

当归干、鲜品中游离阿魏酸和总阿魏酸含量

林丽,晋玲,李应东*,侯嘉,高素芳,杨建成
(甘肃中医学院,兰州 730000)

[摘要] 目的:采用HPLC测定当归鲜品与干品中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量,并对其进行比较。方法:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)分析柱,流动相乙腈-0.085%磷酸(17:83),检测波长316 nm,柱温35℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量为10 μL。测定样品中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量。结果:游离阿魏酸和总阿魏酸分别在0.024 2~0.121 0 μg和0.0242~0.192 36 μg呈良好的线性关系。回收率分别为96.34%,97.35%;09年当归干品中游离阿魏酸含量最高,鲜品中总阿魏酸含量最高。结论:该方法准确简便,具有相对良好的重复性和稳定性,有利于提高当归药材的质量控制。

[关键词] HPLC法;当归;鲜品;干品;游离阿魏酸;总阿魏酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0094-04

Correlation Study of Free and Total Ferulic Acid Content in Dried and Fresh *Angelica sinensis*

LIN Li, JIN Ling, LI Ying-dong*, HOU Jia, GAO Su-fang, YANG Jian-cheng
(Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** The free and total ferulic acid content in dried and fresh *Angelica sinensis* Radix was measured by HPLC. **Method:** Free and total ferulic acid content was determined by HPLC. The separation was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.085% phosphoric acid (17:83) as mobile phase at temperature of 35℃. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detected wavelength was set at 316 nm; the injection volume was 10 μL. **Result:** The linear relationship of free and total ferulic acid was excellent within the range of 0.024 2-0.121 0 μg and 0.024 2-0.192 36 μg, and the recovery rates were 96.34% and 97.35%, respectively. The free ferulic acid in dried *A. sinensis* Radix of 2009 was the highest and the total ferulic acid in fresh *A. sinensis* Radix was the highest. **Conclusion:** This method was simple and accurate with good repeatability and stability. It will help to improve the quality control of *A. sinensis* Radix.

[Key words] HPLC; fresh *Angelica sinensis* Radix; dried *Angelica sinensis* Radix; free ferulic acid; total ferulic acid

[收稿日期] 20120702(430)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31070352)

[第一作者] 林丽,高级实验师,从事中药资源、中药质量评价, Tel:0931-8765396, E-mail: xrhlin@sina.com

[通讯作者] *李应东,教授,博士生导师,从事中药资源、中西医结合, Tel:0931-8765566, E-mail: gszjyinling@163.com

- [6] 李丽,张村,肖永庆,等. 黄芩饮片的产地加工方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):1.
- [7] 李贵波,王欣欣,刘秀华,等. 正交试验法优选黄芩炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):36.
- [8] 熊春媚,郭亚东,马银海,等. RP-HPLC法测定黄芩苷和黄芩素的含量[J]. 食品与药品,2007,9(03A):15.
- [9] 赵春颖,王汝兴. 黄芩素制备工艺及含量测定方法的研究[J]. 承德医学院学报,2007,24(3):239.
- [10] 王彩芳,张红岭,代桂丽,等. 正交实验优选黄芩中黄芩素提取工艺[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2509.
- [11] 刘云华,黄志芳,陈燕,等. 酶解法提取黄芩中黄芩素的工艺研究[J]. 天然产物与开发,2007,19(4):688.
- [12] 姚亚红,张立伟. 黄芩素提取工艺研究[J]. 西北药学杂志,2008,23(5):280.

[责任编辑 顾雪竹]

当归是中医常用中药之一,味甘辛、微苦,具补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[1-3]。药理研究发现其具有抗氧化和清除自由基、抗皮肤性瘙痒作用^[4-5],广泛用于医药、美容产品中,并相应的开发出系列产品。在当归的质量控制研究中,以阿魏酸的定量分析较多,测得阿魏酸的含量^[6-13]。亦有文献报道,当归中含有阿魏酸松柏酯^[14],因提取工艺不同可以在一定条件下水解为阿魏酸,故提出了游离阿魏酸与总阿魏酸的概念,前者为药材中的阿魏酸,而后者为游离阿魏酸及其结合型阿魏酸水解所得阿魏酸之和,目前,没有人对其鲜品中阿魏酸的含量进行研究,本试验采用 HPLC 测定当归鲜品与干品中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量,为今后开发当归鲜品药材提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪(G1329A 自动控温自动进样器, G1315B 二极管阵列检测器), KQ-250TDB 型高频数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 电热恒温水浴锅(HH. S 112, 江苏医疗器械厂), 电子天平(BS 224Sgajf, 北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

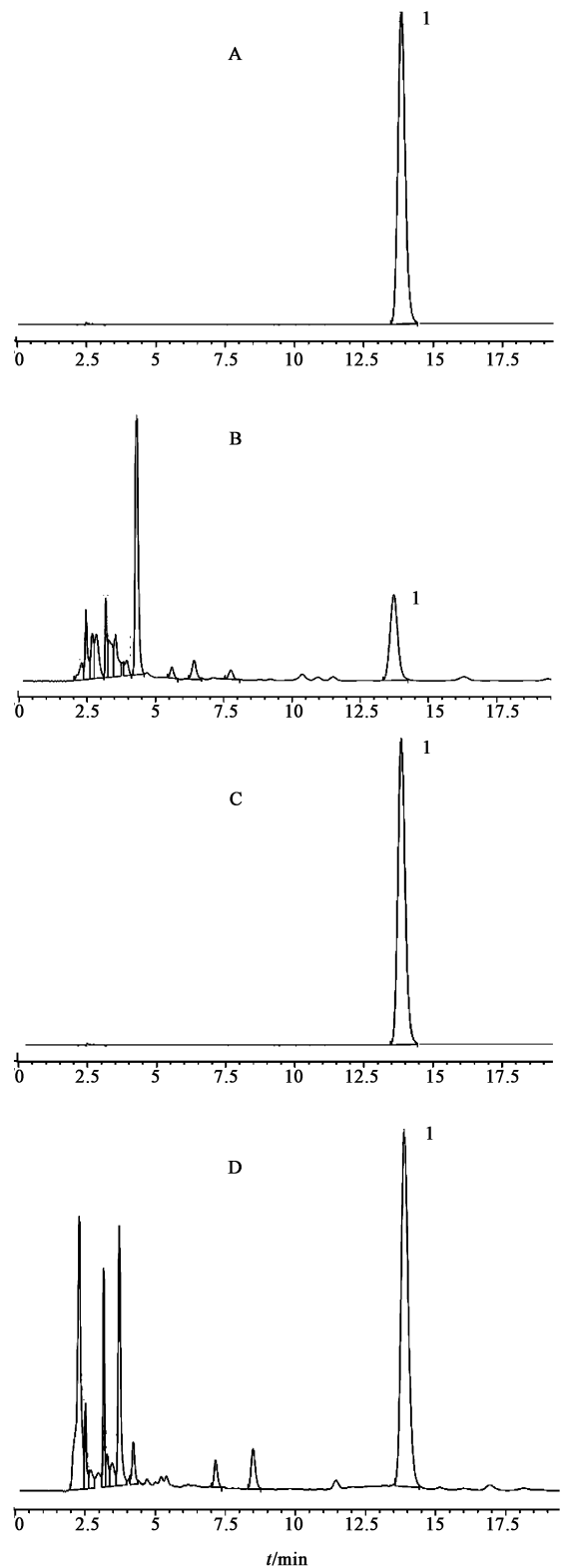
1.2 试剂和药品 试验用水为娃哈哈超纯水, 氢氧化钠、磷酸、盐酸、甲酸为分析纯, 甲醇和乙腈为色谱纯。阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110773-200611)。09 年当归鲜品药材, 09, 08, 07 年当归干品药材, 均采于甘肃岷县, 经过甘肃中医学院晋玲副教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。鲜品药材根据药材干湿比称取 1:3.615 6, 粉碎。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分析柱, 流动相乙腈-0.085% 磷酸(17:83), 检测波长 316 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL^[1]。该色谱条件下阿魏酸峰达到基线分离, 对照品与供试液的色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 游离阿魏酸样品的制备 精密称取 07 年当归干品药材粉末 0.5 g, 置圆底烧瓶中, 加入甲醇-甲酸(95:5) 25 mL 后称重, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用提取溶剂补足失重, 摇匀, 静置, 上清液经滤纸滤过, 取续滤液 5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加提取溶剂定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得回流提取法样品。同样采用超声



A. 游离阿魏酸对照品; B. 游离阿魏酸样品;
C. 总阿魏酸对照品; D. 总阿魏酸样品; 1. 阿魏酸

图 1 当归供试品 HPLC

提取法 40 min, 取续滤液作为供试品溶液。

08, 09 年当归干品、09 年鲜品样品制备同上法。

2.2.2 总阿魏酸样品的制备 精密称取 07 年当归

干品药材粉末 0.5 g, 置圆底烧瓶中, 加入含 2% NaOH 的 70% 甲醇溶液 25 mL 后称重, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 上清液经滤纸滤过, 取续滤液 5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸调 pH 至弱酸性^[14], 再加入 70% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得回流提取法样品。同样采用超声提取法 40 min, 取续滤液作为供试品溶液。

08, 09 年当归干品、09 年鲜品样品制备同上法。

2.2.3 对照品溶液的制备^[6-7] 精密称取 0.012 1 g 阿魏酸对照品, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇-甲酸(95:5)稀释置刻度, 制得 121 mg·L⁻¹ 的对照品贮备液。用移液枪吸取对照品贮备液 0.1 mL 于 1 mL 量瓶, 加甲醇-甲酸(95:5)稀释至刻度, 摇匀。得每 mL 含 12.1 μg 的游离阿魏酸对照品溶液。

精密称取 0.012 1 g 阿魏酸对照品, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加 2% NaOH 的 70% 甲醇溶液稀释置刻度, 制得 121 mg·L⁻¹ 的对照品备液。用移液枪吸取对照品备液 0.1 mL 于 1 mL 量瓶, 加 2% NaOH 的 70% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀。得每 mL 含 12.1 μg 的总阿魏酸对照品溶液。

2.2.4 线性范围考察 依选定色谱条件进样测定, 以峰面积为 Y 轴, 对照品进样量(μg)为 X 轴进行线性回归, 得测定游离阿魏酸和总阿魏酸的回归方程分别为 $Y = 26.375X + 2.01$ ($r = 0.9996$) 和 $Y = 29.164X - 2.9107$ ($r = 0.9997$), 结果表明, 用甲醇-

甲酸(95:5)和含 2% NaOH 的 70% 甲醇溶液, 进样量在(0.024 2~0.121 0) μg, 0. (0.242~0.192 36) μg 呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取用甲醇-甲酸(95:5)和 2% NaOH 的 70% 甲醇溶液配制的对照品溶液各 1 份, 依选定色谱条件, 连续进样 6 次, 测得阿魏酸峰面积, 其 RSD 分别为 1.06%, 1.65%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取 09 年当归干品药材粉末, 分别用甲醇-甲酸(95:5)和 2% NaOH 的 70% 甲醇溶液制备 6 份供试液, 色谱条件同上测定游离阿魏酸和总阿魏酸的平均含量, 其 RSD 分别为 1.70%, 1.27%。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 同制备供试品溶液的制备方法分别制取游离阿魏酸和总阿魏酸供试品溶液, 并分别在 0, 5, 10, 15, 20, 24 h 进样, 按同法色谱条件测定峰面积, 测得其 RSD 分别为 1.34%, 1.75%, 表明供试品 24 h 内稳定。

2.2.8 回收率试验 精密已知含量(09 当归药材, 游离阿魏酸含量 0.077%, 总阿魏酸含量 0.093%) 的供试品 0.25 g, 各 5 份, 分别置 50 mL 锥形瓶中, 根据加样回收率实验 1:1 加入方法, 精密加入已配置好的游离阿魏酸和总阿魏酸对照品溶液各 0.98 mL 和 2 mL, 按 2.2.1, 2.2.2 项下方法制备成供试品溶液, 色谱条件同上, 测得游离阿魏酸及总阿魏酸含量, 并依法测定, 计算游离阿魏酸和总阿魏酸回收率的平均值分别为 96.34%, 97.35%, RSD 1.65%, 1.61%。结果见表 1~2。

表 1 游离阿魏酸加样回收率试验

| No. | 称样量 /g | 样品中含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-----|-----------|--------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 1 | 2.500 1 | 1.925 1 | 1.181 5 | 3.064 2 | 96.41 | | |
| 2 | 2.501 2 | 1.925 9 | 1.181 5 | 3.055 8 | 95.63 | | |
| 3 | 2.500 8 | 1.925 6 | 1.181 5 | 3.074 | 97.2 | 96.34 | 1.65 |
| 4 | 2.501 6 | 1.926 2 | 1.181 5 | 3.088 | 98.33 | | |
| 5 | 2.500 3 | 1.925 2 | 1.181 5 | 3.037 5 | 94.14 | | |

表 2 总阿魏酸加样回收率试验

| No. | 称样量 /g | 样品中含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-----|-----------|--------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 1 | 2.503 1 | 2.327 9 | 2.42 | 4.685 2 | 97.41 | | |
| 2 | 2.502 2 | 2.327 0 | 2.42 | 4.665 5 | 96.63 | | |
| 3 | 2.501 4 | 2.326 3 | 2.42 | 4.726 9 | 99.22 | 97.35 | 1.61 |
| 4 | 2.502 6 | 2.327 4 | 2.42 | 4.707 | 98.33 | | |
| 5 | 2.500 7 | 2.325 7 | 2.42 | 4.628 | 95.14 | | |

表3 当归中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量 %

| 样品 | 总阿魏酸 | | 游离阿魏酸 | |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 超声提取 | 回流提取 | 超声提取 | 回流提取 |
| 07年干品 | 0.038 | 0.051 | 0.061 | 0.077 |
| 08年干品 | 0.052 | 0.070 | 0.042 | 0.056 |
| 09年干品 | 0.089 | 0.093 | 0.039 | 0.045 |
| 09年鲜品 | 0.055 | 0.109 | 0.025 | 0.035 |

2.3 样品含量测定 精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 色谱条件同上测定游离阿魏酸和总阿魏酸峰面积, 计算含量, 结果见表 3。

3 讨论

从本次试验结果看, 贮存条件相同情况下, 贮藏时间越长, 07, 08 年当归干品的游离阿魏酸高; 同一年份当归药材, 干品和鲜品中阿魏酸的含量不同, 其中游离阿魏酸含量 09 年干品 > 09 年鲜品; 总阿魏酸含量 09 年鲜品 > 09 年干品。总阿魏酸含量和游离阿魏酸含量采用回流提取效率远高于超声提取, 且回流提取的总阿魏酸含量均高于药典规定标准。

本方法可测定相对稳定、具有可比性的阿魏酸含量, 操作简便, 适合于当归药材中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量测定。数据表明, 阿魏酸及其结合态阿魏酸松柏酯的含量受贮存年限的影响较大, 故应掌握其分解条件, 以此来确定其贮藏条件及药材可使用年限, 这样对药材的质量和可利用度是非常有意义的。

鲜药早在中国古代就有久远用药历史, 但由于鲜药应用保存不便, 所以在这一领域的研究还不是很多。当归作为甘肃的道地药材和临床常用药材, 我们有条件广泛应用、发掘鲜当归的新用途, 为当归鲜品更合理高效利用提供依据。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部 [S]. 北京: 化学工业出版社,

2005: 89.

- [2] 马家骅, 李霞, 熊永爱, 等. 当归补血汤表证参数与其益气补血功效的关系初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 111.
- [3] 肖培根. 新编中药志. 第 1 卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 428.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草第 5 卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 893.
- [5] 刘海龙, 吴国泰, 王瑞琼, 等. 当归黄芪醇提物对实验性皮肤瘙痒模型的药效学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 200.
- [6] 吕瑞锦, 何丽一, 罗淑荣. 当归中阿魏酸的含量测定的研究 [J]. 中草药, 1980, 11(9): 395.
- [7] 辛宁, 罗翠娥, 莫燕. 不同等级当归的阿魏酸含量比较 [J]. 中药材, 2001, 24(4): 244.
- [8] 吴清, 李云谷, 杜守颖, 等. 当归、川芎提取工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(6): 17.
- [9] 陈汉平, 刘秦香, 李桂梅, 等. 高效液相色谱法测定当归及炮制品中阿魏酸的含量 [J]. 中草药, 1988, 19(10): 15.
- [10] 吴晓薇, 杜憬生, 董玉珍, 等. HPLC 法测定当归片中阿魏酸的含量 [J]. 中药材, 2009, 32(7): 1150.
- [11] 赵奎君, 钟萌, 谢俊大. 不同产地当归中阿魏酸、藜本内酯及总多糖含量比较 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(12): 37.
- [12] 李琰, 徐丽珍, 林佳, 等. 不同产地当归中阿魏酸的含量比较 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(11): 838.
- [13] 谢京晶, 于玥, 王一涛, 等. HPLC 法同时测定当归药材中 6 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1314.
- [14] 刘云华, 易进海, 黄志芳, 等. 川芎当归药材中总阿魏酸的含量测定 [J]. 中成药, 2009, 31(11): 1775.

[责任编辑 顾雪竹]