

•实验研究•

当归药材 HPLC 指纹图谱及其液相色谱-质谱联用分析

刘 毅, 刘素香, 龚苏晓, 张铁军

天津药物研究院, 天津 300193

摘 要 目的: 建立当归的 HPLC 指纹图谱, 并对其化学成分进行分析。方法: 采用高效液相色谱法, 以甲醇-0.05%磷酸水溶液系统进行线性梯度洗脱, 测定了来源于岷县的多批当归药材和市售当归饮片的指纹图谱, 应用相似度分析和聚类分析进行分类; 并采用液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)方法对岷县当归药材中的化学成分进行定性分析。结果: 在选定的色谱条件下, 得到当归 HPLC 指纹图谱, 标定出 12 个共有峰; 根据相似度分析和聚类分析的结果, 将当归药材和当归饮片各分为 1 类。HPLC-MS 鉴定出阿魏酸, 6,7-二羟基茺本内酯, 洋川芎内酯 I、H、A, 阿魏酸松柏酯, *E*-茺本内酯, *Z*-茺本内酯, 3-正丁烯基苯肽共 9 个化学成分。结论: 应用本方法评价当归的质量是可行的。

关键词 当归; 高效液相色谱; 指纹图谱; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R282.710.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2010)04-0259-04

HPLC Fingerprint of *Angelicae Sinensis Radix* and its analysis by HPLC-MS

LIU Yi, LIU Su-xiang, GONG Su-xiao, ZHANG Tie-jun

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of *Angelicae Sinensis Radix* and analyze the chemical components by HPLC-MS. **Methods:** The HPLC method was used with Accurasil-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and methanol-0.05% phosphoric acid was used as mobile phase in a gradient elution. The HPLC fingerprint was established for the determination of several batches of *Angelicae Sinensis Radix* grown in Minxian and *praeparata Angelicae Sinensis Radix* sold in the market and the similarity, and cluster analysis were carried out. The chemical components of *Angelicae Sinensis Radix* grown in Minxian were analysed by HPLC-MS. **Results:** Under the selected spectrum condition, 12 public peaks were shown in the HPLC fingerprint. *Angelicae Sinensis Radix* was classified into two groups based on the result of similarity and cluster analysis including *Angelicae Sinensis Radix* grown in Minxian and *praeparata Angelicae Sinensis Radix* sold in the market. Ferulic acid, 6,7-dihydroxydihydrodiligustilide, senkyunolide I, senkyunolide H, senkyunolide A, coniferyl ferulate, *E*-ligustilide, *Z*-ligustilide, and 3-butylenephthalide were identified in chromatograms based on their MS data. **Conclusion:** This method is reasonable and reliable to the quality control of *Angelicae Sinensis Radix*.

Key words *Angelicae Sinensis Radix*; HPLC; fingerprint; HPLC-MS

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 作为传统中药材, 应用于临床已有 2 000 多年的历史, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效。当归在我国栽培历史悠久, 其中以甘肃岷县当归的品质最好, 产量最高, 占全国年产量的 90% 以上。当归药材的成分复杂, 主要含茺本内酯类及其异构物和有机酸类^[1]、多糖类^[2]。其中,

茺本内酯类及其异构物属于挥发油, 有机酸类属于水溶性成分, 这些成分都具有较好的生理活性^[3]。HPLC 指纹图谱在当归药材及其制剂中的应用已有少量报道^[4-5], 但未见岷县当归药材 HPLC 指纹图谱的系统研究。本研究参考相关文献^[6-9], 应用 HPLC 法建立当归的指纹图谱, 比较甘肃岷县当归原药材与市售当归饮片的差异, 为当归的质量控制

收稿日期: 2010-03-22

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划课题 (2007BAI37B06)。

作者简介: 刘 毅 (1979—), 女, 助理研究员, 研究方向: 中药质量控制。E-mail: liuyi@tjipr.com

提供量化数据, 同时为岷县当归的规范化种植及其质量标准的建立提供实验依据。

1 实验材料

1.1 仪器

安捷伦液相色谱仪 1100 系列(包括 G1310A 四元液相梯度泵、G1313A 自动进样器、G1314A VWD 检测器、CO-201 柱温箱、安捷伦色谱工作站), Thermo 液相色谱, Finnigan LCQ Advantage Max 质

谱仪。

1.2 试剂

藁本内酯对照品(自制, 质量分数>98%); 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为去离子水。

1.3 药材

当归药材购自甘肃岷县, 当归饮片购自天津市各药店, 均经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。见表 1。

表 1 当归产地及来源
Table 1 Origin and sources of *A. sinensis*

批号	产地	来源	状态	批号	产地	来源	状态
D1	岷县	甘肃	原药材	D11	岷县	甘肃	饮片
D2	岷县	甘肃	原药材	D12	甘肃	协和药店	饮片
D3	岷县	甘肃	原药材	D13	甘肃	敬一堂药店	饮片
D4	岷县	甘肃	原药材	D14	甘肃	平湖药店	饮片
D5	岷县	甘肃	原药材	D15	甘肃	安舜药店	饮片
D6	岷县	甘肃	原药材	D16	甘肃	源盈药店	饮片
D7	岷县	甘肃	原药材	D17	甘肃	世纪三潭药店	饮片
D8	岷县	甘肃	原药材	D18	甘肃	华丰药店	饮片
D9	岷县	甘肃	原药材	D19	甘肃	泰和鑫药店	饮片
D10	岷县	甘肃	原药材				

2 方法

2.1 指纹图谱色谱条件

色谱柱为 Accurasil-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液, 线性梯度洗脱: 0~10 min (30:70~45:55), 10~30 min (45:55~70:30), 30~35 min(70:30~70:30), 35~45 min (70:30~90:10), 45~50 min (90:10~100:0), 50~55 min (100:0~30:70); 检测波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃; 进样量 20 μL。

2.2 HPLC-MS 实验条件

2.2.1 色谱条件

流动相为甲醇-0.05%甲酸溶液, 线性梯度洗脱: 0~10 min(30:70~45:55), 10~30 min(45:55~70:30), 30~35 min(70:30~70:30), 35~45 min (70:30~90:10), 45~60 min (90:10~100:0), 60~70 min (100:0~100:0); 体积流量 0.4 mL/min。

2.2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源, 正离子模式。干燥气体流速

35 arb, 辅助气体流速 10 arb, 喷雾电压 4.50 kV, 毛细管温度 260℃, 扫描范围 *m/z* 100~800。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取藁本内酯对照品 22.26 mg, 加甲醇溶解制成浓度为 0.890 4 mg/mL 的藁本内酯对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取当归药材, 粉碎, 过 40 目, 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-甲酸(95:5) 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 60 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇-甲酸(95:5) 补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液用微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度试验

取 D1 批当归药材, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取此供试品溶液 20 μL, 重复进样 6 次, 记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积, 以藁本内酯为内参照峰, 计算其相对保留时间和相

对峰面积值,结果相对保留时间的 RSD 值均小于 1%,相对峰面积值的 RSD 值均小于 5%,表明精密度良好。

3.1.2 稳定性试验

取 D1 批当归药材,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,精密吸取此供试品溶液 20 μ L,分别于 0、2、4、6、12、22、24 h 进样测定,记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积,以藁本内酯为内参照峰,计算其相对保留时间和相对峰面积值,结果相对保留时间的 RSD 值均小于 2%,相对峰面积值的 RSD 值均小于 5%,表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

3.1.3 重复性试验

按供试品溶液的制备方法,取 D1 批当归药材分别制备 6 份供试品溶液,进样 20 μ L 测定,记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积,计算其相对保留时间和相对峰面积值,结果相对保留时间的 RSD 值均小于 1%,相对峰面积值的 RSD 值均小于 5%,表明重复性良好。

3.2 指纹图谱的建立

3.2.1 内参照峰的选择

依据 19 批药材图谱的谱图特征,选择保留时间在 39 min 的一个强峰(6 号色谱峰),其保留时间同藁本内酯对照品色谱峰的保留时间一致,即藁本内酯的色谱峰为内参照峰,见图 1。

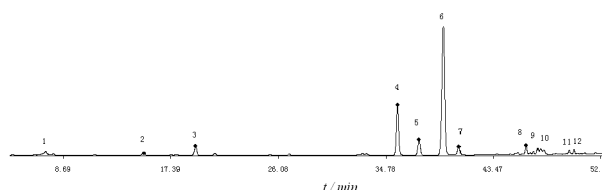


图 1 当归药材指纹图谱(6-藁本内酯)

Fig.1 HPLC Fingerprint of *Angelicae sinensis Radix* (6-ligustilide)

3.2.2 共有指纹峰的选择

对 19 批药材的指纹图谱进行分析,确定藁本内酯色谱峰的相对保留时间为 1,计算其它色谱峰的相对保留时间,结果发现有 12 个色谱峰为当归药材所共有,因此,确定它们为共有指纹峰,且共有峰的总面积占总峰面积的 90%以上。

3.3 数据处理

3.3.1 相似度评价

用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)》对测定的 19 批当归药材指纹图谱进行色谱峰匹配,用中位数法得到对照指纹图谱,得出各批药材图谱与对照图谱的相似度,见表 2。

表 2 相似度评价结果

Table 2 Results of similarity analysis

药材批号	相似度	药材批号	相似度
D1	0.998	D11	0.999
D2	0.998	D12	0.857
D3	1.000	D13	0.937
D4	0.998	D14	0.921
D5	0.998	D15	0.957
D6	0.998	D16	0.955
D7	0.998	D17	0.963
D8	0.998	D18	0.955
D9	0.998	D19	0.949
D10	0.998		

3.3.2 聚类分析

应用数理统计软件 SPSS 11.5 对 19 批当归药材的色谱指纹图谱进行聚类分析,12 个共有峰的相对峰面积作为 12 个变量,代入软件中进行计算。采用类内平均锁链法(average linkage),选用欧氏距离的平方(squared euclidean distance)为测度,聚类谱系图见图 2。聚类分析结果表明,19 批药材分为 2 类,D1~11,为一类,D12~19 为一类,即当归药材为一类,当归饮片为一类。

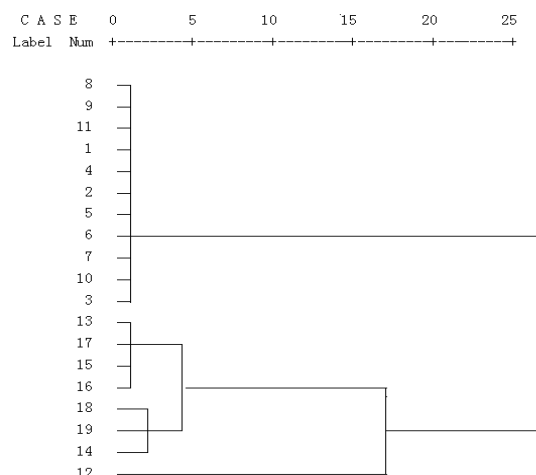


图 2 当归系统聚类分析树状图

Fig.2 Dendrogram of cluster analysis of *A. sinensis*

3.4 HPLC-MS 分析

采用 HPLC-MS 联用技术对岷县当归药材的化学成分进行了结构推测。指出阿魏酸, 6,7-二羟基藁本内酯, 洋川芎内酯 I、H、A, 阿魏酸松柏酯, *E*-藁本内酯, *Z*-藁本内酯, 3-正丁烯基苯肽共 9 个化学成分。结果见表 3、图 3。

表 3 HPLC-MS 分析结果
Table 3 Results of HPLC-MS analysis

编号	t_R / min	$[M+H]^+(m/z)$	化合物名称
1	26.03	195	阿魏酸
2	29.36	225	6,7-二羟基藁本内酯
3	31.07	225	洋川芎内酯 I
4	32.84	225	洋川芎内酯 H
5	46.80	193	洋川芎内酯 A
6	48.20	$[M+Na]^+379$	阿魏酸松柏酯
7	51.15	191	<i>E</i> -藁本内酯
8	52.23	191	<i>Z</i> -藁本内酯
9	53.01	189	3-正丁烯基苯肽

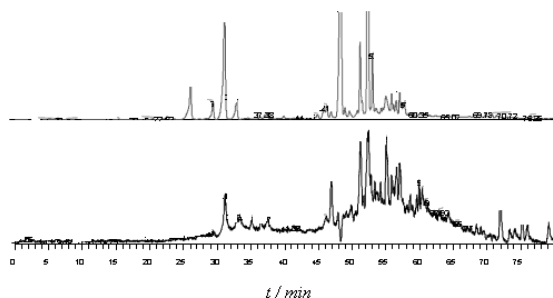


图 3 岷县当归的 HPLC-MS 图
Fig.3 HPLC-MS of *A. sinensis* grown in Minxian

这 9 个化学成分已经从岷县当归药材中分离纯化得到, 并将指纹图谱中各共有峰的保留时间与这 9 个成分的色谱峰保留时间进行对比, 结果, 相对保留时间为 0.39 的共有峰 (2 号色谱峰) 为阿魏酸, 相对保留时间为 0.49 的共有峰 (3 号色谱峰) 为洋川芎内酯 I, 相对保留时间为 0.91 的共有峰 (4 号色谱峰) 为阿魏酸松柏醇酯, 相对保留时间为 0.95 的共有峰 (5 号色谱峰) 为 *E*-藁本内酯, 相对保留时间为 1.00 的共有峰 (6 号色谱峰) 为 *Z*-藁本内酯, 相对保留时间为 1.03 的共有峰 (7 号色谱峰) 为 3-正丁烯基苯肽。6,7-二羟基藁本内酯、洋川芎内酯 H

和洋川芎内酯 A 的色谱峰在当归饮片的色谱图中未检测到。

4 讨论

4.1 色谱条件的选取与优化

分别以甲醇-磷酸水溶液、甲醇-冰醋酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-冰醋酸水溶液系统考察色谱分离能力, 结果都不能达到较好的分离效果。应用本文的流动相系统, 采用线性梯度洗脱, 分离效果较好, 且重复性良好。

4.2 指纹图谱检测波长的确定

在选定的色谱条件下, 采用 DAD 检测器对样品进行测定, 综合考虑基线、色谱峰的数目、各色谱峰的分离度及信号响应值, 确定 270 nm 为最佳检测波长。

4.3 本实验对岷县当归药材和市售当归饮片进行了测定, 并应用相似度分析和聚类分析的方法, 对它们进行研究, 发现当归原药材与市售当归饮片存在明显差异, 市售饮片中各共有峰的吸收值明显低于当归原药材, 且色谱峰的个数明显少于当归原药材, 说明当归原药材经加工炮制切片后, 其化学成分有明显缺失, 且含量明显降低。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 裴 媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酐类和萜类成分作用的虚拟评价[J]. 中草药, 2010, 41 (6): 938-941.
- [4] 严 辉, 段金彪, 钱大玮, 等. 我国不同产地当归药材质量的分析与评价[J]. 中草药, 2009, 40 (12): 1988-1992.
- [5] 王文燕, 赵 强, 张铁军, 等. 牛黄解毒丸的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41 (1): 56-57.
- [6] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F, et al. Fingerprint analysis of four variants of *Chrysanthemi Morifoli Flos* by RP-HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2 (2): 153-156.
- [7] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41 (5): 818-821.
- [8] 罗 文, 刘 斌, 王 伟, 等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24 (1): 39-42.
- [9] 张林疆, 毕开顺, 刘唯芬, 等. 北五味子 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2004, 35 (增刊): 170-172.