

UPLC 法同时测定川白芷中 5 种香豆素成分的含量^{*}

刘丛彬¹, 夏淑媛¹, 刘松照¹, 张 强¹, 汪 浦¹, 俞年军¹, 高广印², 樊 军³, 谢冬梅^{1△}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽广印堂中药股份有限公司, 安徽 亳州 236800;

3. 四川省蓬溪盛大中药材有限公司, 四川 遂宁 629124)

摘要: **目的** 建立 UPLC 法同时测定不同加工方法和不同产地川白芷中欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水化氧合前胡素、佛手柑内酯等 5 种香豆素类成分的含量测定方法。**方法** 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 柱温:30 ℃, 流速:0.3 mL/min; 检测波长:300 nm, 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱。**结果** 欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水化氧合前胡素、佛手柑内酯等五种对照品线性范围分别为 0.005~0.05 μg($r=0.9998$), 0.003~0.03 μg($r=0.9999$), 0.002~0.02 μg($r=0.9999$), 0.002~0.02 μg($r=0.9991$), 0.0008~0.008 μg($r=0.9999$)。加样回收率在 97.00%~101.72%, RSD 在 0.66%~1.52%。**结论** 该方法具有良好的精密度、稳定性和重复性, 可用于川白芷质量控制。

关键词: 川白芷; 超高效液相色谱; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)04-0088-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.022

Simultaneous Determination of 5 Coumarin Components in Angelica Dahurica from Sichuan by UPLC Method

LIU Congbin¹, XIA Shuyuan¹, LIU Songzhao¹, ZHANG Qiang¹, WANG Pu¹, YU Nianjun¹,

GAO Guangyin², FAN Jun³, XIE Dongmei¹

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Anhui GYT Chinese Medicine Co., Ltd, Bozhou 236800, China;

3. Sichuan PXSD Chinese Medicinal Materials Co., Ltd, Suining 629124, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 5 coumarins in the Angelica Dahurica from Sichuan which with different processing methods and areas by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** The determination was performed on Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with gradient elution of acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was at 300 nm. **Results** Five coumarins of imperatorin, isoimperatorin, oxypeucedanin, oxypeucedanin hydrate and bergapten had good linearity in the ranges of 0.005~0.05 μg ($r=0.9998$), 0.003~0.03 μg ($r=0.9999$), 0.002~0.02 μg($r=0.9999$), 0.002~0.02 μg($r=0.9991$) and 0.0008~0.008 μg($r=0.9999$). The average recovery rates were 97.00%~101.72% with RSD of 0.66%~1.52%. **Conclusion** The method has accurate results, simple operation, good operation, and can be used in the determination of 5 coumarins in Angelica Dahurica from Sichuan effectively.

KEY WORDS: Angelica Dahurica from Sichuan; ultra performance liquid chromatography; content determination; quality control

收稿日期: 2018-07-05

^{*} 基金项目: 国家中医药管理局国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-AH-02);安徽省高校科研创新平台团队(中药饮片产地加工与炮制一体化关键技术研究创新团队);安徽中医药大学药学院第四届大学生“药苑之星”项目

第一作者简介: 刘丛彬(1975-),男,讲师,研究方向:中药质量分析。

△通信作者: 谢冬梅, E-mail: xiedongmei96@126.com

白芷以根入药,栽培历史悠久,为我国 40 种大宗常用中药之一,具有解表散寒、祛风止痛、宣通鼻窍、燥湿止带、消肿排脓的功效,常用于感冒头痛、眉棱骨痛、鼻塞流涕、鼻渊、牙痛、带下、疮疡肿痛等症,也被广泛用于食品、保健品、香料、护肤美容等方面,市场需求量较大^[1-2]。商品白芷依据产地不同主要分为川白芷、杭白芷、祁白芷、禹白芷 4 大类^[3-4],其中川白芷因采收时间及产地加工的传统多为硫熏后晒干以利于干燥、提色和防蛀^[5]。研究表明,熏硫后白芷中水合氧化前胡内酯、佛手内酯、白当归脑等化合物含量变化明显,氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素的含量均明显下降,其中以氧化前胡素的含量下降最为明显^[6-8]。

欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水合氧化前胡素、佛手柑内酯等是川白芷中含有的主要香豆素类成分^[9-13],中国药典收载的白芷质量标准中采用 HPLC 法测定欧前胡素一种成分作为评价指标^[14]。由于多指标成分用于中药的质量评价具有全面准确、评价结果科学、合理、可信等优点,且 UPLC 法相对于 HPLC 法具有分析效率高、灵敏度高和分辨率高等优点,并且能大大缩短样品的分析时间^[9]。目

前,关于采用 HPLC 法测定白芷中香豆素类成分的研究较多^[15-18],而用 UPLC 法测定川白芷中香豆素类含量的研究较少^[19],本研究通过 UPLC 法建立川白芷中多种香豆素的含量测定方法,并利用 SPSS.23 软件对不同加工方法生产的川白芷药材和饮片 中 5 种香豆素进行聚类分析^[20-21],为川白芷的质量检测及评价提供参考。

1 仪器与试药

超高效液相色谱仪(Agilent 1290)、十万分之一分析天平(METTLER TOLEDO XS104)、欧前胡素(批号:CFS201602)、异欧前胡素(批号:CFS201602)、氧化前胡素(批号:CFS201602)、水合氧化前胡素(批号:CFS201602)、佛手柑内酯(批号:CFS201602)供含量测定用,均购自武汉天植生物技术有限公司。甲醇、乙腈(色谱纯,默克),其余试剂为分析纯。

川白芷药材和饮片样品信息见表 1(熏硫品以“-lx”表述,未熏硫的晒干品以“-sg”表述),经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为伞形科植物杭白芷 *Angelica dahurica*(Fisch.ex Hoffm.)Benth.et Hook.F.var.formosana(Boiss)Shan et Yuan 的干燥根。凭证样本留样存放于安徽中医药大学药系中药鉴定研究室。

表 1 实验用白芷药材及饮片一览表

编号	类型	来源	凭证样本号	编号	类型	来源	凭证样本号
1	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC011701-sg	17	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP101701-lx
2	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC021701-lx	18	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP111701-lx
3	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC031701-lx	19	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC011702-sg
4	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC041701-lx	20	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP011701-sg
5	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC051701-lx	21	饮片	安国药材市场	CBZ-YP021701-sg
6	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC061701-lx	22	饮片	安国药材市场	CBZ-YP031701-sg
7	药材	荷花池药材市场	CBZ-YC071701-lx	23	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP041701-sg
8	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP011701-lx	24	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP051701-sg
9	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP021701-lx	25	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP061701-sg
10	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP031701-lx	26	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP071701-sg
11	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP041701-lx	27	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP081701-sg
12	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP051701-lx	28	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP091701-sg
13	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP061701-lx	29	饮片	荷花池药材市场	CBZ-YP101701-sg
14	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP071701-lx	30	药材	遂宁市钟灵寺村	CBZ-YCZZ1601-sg
15	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP081701-lx	31	药材	遂宁市钟灵寺村	CBZ-YCZZ1602-sg
16	饮片	重庆药材市场	CBZ-YP091701-lx				

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),柱温:30℃;流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~2 min,10%~38% A,2~7 min,38%~39% A,7~9 min,39%~40% A,9~10 min,40%~55% A,10~14 min,55%~70% A,14~15 min,10% A);流速为 0.3 mL/min;检测波长:300 nm;进样量:5.0 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别取欧前胡素 5 mg、异欧前胡素 3 mg、氧化前胡素、水化氧化前胡素各 2 mg、佛手柑内酯 0.8 mg,置于 10 mL 量瓶定容,得到浓度分别为 0.5,0.3,0.2,0.2,0.08 mg/mL 的对照品储备液;另各取 250 μL 置于 25 mL 量瓶,定容,摇匀,即得混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备 取供试样品粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 45 mL,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz)1 h,取出,冷却后加甲醇至刻度,摇匀,静置后取上清液,滤过,取续滤液即得。

2.4 系统适用性试验 取混合对照品溶液、样品溶液各 5 μL,注入仪器进行分析。结果表明,欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水化氧化前胡素、佛手柑内酯等 5 种香豆素色谱峰分离度良好,见图 1。

2.5 线性关系考察 将混合标准品分别以 1,2,3,4,5,6,8,10 μL 的进样量进行进样,记录分析结果,以峰面积作为纵坐标(Y)进样量作为横坐标(X)绘制工作曲线,计算线性回归方程。欧前胡素: $Y=49.535X-0.2076$ ($r=0.9998$, $n=8$),线性范围 0.005~0.05 μg;异欧前胡素: $Y=29.578X-1.7992$,($r=0.9999$, $n=8$),线性范围 0.003~0.03 μg;氧化前胡

素: $Y=18.211X+0.8885$,($r=0.9999$, $n=8$),线性范围 0.002~0.02 μg;水化氧化前胡素: $Y=20.527X+3.7128$,($r=0.9991$, $n=8$),线性范围 0.002~0.02 μg;佛手柑内酯: $Y=9.7687X-1.4481$,($r=0.9999$, $n=8$),线性范围 0.0008~0.008 μg。

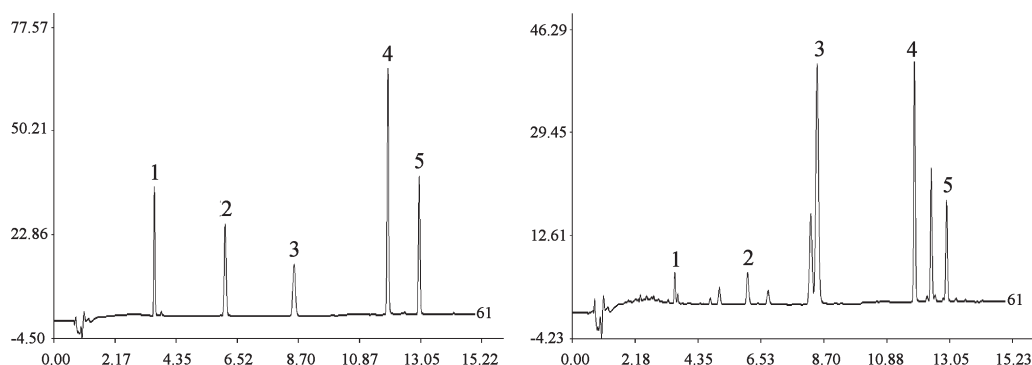
2.6 精密度试验 取先前配好的混合对照品溶液,按照以上色谱条件,连续进样 6 次,欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水化氧化前胡素、佛手柑内酯的 RSD 值分别为 0.24%、0.24%、0.99%、1.89%、0.23%,表明该方法及仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 将供试品溶液放置 0、2、4、8、12、24 h,分别按照“2.1”项下色谱条件测定,记录测定结果。结果欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水化氧化前胡素和佛手柑内酯的峰面积 RSD 分别为 0.19%、2.58%、0.53%、2.61%、0.20%($n=6$),表明样品在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 平行称取 6 份同一批样品(批号:CBZ-YP031701-sg),按“2.3”项下的方法操作,得到 6 份供试品溶液,按以上条件进行进样分析并记录检测结果,测得欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素、水化氧化前胡素和佛手柑内酯的峰面积 RSD 分别为 0.61%、0.93%、1.63%、2.26%、2.98%($n=6$),说明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的同一样品(批号:CBZ-YP031701-sg)6 份各 0.1 g,精密称定后加入一定量的对照品混合储备溶液,按照样品制备方法制备加样回收样品溶液,在上述条件下进样分析,记录测定结果并计算加样回收率,结果见表 2。

2.10 样品含量测定 按“2.3”项下方法制备样品溶液,在上述色谱条件下进行含量测定,结果见表 3。



1 为水化氧化前胡素,2 为佛手柑内酯,3 为氧化前胡素,4 为欧前胡素,5 为异氧化前胡素

图 1 对照品溶液及供试品溶液 UPLC 图

表 2 加样回收率试验结果(<i>n</i> =6)						
成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
欧前 胡素	0.275	0.270	0.531	97.43	98.13	1.15
	0.269	0.270	0.528	97.96		
	0.273	0.270	0.534	98.34		
	0.270	0.270	0.533	98.70		
	0.271	0.270	0.540	99.82		
	0.278	0.270	0.529	96.53		
异欧前 胡素	0.124	0.126	0.253	101.2	100.60	0.96
	0.120	0.126	0.248	100.81		
	0.132	0.126	0.256	99.22		
	0.128	0.126	0.258	101.57		
	0.125	0.126	0.254	101.20		
	0.130	0.126	0.255	99.61		
氧化前 胡素	0.052	0.052	0.102	98.08	98.72	1.35
	0.053	0.052	0.104	99.05		
	0.050	0.052	0.103	100.98		
	0.051	0.052	0.101	98.06		
	0.055	0.052	0.106	99.07		
	0.051	0.052	0.100	97.09		
水合 氧化前 胡素	0.190	0.196	0.375	97.15	97.00	0.66
	0.192	0.196	0.373	96.13		
	0.189	0.196	0.376	97.66		
	0.196	0.196	0.378	96.43		
	0.196	0.196	0.380	96.94		
	0.197	0.196	0.384	97.71		
佛手柑 内酯	0.042	0.044	0.087	101.16	101.72	1.52
	0.044	0.044	0.090	102.27		
	0.048	0.044	0.091	98.91		
	0.043	0.044	0.089	102.30		
	0.042	0.044	0.088	102.34		
	0.045	0.044	0.092	103.37		

2.11 聚类分析 利用 SPSS.23 软件对 31 批不同来源的川白芷进行聚类分析^[20-21],结果见图 2。结果表明,在低阈值下(<5),31 批药材被聚为 3 类。2-18,27 批次为Ⅰ类,1,19-26,28,29 批次为Ⅱ类,30,31 批次为Ⅲ类,说明不同来源、不同加工方法生产的川白芷在以 5 种香豆素成分作为评价标准时,存在明显的质量差异;结合含量测定结果可以看出,其中采自遂宁市钟灵寺村自制的晒干品Ⅲ类的含量最高,购自市场的未硫熏的药材或饮片Ⅱ类次之,硫熏后的Ⅰ类最低。

表 3 样品含量测定结果(mg/g)					
批号	欧前 胡素	异欧前 胡素	氧化前 胡素	水合氧化 前胡素	佛手柑 内酯
1	1.09	0.84	0.26	0.23	0.07
2	0.08	0.15	—	0.02	—
3	0.50	0.54	—	0.10	—
4	0.99	0.52	—	0.24	0.07
5	0.86	0.47	—	0.38	0.11
6	0.59	0.38	—	0.16	0.05
7	0.71	0.59	—	0.11	—
8	0.42	0.38	—	0.06	—
9	0.63	0.36	—	0.21	0.06
10	0.53	0.36	—	0.24	0.07
11	0.59	0.43	—	0.18	0.08
12	0.54	0.40	—	0.13	0.05
13	0.80	0.47	—	0.15	0.07
14	0.60	0.53	—	0.14	0.07
15	0.69	0.47	—	0.04	—
16	0.82	0.61	—	0.27	0.09
17	0.63	0.43	—	0.13	0.07
18	0.55	0.38	—	0.16	0.06
19	1.41	0.50	0.87	0.19	0.17
20	1.80	0.73	1.51	0.32	0.26
21	1.28	0.61	0.22	0.76	0.15
22	1.35	0.63	0.26	0.98	0.21
23	1.36	0.64	1.62	0.34	0.17
24	1.15	0.52	1.15	0.32	0.12
25	1.74	0.71	1.29	0.39	0.23
26	1.55	0.60	1.12	0.37	0.19
27	0.66	0.43	—	0.10	0.05
28	2.48	0.60	1.34	0.10	0.23
29	2.83	0.83	0.85	0.13	0.30
30	3.36	0.77	1.53	0.11	0.38
31	4.05	0.87	1.01	0.10	0.39

3 讨论

在 2015 版《中华人民共和国药典》一部收录的白芷 HPLC 检测方法的基础上,采用 UPLC 法测定川白芷中香豆素类多指标成分含量,对流动相、检测波长、柱温等色谱条件进行优选。最终确定的最佳方案为流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液,检测波长:300 nm,柱温:30 ℃,流速:0.3 mL/min。

31 批不同市场来源的川白芷药材含量测定结果显示,硫熏后的川白芷药材和饮片中欧前胡素、氧化前胡素含量下降明显,佛手柑内酯含硫熏后降低甚至

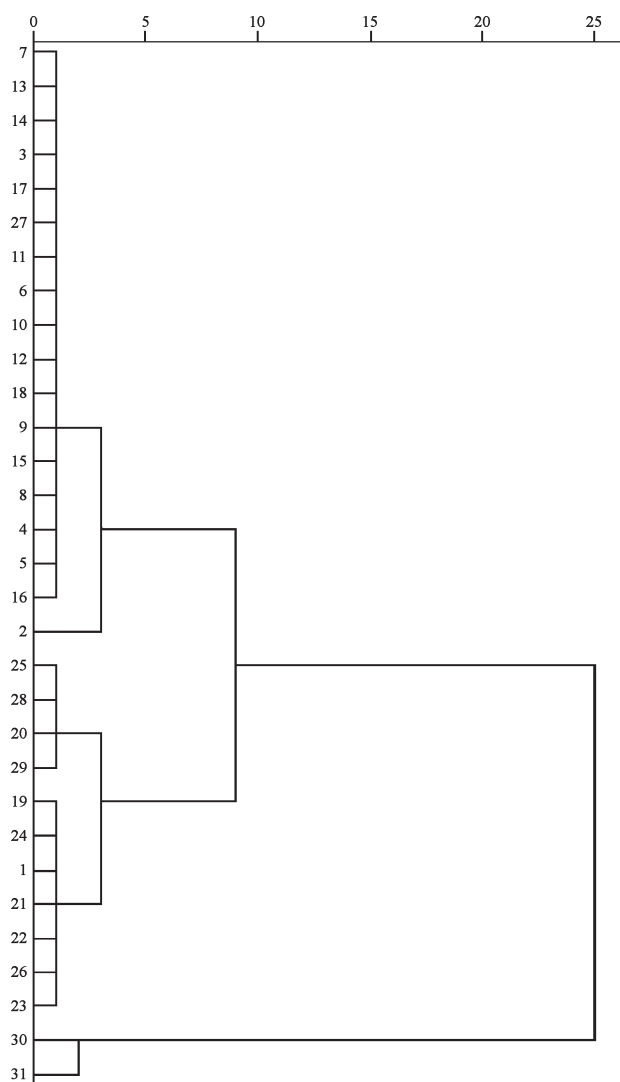


图 2 不同批次川白芷药材及饮片聚类分析图表

未检出,可能与硫熏的用量和程度有关。因此,为了提高川白芷的质量,有必要对氧化前胡素的限量进行限制,为更好地判别川白芷的硫熏程度提供依据。

聚类结果分析表明,硫熏制的产品香豆素含量降低,归于Ⅰ类,而晒干产品香豆素含量高于硫熏产品,大致归于Ⅱ类,个别产地晒干产品香豆素含量明显偏高,归于Ⅲ类。

本研究所确定的方法准确有效,分析时间短,分析成本低,可为川白芷的质量控制提供依据,规范市场。

参考文献:

- [1] 吴媛媛, 蒋桂华, 马逾英, 等. 白芷的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 625-627.
- [2] 王梦月, 贾敏如. 白芷本草考证[J]. 中药材, 2004, 27(5): 382-385.

- [3] 庄俊嵘, 徐德生, 刘力, 等. 白芷的功效与临床应用[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(6): 82-83.
- [4] 吴春艳, 王宇. 中药白芷临床应用浅析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015(11): 1668-1669.
- [5] 彭梁, 马爽, 柳杰, 等. 中药白芷活性成分的研究进展[J]. 安徽农业科技, 2015, 43(22): 57-58.
- [6] 蒋运斌, 卢晓琳, 杨枝中, 等. 与硫熏加工相关的白芷化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 74-78.
- [7] 吴晓毅. 多种分析技术对白芷硫磺熏蒸的创新性应用研究和 β -谷甾醇标准样品的研制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [8] 韦玮, 杨秀伟, 周媛媛. 杭白芷正丁醇溶性部位化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 630-634.
- [9] 肖永庆, 李丽, 游小琳, 等. 白芷质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 654-657.
- [10] 唐策, 范刚, 张艺, 等. 道地药材川白芷的质量标准提高研究[J]. 中国药房, 2013, 24(3): 235-238.
- [11] 梁波, 徐丽珍, 邹忠梅, 等. 川白芷的化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1132-1135.
- [12] 黄新苹, 包淑云, 杨隆河, 等. 中药川白芷的化学成分研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2011, 39(4): 88-90.
- [13] 张国彬, 薛敦渊, 李兆琳, 等. 杭白芷精油化学成分研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1989, 25(3): 159-160.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 105-106.
- [15] 郝旭亮, 张永文. 中药质量标准中建立多指标含量测定的必要性浅析[J]. 中国执业药师, 2009, 6(9): 31-33.
- [16] 王婷婷, 陈晓辉, 胡庆庆, 等. 白芷质量的 HPLC 指纹图谱评价方法[J]. 药学学报, 2006, 41(8): 747-751.
- [17] 史洋, 雷云, 许海玉, 等. 白芷中 3 个主要活性成分含量测定及其质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 915-919.
- [18] 舒翔, 叶小春, 陈军, 等. 高效液相色谱法同时测定白芷中欧前胡素和异欧前胡素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(5): 427-429.
- [19] 丁锐, 陈亚龙, 张海旭, 等. 都梁软胶囊和滴丸中川芎和白芷的鉴别和含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2015(12): 2168-2172.
- [20] 王鹰, 杨永超. 聚类分析方法在中药分类中的应用初探[J]. 中国中医急症, 2012, 21(4): 551.
- [21] 周冰, 刘培, 陈京, 等. 不同产地白芷药材中香豆素类及多糖类化学成分的分析评价[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(1): 68-73.