

• 药剂 •

当归 HPLC 指纹图谱研究

董自波¹, 洪敏², 樊宏伟², 闵春艳², 朱荃²

(1. 山东鲁南制药有限公司, 山东临沂 276003; 2. 南京中医药大学规范化中药药理实验室, 江苏南京 210029)

摘要: 目的: 应用 HPLC 法进行当归指纹图谱研究。方法: Zorbax 300SB C₁₈ 分析柱, CH₃CN-H₂O-H₃PO₄ 梯度洗脱, 流速 1ml/min, 检测波长 280nm。结果和结论: 建立了当归的指纹图谱检测标准, 共有指纹峰 16 个, 鉴定其中三个为阿魏酸、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I。实验方法简便、准确、重复性好。

关键词: 当归; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)03-0001-03

Studies on the Fingerprints of Radix Angelicae Sinensis

Dong Zi-bo¹, Hong Min², Fan Hong-wei², Min Chun-yan², Zhu Quan²

(1. Shandong LuNan Pharmaceutical Company Limited, Shandong Linyi 276003, China)

2. National Standard Lab of Pharmacology for Chinese Materia Medica, Jiangsu Nanjing 210029, China;

Abstract: Objective: To study the fingerprints of Radix Angelicae Sinensis. Method: Zorbax 300SB C₁₈ column was used, with a mixture liquid of CH₃CN-H₂O-H₃PO₄ mobile phase in a gradient mode. The wavelength of measurement was 280nm. Result and conclusion: Sixteen peaks has been gotten from the Radix Angelicae Sinensis as its fingerprints. Three of them were identified as Ferulic acid, Senkyunolide H and Senkyunolide respectively. The method is simple and reliable.

Key words: Radix Angelicae Sinensis; HPLC; Fingerprints

中药材的指纹图谱研究对于研究中药中的活性成分和质量控制有重要的意义, 本文以 HPLC 法对当归水提液进行了指纹图谱的研究, 为当归的深入研究提供基础。

1 实验材料

1.1 仪器 Agilent 1100 液相色谱仪, DAD 及 SEI/MSD 检测器, 含在线真空脱气机、二元/四元梯度泵、自动进样器、柱温箱, 梯度滞后体积为 1.4mL。色谱和质谱数据的采集与处理由 Agilent 化学工作站完成。KQ-500E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 阿魏酸(ferulic acid)对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号为 0073-9910。磷酸、甲酸为分析纯, 甲醇为色谱纯, 乙腈为美国 Tedia 公司产品(色谱纯), 水为超纯水。

1.3 药材 岷当归采自甘肃省陇西县首阳镇首阳村当归种植基地, 采集时间 1990-10-29; 市售当归购

自江苏省药材公司, 经本校鉴定教研室吴启南教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diel 的干燥根。

2 方法与结果^[1-3]

2.1 当归供试溶液的制备 将上述岷当归和市售当归药材粉碎(40 目), 分别称取粗粉 10g, 加 8 倍量蒸馏水煮沸 1h, 滤过, 滤液浓缩至 10mL, 放冷, 离心, 上清液经 0.45μm 滤膜滤过, 取滤液供 HPLC 分析。

2.2 色谱分析条件 色谱柱: Zorbax 300SB C₁₈ 5μm, 250mm × 4.6mm, 柱死体积为 2.9mL。柱温: 室温(25 ± 5 °C)。流动相: CH₃CN-H₂O-H₃PO₄, A 为 0: 1000: 1, B 为 1000: 0: 1, A + B = 100%, A $\xrightarrow{10\text{min}}$ 2% B $\xrightarrow{15\text{min}}$ 10% B $\xrightarrow{25\text{min}}$ 20% B $\xrightarrow{15\text{min}}$ 35% B (5min)。流速 1ml/min。检测波长为 320、254 和 280nm。进样 5μL, 记录时间 70min。

2.3 LC/MS 条件 流动相参见 2.2 项, 其中 0.1% H₃PO₄ 改为 1% 甲酸, 检测波长 254nm, 进样 20μL, 其他条件同 2.2 项。柱后分流: 0.4mL · min⁻¹ 进质谱仪。质谱条件: 扫描范围 100~1000, 干燥气流速

9L·min⁻¹, 干燥气温度 350℃, 雾化气压 35psi, 传输电压 70V, 毛细管电压: 正离子为 4000V, 负离子为 3500V。

2.4 检测方法的方法学考察

2.4.1 供试品溶液稳定性及仪器精密度实验 按 2.1 项下方法制备岷当归供试溶液, 分别在 0、2、4、10、48h 检测指纹图谱, 考察当归水提液的稳定性, 各峰高比值的 RSD < 3%。当归供试溶液连续进样 5 次, 考察 HPLC 的精密度, 结果各峰高比值的 RSD < 3%。

2.4.2 供试品测定的重复性实验 取同一批岷当归药材粗粉(40 目), 按 2.1 项下方法平行制备 3 份供试溶液, 检测 HPLC 指纹图谱, 结果各峰高比值 RSD < 5%。

2.4.3 指纹图谱检测波长及流动相梯度的确定 根据当归水提液中的成分特征及文献资料检索, 首先设置 210、230、254、280 和 320nm 五个波长对色谱条件进行考察。综合考虑基线、色谱峰的数目、峰形及信号响应强弱, 确定 280nm 为最佳检测波长。经反复摸索, 以 2.2 项下色谱条件出峰较多、峰形较好, 且基线平稳。

2.4.4 指纹图谱记录时间的确定 岷当归水提液在 2.2 项色谱条例上的 2h 记录图和空白对照图地行比较, 考察最佳记录时间。结果确定最佳记录时间为 70min。

表 1 共有指纹峰的相对保留时间、相对峰高
(以 14 号峰阿魏酸参照) 及百分峰高

峰号	相对保留时间	相对峰高	百分峰高
1	0.173 ± 0.002	0.047 ± 0.011	0.010 ± 0.004
2	0.181 ± 0.003	0.093 ± 0.015	0.021 ± 0.002
3	0.201 ± 0.002	0.334 ± 0.018	0.078 ± 0.004
4	0.239 ± 0.001	0.230 ± 0.028	0.053 ± 0.006
5	0.264 ± 0.004	0.166 ± 0.051	0.038 ± 0.010
6	0.306 ± 0.003	0.362 ± 0.042	0.084 ± 0.011
7	0.410 ± 0.003	0.057 ± 0.014	0.013 ± 0.004
8	0.448 ± 0.002	0.114 ± 0.019	0.026 ± 0.003
9	0.510 ± 0.001	0.226 ± 0.022	0.052 ± 0.004
10	0.598 ± 0.002	0.430 ± 0.046	0.126 ± 0.009
11	0.702 ± 0.001	0.234 ± 0.018	0.054 ± 0.002
12	0.737 ± 0.002	0.095 ± 0.019	0.021 ± 0.004
13	0.857 ± 0.005	0.076 ± 0.010	0.017 ± 0.004
14	1.000	1.000	0.232 ± 0.022
15	1.213 ± 0.001	0.284 ± 0.016	0.076 ± 0.005
16	1.293 ± 0.002	0.045 ± 0.009	0.010 ± 0.004

2.5 当归水提液的 HPLC 指纹图谱研究

2.5.1 共有指纹峰的确定 通过四批市售当归和岷当归药材的水提液在 2.2 项色谱条件下的 HPLC 指纹图谱, 确定共有指纹峰 16 个(表 1, 非共有峰高占总峰高的 8.55%)。

2.5.2 指纹图谱中特征峰的确定 将市售当归和岷当归水提液在 2.2 项色谱条件下的 HPLC 指纹图谱与标准品对照(图 1), HPLC-MS 联用分析。指认当归 HPLC 指纹图谱中的 14 号峰为阿魏酸。在本实验室生物色谱的研究工作中发现, 15、16 号峰能特异性的与红细胞结合, 有降低红细胞聚集性, 提高红细胞变形性的活性, 经质谱、核磁共振, 分别鉴定为洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 I(图 2, 表 2)。

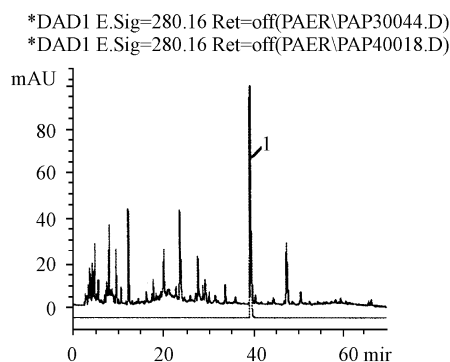


图 1 阿魏酸(1)对照品与岷当归水提液的 HPLC 对照图

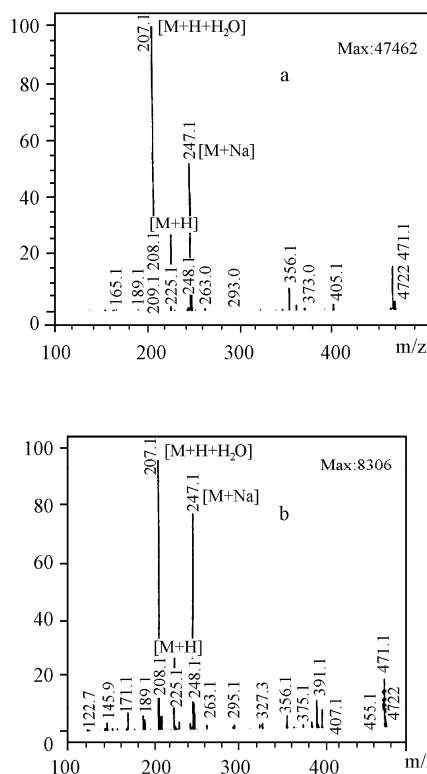


图 2 15 号峰(a)和 16 号峰(b)的 ESI(+) MS 图谱

表 2 15 号峰和 16 号峰的¹H NMR 数据(300MHz, CDCl₃, δppm, mult, J in Hz) 和¹³C NMR 数据(75MHz, CDCl₃, δppm)

	¹ H NMR		¹³ C NMR	
	15 号峰	16 号峰	15 号峰	16 号峰
1			169.3	169.2
3			153.2	153.2
3a			148.2	148.1
4	2.40~ 2.70(m)	2.45~ 2.60(m)	18.4	18.8
5	1.80~ 2.20(m)	1.85~ 2.10(m)	25.7	26.2
6	4.05(ddd, 7.9, 3.6, 2.0)	3.95(ddd, 9.3, 5.2, 2.8)	67.3	71.5
7	4.61(d, 3.6)	4.46(d, 5.2)	63.4	67.2
7a			125.4	125.9
8	5.31(t, 7.9)	5.26(t, 7.9)	114.3	114.1
9	2.36(dt, 7.9, 7.3)	2.31(dt, 7.9, 7.4)	28.1	28.1
10	1.50(tq, 7.3, 7.3)	1.46(tq, 7.4, 7.3)	22.3	22.2
11	0.95(t, 7.3)	0.92(t, 7.3)	13.7	13.7

3 讨论

为尽可能全面考察当归水溶性成分, 本实验未采用线性梯度, 而是采用了多阶梯度, 且给出梯度滞后体积和柱死体积, 以增加该指纹谱的重现性。考察了不同批次当归及某些因素的影响, 摸索了 HPLC 的最适条件, 确定了当归水提液中 16 个, 其中 14-16 号峰分别为阿魏酸, 洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 I。

中药的成分十分复杂, 且每一种中药的成分还会因产地、品种、采摘季节、气候条件、炮制等多种因素的影响而不同。中药 HPLC 指纹图谱技术利用 HPLC 分离效能高、分析速度快等优点, 通过不同的特征峰来标示中药的化学成分及含量分布情况。HPLC 指纹图谱的影响因素很多, 本文的研究仍未涉及到加工炮制等复杂因素的影响。

参考文献:

- [1] 王宝葵. 中成药质量标准与标准物质研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 100.
- [2] 黄伟晖, 宋纯青. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 147-151, 155.
- [3] Long-Ze, Lin, Xiarr-Guo He, Li-Zhi Lian, et al. Liquid Chromatographic electrospray mass spectrometric study of phthalides of Angelica sinensis and chemical changes of Z-ligustilide[J]. J Chromatogr A, 1998, 810: 71-79.