

高效液相色谱法研究当归指纹图谱

赵健雄¹, 封士兰¹, 胡芳弟¹, 刘 欣¹, 李应东²

(1. 兰州大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 目的: 研究当归药材的指纹图谱. 方法: 高效液相色谱法, Hypersil ODS 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), Kromasil ODS 保护柱 (4.6 mm×10 mm, 5 μm). 甲醇-1% 醋酸梯度流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 ℃. 以当归对照药材为对照品, 色谱峰光谱采集范围: 190~400 nm; 以阿魏酸为参照物并测定了阿魏酸的含量, 检测波长: 323 nm, 流动相: 甲醇-1% 醋酸 (40: 60, V/V), 流速 0.7 mL/min. 结果: 找出了 22 个共有峰, 其中 5 号峰为阿魏酸, 11 个样品与当归对照药材之间的相似度均在 90% 以上, 平均相似度为 96.77%. 结论: 样品处理方法简单, 研究所得的当归指纹图谱稳定性、重复性好, 可以作为当归极性部分的特征性指纹图谱.

关键词: 当归; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R657.2

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2005)04-0303-04

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥根, 又叫秦归、云归、西当归和岷当归, 生长于海拔 1 800~2 500 m 高寒阴湿地区. 主要栽培于甘肃岷县及云南. 当归化学成分主要分为挥发油和水溶性两大部分. 周长新、李家仁、方洪矩、李菁^[1~4] 等对当归挥发油做了较深入的研究, 其水溶性部分因具有补血和调节免疫的功能, 成为近年来研究的热点. 当归对机体的心血管系统、血液系统、免疫系统等具有显著的药理作用, 并且有抗肿瘤、调节子宫平滑肌、抗炎及抗损伤等作用. 关于当归的质量控制, 2000 版中国药典主要是常规的鉴别, 国内未见关于指纹图谱研究的报道. 本文作者采用高效液相色谱法研究了 10 个甘肃不同产地当归、1 个云南产当归及当归对照药材样品甲醇提取部分的指纹图谱, 并对主要指标成分阿魏酸进行了定位和含量测定.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

美国 Waters 2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 2996 二极管阵列检测器 (M³² 色谱管理站). 甲醇为色谱纯 (山东禹王实业有限公司禹城化工

厂), 冰醋酸为分析纯 (北京化工厂), 超纯水 (兰州大学第一医院药剂科), 当归药材由甘肃中医学院生药学教研室李成义教授鉴定为 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels. 阿魏酸对照品 (购自中国药品生物制品检定所).

1.2 色谱条件

Hypersil ODS 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 大连依利特公司生产; Kromasil ODS 保护柱 (4.6 mm×10 mm, 5 μm), 天津琛航科技有限公司生产; 甲醇-1% 醋酸梯度流动相见表 1. 温度 25 ℃. 色谱峰光谱采集范围: 190 nm~400 nm; 以阿魏酸为参照物, 检测波长 254 nm.

1.3 对照品溶液的制备

精密称取阿魏酸对照品 5.08 mg, 用甲醇溶解定容至刻度. 再精密吸取 80、160、240、320 和 400 μL 分别置于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得系列浓度的对照品溶液.

1.4 供试品溶液的制备

用四分法称取药材 1 g, 甲醇超声提取 3 次 (30, 30, 30 mL), 每次 30 min, 蒸干甲醇, 残渣用甲醇超声溶解, 定容于 10 mL 容量瓶中. 用 0.45 μm 膜过滤, 进样量 10 μL. 波长扫描范围 190~400 nm. 流动

收稿日期: 2005-09-20; 修订日期: 2005-10-16.

基金项目: 甘肃省省长基金资助项目 (No. GS015-A45-007, GS024-A43-018)

作者简介: 赵健雄 (1943-), 男, 教授, 博导, 主要从事中西医结合临床、基础研究.

相见表 1.

表 1 测定当归指纹图谱的流动相梯度			
Table 1 Mobile phase for Determination Chromatographic fingerprint of Danggui			
时间/ min	流速/ (mL/min)	甲醇/ %	1% 醋酸/ %
0	1.0	5	95
20	1.0	20	80
35	1.0	50	50
45	1.0	70	30
70	1.0	100	0
80	1.0	100	0

1.5 检测波长的选择

对 190~ 400 nm 扫描的各波长下的色谱图进行分析比较, 结果在 254 nm 波长下各峰分离良好, 峰数目也比较多, 而且阿魏酸的峰明显可见(图 1 中 5 号峰). 尽管阿魏酸的最大吸收波长是 235 nm 和 323 nm, 但是样品色谱图在 235 nm 处峰数较少, 而且基线不稳, 样品色谱图在 323 nm 处尽管基线较

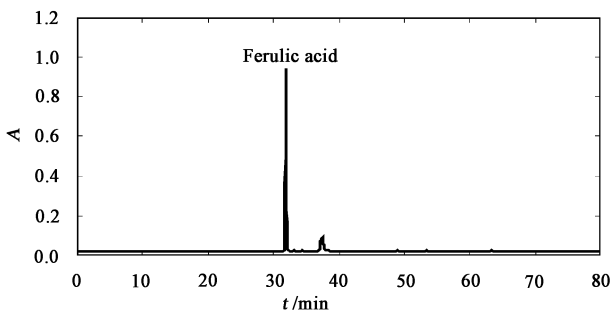


图 1 阿魏酸的 HPLC 图
Fig. 1 Chromatogram of ferulic acid

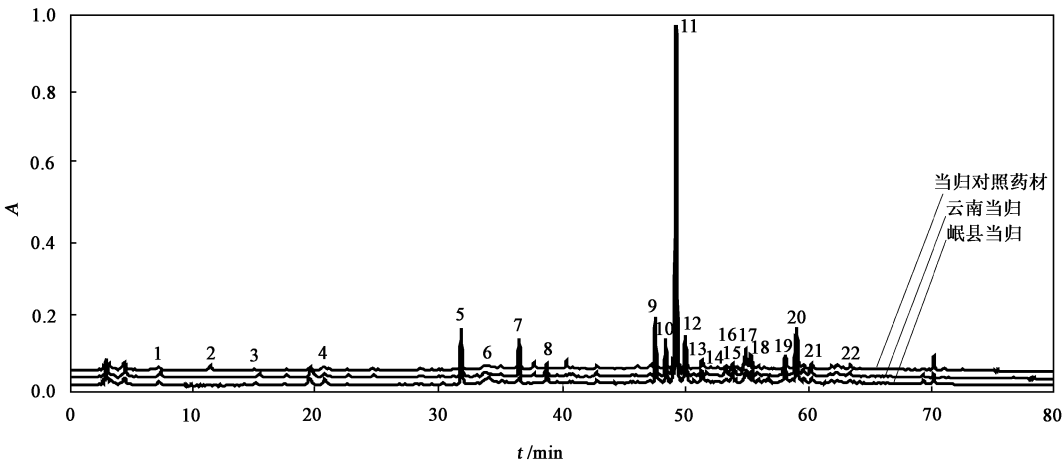


图 2 当归高效液相色谱指纹图谱
Fig. 2 Typical chromatograms for determination fingerprint of danggui

稳, 但整个色谱图中仅有 4 个峰, 所以选择 254 nm 作为检测波长, 阿魏酸作为当归指纹图谱的参照物.

1.6 流动相的选择

先用甲醇和水作为流动相检测, 调整比例, 色谱图分离度较差. 将水改换为醋酸溶液, 并分别试用了 0.5%、1.0% 醋酸溶液, 结果以 1.0% 醋酸溶液和甲醇组成的梯度流动相(见表 1) 所得指纹图谱较好.

1.7 参照物色谱峰的鉴定

在 254 nm 波长下, 测定阿魏酸对照品, 其保留时间为 32.81 min, 并与样品指纹图谱中相应色谱峰进行比较, 发现当归样品指纹图谱中 5 号峰的保留时间及紫外光谱图与阿魏酸一致, 故将当归样品指纹图谱中 5 号特征峰鉴定为阿魏酸, 见图 1, 图 2.

1.8 指纹图谱分析、数据处理及相似度

用 1.2 色谱条件测定了 10 批当归药材样品和当归对照药材的指纹图谱, 见图 2. 以当归对照药材为对照, 对各样品的各个峰紫外光谱图进行对比分析, 找到 22 个共有峰, 对各个样品的相似度进行了计算. 数据处理采用 Waters Patten Match 相似度软件, 计算采用夹角余弦法. 色谱图处理用中南大学中药现代化研究中心的 FPCASE 软件. 以共有峰的峰面积计算相似度, 10 个样品的平均相似度为 96.77%, 结果见表 2. 用本文的条件测定了云南产的当归的指纹图谱, 结果见表 2、图 2. 云南产当归指纹图谱与当归对照药材相比, 相似度为 97.96%.

1.9 相似度的精密度与重现性

分别取当归对照药材样品溶液, 连续进样 3 次, 测定指纹图谱相似度的日内精密度, 各共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%) 分别为 99.99、99.91、

表 2 10 个当归样品共有峰相对保留时间及与当归对照药材之间的相似度

Table 2 Relative retention times of common peaks and similarity of common peaks from 10 Danggui samples between danggui standard													
编号	岷县 1 [#]	岷县 2 [#]	岷县 3 [#]	岷县 4 [#]	岷县 5 [#]	岷县 6 [#]	岷县 7 [#]	岷县 8 [#]	岷县 9 [#]	漳县 10 [#]	当归对照药材	云南	相对 RT 平均值
1	0.230	0.229	0.228	0.230	0.230	0.229	0.229	0.230	0.230	0.231	0.230	0.234	0.230
2	0.477	0.475	0.474	0.476	0.475	0.475	0.475	0.475	0.474	0.474	0.476	0.485	0.475
3	0.616	0.610	0.610	0.614	0.610	0.610	0.611	0.611	0.610	0.616	0.614	0.615	0.612
4	0.656	0.651	0.653	0.652	0.654	0.654	0.654	0.654	0.655	0.655	0.652	0.651	0.654
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	1.146	1.147	1.141	1.148	1.141	1.142	1.147	1.147	1.147	1.147	1.148	1.147	1.145
7	1.216	1.217	1.217	1.186	1.217	1.217	1.217	1.217	1.217	1.217	1.186	1.216	1.210
8	1.341	1.344	1.345	1.345	1.344	1.344	1.344	1.344	1.344	1.345	1.345	1.344	1.344
9	1.484	1.495	1.494	1.504	1.495	1.495	1.495	1.495	1.495	1.487	1.504	1.494	1.495
10	1.518	1.522	1.521	1.522	1.521	1.522	1.521	1.522	1.522	1.521	1.522	1.520	1.521
11	1.544	1.548	1.546	1.548	1.547	1.547	1.547	1.548	1.548	1.547	1.548	1.546	1.547
12	1.566	1.570	1.569	1.570	1.569	1.569	1.569	1.570	1.570	1.569	1.570	1.568	1.569
13	1.609	1.613	1.611	1.613	1.612	1.613	1.612	1.613	1.613	1.612	1.613	1.610	1.612
14	1.672	1.674	1.673	1.675	1.673	1.673	1.674	1.675	1.674	1.673	1.675	1.672	1.674
15	1.687	1.690	1.689	1.691	1.690	1.690	1.690	1.691	1.691	1.689	1.691	1.689	1.690
16	1.720	1.723	1.723	1.724	1.724	1.725	1.723	1.724	1.724	1.723	1.724	1.722	1.723
17	1.737	1.738	1.737	1.739	1.737	1.738	1.738	1.739	1.739	1.738	1.739	1.736	1.738
18	1.821	1.825	1.824	1.826	1.824	1.824	1.824	1.825	1.824	1.823	1.826	1.822	1.824
19	1.849	1.853	1.852	1.854	1.853	1.853	1.852	1.854	1.853	1.852	1.854	1.851	1.852
20	1.867	1.827	1.871	1.871	1.872	1.872	1.872	1.873	1.872	1.869	1.871	1.870	1.867
21	1.951	1.956	1.955	1.956	1.955	1.956	1.956	1.957	1.956	1.954	1.956	1.954	1.955
22	2.197	2.203	2.202	2.204	2.202	2.203	2.202	2.204	2.204	2.203	2.204	2.203	2.202
相似度/%	94.93	97.80	97.50	95.08	99.91	99.14	98.00	93.07	97.42	94.83	100	97.96	96.77

99.14, *RSD* 为 0.47%。分别在 0、1、2 d 进样, 测定指纹图谱相似度的日间精密性, 各共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%) 分别为 94.77、94.83、95.46, *RSD* 为 0.40%。分别取岷县科技园当归药材 5 份, 按供试品溶液制备方法制备样品溶液, 测定指纹图谱相似度的重复性, 共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%) 分别为 94.93、99.99、97.80、97.50、95.08, *RSD* 为 2.18%。

1.10 当归中阿魏酸的含量测定

色谱条件: Hypersil ODS 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil ODS 保护柱 (4.6 mm × 10 mm, 5 μm)。流动相甲醇-1%醋酸(40: 60, *V/V*), 进样量 10 μL, 流速 0.7 mL/min, 检测波长 323 nm, 柱温 25 ℃。阿魏酸的回归方程和相关系数为: $A = 6.90 \times 10^5 C - 5.10 \times 10^5$, $r = 0.9999$, 线性范围为 0.162~0.810 μg。样品处理方法同 1.4, 结果见

表 3、图 3、图 4。甘肃产当归阿魏酸的含量为 0.32~0.36 μg/g, 云南产当归阿魏酸的含量为 0.55 μg/g。

表 3 当归药材中阿魏酸的含量

Table 3 Contents of ferulic acid from danggui samples		
序号	样品来源	阿魏酸含量/(μg/g)
1	岷县科技园区 1 [#]	0.337 ± 0.000
2	岷县科技园区 2 [#]	0.339 ± 0.001
3	岷县科技园区 3 [#]	0.322 ± 0.000
4	岷县科技园区 4 [#]	0.353 ± 0.001
5	岷县科技园区 5 [#]	0.346 ± 0.000
6	岷县科技园区 6 [#]	0.322 ± 0.000
7	岷县科技园区 7 [#]	0.347 ± 0.000
8	岷县科技园区 8 [#]	0.339 ± 0.001
9	岷县科技园区 9 [#]	0.321 ± 0.000
10	漳县 10 [#]	0.322 ± 0.000
11	当归对照药材	0.347 ± 0.000
12	云南	0.550 ± 0.001

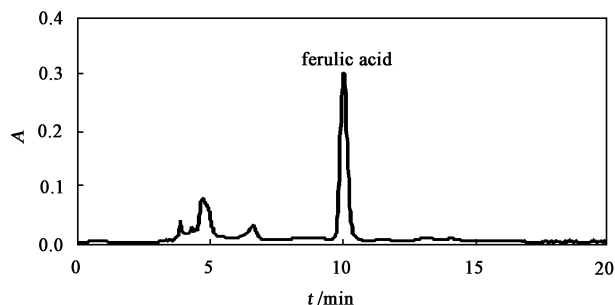


图 3 当归样品 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of Danggui sample

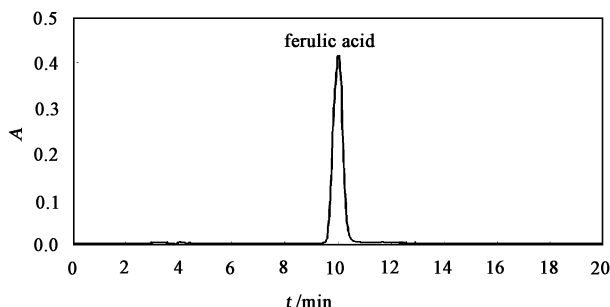


图 4 阿魏酸 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of ferulic acid

2 讨论与小结

通过测定,我们将当归的指纹图谱评价标准定为 22 个特征峰,其中 5 号峰为阿魏酸,阿魏酸的含量为 0.32~0.55 $\mu\text{g/g}$ 。

从这 10 批样品的高效液相色谱指纹图谱中可以看到,不同产地、不同采集时间的当归样品,以及云南产当归样品的指纹图谱,与当归对照药材相比较指纹图谱的相似度都在 90% 以上,这说明所研究的当归指纹图谱具有比较好的稳定性和重复性,在本文条件下,当归的指纹图谱具有较好的特征性,可作为当归极性部分专属性的指纹图谱。

参考文献:

- [1] 周长新,邹建凯,陈耀祖,等.气相色谱-质谱法测定当归挥发油中蒿本内酯的含量[J].药物分析杂志,2002,22(4):290-292.
- [2] 李家仁.中国当归化学成分研究[J].中草药,1983,18(4):41-42.
- [3] 方洪矩,吕瑞绵,刘国声,等.挥发油成分的研究 II.中国当归与欧当归主要成分的比较[J].药学学报,1979,14(10):617.
- [4] 李菁,葛发欢,黄晓芬,等.超临界 CO_2 萃取当归挥发油的研究[J].中药材,1996,19(4):187-189.

Studies on Chromatography Fingerprint(CFP) of Danggui by High-performance Liquid Chromatography

ZHAO Jian-xiong¹, FENG Shi-lan¹, HU Fang-di¹,
LIU Xin¹, LI Ying-dong²

(1. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. Tradition Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective: Study on chromatographic fingerprint of Danggui herbs. Method: High-performance liquid chromatography on a Hypersil ODS column with HOAc(1%)-methanol gradient elution, flow-rate of 1.0 mL/min, column temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$, standard such as Danggui standard, acquisition wave range was 190~400 nm. Determined content of ferulic acid with PAD. Mobile phase: Methanol-1% HOAc (60:40, V/V), flow-rate of 0.7 mL/min, detector wave: 323 nm. Result: 22 common peaks were pointed out, 5th peak was ferulic acid, their similarity of 11 samples were more than 90.0%. Conclusion: Handle method of samples was simple, stable and repeatable. The chromatographic fingerprint of Danggui samples could be used to aqueous solution section of them characterized chromatographic fingerprint.

Key words: danggui; chromatographic fingerprint(CFP); high-performance liquid chromatography

Classifying number: 0657.2