

30 批当归中阿魏酸、藁本内酯含量测定

王婕¹, 赵建邦^{2*}, 宋平顺²

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省食品药品检验所, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定当归药材中阿魏酸和藁本内酯含量的方法, 比较各地 30 批当归质量, 并以此建立当归质量控制方法。方法: 以乙腈-1% 的乙酸水溶液进行流动相梯度洗脱, 检测波长为 323 nm, 柱温为室温, 流量 1.0 mL·min⁻¹。结果: 阿魏酸 $A = 57\ 247C + 4\ 356.0$ ($r = 0.999\ 4$), 线性范围为 10.34 ~ 206.8 μg; 藁本内酯 $A = 17\ 901C + 13\ 305$ ($r = 0.999\ 6$), 线性范围为 101.4 ~ 2\ 535.0 μg; 阿魏酸含量在 0.05% ~ 0.20%, 藁本内酯含量在 0.11% ~ 2.50%。结论: 本实验建立的 HPLC 测定方法, 准确、简便、快速, 并采用聚类分析法作为验证, 可作为当归药材及饮片质量控制的方法之一。

[关键词] 当归; 阿魏酸; 藁本内酯; 聚类分析; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0070-04

当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 有补血、和血、调经止痛、润肠通便之功效。《中国药典》2010 年版将其主要活性成分阿魏酸规定为当归药材的质量控制指标^[1]。阿魏酸是公认的天然抗氧化剂, 也是近年来国际认知的防癌物质, 与藁本内酯一同被认为是当归药理作用的主要物质基础。但目前《中国药典》2010 年版对当归的质量控制中含量测定主要是测定阿魏酸, 藁本内酯则只收录了薄层鉴别项目。王祝举等^[2]建立了 HPLC 测定藁本内酯含量的方法。谢京晶^[3]等建立同时测定当归中包括阿魏酸、Z-藁本内酯在内的 6 种成分的含量测定方法。赵奎君^[4]、段然^[5]等亦做了同时测定当归中阿魏酸、藁本内酯含量的 HPLC 法研究。建立同时测定阿魏酸和藁本内酯含量方法已不是新课题, 但均存在两个问题, 一是样品收集不够系统, 使得作者得出的结论不能正确地评价当归质量, 二是前述研究均着力于建立同时测定 2 种或多种化合物含量的测定方法, 对于取得的数据如何处理, 并应用于当归质量控制却没有过多涉及。本文建立了 HPLC 法同时测定当归中阿魏酸和藁本内酯的含量的方法, 测定了 30 批样品的数

据, 比较了国内不同产地、不同采收期及不同规格样品的含量, 并对结果做了聚类分析, 探讨了当归药材中阿魏酸和藁本内酯的含量与药材质量之间的关系, 为当归含量测定并应用于当归质量控制提供了方法依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-20AT 型岛津高效液相色谱仪, 超声清洗器 (250 W, 40 kHz), SPSS 11.5 数据分析软件。

1.2 试剂 甲醇、乙腈 (色谱纯)、纯净水 (娃哈哈), 冰乙酸、磷酸 (分析纯)。阿魏酸对照品 (110773-200611, 中国药品生物制品检定所), 藁本内酯对照品 (天津马克生物技术有限公司, 含量为 99.0%)。

1.3 样品 收集了国内 30 批当归药材样品, 并经宋平顺主任药师鉴定, 结果见表 1。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸 (FA) 对照品 5.17 mg, 加乙腈制成每 1 mL 分别含 0.517 μg 的储备溶液、20.68 μg 的对照溶液; 精密称取藁本内酯 (LD) 对照品 10.14 mg, 加乙腈制成每 1 mL 分别含 1.014 μg 的储备溶液、202.8 μg 的对照溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取当归药材粉碎 (过四号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 精密加入甲醇 20 mL, 超声 40 min。取上清液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以流动相乙腈 (A)-1% 的乙酸水溶液 (B) 洗脱, 洗脱梯度为 0 ~ 15 min, 38% A, 15 ~ 20 min, 38% ~

[收稿日期] 2011-03-11

[基金项目] 甘肃省科技重大专项计划 (1002KFDA048)

[第一作者] 王婕, 在读硕士研究生, 从事中药化学及质量标准研究, Tel: 13639395651, E-mail: pengju1986@163.com

[通讯作者] * 赵建邦, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药化学及质量标准研究, Tel: 0931-4968901, E-mail: zjb_5528@163.com

表1 当归样品产地、来源及含量测定

No.	规格	产地	来源	收购时间	阿魏酸/%	藁本内酯/%
1	全归	甘肃岷县岷阳镇东门村	岷县	2010-03-10	0.090	1.033
2	全归	甘肃岷县岷阳镇纸坊村	岷县	2010-03-10	0.132	1.395
3	全归	甘肃岷县西寨镇大寨村	岷县	2010-03-10	0.103	1.090
4	全归	甘肃岷县清水镇	岷县	2010-03-10	0.106	1.420
5	全归	甘肃岷县西寨镇官上村	岷县	2010-03-10	0.096	1.094
6	全归	甘肃岷县中寨乡	岷县	2008-10-23	0.051	0.408
7	全归	甘肃漳县石川乡	漳县	2007-10-15	0.067	0.125
8	全归	甘肃岷县清水乡	岷县	2007-10-15	0.077	0.109
9	全归	甘肃漳县金钟	漳县	2010-03-22	0.081	1.404
10	全归	甘肃岷县清水乡	岷县	2008-10-23	0.078	0.561
11	全归	甘肃西和县	西和县	2010-04-10	0.072	0.857
12	全归	甘肃陇西	陇西县	2010-04-10	0.067	1.038
13	全归	甘肃岷县	兰州黄河市场	2010-03-22	0.121	1.337
14	全归	甘肃渭源会川	渭源会川	2007-10-15	0.046	0.398
15	全归	甘肃武山鸳鸯镇	武山县	2010-04-10	0.064	0.694
16	草把归	甘肃渭源县田家河	渭源县	2010-04-10	0.097	2.496
17	全归	甘肃临夏	兰州黄河市场	2010-03-22	0.061	0.598
18	全归	甘肃渭源	兰州黄河市场	2010-03-22	0.103	1.381
19	全归	甘肃岷县	安泰堂公司	2010-03-22	0.072	0.733
20	全归	甘肃甘肃岷县	安泰堂公司	2010-03-22	0.147	1.924
21	全归饮片	甘肃岷县	复兴厚公司	2010-03-22	0.060	0.964
22	当归头	甘肃岷县	复兴厚公司	2010-03-22	0.095	0.970
23	全归	甘肃岷县	复兴厚公司	2010-03-22	0.154	2.068
24	全归	甘肃镇原县武沟乡	镇原县	2010-04-10	0.096	2.671
25	全归	四川西昌	四川	2010-03-15	0.195	2.159
26	全归	云南	云南	2010-03-15	0.105	1.918
27	全归	甘肃康乐县	康乐县	2010-03-22	0.165	2.689
28	全归	甘肃和政县	和政县	2010-03-22	0.114	1.708
29	全归	甘肃临夏漫路乡	临夏	2010-03-22	0.057	1.066
30	全归	甘肃临夏民乡	临夏	2010-03-22	0.098	1.321

70% A, 20 ~ 40 min, 70% A; 检测波长 323 nm; 柱温为室温; 流量 1.0 mL·min⁻¹。

2.4 对照品线性关系考察 分别准确量取阿魏酸、藁本内酯对照品储备液适量,用乙腈稀释成6个浓度的系列混合对照品溶液,以各对照品峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,阿魏酸 $A = 57\ 247C + 4\ 356.0$ ($r = 0.999\ 4$),线性范围 10.34 ~ 206.8 μg; 藁本内酯 $A = 17\ 901C + 13\ 305$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围 101.4 ~ 2 535.0 μg。

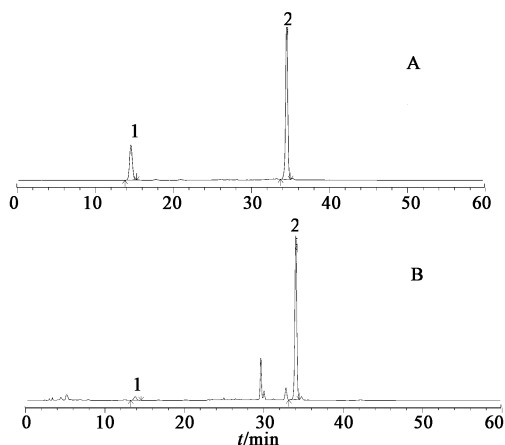
2.5 精密度考察 按 2.1 项下方法制备 1 号当归样品供试溶液,连续进样 5 次,结果各次进样的阿魏酸、藁本内酯峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 3.0%。

2.6 重复性考察 按 2.1 项下方法制备 1 号当归样品供试溶液 5 份,分别进样,结果 5 份样品的阿魏酸、藁本内酯峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%。

2.7 稳定性考察 按 2.1 项下方法制备 1 号当归

供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 10, 16, 24 h 测定阿魏酸、藁本内酯峰的峰面积,结果阿魏酸、藁本内酯峰的峰面积的 RSD 均 < 3.0%。

2.8 测定法 分别吸取供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图,即得。混合对照品和样品色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 阿魏酸; 2. 藁本内酯

图 1 当归样品色谱

3 结果的分析与讨论

3.1 提取溶剂的选择 取 3 种当归样品,分别采用有甲醇-甲酸(95:5)、50% 甲醇、70% 甲醇、80% 甲醇和甲醇溶剂提取比较。甲醇-甲酸(95:5)提取结果阿魏酸含量很低,藁本内酯含量最高;50% 甲醇提取结果阿魏酸含量相对较高,而藁本内酯含量低;50% 甲醇和甲醇提取效果阿魏酸含量相对较低,而藁本内酯含量较高。综合考虑,选择 70% 甲醇溶剂(《中国药典》2010 年版方法)提取,兼顾了阿魏酸和藁本内酯的两种含量的最大化,最后以 70% 甲醇为提取溶剂进行超声提取。选择提取方法时,考察到阿魏酸、藁本内酯均对热不稳定,长时间加热回流可能造成成分分解及较大损失,并且经试验,超声 40 min 提取较完全,故采用超声提取 40 min 作为提取方法。

3.2 色谱条件的优化 比较了在甲醇-乙酸、乙腈-乙酸、甲醇-磷酸、乙腈-磷酸不同体系下,结果表明选择乙腈-1% 乙酸可得到较好的色谱分离效果。根据文献,选择 323 nm 作为检测波长。比较了 0.5, 1.0 mL·min⁻¹ 流速,后者色谱图峰形较好,基线平稳,故选定流速为 1.0 mL·min⁻¹。经过多次探索,选定了流动相比比例梯度。

3.3 含量测定结果分析 对 30 份样品的测定显

示,藁本内酯质量分数分布在 0.11% ~ 2.50%,阿魏酸质量分数分布在 0.05% ~ 0.20%。除 1 批外,其余样品中阿魏酸质量分数均达到《中国药典》2010 年版应不低于 0.050% 的规定,其中 11 批样品阿魏酸质量分数高于 0.10%。

储藏时间对 2 种成分含量均有影响,藁本内酯属挥发性成分,其含量随着贮藏时间的增长而明显下降,而阿魏酸含量亦稍有下降,如样品 6 ~ 8, 10, 14, 两成分含量均为最低。主产区与非主产区比较,镇原、康乐、和政样品(非主产区)中 2 种成分含量普遍高于岷县(主产区)样品,而西和、武山样品(非主产区)藁本内酯含量较低;四川、云南和甘肃渭源样品中含量也很高。从规格看,样品 20, 21 产自岷县,为全归饮片和当归头,其中的两成分含量低于当归药材。

测定结果初步表明,药材当归品系、产地、药材规格、年限对含量存在不同的影响,而藁本内酯含量的影响更为显著。当年采收的甘肃岷县当归阿魏酸、藁本内酯含量均较高,质量为最好。同时当归样品中藁本内酯含量较高时,阿魏酸含量也较高,表示当归中此 2 种化合物含量之间具有相关性。

3.4 系统聚类分析 以所测 30 份样品的 2 个含量数值为变量,采用 SPSS 11.5 统计分析软件对样品进行系统聚类分析(离差平方和法, Ward's Method),利用欧氏距离(Euclidean Distance)作为样品的测度。纵坐标为样品编号,结果见图 2。

图中,Rescaled Distance Cluster Combine 意为聚类重新标定距离,当聚类重新标定距离为 25 时,30 批样品聚为两大类,样品 23 ~ 28, 16, 20 聚为第一类,其余样品聚为第二类。当聚类重新标定距离为 12.5 时,样品 6 ~ 8, 10, 14, 15, 17, 19 聚为第二小类,当聚类重新标定距离为 5 时,样品 2, 4, 9, 13, 18, 30 聚为第三小类,剩余样品归为第四小类(表 2)。

表 2 30 批样品聚类

聚类结果	样品编号	阿魏酸	藁本内酯
1	23 ~ 28, 16, 20	0.096 ~ 0.195	1.708 ~ 2.689
2	6 ~ 8, 10, 14, 15, 17, 19	0.046 ~ 0.078	0.109 ~ 0.733
3	2, 4, 9, 13, 18, 30	0.081 ~ 0.132	1.321 ~ 1.420
4	1, 3, 5, 11, 12, 21, 22, 29	0.057 ~ 0.103	0.857 ~ 1.094

结合含量结果发现,第一类样品 23 ~ 28, 16, 20 是藁本内酯含量最高的 8 批样品,而第二类样品 6 ~

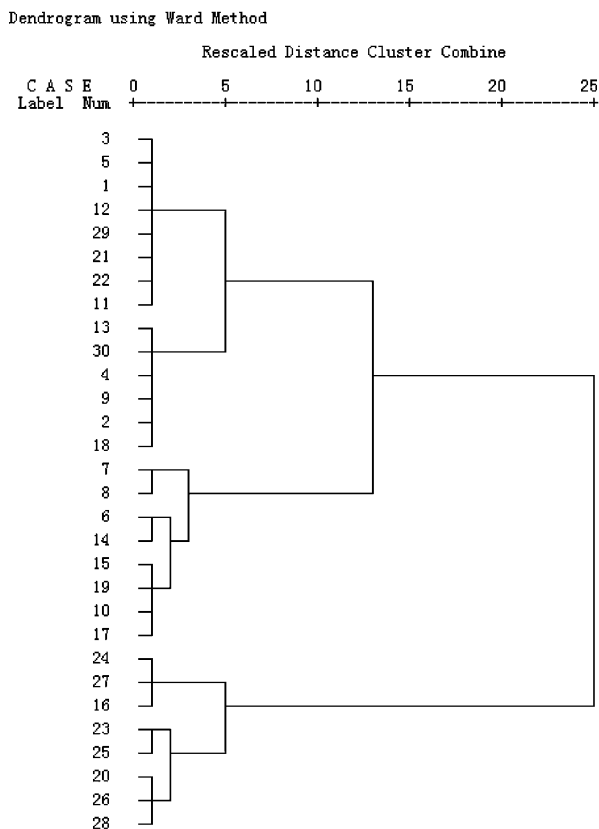


图2 30批当归样品聚类分析

8,10,14,15,17,19,则是藁本内酯含量最低的8批样品。由图4(藁本内酯含量的降序排列折线图)可知,藁本内酯含量由高向低排列时,样品顺序与聚类分析结果一致,因此结合聚类分析结果可看出,藁本内酯的含量对当归质量具有显著影响。由图4亦可看出,阿魏酸含量与藁本内酯含量具有较好的相关性,因此阿魏酸和藁本内酯含量均较高时,才能保证

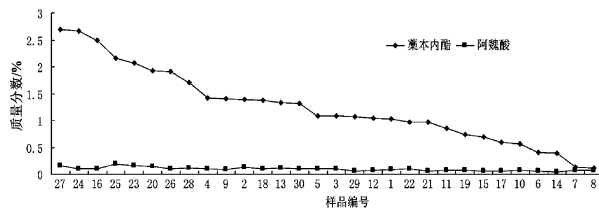


图3 样品藁本内酯含量降序排列折线图

当归质量。因此,在当归药材质量标准当中应该加入对藁本内酯含量的规定,以更全面地控制当归质量。

本实验建立的同时测定当归中阿魏酸、藁本内酯含量的方法,方法学考察表明该法准确、灵敏、简便、快速,并采用系统聚类法加以验证,证明该法可作为当归药材及饮片质量控制的方法之一。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:124.

[2] 王祝举,唐力英,赫北湘,等. HPLC 测定当归中藁本内酯的含量[J]. 中国中药杂志,2005,30(21):1699.

[3] 谢京晶,于珥,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.

[4] 赵奎君,钟萌,谢俊大. 不同产地当归中阿魏酸、藁本内酯及总多糖含量比较[J]. 中国中医药信息杂志,2007,12(14):37.

[5] 段然,薛润光,李军,等. 用 HPLC-DAD 的方法评价不同产地当归药材的质量[J]. 中国现代中药,2009,11(8):27.

[责任编辑 蔡仲德]