持续利用”科技创新团队项目(湘教通[2010]212号);国家中医药管理局“药用植物学”、“中药药剂学”重点学科项目(国中医药发[2009]30号);湖南省“中药学”重点学科项目(湘教通[2011]76号)

[第一作者] 王元清,博士,讲师,从事生物药物的教学与科研, Tel: 0731-85623496, E-mail: wangyuanqing201@126.com

[通讯作者] * 严建业,博士,副教授,从事中药剂型与疗效研究, Tel: 0731-88458231, E-mail: yanjianye201@126.com

* 李顺祥,博士,教授,研究员,博士生导师,从事中药有效成分与资源研究, Tel: 0731-88458229, E-mail: lishunxg@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] 高双荣,梁爱华,易艳,等. 雄黄中砷的不同形态及其毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 243.
- [2] 顾晶晶,黄珍贞,谷颖敏,等. 雄黄可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 230.
- [3] 韩小丽,张小波,郭兰萍,等. 中药材重金属污染现状的统计分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2041.
- [4] 胡斌,江祖成. 高效液相色谱/氢化物发生/原子荧光快速检测尿砷形态[J]. 分析科学学报, 2000, 16(2): 89.
- [5] 董菊,陈辉,吴娟,等. 原子荧光光谱法检测牛黄解毒片及其拆方可溶性砷的含量[J]. 中国实验方剂学杂

- 志, 2011, 17(18): 67.
- [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: 263.
- [7] 严秀平,倪哲明. 联用技术应用于元素形态分析的新进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(5): 945.
- [8] 龙尚祥,赵洋,周欣,等. 杠板归药材中重金属的含量测定及其质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 52.
- [9] 冷静,魏伯平,杨华蓉,等. 氢化物发生-原子荧光法测定三七、三七三醇皂苷及其制剂中的砷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 54.
- [10] 杨健,王宏洁,边宝林. 中药材鲜地黄中砷、汞、铅和镉的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 33.

[责任编辑 顾雪竹]

Fingerprints of Essential Oil from *Angelicae Sinensis Radix* and *Aurantii Fructus* by HPLC

WANG Yuan-qing^{1,2}, YAN Jian-ye^{1*}, LI Shun-xiang^{1*}, LUO Kun¹, XIE Yu¹

(1. Key Lab of Modernization of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Lab of Biotechnology and Engineering, College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

[Abstract] Objective: To establish the HPLC fingerprint of essential oil from different batches of *Angelicae Sinensis Radix* and *Aurantii Fructus* extracted with supercritical CO₂ fluid mixing extraction, and to evaluate and control the quality of it. **Method:** The analytical column was a Hypersil ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); a mixture of acetonitrile-water was used as the mobile phase with gradient elution. Flow rate was 1 mL · min⁻¹ wavelength was set at 283 nm. Column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The fingerprint of essential oil from *Angelicae Sinensis Radix* and *Aurantii Fructus* obtained by mixing extraction was established. The ligustilide peak was taken as the reference peak. Thirteen common peaks were assigned, and two peaks were confirmed by comparing with reference standards. The fingerprint of essential oil obtained by steam distillation can be identified. **Conclusion:** The method could be used for the quality control of essential oil from *Angelicae Sinensis Radix* and *aurantii fructus* obtained by mixing extraction accurately and reliably.

[Key words] *Angelicae Sinensis Radix*; *Aurantii Fructus*; essential oil; HPLC; fingerprint

当归、枳壳为治疗骨关节炎的骨痹康方中的含有挥发油成分的药材。枳壳挥发油中的右旋柠檬烯具有镇痛作用^[1],当归挥发油可提高机体免疫功能及镇痛抗炎作用^[2-3],其中藜本内酯还具有抗血栓形成及抗血凝,具有活血化瘀的作用^[4-5]。有关当归、枳壳挥发油的研究主要是各自挥发油的提取及成分分析^[6-9],而当归、枳壳混合挥发油的研究尚未见报道。为进一步控制骨痹康方中提取的挥发油的质量,合理开发利用其挥发油,课题组对不同批次当归、枳壳经 CO₂ 超临界混合萃取的挥发油建立了高效液相色谱指纹图谱。

1 材料

Agilent 1200 LC(安捷伦科技有限公司),伊利特 ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),粉碎机 FW135 型(天津市泰斯特仪器有限公司);电子分析天平 T-214 型(北京赛多利斯仪器系统有限公司),HL-2L/50Mpa-IIIB 型 CO₂ 超临界萃取仪(江苏南通超临界设备公司)。

蒿本内酯(批号 110729,供含量测定用,南京泽朗医药科技有限公司),阿魏酸(批号 111610-200604,供含量测定用,中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。当归购于长沙东塘药店,经湖南中医药大

学刘塔斯教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelicae Sinensis*(Oliv.) Diels 的干燥根,枳壳购于湖南益阳汉森制药有限公司,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实。当归、枳壳经检测,均符合 2010 年版《中国药典》。当归、枳壳挥发油由本校实验室的 CO₂ 超临界萃取仪萃取得到。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适应性试验 伊利特 ODS2 C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相乙腈-水(20:80),采用梯度洗脱,程序见表 1;检测波长 325 nm,流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,记录 75 min 色谱图。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取蒿本内酯对照品 0.008 3 g,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解,并定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得(每 1 mL 含蒿本内酯 0.83 mg)。

精密称取阿魏酸对照品 0.005 9 g,置于 25 mL 棕色量瓶中,加 70% 甲醇超声溶解,定容至刻度,摇匀。精密移取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇稀释定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得(每 1 mL 含阿魏酸 0.023 6 mg)。

表 1 流动相梯度程序

t/min	水/%	乙腈/%
0	70	30
20	60	40
45	55	45
60	30	70
65	50	50
70	70	30
75	70	30

2.3 当归、枳壳挥发油的制备 按处方比例称取当归、枳壳药材共 480 g, 粉碎成粗粉, 混合, 经 CO₂ 超临界流体萃取, 萃取条件为: 分离釜 I 的温度 40 ℃、分离釜 II 的温度 35 ℃、分离釜 I 的压力 10 MPa、分离釜 II 的压力 5 MPa、萃取温度 50 ℃、萃取压力 18 MPa、萃取时间 90 min。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取挥发油样品 0.5 g, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度实验 取同一批次样品溶液连续进样 6 次, 记录指纹图谱, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD, 结果各相对峰面积的 RSD < 3%, 各相对保留时间的 RSD < 1%, 符合指纹图谱的要求。

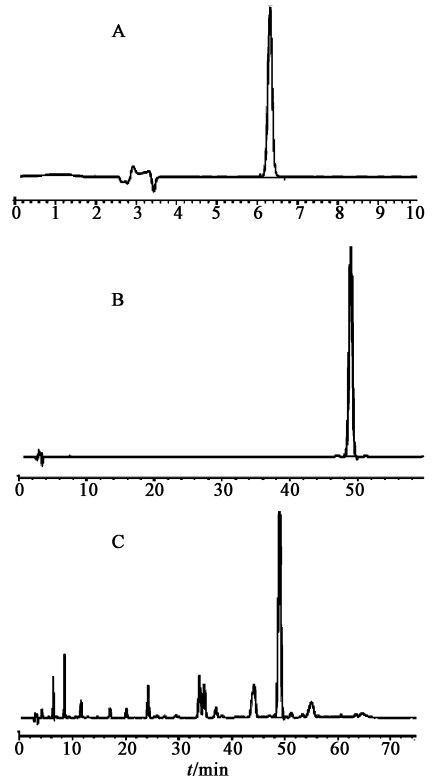
2.5.2 稳定性实验 取同一批次样品溶液在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 分别进样, 记录指纹图谱, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD, 结果各相对峰面积的 RSD < 3%, 各相对保留时间的 RSD < 2%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性实验 取同一批次当归、枳壳超临界混合萃取的挥发油, 平行取 6 份, 按 2.3 的方法制备供试品溶液, 进样, 记录指纹图谱, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD, 结果各相对峰面积的 RSD < 3%, 各相对保留时间的 RSD < 2%, 表明重复性较好。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 参照峰的选择 精密吸取阿魏酸对照品溶液、蒿本内酯对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 发现阿魏酸的 t_R = 6.321, 蒿本内酯 t_R = 48.966, 供试品色谱图中在对照品的保留时间处有相同的色谱峰, 即当归、枳壳挥发油样品中含有阿魏酸成分和蒿本内酯成分, 见

图 1。而在样品的色谱图中发现蒿本内酯色谱峰的强度高, 峰面积大, 分离度较好, 因而选择蒿本内酯的峰为参照峰。



A. 阿魏酸; B. 蒿本内酯; C. 样品

图 1 当归、枳壳挥发油 HPLC

2.6.2 共有峰的确定 通过对 11 个批次的色谱图分析比较, 共标定了 13 个共有峰, 其保留时间为 t₁ = 4.244, t₂ = 6.352, t₃ = 8.482, t₄ = 11.602, t₅ = 17.007, t₆ = 20.145, t₇ = 24.271, t₈ = 33.92, t₉ = 34.804, t₁₀ = 37.036, t₁₁ = 49.021, t₁₂ = 51.219, t₁₃ = 53.238。见图 2。

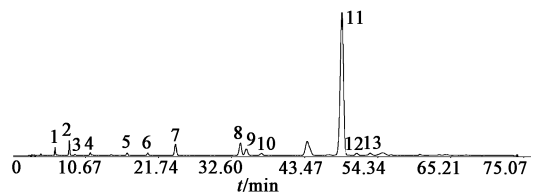


图 2 当归、枳壳挥发油对照指纹图谱

2.6.3 共有峰的相对保留时间与相对峰面积 以各批次的蒿本内酯峰为参照峰, 计算同一图谱中各共有峰的相对保留时间与相对峰面积, 其结果见表 2, 3。

2.6.4 相似度计算 采用国家药典委员会提供的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版) 计算相似度。

表 2 不同批次样品各共有峰的相对保留时间

No.	批次											平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	0.086 5	0.086 5	0.086 6	0.086 6	0.086 6	0.086 4	0.086 5	0.086 7	0.086 7	0.086 6	0.086 7	0.086 6	0.10
2	0.129 3	0.129 4	0.129 7	0.129 6	0.129 6	0.129 5	0.129 9	0.129 7	0.129 7	0.129 5	0.129 7	0.129 6	0.12
3	0.173 1	0.172 8	0.173 1	0.172 8	0.173 1	0.172 7	0.173 0	0.173 0	0.173 2	0.173 0	0.173 3	0.173 0	0.10
4	0.236 6	0.236 4	0.236 7	0.236 4	0.236 8	0.236 7	0.236 8	0.236 7	0.236 9	0.236 6	0.237 0	0.236 7	0.08
5	0.348 0	0.347 9	0.348 3	0.347 9	0.348 3	0.348 3	0.348 3	0.348 2	0.348 5	0.348 0	0.348 6	0.348 2	0.06
6	0.411 2	0.410 6	0.410 9	0.410 6	0.410 7	0.410 7	0.410 8	0.410 7	0.411 4	0.410 9	0.411 7	0.410 9	0.09
7	0.495 0	0.494 6	0.495 1	0.494 9	0.495 2	0.495 0	0.495 2	0.495 1	0.495 5	0.495 0	0.495 3	0.495 1	0.04
8	0.691 9	0.691 7	0.692 0	0.691 6	0.691 7	0.691 7	0.691 5	0.692 0	0.692 1	0.692 1	0.692 4	0.691 9	0.04
9	0.710 4	0.709 7	0.709 9	0.709 4	0.709 6	0.709 5	0.709 3	0.710 0	0.710 2	0.710 3	0.710 8	0.709 9	0.06
10	0.756 3	0.755 6	0.755 5	0.754 6	0.755 0	0.754 9	0.754 7	0.755 8	0.755 7	0.756 0	0.756 6	0.755 5	0.09
S	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
11	1.045 4	1.044 8	1.044 4	1.044 6	1.045 2	1.044 6	1.044 7	1.044 7	1.045 0	1.044 9	1.044 9	1.044 8	0.03
12	1.083 3	1.089 0	1.088 4	1.087 8	1.083 0	1.088 3	1.082 4	1.088 9	1.082 9	1.083 2	1.089 3	1.086 0	0.28

表 3 不同批次样品各共有峰的相对峰面积

No.	批次											平均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	0.0043	0.0138	0.0073	0.0059	0.0057	0.0043	0.0033	0.0038	0.0037	0.0077	0.0043	0.0058
2	0.011 2	0.046 0	0.015 6	0.017 2	0.013 4	0.013 9	0.014 6	0.008 2	0.013 0	0.021 4	0.011 9	0.016 9
3	0.032 9	0.082 8	0.013 2	0.024 6	0.035 2	0.032 4	0.034 4	0.022 6	0.033 6	0.038 6	0.028 5	0.034 4
4	0.004 9	0.027 6	0.005 9	0.008 9	0.011 2	0.011 0	0.003 4	0.008 6	0.004 2	0.007 8	0.010 0	0.009 4
5	0.011 3	0.020 4	0.004 3	0.008 0	0.014 4	0.007 2	0.007 4	0.005 0	0.009 5	0.007 4	0.006 4	0.009 2
6	0.005 6	0.019 6	0.004 4	0.006 1	0.005 7	0.012 5	0.009 4	0.008 9	0.007 5	0.009 2	0.011 1	0.009 1
7	0.047 3	0.081 8	0.034 5	0.048 1	0.068 2	0.051 7	0.047 3	0.033 1	0.047 7	0.042 5	0.044 5	0.049 7
8	0.029 7	0.139 7	0.020 3	0.028 2	0.023 9	0.139 3	0.074 2	0.092 8	0.051 2	0.079 5	0.119 6	0.072 6
9	0.045 5	0.123 4	0.015 9	0.033 6	0.038 4	0.035 8	0.044 0	0.029 9	0.044 8	0.040 3	0.034 1	0.044 2
10	0.014 9	0.038 8	0.005 6	0.013 0	0.024 3	0.013 2	0.006 5	0.012 4	0.010 5	0.008 4	0.013 0	0.014 6
S	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
11	0.015 6	0.018 2	0.014 2	0.013 2	0.013 3	0.011 4	0.012 5	0.012 2	0.012 0	0.011 6	0.011 9	0.013 3
12	0.044 4	0.013 7	0.006 8	0.011 5	0.026 3	0.010 8	0.017 0	0.005 4	0.017 7	0.013 1	0.009 0	0.016 0

以第 3 批样品图谱为参照图谱,采用中位数法,时间宽度为 0.20,多点校正后自动匹配,生成对照指纹图谱,见图 3,表 4。相似度结果表明,11 批当归、枳壳挥发油的相似度均 > 0.96。

2.6.5 当归、枳壳挥发油不同提取方法的指纹图谱比较 将同一批次当归、枳壳药材两份,一份采用水蒸汽蒸馏法提取挥发油,另一份采用超临界流体萃取法提取挥发油,按 2.3 的方法制备供试品溶液,按 2.1 的色谱条件下记录 75 min 的色谱图。从色谱图中可以看出,当归枳壳挥发油采用不同的提取方法

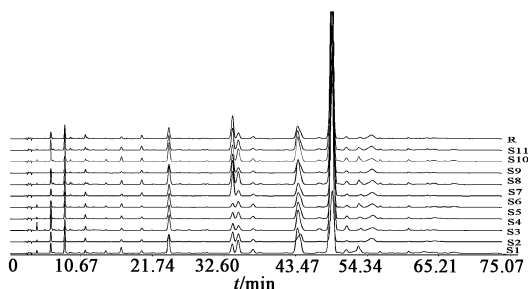


图 3 当归、枳壳挥发油各批次指纹图谱

所得的指纹图谱中峰的数目、峰的强度有一定的差

表 4 不同批次当归、枳壳挥发油与对照指纹图谱的相似度

No.	相似度	No.	相似度
1	0.997	7	0.999
2	0.960	8	0.995
3	0.996	9	0.999
4	0.998	10	0.999
5	0.998	11	0.999
6	0.998		

异性,可以较好地鉴别开来;从已知成分看,水蒸汽蒸馏法所得挥发油中蒿本内酯色谱峰峰面积占总峰面积的比例较大,而阿魏酸色谱峰峰面积占总峰面积的比例较小。

3 讨论

挥发油的指纹图谱研究通常采用气相色谱法^[10-11],前期研究尝试了采用 GC-MS 法研究当归、枳壳挥发油。GC-MS 分析研究中检测到了蒿本内酯($t_R = 21.7 \text{ min}$)而未检测出阿魏酸,而 HPLC 法可将这两个成分同时检测,因而本研究最终选择 HPLC 法。

在色谱条件摸索过程中,色谱柱考察了 NUCLEOSIL C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱、Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱、大连伊利特 ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱等,发现大连伊利特 ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱的柱效较高,分离性能较好。

考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 醋酸水等流动相,发现乙腈-水的系统分离性能较好。而在恒定比例的乙腈-水系统中不能将各成分洗脱出来,因而采用梯度洗脱系统。

考察了 325, 280 nm 处的色谱峰,发现在 325 nm 处色谱峰的强度较强、噪音较低,因而选择 325 nm 处为测定波长。

当归、枳壳挥发油不同提取方法的指纹图谱比较发现,当归、枳壳挥发油不同提取方法获得的挥发油成分的数与量存在较大的差异,可以通过该指纹图谱鉴别提取方法。2 种提取方法中,各色谱峰对应成分相对总含量的差异较大;预实验研究表明,采

用 CO₂ 超临界流体萃取法获得的挥发油总量、蒿本内酯含量及阿魏酸含量均高于水蒸汽蒸馏法,因而本研究建立当归、枳壳经 CO₂ 超临界流体混合萃取法获得的挥发油的指纹图谱。而两种提取方法所得挥发油的药理作用比较及谱效关系有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 黄加龙,杨武尧,周道根. 枳壳研究概况[J]. 食品与药品, 2006, 8(11):1.

[2] 刘琳娜,贾敏,梅其炳,等. 乙醇提取新鲜当归油的抗炎镇痛作用[J]. 中国药房, 2002, 13(9):526.

[3] Chao W W, Hong Y H, Chen M L, et al. Inhibitory effects of *Angelica sinensis* ethyl acetate extract and major compounds on NF-kappa B trans-activation activity and LPS-induced inflammation[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129(2):244.

[4] 李健蕊,柳钟勋,左增艳. 当归内酯对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5):13.

[5] 王欢,唐于平,郭建明,等. 当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集及凝血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):73.

[6] 曲贵家,李守君. 应用超临界 CO₂ 萃取当归中挥发油的研究[J]. 佳木斯大学学报:自然科学版, 2007, 25(6):848.

[7] 孙宇靖,王亚丽. 利用 GC-MS 法比较 3 种不同当归挥发油提取方法的研究[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(13):50.

[8] 龚千锋,钟凌云,曹君,等. 不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油 GC-MS 分析[J]. 中成药, 2007, 29(11):1639.

[9] 王元清,严建业,师白梅,等. 不同批次枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、总黄酮、挥发油的含量比较及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):146.

[10] 曹君,王少军,段启,等. 枳壳麸炒品挥发油成分的 GC 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1):50.

[11] 袁雷,钟国辉,权红,等. 西藏大花红景天挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):67.

[责任编辑 顾雪竹]