·实验研究·

白芷饮片水煎浸膏 HPLC 指纹图谱及 8 个特征成分含量测定方法的建立

冯　婷[1,2],朱帅鸣[2],骆芙瑶[2],麻　浩[2],李长伟[2],杨　郁[2],徐　锐[2],高　婕[3],单俊杰[2*],张有志[2*]
(1 南京中医药大学,南京 210046; 2 军事医学研究院,北京 100850; 3 济宁医学院,日照 276800)

[摘要] **目的:**采用 HPLC 技术建立白芷饮片水煎浸膏指纹图谱和 8 个特征成分的含量测定方法,同时测定 14 批白芷饮片水煎浸膏指纹图谱及 8 个特征成分的含量。**方法:**采用 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),以 0.025% 磷酸水溶液-乙腈为流动相,程序梯度洗脱,柱温 35 ℃,检测波长 220 nm,流速分别为 1.0 mL·min^{-1}(指纹图谱)和 1.2 mL·min^{-1}(含量测定)。**结果:**白芷饮片水煎浸膏 HPLC 指纹图谱中含有 29 个共有峰,鉴定出 9 个色谱峰成分(花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、异茴芹内酯、欧前胡素和珊瑚菜素),14 批白芷饮片指纹图谱的相似度 >0.980。花椒毒酚、5-羟基-8-甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的含量线性范围分别为 3.24 ~ 162.00、2.86 ~ 143.00、3.10 ~ 155.00、2.98 ~ 149.00、3.12 ~ 156.00、3.02 ~ 151.0、3.16 ~ 158.00 和 2.30 ~ 115.00 μg·mg^{-1}。14 批白芷饮片水煎浸膏中花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的含量范围分别为 0.14 ~ 0.37、0.26 ~ 0.39、2.31 ~ 3.48、1.09 ~ 2.22、0.04 ~ 0.26、0.19 ~ 0.34、0.03 ~ 0.14 和 0.11 ~ 0.23 μg·mg^{-1}。**结论:**该方法具有良好精确性、重复性和稳定性,能较好地反映白芷水煎浸膏的整体成分特征和主要特征成分的含量范围,可用于白芷药材、饮片及其制剂的质量控制。

[关键词] 白芷;水煎浸膏;指纹图谱;含量测定
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2026)12 - 1304 - 11

Establishment of HPLC fingerprinting and content determination methods of eight characteristic components in water-decocted extract of *Angelicae Dahuricae* Radix

FENG Ting[1,2], ZHU Shuai-ming[2], LUO Fu-yao[2], MA Hao[2], LI Chang-wei[2], YANG Yu[2], XU Rui[2], GAO Jie[3], SHAN Jun-jie[2*], ZHANG You-zhi[2*]
(1 *College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing* 210046, *China*; 2 *Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100850, *China*; 3 *Jining Medical University, Rizhao* 276800, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish the HPLC fingerprinting and quantitative method of eight characteristic components in water-decocted extract of *Angelicae Dahuricae* Radix, and investigate the similarities of 14 batches of *Angelicae Dahuricae* Radix samples. **Methods**: SinoChrom ODS-BP column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for the fingerprinting and quantitative assay. The mobile phase was 0.025% phosphoric acid-acetonitrile under gradient elution mode. The column temperature was 35 ℃, the detection wavelength was 220 nm, the flow rates

[基金项目] 国家中医药管理局高水平重点学科建设资助项目(zyyzdxk-2023311)
[作者简介] 冯婷,女,硕士研究生,主要从事中药质量控制方法研究。联系电话:(010)66930644,E-mail:1342114830@qq.com。共同第一作者:朱帅鸣,男,副研究员,主要从事天然产物化学及生物活性研究。联系电话:(010)66930644,E-mail:zhushuaiming@aliyun.com。
[通讯作者] *单俊杰,女,研究员,主要从事中药新药研发和多糖化学研究。联系电话:(010)66930644,E-mail:shanjunjie001@126.com。*张有志,男,研究员,主要从事中药新药研发和中药药理学研究。联系电话:(010)66874620,E-mail:13901363887@163.com。
[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.12.010

were 1.0 mL·min^{-1} for fingerprinting and 1.2 mL·min^{-1} for quantitative assay, respectively. **Results**: In the HPLC fingerprinting, there were 29 common peaks in 14 batches of *Angelicae Dahuricae* Radix, and eight characteristic components were identified (xanthotol, 5-hydroxy-8-methoxypsoralen, oxypeucedanin hydrate, byakangelicin, xanthotoxin, bergapten, isoimpinellin, imperatorin, and phellopterin). The fingerprints of the 14 batches of *Angelicae Dahuricae* Radix were similar and the similarities were greater than 0.980. The linear ranges of xanthotoxol, 5-hydroxy-8-methoxypsoralen, oxypeucedanin hydrate, byakangelicin, xanthotoxin, bergapten, imperatorin, and phellopterin were 3.24 ~ 162.00, 2.86 ~ 143.00, 3.10 ~ 155.00, 2.98 ~ 149.00, 3.12 ~ 156.00, 3.02 ~ 151.0, 3.16 ~ 158.00, and 2.30 ~ 115.00 μg·mg^{-1}, respectively. The content ranges of xanthotoxol, 5-hydroxy-8-methoxypsoralen, oxypeucedanin hydrate, byakangelicin, xanthotoxin, bergapten, imperatorin, and phellopterin were 0.14 ~ 0.37, 0.26 ~ 0.39, 2.31 ~ 3.48, 1.09 ~ 2.22, 0.04 ~ 0.26, 0.19 ~ 0.34, 0.03 ~ 0.14, and 0.11 ~ 0.23 μg·mg^{-1}, respectively for the 14 batches of *Angelicae Dahuricae* Radix. **Conclusion**: The established methods of HPLC fingerprinting and quantitative analysis are reproducible, reliable, and stabile. In the future, these methods can be used for the quality control of original, processed materials and products of *Angelicae Dahuricae* Radix.

[**Key words**] *Angelicae Dahuricae* Radix; water-decocted extract; fingerprinting; content determination

白芷为伞形科植物白芷[*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.]或杭白芷[*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. formosana (Boiss.) Shan et Yuan]的干燥根，其性温，气芳香，味辛、微苦，具有解表散寒、祛风止痛、宣通鼻窍、燥湿止带、消肿排脓之功效，临床用于治疗感冒头痛、眉棱骨痛、鼻塞流涕、鼻渊、牙痛、带下和疮疡肿痛等[1]。白芷为临床常用大宗药材之一，据统计，中成药处方数据库中收录含有白芷的中成药品种达到565个，中药方剂数据库中收录含有白芷的方剂高达1 836条[2]，其中包含九味羌活汤、柴葛解肌汤、仙方活命饮、川芎茶调散、大秦艽汤、玉真散、藿香正气散、加味五积饮、白术石斛汤、加味辛夷散、白虎葛根汤和加味清凉饮等经典名方[3]。现代药理研究表明白芷具有镇痛、抗炎、保护神经、保肝、舒张血管、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、抗过敏、美白等作用[4]。

白芷主要含有香豆素类、挥发油类、多糖类、氨基酸类、生物碱类和苷类等多种化学成分，其中含量较高和研究报道较多为香豆素类，其次为挥发油类[5-7]。目前对白芷药材、饮片、配方颗粒等质量控制方面研究和报道较多，但也存在明显不足：《中华人民共和国药典》2020年版采用TLC法鉴别白芷药材乙醚提取物(非水溶性成分)，采用HPLC法仅测定其药材甲醇提取物(非水提物)中欧前胡素的含量[1]，无法对白芷水提物进行有效质量控制。另外，虽然目前有较多文献研究白芷药材和饮片的指纹图谱及多成分含量测定，但多用甲醇、乙醇或不同比例的醇-水作为溶剂，对药材或饮片进行提取后作为供试品，再采用HPLC、UPLC或HPLC-MS等方法进行指纹图谱和多成分含量测定[8-12]。目前尚未见有关白芷药材或饮片水煎提取物的指纹图谱和多成分含量测定方法研究和报道。

白芷饮片作为临床较多复方制剂中的重要药味之一，其临床应用、新药研发和经典名方的开发主要采用水煎方法提取和服用，因此建立白芷药材和饮片水煎提取物的HPLC指纹图谱及多个特征成分的含量测定方法，对有效控制白芷药材、饮片、中间体及复方制剂质量有重要意义。

材料与方法

1 药材和试剂

1.1 药材

收集不同省份14批白芷饮片的编号、产地、饮片生产企业及批号，详见表1。白芷对照药材购自中国食品药品检定研究院(批号：120945-202111)。

表1 14批不同来源白芷饮片的信息

饮片编号	产地	生产企业	批号
1	四川省	北京万泰利克药业有限公司	142204029
2	四川省	安国市安兴中药饮片有限公司	221202
3	四川省	安国市安兴中药饮片有限公司	221001

续表 1

饮片编号	产地	生产企业	批号
4	四川省	云南宗顺药业饮片有限公司	C220821003
5	四川省	河北国松堂制药有限公司	3221102
6	四川省	贵州山海桐嘉药业有限公司	20220301
7	四川省	吉林敖东世航药业股份有限公司	22091101
8	安徽省	亳州市永刚饮片厂有限公司	A220811
9	安徽省	安徽省佗源堂药业有限公司	221001
10	安徽省	桂林中南(亳州)药业科技有限公司	20220401
11	安徽省	湖南药圣堂中药科技有限公司	20220201
12	河南省	北京燕北饮片厂	200616
13	河南省	北京燕北饮片厂	201116
14	重庆市	北京同仁堂(安国)中药饮片有限公司	2403043

1.2 对照品和试剂

花椒毒素(批号:112077-202101,纯度:99.7%)、佛手柑内酯(批号:112078-202101,纯度:99.2%)、欧前胡素(批号:110826-202219,纯度:99.0%)均购自中国食品药品检定研究院;水合氧化前胡素(批号:B21189,纯度:HPLC≥98%)、花椒毒酚(批号:B20537,纯度:HPLC≥98%)、白当归素(批号:B20027,纯度:HPLC≥98%)、异茴芹内酯(批号:B21533,纯度:HPLC≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;5-羟基-8-甲氧基补骨脂素(批号:PU0969-0010MG,纯度:HPLC≥98%)和珊瑚菜素(批号:PU0168-10MG,纯度:HPLC≥98%)均购自成都普思生物科技有限公司;甲醇、乙腈(Fisher Scientific 公司,色谱纯);正丁醇、乙醇、甲酸、乙酸、硫酸、碘(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);磷酸(北京伊诺凯科技有限公司,分析纯);氨水(西陇化工股份有限公司,分析纯);超纯水(自制)。

1.3 仪器

Agilent Technologies 1260 series 型高效液相色谱仪(DAD 检测器,美国安捷伦科技有限公司);Agilent Technologies 1200 series 型高效液相色谱仪(紫外可见检测器,美国安捷伦科技有限公司);ZF－20D 型暗箱式紫外分析仪(巩义市予华仪器有限公司);H1650 型高速台式离心机(长沙湘仪离心仪器有限公司);BS124S 型和 BT 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Master-DHV 型实验室超纯水机(上海和泰仪器有限公司);C－300 型超声波清洗机(北京创新德超声电子研究所);DHG－9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);BZF－6920 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

2 白芷饮片及白芷对照药材的水煎干浸膏制备

称取不同批次的白芷饮片各 100 g,分别加入 1 000 mL 去离子水,室温浸泡 1 h 后,冷凝水回流煎煮 1 h,用 200 目不锈钢筛趁热过滤,滤渣再加入 1 000 mL 去离子水,重复煎煮一次,过滤。合并滤液,然后 55～60 ℃减压浓缩,浓缩液再转移至平盘中,置于 80 ℃烘箱中,继续挥发溶剂至浓浸膏。将浓浸膏置于 55 ℃真空干燥箱中,继续干燥至恒重,得到干浸膏,计算干浸膏得率。14 批饮片干浸膏名称分别为 S_1(1 号饮片)～S_{14}(14 号饮片)。称取白芷对照药材 1 g,同样按照上述方法,制备对照药材水煎干浸膏($S_{对}$)。

3 供试品溶液的配制

3.1 溶剂的选择

平行称取 6 份 100 mg 白芷饮片水煎干浸膏,分别置于 1.5 mL 离心管中,然后分别加入不同溶剂(水、10% 甲醇、20% 甲醇、30% 甲醇、40% 甲醇和 50% 甲醇溶液)各 1.0 mL,涡旋混合 10 min,离心(3 000 r·min^{-1},10 min),观察各离心管中沉淀量。结果表明加入 30% 甲醇的离心管中沉淀很少,样品溶解最好,因此选择 30% 甲醇溶液作为溶剂,用于供试品溶液的配制。

3.2 HPLC 指纹图谱供试品溶液的配制

3.2.1 单一对照品溶液的配制　分别称取花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、异茴芹内酯、欧前胡素和珊瑚菜素对照品各 3.00 mg,分别置于 5 mL 容量瓶中,各加入甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 0.562 mg·mL^{-1}花椒毒酚、0.548 mg·mL^{-1} 5-羟基-8-

甲氧基补骨脂素、0.528 mg·mL^{-1}水合氧化前胡素、0.536 mg·mL^{-1}白当归素、0.530 mg·mL^{-1}花椒毒素、0.512 mg·mL^{-1}佛手柑内酯、0.502 mg·mL^{-1}异茴芹内酯、0.508 mg·mL^{-1}欧前胡素和0.542 mg·mL^{-1}珊瑚菜素的对照品溶液。

3.2.2 混合对照品溶液的配制 移取“**3.2.1**”项下花椒毒酚、5-羟基-8甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、异茴芹内酯、欧前胡素和珊瑚菜素对照品溶液各1.0 mL,置于10 mL容量瓶中,加甲醇溶解和定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

3.2.3 待测样品溶液的配制 称取14批白芷饮片水煎干浸膏各10.0 mg,分别置于1.5 mL离心管中,然后各加入30%甲醇水溶液1 mL,超声溶解10 min,离心(3 000 r·min^{-1},10 min),0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液,即得待测样品供试品溶液。

3.3 白芷水煎浸膏含量测定的供试品溶液配制

3.3.1 混合对照品溶液的配制 称取花椒毒酚1.62 mg、5-羟基-8甲氧基补骨脂素1.43 mg、水合氧化前胡素1.55 mg、白当归素1.49 mg、花椒毒素1.56 mg、佛手柑内酯1.51 mg、欧前胡素1.58 mg和珊瑚菜素1.15 mg置于10 mL容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

3.3.2 待测样品溶液的配制 称取14批白芷饮片水煎浸膏各30.0 mg,分别置于1 mL容量瓶中,然后各加入30%甲醇水溶液定容至刻度,超声溶解10 min,转移至1.5 mL离心管中,离心(3 000 r·min^{-1},10 min),0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液,即得待测样品供试品溶液。

4 白芷饮片水煎干浸膏的HPLC指纹图谱建立

4.1 色谱条件

色谱柱:SinoChrom ODS-BP(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.025%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:0~40 min,5%→20% B;40~50 min,20%→55% B;50~70 min,25%→30% B;70~80 min,30%→45% B;80~100 min,45%→55% B;100~115 min,100% B;115~125 min,100%→5% B;检测波长:220 nm;柱温:35 ℃;流速:1.0 mL·min^{-1};进样体积:20 μL。

4.2 方法学考察

4.2.1 专属性实验 分别移取S_{12}供试品溶液、混合对照品溶液和流动相溶液(空白对照)各20 μL,按“**4.1**”项下色谱条件注入液相色谱仪,记录色谱图,检测色谱峰的专属性。

4.2.2 精密度实验 移取S_{12}供试品溶液,按“**4.1**”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以白当归素(18号峰)为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算RSD。

4.2.3 稳定性实验 称取S_{12}干浸膏,按“**3.2.3**”项下方法制备供试品溶液,按“**4.1**”项下色谱条件,分别在0、3、6、9、12、36、48、60和72 h注入液相色谱仪,记录色谱图,以白当归素(18号峰)为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算RSD。

4.2.4 重复性实验 平行称取6份S_{12}干浸膏,分别按“**3.3.2**”项下方法配制供试品溶液,然后按“**4.1**”项下色谱条件注入液相色谱仪,记录色谱图。以白当归素(18号峰)为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,计算RSD。

4.3 白芷饮片水煎干浸膏的HPLC指纹图谱建立和分析

4.3.1 对照指纹图谱的生成 分别移取S_1~S_{14}供试品溶液,按照“**4.1**”项下色谱条件注入色谱仪,记录色谱图。将S_1~S_{14}样品的HPLC图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件中,设定S_1样品为参照色谱图,选取时间窗宽度设为0.3 min,通过平均数法生成对照指纹图谱。

4.3.2 色谱峰的确认 分别移取“**3.2.1**”项下单一对照品溶液、混合对照品溶液以及S_1~S_{14}的供试品溶液,按照“**4.1**”项下色谱条件分别注入色谱仪,记录色谱图。通过比对色谱图中对照品和供试品色谱峰的保留时间及紫外吸收光谱图,确认色谱峰的化学成分。

4.3.3 指纹图谱相似度分析 分别移取S_1~S_{14}供试品溶液,按照“**4.1**”项下色谱条件注入色谱仪,记录色谱图。将S_1~S_{14}样品的HPLC图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件中,设定S_1样品为参照色谱图,选取时间窗宽度设为0.3 min,通过平均数法生成对照指纹图谱。然后运用多点校正对色谱峰进行匹配,计算其相似度。

4.3.4 聚类分析 采用SPSS 22.0软件,以S_1~S_{14}样品的HPLC指纹图谱中29个共有峰的峰面积为变量,采用组间联接的聚类方法,以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析。

4.3.5 主成分分析 采用SPSS 22.0软件对S_1~S_{14}样品的HPLC指纹图谱中29个共有峰峰面积进

行标准化处理后,然后进行主成分分析。

5 HPLC 测定白芷饮片水煎浸膏中 8 个特征成分含量的方法建立

5.1 色谱条件

色谱仪:Agilent 1200;色谱柱:SinoChrom ODS-BP(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.025%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:0 ~ 20 min,20% ~25% B;20 ~ 50 min,25% ~30% B;50 ~ 70 min,30% ~50% B;70 ~ 80 min,50% ~55% B;80 ~ 90 min,55% ~100% B;90 ~ 95 min,100% B;95 ~ 100 min,100% ~20% B;流速:1.2 mL·min^{-1};柱温:40 ℃;检测波长:220 nm;进样体积:20 μL。

5.2 方法学考察

5.2.1 专属性考察 移取 S_{12}样品供试品溶液、混合对照品溶液和流动相溶液(空白对照)各 20 μL,按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪,通过色谱峰比对,确定方法的专属性。

5.2.2 精密度考察 称取 S_{12}浸膏样品 10.0 mg,置于 1 mL 容量瓶中,然后加入 30% 甲醇水溶液定容至刻度线,超声溶解10 min,转移至 1.5 mL 离心管中,离心(3 000 r·min^{-1},10 min),上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,按“**5.1**”项下色谱条件连续进样 6 次,记录 8 个对照品对应的色谱峰峰面积,计算 RSD。

5.2.3 稳定性考察 称取 S_{12}浸膏样品 10.0 mg,置于 1 mL 容量瓶中,然后加入 30% 甲醇水溶液定容至刻度线,超声溶解10 min,转移至 1.5 mL 离心管中,离心(3 000 r·min^{-1},10 min),上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,按“**5.1**”项下色谱条件分别在配制溶液后 0、4、8、12、24、36、48、60 和 72 h 注入色谱仪,记录 8 个对照品对应色谱峰的峰面积,计算不同时间点 RSD。

5.2.4 重复性考察 平行称取 6 份 S_{12}浸膏样品 10.0 mg,分别置于 1 mL 容量瓶中,加入 30% 甲醇水溶液定容至刻度线,超声溶解 10 min,转移至 1.5 mL 离心管中,离心(3 000 r·min^{-1},10 min),上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,按“**5.1**”项下色谱条件分别注入色谱仪,记录 8 个对照品对应的色谱峰峰面积,计算 RSD。

5.2.5 检测限与定量限 取混合对照品溶液,稀释适当倍数,按“**5.1**”项下色谱条件进样分析,信噪比(S/N) = 3 为检测限,S/N = 10 为定量限。

5.2.6 线性关系考察 称取花椒毒酚 1.62 mg、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素 1.43 mg、水合氧化前胡素 1.55 mg、白当归素 1.49 mg、花椒毒素 1.56 mg、佛手柑内酯 1.51 mg、欧前胡素 1.58 mg 和珊瑚菜素 1.15 mg 置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得混合对照品母溶液。

将混合对照品母溶液用甲醇分别按 4∶5、3∶5、2∶5、1∶5、1∶10、1∶20、1∶50 和 1∶100 进行稀释,获得 8 个不同浓度的混合对照品稀释溶液。然后各取 20 μL 注入色谱仪,以色谱峰面积(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,计算标准曲线方程。

5.2.7 加样回收率考察 方法一:平行称取 9 份 S_{12}浸膏样品 10.0 mg,分别置于 1 mL 容量瓶中,分别按照 50%、100% 和 150% 这 3 个水平加入水合氧化前胡素和白当归素对照品溶液,配制加样回收实验的供试品溶液。按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪,记录这 2 个成分的色谱峰峰面积,代入标准方程,计算加样回收率及 RSD。

方法二:平行称取 9 份 S_{12}浸膏样品 30.0 mg,分别置于 1 mL 容量瓶中,分别按照 50%、100% 和 150% 这 3 个水平加入花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素对照品溶液,配制加样回收实验的供试品溶液。按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪,记录 6 个对照品成分对应的色谱峰峰面积,代入标准方程,计算加样回收率及 RSD。

5.3 测定不同批次白芷饮片水煎浸膏中 8 个特征成分的含量

称取 S_1 ~ S_{14}浸膏样品,按“**3.3.2**”项下方法配制供试品溶液,然后按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪,分别记录花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素对应的色谱峰峰面积,代入线性标准方程,计算样品中该 8 个特征成分的含量。

结 果

1 白芷饮片水煎干浸膏 HPLC 指纹图谱的建立

1.1 方法学考察结果

1.1.1 专属性 移取混合对照品溶液、S_{12}供试品溶液和空白对照溶液(流动相)各 20 μL,按照“**4.1**”项下色谱条件分别进样,其色谱图见图 1。从图中可以看出,混合对照品溶液中 9 个色谱峰和 S_{12}供试品溶液中 29 个特征峰在空白对照溶液中均无显示,提示该方法专属性良好。

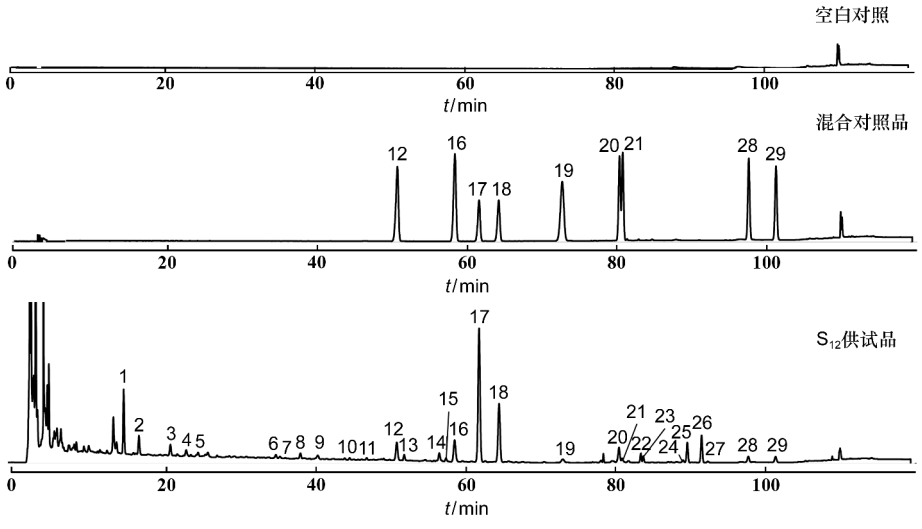


图 1 HPLC 指纹图谱专属性考察

1.1.2 精密度 移取 S_{12} 供试品溶液 20 μL,按照“**4.1**”项下色谱条件重复进样 6 次,计算各特征峰的相对保留时间和相对面积。结果表明特征峰的相对保留时间 RSD < 0.71%,相对峰面积 RSD < 4.17%,提示该方法精密度良好。

1.1.3 稳定性 移取 S_{12} 浸膏供试品溶液,按照“**4.1**”项下色谱条件,分别在配制溶液后 0、3、6、9、12、36、48、60 和 72 h 进样,计算在不同时间点色谱图中各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明不同时间点各特征峰的相对保留时间 RSD < 0.98%,相对峰面积 RSD < 4.78%,提示供试品溶液在 3 d 内稳定性良好。

1.1.4 重复性 平行称取 6 份 S_{12} 浸膏样品,按照“**3.3.2**”项下方法配制供试品溶液 6 份,然后按照“**4.1**”项下色谱条件分别进样,计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明各特征峰相对保留时间的 RSD < 0.72%,相对峰面积 RSD < 4.48%,提示该方法重复性良好。

1.2 白芷饮片水煎浸膏 HPLC 指纹图谱的建立

分别将 S_1 ~ S_{14} 浸膏样品的供试品溶液按“**4.1**”项下色谱条件注入色谱仪中,记录其 HPLC 色谱图。将得到的 HPLC 图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件中进行色谱峰匹配,结果表明 14 个批次的白芷水煎浸膏供试品溶液经比较其色谱图和计算相对保留时间,其中有 29 个峰确定为共有峰。建立了以 29 个共有峰为构成的 S_1 ~ S_{14} 批次白芷饮片水煎浸膏的指纹图谱(见图 2),并建立其对照指纹图谱(见图 3)。

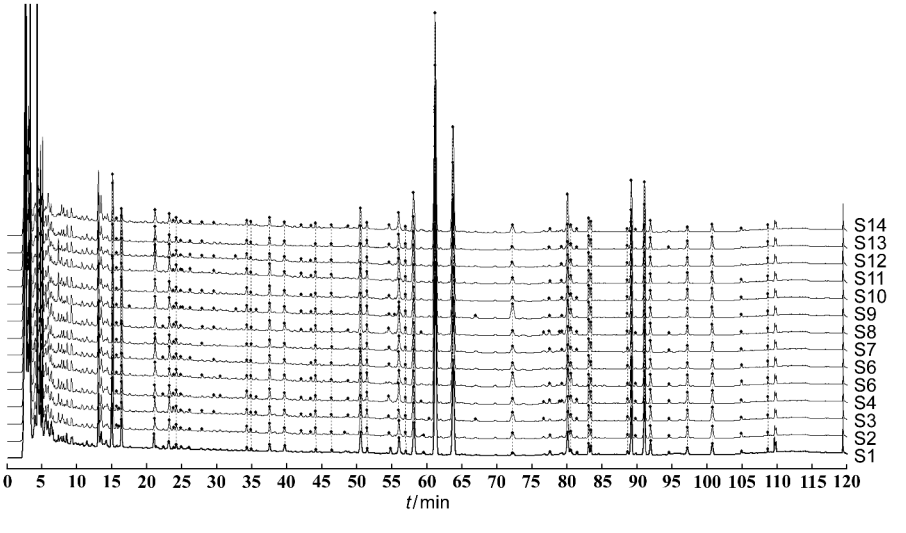


图 2 S_1 ~ S_{14} 白芷饮片水煎浸膏样品的 HPLC 指纹图谱

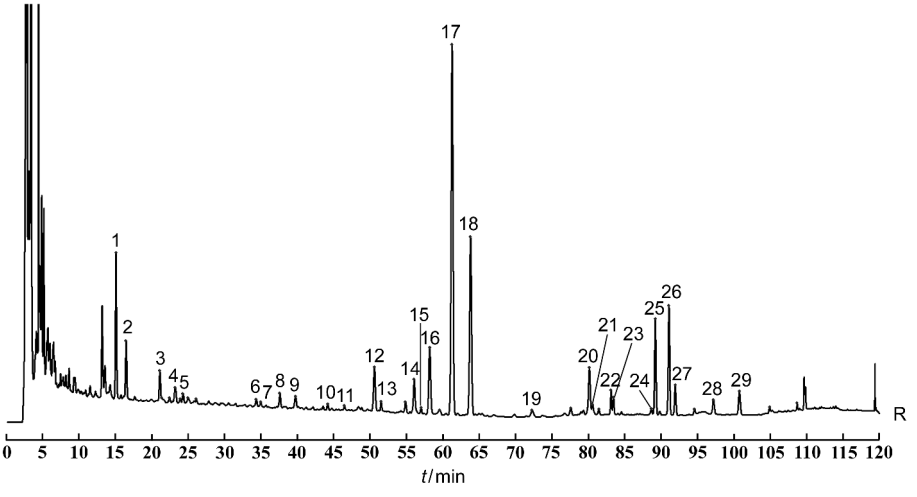


图 3 白芷饮片水煎浸膏的 HPLC 对照指纹图谱(R)

1.3 指纹图谱中部分色谱峰的成分指认

按照“**4.1**”项下色谱条件,将花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、异茴芹内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的单一对照品溶液及其混合对照品溶液分别进样,通过比对其相对保留时间,确认混合对照品色谱图中 9 个单一成分的色谱峰位置,然后再将 S_{12} 供试品溶液进样,比对混合对照品中 9 个成分色谱峰和 S_{12} 供试品溶液所对应色谱峰的保留时间以及紫外光谱图,确认 S_{12} 样品中含有花椒毒酚(14 号峰)、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素(16 号峰)、水合氧化前胡素(17 号峰)、白当归素(18 号峰)、花椒毒素(19 号峰)、佛手柑内酯(20 号峰)、异茴芹内酯(21 号峰)、欧前胡素和珊瑚菜素(28 和 29 号峰)。9 个成分的紫外光谱见图 4。

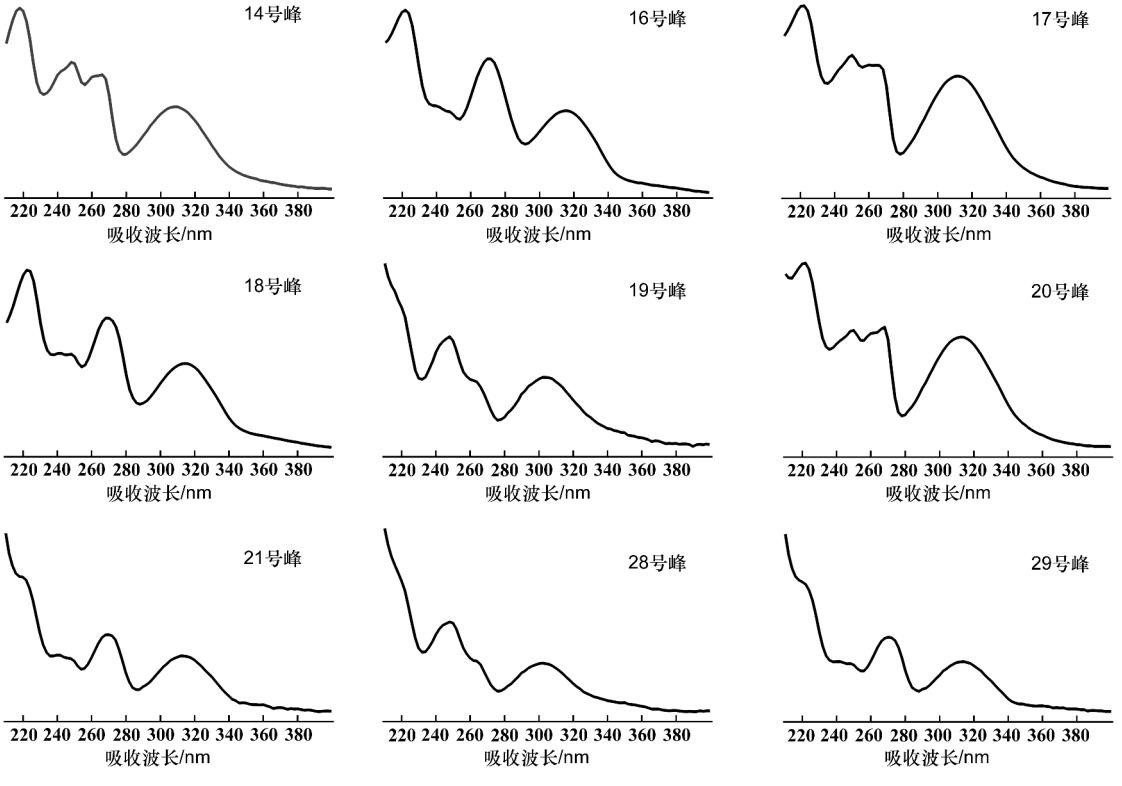


图 4 S_{12} 样品中 9 个色谱峰的紫外光谱

1.4 指纹图谱相似性评价结果

将 14 批白芷饮片水煎浸膏(S_1 ~ S_{14})供试品溶液的 HPLC 色谱图数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件中,采用夹角余弦法计算相似度。实验结果显示 14 批白芷饮片水煎浸膏的指纹图谱与所生成的对照图谱相似度均在 0.980 以上,相似度平均值为 0.995,提示这 14 批白芷饮片水煎浸膏所含成分相似度较好。

1.5 聚类分析

以 14 批次白芷饮片水煎浸膏(S_1 ~ S_{14})供试品溶液的 HPLC 指纹图谱中 29 个共有峰的峰面积为变量,采用组间联接的聚类方法,以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析,分析结果见图 5。数据表明,当平方欧氏距离为 25 时,S_1 ~ S_{14}白芷饮片水煎浸膏可聚为 2 类:其中 S_4(四川省)、S_{14}(重庆市)和 S_8(安徽省)聚为一类,相似度为 0.994 ~ 0.997;其他 11 个批次白芷饮片浸膏聚为一类,相似度为 0.987 ~ 0.998。当平方欧氏距离为 5 时,可聚为 6 类:其中 S_8(安徽省)、S_{10}(安徽省)和 S_{11}(安徽省)各自单独聚为一类,相似度分别为 0.994、0.997 和 0.993;S_4(四川省)和 S_{14}(重庆市)聚为一类,相似度分别为 0.996 和 0.997;S_2(四川省)、S_3(四川省)、S_5(四川省)、S_6(四川省)和 S_{12}(河南省)聚为一类,相似度分别为 0.993、0.993、0.987、0.996 和 0.995;S_1(四川省)、S_7(四川省)、S_9(安徽省)和 S_{13}(河南省)聚为一类,相似度分别为 0.996、0.998、0.996 和 0.998。结果提示四川省与河南省产地的白芷饮片相似性好,四川省和重庆市产地白芷相似性良好,安徽省产地白芷与其他产地的白芷饮片存在一定差异。

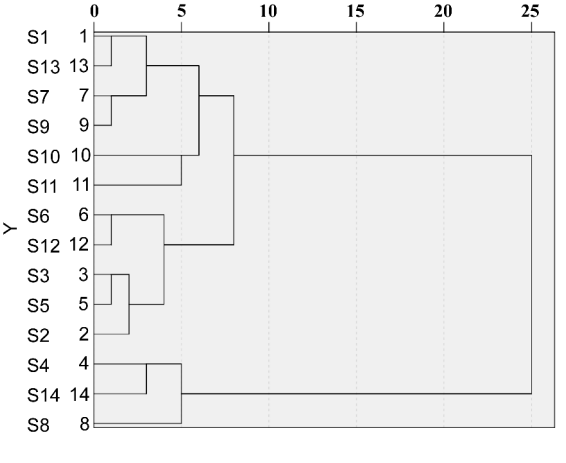


图 5 白芷饮片水煎浸膏 S_1 ~ S_{14}的聚类分析树状图

1.6 主成分分析

将 14 批白芷饮片水煎浸膏(S_1 ~ S_{14})供试品溶液 HPLC 指纹图谱中 29 个共有峰峰面积进行主成分分析,以特征值 >1 为提取标准,共提取出 7 个主成分,累计其方差贡献率为 92.02%,提示该 7 个成分可代表白芷饮片水煎浸膏指纹图谱共有峰的大部分信息。将特征向量作为系数计算各主成分得分,以主成分的贡献率为权重计算综合得分。再将标准化后的原始数据带入主成分表达式,计算 14 批次白芷饮片水煎浸膏样品的主成分得分(Z_1、Z_2、Z_3、Z_4、Z_5、Z_6、Z_7)。再根据各主成分的贡献率,计算出综合得分。综合得分公式:$Z = Z_1 \times 0.296\ 13 + Z_2 \times 0.181\ 76 + Z_3 \times 0.150\ 84 + Z_4 \times 0.126\ 96 + Z_5 \times 0.078\ 51 + Z_6 \times 0.047\ 49 + Z_7 \times 0.038\ 49$。方差分析结果见表 2。结果显示安徽省的白芷饮片水煎浸膏综合得分最高,提示安徽省的白芷饮片质量优于其他产地,四川省、重庆市和河南省产地的白芷饮片依次为佳。

表 2 7 个主成分的特征值和累计方差贡献率

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	8.588	29.613	29.613
2	5.271	18.176	47.789
3	4.374	15.084	62.873
4	3.682	12.696	75.569
5	2.277	7.851	83.42
6	1.377	4.749	88.169
7	1.116	3.849	92.018

2 白芷水煎浸膏中 8 个特征成分含量测定方法的建立

2.1 方法学考察结果

2.1.1 专属性 白芷饮片水煎浸膏 S_{12}供试品溶液、对照品混合溶液和空白对照溶液(流动相)分别注入液相色谱仪,检测色谱峰的专属性,结果见图 6。从图中可以看出,混合对照品溶液的 8 个色谱峰和 S_{12}供试品溶液中 8 个待测成分的色谱峰在空白对照溶液色谱图中均无显示,提示该方法专属性良好。

2.1.2 精密度 移取 S_{12}样品供试品溶液 20 μL,按“**5.1**”项下色谱条件连续进样 6 次,分别记录花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的峰面积,该 8 个成分峰面积的 RSD 分别为 0.87%、0.72%、0.92%、0.89%、1.00%、0.51%、0.25% 和 0.33%,提示该方法精密度良好。

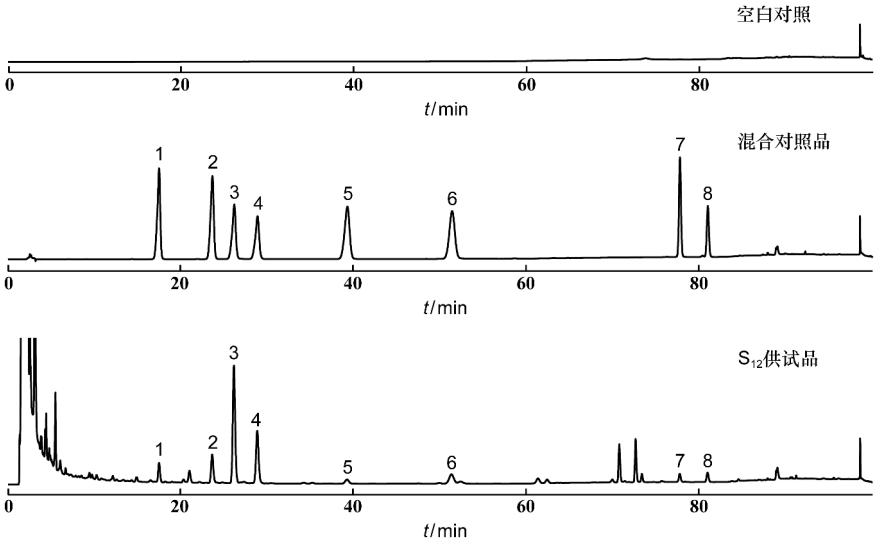


图 6 专属性考察结果

2.1.3 稳定性 配制 S_{12}样品供试品溶液,分别在配制的 0、4、8、12、24、36、48、60 和 72 h 按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪,记录花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的峰面积,该 8 个成分峰面积的 RSD 分别为 3.80%、0.74%、0.93%、1.56%、2.16%、1.45%、2.70% 和 1.64%,提示该方法在 72 h 内稳定性良好。

2.1.4 重复性 平行称取 6 份 S_{12}浸膏样品,配制 6 份供试品溶液。分别移取 20 μL,按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪,记录花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的峰面积,该 8 个成分峰面积的 RSD 分别为 4.74%、1.74%、1.56%、2.29%、3.23%、2.25%、3.20% 和 2.56%,提示该方法的重复性良好。

2.1.5 检出限和定量限 混合对照品溶液按 5 倍稀释法逐级稀释,得到一系列不同稀释浓度的溶液,然后分别注入色谱仪,以 $S/N = 3$ 确定检测限,以 $S/N = 10$ 确定定量限。结果表明花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的检出限分别为 0.07、0.07、0.08、0.07、0.08、0.08、0.03 和 0.06 ng,定量限分别为 0.36、0.32、0.54、0.89、0.55、0.91、0.12 和 0.11 ng。

2.1.6 线性关系 分别移取不同浓度花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的混合对照品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,以样品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制 8 个对照品的回归方程及线性范围见表 3,其标准曲线见图 7。

表 3 8 个对照品峰面积与浓度的线性方程及线性范围

对照品	线性方程	线性范围/μg·mL^{-1}
花椒毒酚	$A = 104.59C + 47.472$, $R^2 = 0.9993$	3.24 ~ 162.00
5-羟基-8 甲氧基补骨脂素	$A = 120.02C + 43.457$, $R^2 = 0.9994$	2.86 ~ 143.00
水合氧化前胡素	$A = 79.508C + 15.834$, $R^2 = 0.9993$	3.10 ~ 155.00
白当归素	$A = 69.289C + 25.335$, $R^2 = 0.9994$	2.98 ~ 149.00
花椒毒素	$A = 105.44C + 38.016$, $R^2 = 0.9993$	3.12 ~ 156.00
佛手柑内酯	$A = 110.51C + 41.683$, $R^2 = 0.9993$	3.02 ~ 151.00
欧前胡素	$A = 80.329C + 39.024$, $R^2 = 0.9993$	3.16 ~ 158.00
珊瑚菜素	$A = 59.386C + 16.231$, $R^2 = 0.9994$	2.30 ~ 115.00

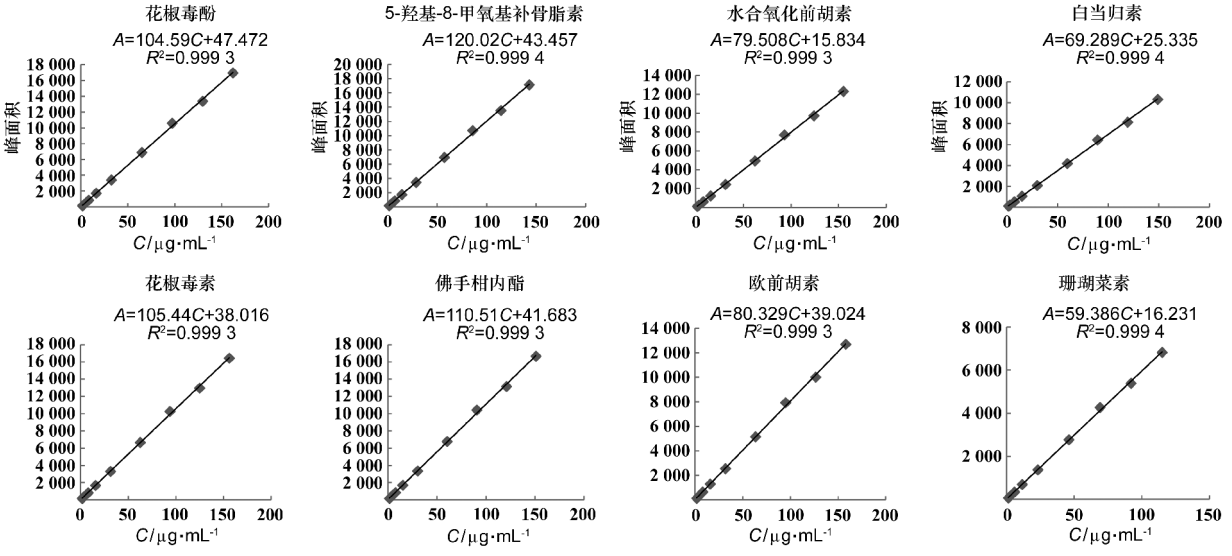


图 7 8 个对照品的峰面积与浓度的线性曲线

2.1.7 加样回收率 方法一：移取按“**5.2.7**”项下方法配制的 S_{12} 样品供试品溶液，将水合氧化前胡素和白当归素对照品分别按照浸膏样品溶液浓度的 50%、100%、150% 添加，制备加样回收实验的供试品溶液。按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪，记录水合氧化前胡素和白当归素的峰面积，代入线性方程和回收率计算公式，计算得到水合氧化前胡素 3 个不同加样量的平均加样回收率为 97.8%，RSD 为 4.51%。白当归素 3 个不同加样量的平均加样回收率为 93.2%，RSD 为 4.68%。提示水合氧化前胡素和白当归素的加样回收率良好。

方法二：按“**5.2.7**”项下方法配制 S_{12} 样品供试品溶液，将花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素对照品分别按照浸膏样品溶液浓度的 50%、100%、150% 添加，制备加样回收实验的供试品溶液。按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪，分别记录花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的峰面积，代入线性方程和回收率计算公式，计算得到花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的平均加样回收率分别为 104.9%、90.3%、106.1%、85.2%、92.4% 和 92.5%，其 RSD 分别为 4.38%、3.65%、3.57%、2.23%、4.85% 和 4.72%。提示花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的加样回收率良好。

2.2 白芷饮片水煎浸膏样品（S_1 ~ S_{14}）中 8 种成分的含量测定

移取 14 批白芷饮片水煎浸膏（S_1 ~ S_{14}）的供试品溶液，按“**5.1**”项下色谱条件注入色谱仪，分别测定花椒毒酚、5-羟基-8 甲氧基补骨脂素、水合氧化前胡素、白当归素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和珊瑚菜素的峰面积，各代入其标准曲线方程，计算 S_1 ~ S_{14} 样品中 8 种特征成分含量，测定结果见表 4。14 批次白芷饮片水煎浸膏中花椒毒酚含量范围为 0.14 ~ 0.37 μg·mg^{-1}，5-羟基-8 甲氧基补骨脂素含量为 0.26 ~ 0.39 μg·mg^{-1}，水合氧化前胡素含量为 2.31 ~ 3.48 μg·mg^{-1}，白当归素含量为 1.09 ~ 2.22 μg·mg^{-1}，花椒毒素含量为 0.04 ~ 0.26 μg·mg^{-1}，佛手柑内酯含量为 0.19 ~ 0.34 μg·mg^{-1}，欧前胡素含量为 0.03 ~ 0.14 μg·mg^{-1}，珊瑚菜素含量为 0.11 ~ 0.23 μg·mg^{-1}。

表 4 S_1 ~ S_{14} 水煎浸膏中 8 种特征性成分含量测定结果

样品	含量/μg·mg^{-1}							
	花椒毒酚	5-羟基-8-甲氧基补骨脂素	水和氧化前胡素	白当归素	花椒毒素	佛手柑内酯	欧前胡素	珊瑚菜素
S1	0.24	0.30	2.57	1.54	0.04	0.19	0.06	0.15
S2	0.37	0.34	2.31	1.32	0.10	0.25	0.11	0.17
S3	0.26	0.33	2.46	1.12	0.15	0.21	0.11	0.20

续表 4

样品	含量/μg·mg^{-1}							
	花椒毒酚	5-羟基-8-甲氧基补骨脂素	水和氧化前胡素	白当归素	花椒毒素	佛手柑内酯	欧前胡素	珊瑚菜素
S4	0.31	0.32	3.48	1.97	0.09	0.32	0.13	0.22
S5	0.35	0.35	2.32	1.09	0.23	0.29	0.13	0.22
S6	0.19	0.31	2.36	1.11	0.10	0.21	0.06	0.15
S7	0.14	0.26	2.44	1.45	0.10	0.21	0.06	0.14
S8	0.30	0.36	3.18	2.22	0.09	0.32	0.10	0.19
S9	0.24	0.30	2.66	1.52	0.26	0.30	0.10	0.18
S10	0.34	0.39	3.16	2.03	0.07	0.34	0.14	0.23
S11	0.18	0.39	2.72	1.55	0.11	0.28	0.13	0.22
S12	0.25	0.36	2.45	1.39	0.09	0.25	0.11	0.18
S13	0.25	0.34	2.96	1.71	0.07	0.25	0.09	0.19
S14	0.19	0.36	3.09	1.81	0.11	0.32	0.03	0.11

讨　论

现代药理学研究表明白芷有镇痛、抗炎、舒张血管、抗肿瘤、抗过敏、美白等作用。目前对于白芷药材甲醇提取物、乙醇提取物、挥发油提取物、香豆素类提取物及其配方颗粒的指纹图谱均有研究和报道,但其 HPLC 指纹图谱普遍存在一个共性特点,即采用甲醇或乙醇对白芷药材或饮片进行提取,制备甲醇或乙醇的提取物作为供试品,建立 HPLC 指纹图谱[8-12]。有学者将水煎制备的白芷配方颗粒同样采用甲醇萃取,仅对甲醇萃取部分建立 HPLC 指纹图谱,因此无法真实反映白芷配方颗粒的整体化学信息[15]。本课题组前期采用甲醇萃取白芷水煎浸膏,得到的甲醇萃取物质量仅为水煎浸膏的 1/3。

本文建立白芷水煎浸膏的 HPLC 指纹图谱和特征成分含量测定方法的研究过程中,有以下 4 个关键要点。① 供试品的溶解条件:筛选合适溶剂,应尽可能将待测样品进行最大溶解,避免丢失重要活性成分信息;② 色谱柱的选择:须考察不同极性的 HPLC 色谱柱对水煎浸膏的分离效果。本文考察了 Supersil ODS2、Supersil ODS-B、SinoChrom ODS-BP 和 SinoChrom ODS-AQ 这 4 种极性不同的色谱柱对白芷水煎浸膏的分离效果,发现 SinoChrom ODS-BP 色谱柱对白芷饮片水溶性成分的分离效果最好;③ 检测波长的选择:建议使用 DAD 检测器,能对待测样品进行全波长扫描。建议重点关注 200、220、254、280 和 365 nm 等波长下的色谱峰,选择色谱峰数量和特征性成分数量多的波长用于指纹图谱,选择待测特征成分吸收强度大的波长用于含量测定;④ 不同 pH 值流动相对白芷水煎浸膏的色谱峰分离也有一定的影响,推测不同 pH 值可能影响供试品中某些化学成分的性质和结构。

[参 考 文 献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 109 - 110.
[2] 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.
[3] ZHAO H, FENG YL, WANG M, *et al*. The Angelica dahurica: a review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 896637.
[4] BATIHA GES, SHAHEEN HM, ELHAWARY EA, *et al*. Phytochemical constituents, folk medicinal uses, and biological activities of genus Angelica: a review[J]. *Molecules*, 2023, 28: 267.
[5] 温建牛, 石钰, 杨万青, 等. 白芷中香豆素类成分研究[J]. 中草药, 2024, 55(19): 6465 - 6473.
[6] 潘明霞, 赵淑军, 刘洁, 等. 白芷中香豆素类化合物的超临界流体色谱分离方法研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(6): 1120 - 1128.
[7] 田恩伟, 成欣, 刘银榕, 等. 五类栽培白芷与兴安白芷的挥发油成分及其化学亲缘关系[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(3): 360 - 366.
[8] 刘志荣, 张明童, 张平, 等. 高效液相色谱法同时测定白芷饮片中的 9 种香豆素成分及其质量分析[J]. 化学试剂, 2022, 44(10): 1513 - 1518.
[9] 章军, 王跃生, 何希荣. RP-HPLC 指纹图谱鉴别不同品种白芷饮片的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(7): 1 - 4.
[10] 张烨, 孙艳雪, 马宇衡, 等. 白芷 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 食品与药品, 2020, 22(2): 130 - 134.
[11] 陈菊英, 黎晓丽, 雷桥仕, 等. 白芷香豆素类成分的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2019, 42(4): 845 - 849.
[12] GAO FY, CHEN HY, LUO YS, *et al*. "Q-markers targeted screening" strategy for comprehensive qualitative and quantitative analysis in fingerprints of Angelica dahurica with chemometric methods[J]. *Food Chem*, 2021, 12: 100162.
[13] 王婷婷, 李清, 宋爱华, 等. 白芷挥发油 GC 指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1340 - 1343.
[14] 高颖, 马逾英, 邹文莉. 白芷配方颗粒及市售同类产品质量对比研究[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1164 - 1167.
[15] 江洁怡, 胥爱丽, 李养学, 等. 白芷配方颗粒的指纹图谱研究[J]. 今日药学, 2017, 27(9): 612 - 616.

编辑:姚佳敏/接受日期:2025 - 12 - 29