

当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究

陈 健^{1,2}, 张 越^{1,2}, 王洪兰^{1,2*}, 李俊松^{1,2*}, 池玉梅¹, 狄留庆^{1,2}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱, 为当归标准汤剂质量控制提供依据。**方法** 采用 HPLC 法建立 15 批当归标准汤剂指纹图谱, 采用相似度评价结合聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 等模式识别技术探讨影响当归标准汤剂质量的主要色谱峰, 并同时测定这些主要色谱峰中阿魏酸、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、藁本内酯及色氨酸的含量。色谱条件为色谱柱 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.2 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 35 °C。**结果** 建立的当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱共标定出 17 个共有峰, 15 批样品相似度在 0.788~0.983; CA、PCA 将样品大致分为 3 类, 结合 PLS-DA, 筛选出 7 个标志化合物, 其中指出阿魏酸 (8 号峰)、藁本内酯 (17 号峰)、洋川芎内酯 I (10 号峰)、洋川芎内酯 H (12 号峰)。定量分析条件通过方法学验证, 平均加样回收率为 99.43%~104.35%。15 批样品中阿魏酸为 0.041%~5.596%、洋川芎内酯 H 为 0.026%~1.583%、洋川芎内酯 I 为 0.201%~6.461%、藁本内酯为 0.126%~4.942%、色氨酸含为 0.481%~2.753%。**结论** 建立的分析方法稳定可靠, 重复性好, 为当归标准汤剂及其相关制剂的质量评价提供参考。

关键词: 当归; 标准汤剂; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘判别分析; 模式识别; 阿魏酸; 洋川芎内酯 H; 洋川芎内酯 I; 藁本内酯; 色氨酸; 相似度; 质量评价

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-4942-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.015

Fingerprint and multi-components content determination of standard decoction of *Angelicae Sinensis Radix*

CHEN Jian^{1,2}, ZHANG Yue^{1,2}, WANG Hong-lan^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, CHI Yu-mei¹, DI Liu-qing^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the fingerprint analysis and content determination of standard decoction of *Angelicae Sinensis Radix* (ASR), and to provide an effective method to ensure the quality of standard decoction of ASR. **Methods** Fingerprint of standard decoction of ASR was established by HPLC. The similarity evaluation combined with cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were applied to explore chromatographic peak of main affecting the quality of standard decoction of ASR, and to determine the contents of ferulic acid, ligustilide H, ligustilide I, ligustilide and tryptophan. All samples were analyzed by Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) maintained at 35 °C and eluted with acetonitrile-0.1% formic acid at the flow rate of 1.2 mL/min, and the detection wavelength was 280 nm. **Results** There were 17 common peaks in the HPLC fingerprint of established standard decoction of ASR, and the similarity of 15 batches of standard decoction of ASR was between 0.788 and 0.983. The samples were broadly divided into three categories by CA and PCA. Seven markers were verified by PLS-DA, and peaks 8, 17, 10, and 12 were identified as ferulic acid, ligustilide, ligustilide I, and ligustilide H, respectively. In quantitative analysis, the five components showed good regression ($r^2 > 0.999$) with linear range, the content respectively was 0.041%—5.596% in ferulic acid, 0.026%—1.583% in ligustilide H, 0.201%—6.461% in

收稿日期: 2019-05-31

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-C-JS-30); 江苏省科技成果转化专项资金项目 (BA2016104)

作者简介: 陈 健 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: cj1611816726@yeah.net

*通信作者 王洪兰 (1977—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药及复方药效物质基础。Tel: (025)85811512 E-mail: honglanwang2004@163.com
李俊松 (1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药新制剂与新技术。Tel: (025)85811517 E-mail: Lijunsong1964@163.com

ligustilide I, 0.126%—4.942% in ligustilide, and 0.481%—2.753% in tryptophan, and the average recoveries were in the range of 99.43%—104.35%. **Conclusion** The analysis method established in this experiment is stable, reliable, and repeatable, which can provide reference for the quality evaluation of standard decoction of ASR.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; standard decoction; HPLC; fingerprint; quality control; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares discriminant analysis; pattern recognition; ferulic acid; ligustilide H; ligustilide I; ligustilide; tryptophan; similarity; quality evaluation

当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根, 主产于甘肃。当归始载于《神农本草经》, 列为上品, 其性温, 味甘、辛, 归心、肝、脾经, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效^[1]。当归主要化学成分有挥发油、有机酸、多糖等^[2-8], 临床上主要用于治疗各种妇科疾病, 疗效显著, 素有“药王”之誉^[9-11]。《中国药典》2015 年版仅以阿魏酸为当归质控指标, 但考虑到中药成分的复杂性及成分之间多靶点、多途径的相互作用, 单一指标成分不能科学、全面地反映当归质量。中药指纹图谱从物质群出发将中药成分信息全面展现, 从整体上把握中药指标性成分, 是一种综合的、量化的中药分析手段^[12-14]。

本实验通过 HPLC 法建立 15 批当归饮片标准汤剂的指纹图谱, 并采用相似度评价结合聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 等模式识别技术, 分析探讨影响当归标准汤剂质量的主要色谱峰, 同时建立了当归标准汤剂中 5 个指标性成分的含量测定方法, 以期为当归及其复方制剂的物质基准研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; XP-6 型百万分之一精密天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; KH-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; TGL-18C-C 型台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; HGZF-II-101-2 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海跃进器械医疗有限公司; RE-2000A 型旋转蒸发仪, 巩义市予华仪器有限公司; DZ-2BCIV 型真空干燥箱, 天津泰斯特有限公司; Lab-1A-50 型真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 材料

对照品阿魏酸, 批号 110773-201614, 质量分数 $\geq 99\%$, 购自中国药品食品检定研究院; 对照品洋川芎内酯 H (批号 JBZ-1467, 质量分数 $\geq 98\%$)、藁本内酯 (批号 18113001, 质量分数 $\geq 98\%$)、洋

川芎内酯 I (批号 17121105, 质量分数 $\geq 98\%$)、L-色氨酸 (批号 171013, 质量分数 $\geq 98\%$) 均购于南京金益柏有限公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 美国天地有限公司; 甲酸, 分析纯, 西陇科学股份有限公司; 水为超纯水。

实验用 15 批当归药材经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根, 药材来源信息分别为甘肃省张掖市 5 批, 编号 S1~S5, 批号 DG-18001~DG-18005; 岷县维新乡 1 批, 编号 S6, 批号 DG-18006; 岷县秦许乡 1 批, 编号 S7, 批号 DG-18007; 岷县中寨镇 2 批, 编号 S7、S8, 批号 DG-18008、DG-18009; 岷县梅川乡 1 批, 编号 S10, 批号 DG-18010; 渭源县会川镇哈地窝村 1 批, 编号 S11, 批号 DG-18011; 渭源县会川镇梁家坡村 1 批, 编号 S12, 批号 DG-18012; 渭源县会川镇本庙村 1 批, 编号 S13, 批号 DG-18013; 渭源县会川镇南沟村 1 批, 编号 S14, 批号 DG-18014; 渭源县会川镇新城村 1 批, 编号 S15, 批号 DG-18015。

2 方法与结果

2.1 当归药材质量评价

按《中国药典》2015 年版标准, 对 15 批次当归药材进行鉴别、检查 (水分、总灰分、酸不溶性灰分)、含量测定、浸出物测定。

2.2 当归饮片制备

将 15 批当归药材分别除去杂质、洗净, 润透, 切薄片 (1~2 mm), 40 °C 低温干燥, 即得。

2.3 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 5% 乙腈; 5~10 min, 5%~16% 乙腈; 10~15 min, 16% 乙腈; 15~23 min, 16%~20% 乙腈; 23~34 min, 20%~38% 乙腈; 34~39 min, 38%~48% 乙腈; 39~43 min, 48%~52% 乙腈; 43~63 min, 52%~90% 乙腈; 柱温 35 °C; 体积流量 1.2 mL/min; 检测波长 280 nm; 进样量 10 μL; 按阿魏酸峰计算理论塔板数不低于 5 000。

2.4 溶液制备

2.4.1 当归标准汤剂^[15-18] 称取当归饮片约 20 g, 粉碎, 过 1 号筛, 混匀, 取 1.67 g, 精密称定, 加水 150 mL, 浸泡 0.5 h, 武火煮沸, 文火保持微沸至药液浓缩至 120 mL, 停止加热, 趁热滤过, 放冷至室温。精密取当归标准汤剂适量, 冷冻干燥得冻干粉。

2.4.2 混合对照品溶液制备 取阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 61.505、65.408、20.404、80.690、29.881 mg/L 的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液制备 称取当归标准汤剂冻干粉约 7 mg, 精密称定, 加超纯水适量, 超声使溶解, 定容至 2 mL 量瓶中, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一批 (批号 DG18006) 当归标准汤剂供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录 HPLC 图, 以阿魏酸为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.03%~0.15% 和 0.18%~2.19%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取同一批 (批号 DG18006) 当归标准汤剂供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件, 分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进样, 记录 HPLC 图, 以阿魏酸为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.03%~0.15% 和 0.08%~2.75%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取同一批 (批号 DG18006) 当归标准汤剂冻干粉 6 份, 按“2.4.3”项下制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录 HPLC 图, 以阿魏酸为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.02%~0.19% 和 0.18%~1.61%, 表明该方法重复性良好。

2.6 指纹图谱建立及化学模式识别

2.6.1 HPLC 指纹图谱建立 取 15 批不同产地的当归标准汤剂供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样检测, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版》, 以 S8 为参照图谱, 时间宽度设定为 0.50 ms, 采用平均数法, 经全谱峰匹配后标定了 17 个

共有峰, 其中 4、8、10、12、17 号共有峰分别对应色氨酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯, 混合对照品溶液图谱、15 批当归标准汤剂指纹图谱及其生成的对照指纹图谱 (R) 见图 1。

2.6.2 不同批次当归标准汤剂相似度分析 阿魏酸为当归主要有效成分之一, 是《中国药典》2015 年版规定的当归指标性成分, 该色谱峰峰面积较为稳定, 故选择阿魏酸色谱峰作为参照峰。采用国家药典委员会编写的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版》, 生成对照谱图 (R), 计算样品与 R 的相似度分别为 0.937、0.920、0.788、0.836、0.944、0.939、0.972、0.971、0.983、0.880、0.943、0.947、0.939、0.948、0.959, 15 批样品相似度在 0.788~0.983。

对 15 个批次的相似度值做箱式图分析, 结果见图 2, 该组数据分布明显不对称, 批次 S3、S4、S10 相似度值较为离散, 可将其与其他样品区分开。以 R 作参比, 得 12 批当归样品的相似度为 0.927 ± 0.013 , 故规定相似度阈值为 0.913, 相似度结果表明各批次当归标准汤剂样品之间存在一定差异性, 所建立的当归标准汤剂指纹图谱能很好地区分差异性样品, 为进一步探讨引起当归标准汤剂差异性的主要色谱峰, 进行模式识别分析。

2.6.3 CA^[19-20] CA 常被用于衡量不同数据源间的相似性, 是目前常用的数据挖掘分析方法之一。采用 SPSS 24.0 软件, 以 15 批当归指纹图谱的 17 个共有峰峰面积为变量, 选用 WORD 连接法, 利用平方欧氏距离作为度量标准进行分析, 探讨不同批次之间样本数据的一致性, 再进行运算并绘制树状图, 见图 3。当判别条件距离为 6.5 时, 将 15 批当归大致分为 3 类, S1、S2、S4、S5、S12~S15 为第 1 类, S3、S7、S11 为第 2 类, S6、S8~S10 为第 3 类。S1、S2、S4、S5、S12~S15 分为一类的原因, 可能是 8 号峰 (阿魏酸)、9 号峰峰面积较小; S3、S7、S11 分为一类, 可能是 9、17 号峰 (藁本内酯) 峰面积较大; S6、S8~S10 为一类, 可能是 10 号峰 (洋川芎内酯 I)、12 号峰 (洋川芎内酯 H) 峰面积较大, CA 结果表明, 各批次当归标准汤剂样品与产地存在一定相关性, 在相似度大于 0.90 的前提下, 以甘肃渭源县产地的第 3 类样品相似度最佳, 主要原因可能是药材质量稳定性受采收时间、采收环境、加工方式等影响, 进而引起当归主要成分群的变化。

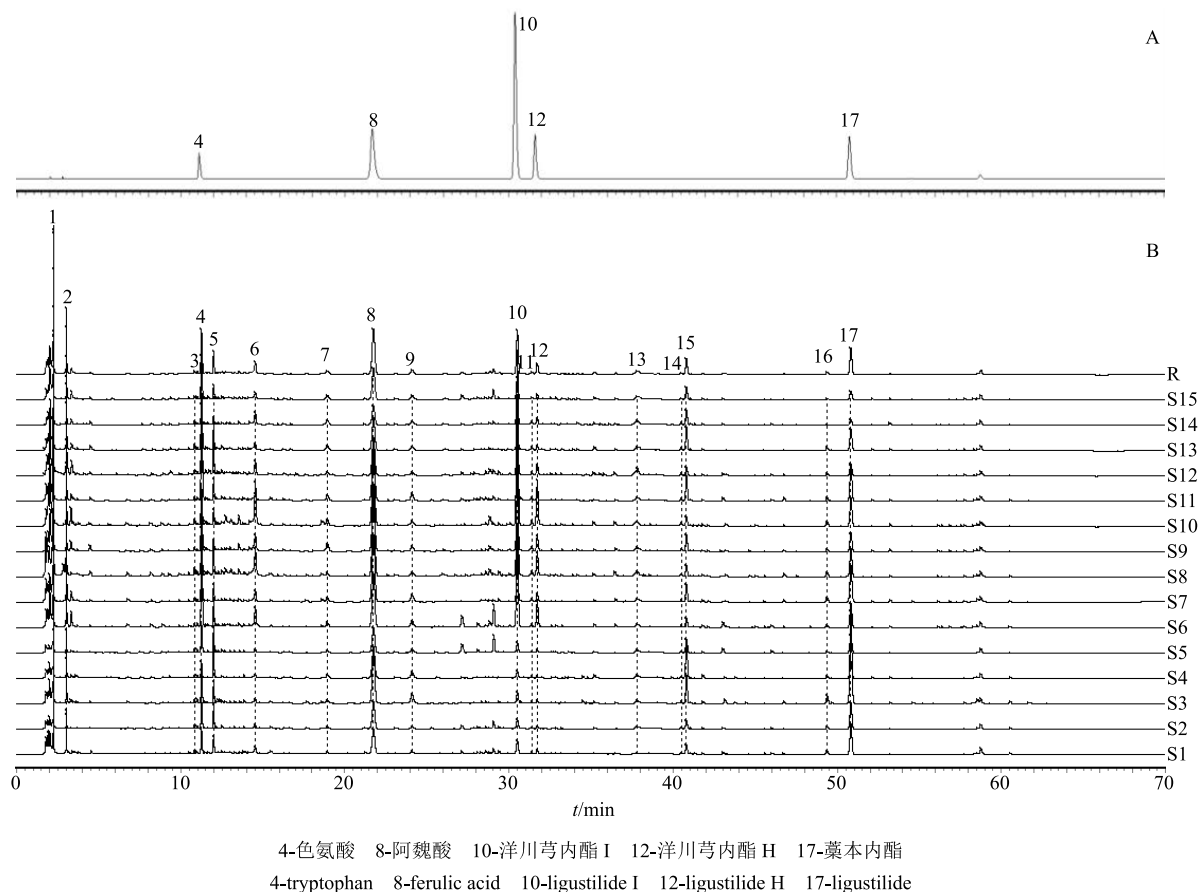


图 1 混合对照品溶液 HPLC 图 (A) 和 15 批当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (B)
Fig. 1 HPLC of mixed control solution (A) and HPLC fingerprint of 15 batches of standard decoction of *Angelica sinensis* and its control fingerprint (B)

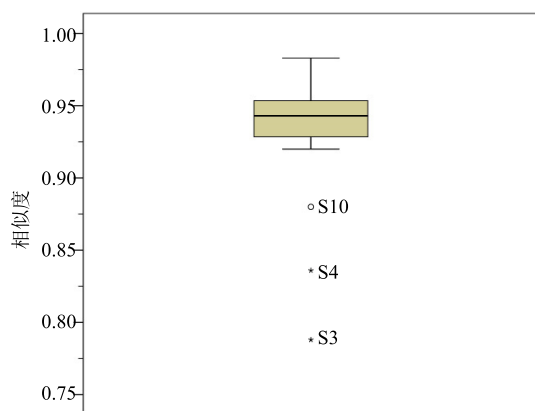


图 2 相似度箱式图
Fig. 2 Box diagram of similarity degree

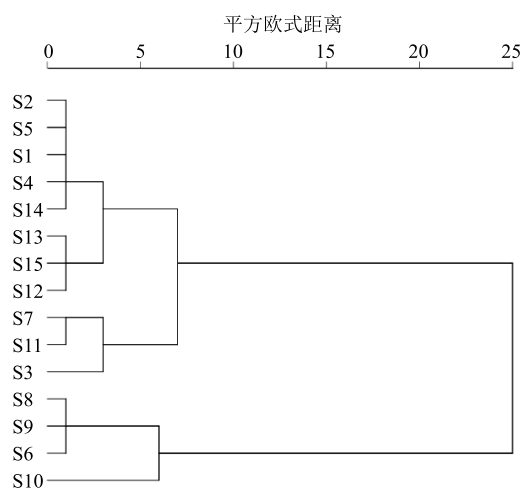


图 3 15 批样品 CA 结果
Fig. 3 Cluster analysis of 15 batches of samples

2.6.4 PCA^[21] 为进一步分析 17 个共有成分对样品的分辨能力, 首先采用 SPSS 24.0 软件对 15 批当归标准汤剂指纹图谱的 17 个共有峰峰面积做标准化处理, 再进行运算, 主成分个数的提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 4 个成分, 累积贡献率可达 84.03%, 说明这 4 个主成分在反映不同来源

样品与 17 个共有成分的关系中起主导作用。PCA 碎石图见图 4, 结果显示, 先提取出来的 4 个主成分的坡度较陡而后的坡度较为平缓, 表明这 4 个主成分可能是评价当归品质的代表性变量。进一步分

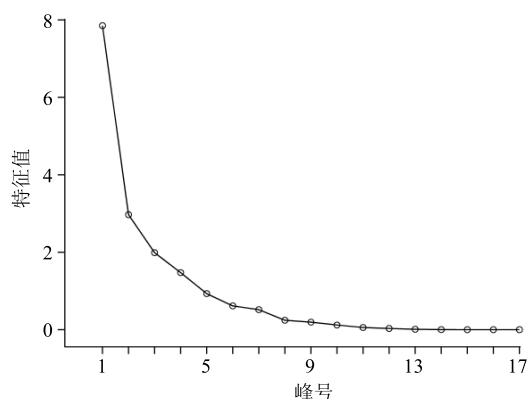


图 4 主成分碎石图

Fig. 4 PCA gravel map

析得到主成分矩阵, 见表 1, 第 1 主成分的信息主要来自于色谱峰 1~4、6、8、10~14; 第 2 主成分的信息主要来自于色谱峰 9、15~17; 第 3 主成分的信息主要来自于色谱峰 7; 第 4 主成分的信息主要来自于色谱峰 5。结果表明, 通过 PCA 降维处理后所提取的 4 个主成分能代表当归标准汤剂指纹图谱中 17 个共有峰的主要信息。

同时采用多元变量统计软件 SIMCA 14.0 得到 PCA 得分图, 见图 5, 将样品分为 3 类, S1、S2、S4、S5、S12~S15 为第 1 类, S3、S7、S11 为第 2 类, 剩余为第 3 类。PCA 与 CA 结果一致, 进一步证明前 4 个主成分可以代表样品的整体质量情况。

表 1 主成分矩阵

Table 1 Principal component matrix

峰号	主成分				峰号	主成分				峰号	主成分			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
1	0.951	-0.057	-0.065	0.070	7	0.436	-0.043	0.860	-0.119	13	0.590	-0.235	0.168	0.541
2	0.858	-0.017	-0.045	0.382	8	0.801	0.454	0.075	-0.059	14	0.930	-0.070	0.082	-0.015
3	0.713	-0.004	-0.362	-0.058	9	0.196	0.861	0.265	0.075	15	-0.341	0.554	0.406	0.183
4	0.493	0.160	0.458	0.376	10	0.903	-0.089	-0.206	-0.205	16	0.247	0.845	-0.348	-0.095
5	0.062	0.110	-0.491	0.792	11	0.845	-0.057	0.321	-0.165	17	-0.032	0.930	-0.190	-0.157
6	0.938	-0.124	-0.173	-0.222	12	0.886	-0.077	-0.231	-0.218					

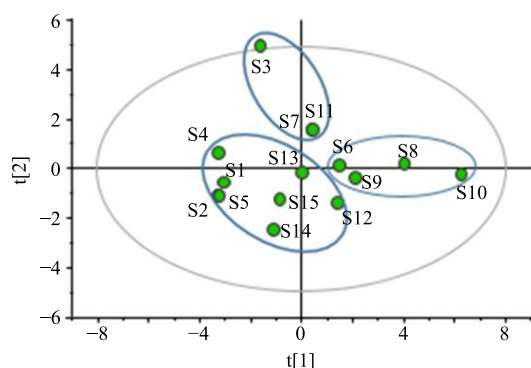


图 5 15 批样品的 PCA 得分图

Fig.5 PCA results of 15 batches of samples

为进一步分析引起样品差异的主要色谱峰, 进行 PLS-DA。

2.6.5 PLS-DA^[22] 通过 CA 和 PCA, 当归标准汤剂样品可分为 3 类, 其中影响当归标准汤剂样品质量差异性的主要色谱峰为峰 6、8~10、12、16、17; 在此基础上, 进一步进行 PLS-DA, 结果表明在 PLS-DA 模型中 (图 6), 3 组样品聚类良好, 分离更加显著, 与 CA、PCA 结果一致, 从而进一步验证了分析的合理性。结合变量重要性投影 (VIP)

法, 以 VIP 值大于 1 为标准, 筛选得到具有统计学意义的 7 个差异性标志物, 其影响程度依次为峰 9>峰 17>峰 8>峰 10>峰 12>峰 6>峰 16, 经指认 17、8、10、12 号峰分别为藁本内酯、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H。故进一步对这几个主要差异性成分进行定量测定, 为当归标准汤剂的质量控制提供一定依据。

2.7 多成分含量测定

2.7.1 系统适应性考察 精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液 (DG18006) 各 10 μ L, 按“2.3”项下色谱条件分别进样。结果显示, 阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸之间分离度良好, 相邻色谱峰间分离度均大于 1.5, 样品测定无干扰, 见图 1-A。

2.7.2 线性关系考察 取阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 61.505、65.408、20.404、80.690、29.881 mg/L 的混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品储备液, 用倍比稀释的方法制成系列对照品溶液, 按“2.3”项下色

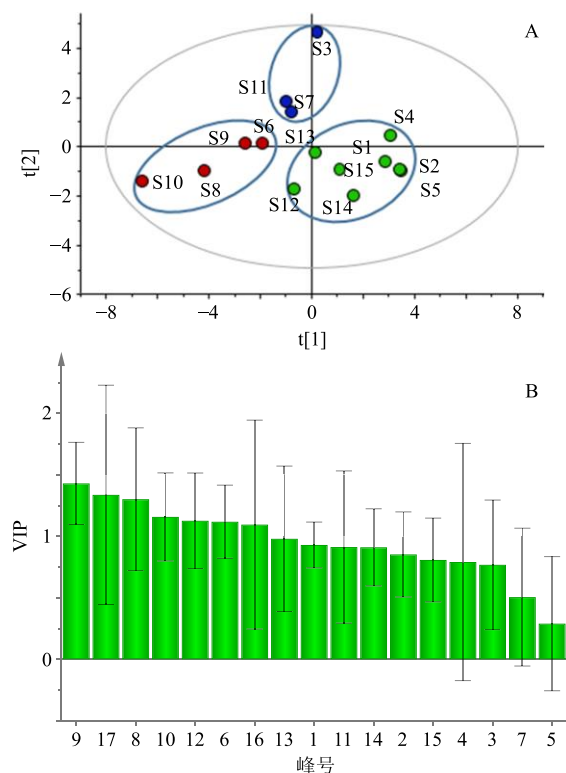


图 6 15 批样品的 PLS-DA 得分图 (A) 和 VIP 图 (B)

Fig. 6 PLS-DA (A) and VIP (B) results of 15 batches of samples

谱条件分别进样,记录各色谱峰峰面积值,以进样质量浓度对峰面积进行线性回归,得到各成分的回归方程及线性范围,结果分别为阿魏酸 $Y=24\ 049 X+12\ 041$, $r=0.999\ 8$,线性范围 $0.85\sim 61.51\text{ mg/L}$; 藁本内酯 $Y=13\ 709 X+7\ 835.8$, $r=0.999\ 8$,线性范围 $0.91\sim 65.41\text{ mg/L}$; 洋川芎内酯 H $Y=38\ 969 X+7\ 522.1$, $r=0.999\ 8$,线性范围 $0.28\sim 20.40\text{ mg/L}$; 洋川芎内酯 I $Y=39\ 124 X+30\ 470$, $r=0.999\ 7$,线性范围 $1.12\sim 80.69\text{ mg/L}$; 色氨酸 $Y=12\ 540 X+3\ 057.6$, $r=0.999\ 8$,线性范围 $0.42\sim 29.88\text{ mg/L}$ 。

2.7.3 精密度试验 取同一批 (DG18006) 当归饮片标准汤剂的供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件测定,阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸峰面积的 RSD 依次为 0.15%、1.05%、0.07%、0.11%、0.17%,表明仪器精密度良好。

2.7.4 稳定性试验 取同一批 (DG18006) 当归饮片标准汤剂的供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件测定,阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸峰面积的 RSD 依次为 0.42%、2.54%、1.13%、0.17%、0.20%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.5 重复性试验 取同一批 (DG18006) 当归标准汤剂冻干粉适量,按“2.4.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样分析,测得阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸平均质量分数分别为 430.3、579.4、107.2、464.4、263.7 $\mu\text{g/g}$, RSD 均小于 3%,表明该方法重复性良好。

2.7.6 加样回收率试验 取同一批 (DG18006) 当归标准汤剂冻干粉 6 份,每份约 3.5 mg,精密称定,加入质量浓度分别为 551.66、903.88、983.66、227.36、1 226 $\mu\text{g/mL}$ 的阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸的混合对照品溶液 100 μL ,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸的平均加样回收率分别为 104.17%、102.48%、99.43%、100.42%、104.35%, RSD 分别为 0.42%、0.37%、0.32%、0.39%、1.25%,结果表明该方法准确可靠。

2.8 样品含量测定

取 15 批当归标准汤剂冻干粉,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液。按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、色氨酸的含量,结果见表 2。

表 2 15 批当归标准汤剂中各成分的质量分数 ($n=2$)

Table 2 Content of target compounds in 15 batches of ASR standard decoction ($n=2$)

编号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	阿魏酸	藁本内酯	洋川芎内酯 H	洋川芎内酯 I	色氨酸
1	0.004 9	0.012 6	0.013 3	0.076 4	0.080 3
2	0.559 6	0.015 1	0.015 2	0.084 1	0.275 3
3	0.497 9	0.014 8	0.002 8	0.028 0	0.138 6
4	0.384 6	0.374 7	0.002 6	0.020 1	0.233 2
5	0.005 3	0.014 3	0.003 5	0.026 0	0.170 1
6	0.078 7	0.494 2	0.102 2	0.437 3	0.185 2
7	0.142 3	0.142 6	0.038 7	0.173 9	0.131 5
8	0.010 0	0.296 6	0.031 9	0.158 2	0.131 5
9	0.004 1	0.042 1	0.018 2	0.111 3	0.067 0
10	0.017 8	0.058 2	0.050 7	0.262 4	0.067 0
11	0.023 6	0.256 0	0.158 3	0.646 1	0.051 3
12	0.014 9	0.025 9	0.009 6	0.054 6	0.082 5
13	0.184 0	0.286 1	0.032 2	0.168 8	0.068 4
14	0.213 8	0.030 0	0.007 3	0.044 7	0.055 4
15	0.004 1	0.026 4	0.017 1	0.089 6	0.048 1

3 讨论

3.1 当归药材质量评价分析

通过对 15 批次当归药材进行质量考察,保证原药材质量。当归薄层色谱结果表明,15 批当归药材在与对照品相应位置上均出现相同颜色斑点;当归水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物含量均满足药典要求;当归有效成分阿魏酸含量在 0.087%~0.161%,高于药典标准 1.5~3 倍;挥发油含量在 0.40%~0.85%,符合药典标准。以上实验结果表明,本实验选择的当归药材品质较高,为后续实验奠定基础。

3.2 浓缩条件分析

当归标准汤剂所得水煎液质量浓度较低,不利于后续研究,故进行浓缩工艺考察。鉴于当归中富含藁本内酯、阿魏酸、洋川芎内酯 H/I、阿魏酸松柏酯等不稳定性成分^[23],可能在浓缩过程中发生转化、降解,故选择在低温条件下进行浓缩。考察减压浓缩(30、45、60 ℃)、真空干燥(30、45、60 ℃)、冷冻干燥 3 种条件下当归物质群转移的完整性。结果发现,30 ℃时,减压浓缩和真空干燥时间很长,得到的当归标准汤剂指纹图谱峰数及峰面积相对减少;同时在实验过程中发现,当归水煎液不利于储存,4 ℃冰箱放置 2 周,发生变质,推测原因可能是因为当归中多糖类成分较多,难以储存,故最终确定将当归饮片水煎液直接冷冻干燥得到冻干粉。

3.3 色谱条件分析

比较水-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸水溶液-乙腈 3 种不同体系下,色谱峰分离情况。结果表明,选择 0.1%甲酸水溶液-乙腈流动相具有较好的分离结果,选择 190~400 nm 进行扫描以最大化获得有效指纹图谱信息,结果在 280 nm 条件下,指纹图谱的峰数及响应较好,所以最终确定 280 nm 作为检测波长。通过比较不同体积流量 0.5、0.8、1.0、1.2 mL/min 下色谱峰分离效果,兼顾时间成本,最终选择体积流量为 1.2 mL/min。通过在不同柱温 25、35、45 ℃下对同一样品进行测定,结果发现温度为 35 ℃时,各色谱峰分离度良好,最终选择柱温 35 ℃,体积流量 1.2 mL/min。

3.4 当归标准汤剂指纹图谱及成分含量评价

指纹图谱结果显示,当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱共有峰 17 个,相似度分析结果在 0.788~0.983,表明各批次样品的质量具有较好的一致性。CA、PCA 结果表明,15 批样品可聚为 3 类,且质量差异

不大。通过 CA 碎石图和 PLS-DA 确定影响样品分组的主要原因是 9、17、8、10、12、6、16 号峰的含量差异。5 种指标成分定量测定结果显示,不同批次之间,当归标准汤剂各类成分差异显著,推测原因可能有以下 3 种:(1)本实验所收集的原药材来自 3 个产地,受自然环境(采摘地点、气候、时间、温度等)以及人为因素(采摘人员,储存时间、方式等)影响,不同批次之间存在一定差异;(2)洋川芎内酯 H/I、藁本内酯、阿魏酸结构不稳定,可能在存储过程中发生分解或转变,色氨酸可能与当归中多糖反应,发生降解;(3)标准汤剂制备过程中可能会使某些成分发生降解、转化乃至生成等,引起变化。

本研究采用指纹图谱结合多成分含量测定及化学模式识别的分析方法,对 15 批当归标准汤剂质量进行了初步研究,该方法可以较快地筛选出影响不同批次药材质量的关键色谱峰,有阿魏酸、藁本内酯、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H。目前研究显示,当归多糖及阿魏酸等成分与补血作用相关,藁本内酯、正丁烯酰内酯等挥发油类成分具有松弛平滑肌作用^[24],后期将结合药效进行深入研究,为当归标准汤剂及其相关复方制剂的质量控制提供依据。

参考文献

- [1] 全家羽,赵 嵘,代云桃,等. 当归标准汤剂质量评价体系的建立 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 18-23.
- [2] 王 华,孙 娜. 当归的有效化学成分及药理作用研究进展分析 [J]. 山东化工, 2017, 46(18): 59-60.
- [3] 杨雪婷. 当归有效成分提取及药理作用研究进展 [A] // 中国商品学会. 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集 [C]. 哈尔滨: 中国商品学会, 2017.
- [4] 何嘉辉,茆睿智,唐 钺,等. 纳米磁珠辅助红细胞膜垂钓技术及其在当归活性成分筛选中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1041-1047.
- [5] 韦 玮,龚苏晓,张铁军,等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134.
- [6] 龚苏晓,刘 毅,刘素香,等. 当归总苯酐的超临界 CO₂ 萃取工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 448-452.
- [7] Fang L, Xiao X F, Liu C X, et al. Recent advance in studies on *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(1): 12-25.
- [8] 李 静,魏玉海,秦雪梅,等. 基于 NMR 代谢组学技

- 术的当归不同部位化学成分比较 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1409-1415.
- [9] 王碧霞, 黄春优. 温经汤联合西药治疗月经不调的临床效果分析 [J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(9): 146-147.
- [10] 何秀莲, 何德华. 疏肝温经汤联合针灸治疗原发性痛经临床研究 [J]. 河南中医, 2016, 36(2): 278-280.
- [11] 宫文霞, 周玉枝, 李 肖, 等. 当归抗抑郁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3905-3911.
- [12] 徐 妍, 杨华蕊, 杨永寿, 等. 中药指纹图谱研究现状及展望 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(76): 91-94.
- [13] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [14] 林 夏, 崔培超, 王 雪, 等. 双鱼颗粒挥发性成分指纹图谱和定量分析 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2081-2086.
- [15] 邓 哲, 荆文光, 王淑慧, 等. 中药饮片标准汤剂研究进展与讨论 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 242-248.
- [16] 刘德文, 邓 哲, 陈 莎, 等. 泽泻饮片标准汤剂的制备及质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 860-867.
- [17] 荆文光, 邓 哲, 孙晓波, 等. 姜厚朴饮片标准汤剂研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 83-89.
- [18] 陈士林, 刘 安, 李 琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [19] 段晓颖, 陈 霄, 马秋莹, 等. 不同产地赤芝药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 609-615.
- [20] 付小梅, 孙 菡, 刘 婧, 等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4653-4661.
- [21] 伍红年, 谭诗涵, 王元清, 等. 竹节参 HPLC 指纹图谱的建立及 7 种成分测定 [J]. 中成药, 2019, 41(5): 1074-1080.
- [22] 周 欣, 张 琳, 毛 婵, 等. 基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2194-2200.
- [23] 张来宾, 吕洁丽, 陈红丽, 等. 当归中苯酞类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 167-176.
- [24] 孙 敏, 陈振鹤, 刘峰林, 等. 当归挥发油平滑肌效应研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(4): 90-92.