

# 当归配方颗粒及饮片的 HPLC 特征图谱研究 及多成分含量分析\*

郭敏, 王婷婷, 安培坤, 罗燕燕, 王红丽<sup>△</sup>

甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050

**[摘要]** 目的:建立当归饮片及配方颗粒的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)特征图谱,进行相关性评价及4个成分含量分析。方法:应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”绘制18批样品指纹图谱,考察相似度;应用SPSS 22.0软件进行聚类分析,对当归药材及两个厂家(厂家A、厂家B)配方颗粒进行相关性评价及4个成分含量分析。结果:当归饮片及两个厂家配方颗粒HPLC特征图谱共有18个共有峰,相似度在0.698~1.000之间;指出绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯I、藁本内酯4个特征峰,线性方程分别为 $Y=8.5183X+40.389$ ( $R^2=0.9995$ )、 $Y=19.951X+4.7477$ ( $R^2=0.9994$ )、 $Y=52.466X+17.971$ ( $R^2=0.9994$ )、 $Y=5.03X+6.68$ ( $R^2=0.9993$ ),平均加样回收率分别为99.60%、99.09%、98.13%、98.09%,重复性、精密性、稳定性试验RSD均小于3%;聚类分析结果显示当距离为2时,18批样品可聚为二类,其中S1~S6、S7~S18各聚为一类,与相似度评价结果一致;与饮片相比,配方颗粒中增加4号峰,18号峰差异大。结论:当归饮片与配方颗粒、配方颗粒之间HPLC图谱具有较高的相似度,但仍存在差异,为配方颗粒的质量控制及临床应用提供参考。

**[关键词]** 当归;饮片;配方颗粒;高效液相色谱;相关性评价

**[中图分类号]** R286.0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2024)12-0001-06

## Study on HPLC Specific Chromatograms and Multi-component Content Analysis of Danggui Formula Granules and Decoction Pieces

GUO Min, WANG Tingting, AN Peikun, LUO Yanyan, WANG Hongli<sup>△</sup>

Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

**Abstract** Objective: To establish high performance liquid chromatography (HPLC) characteristic chromatograms of *Danggui* (*Angelica sinensis*) slices and its formula granules, and to conduct correlation evaluation and content analysis of the four components. Methods: The fingerprints of 18 batches of samples were plotted using the "similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (version 2012)" to investigate the similarity. Cluster analysis was performed with SPSS 22.0 software. The correlation evaluation and the content analysis of four components were performed on *Danggui* and the formula granules of two manufacturers (Manufacturer A and Manufacturer B). Results: There are 18 common peaks in the HPLC characteristic chromatograms of *Danggui* decoction pieces and the formula granules of the two manufacturers, with similarities ranging from 0.698 to 1.000; four characteristic peaks of chlorogenic acid, ferulic acid, ligustilide I and ligustilide were identified, and the linear equations are  $Y=8.5183X+40.389$  ( $R^2=0.9995$ ),  $Y=19.951X+4.7477$  ( $R^2=0.9994$ ),  $Y=52.466X+17.971$  ( $R^2=0.9994$ ),  $Y=5.03X+6.68$  ( $R^2=0.9993$ ), the average sample recovery rates were 99.60%, 99.09%, 98.13%, and 98.09% respectively. RSDs of the repeatability, precision, and stability tests were all less than 3%; the cluster analysis results showed that when the distance was 2, 18 batches of the samples can be clustered into two categories, of which S1 to S6 and S7 to S18 are each clustered into one category, which is consistent with the similarity evaluation results. Compared with the decoction pieces, peak No. 4 is added to the formula particles, and peak No. 18 has a large difference. Conclusion: The HPLC fingerprints of *Danggui* decoction pieces and formula granules, between formula granules show high similarity, but there are still differences, which could provide a reference for the quality control and clinical application of formula granules.

**Keywords** *Danggui*; decoction pieces; formula granules; HPLC; correlation evaluation

当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,别名干归、云归、秦归等<sup>[1-2]</sup>。当归主产于甘肃东南部,以岷县产量多、质量好,其次为云南、四川、陕西、湖北等省<sup>[3]</sup>。当

归是常用中药,具有补血活血、调经止痛、润燥通肠之功效<sup>[4-5]</sup>。在《中华人民共和国药典》中,当归的质量控制均以阿魏酸为指标,但单一成分不能全面、科学地反映药材的内在质量,亦不能体现中

药多成分、多靶点、多途径的作用特点。近年来,有研究采用指纹图谱技术对当归饮片进行质量控制,因其具有整体性、相似性的特点,能够体现中药的整体面貌<sup>[4-10]</sup>。当归配方颗粒由当归药材加工而成,易于携带和服用,但配方颗粒与饮片的功效是否一致,是广大患者及医务人员关注的焦点<sup>[11-12]</sup>。目前,基于指纹图谱技术研究当归配方颗粒与饮片的质量差异仍未见报道。笔者通过建立当归饮片及两个常用厂家配方颗粒的HPLC特征图谱,进行相关性评价及多成分含量分析,为配方颗粒的质量控制及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 infinity II series 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司,包括四元泵、DAD 检测器、Chem Station 工作站);CPA225D 型电子天平(Sartorius);SB-5200 型超声波清洗

机(宁波新芝生物科技股份有限公司);DL-5-B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药及试剂 18 批当归饮片(编号 S1~S6)、配方颗粒(厂家 A 编号 S7~S12,厂家 B 编号 S13~S18),分别由甘肃省中医院药学部饮片药房、颗粒药房提供,具体来源信息见表 1。对照品:洋川芎内酯 I(成都普菲德生物技术有限公司,批号:19121104,纯度≥98%);藁本内酯(上海鸿永生物科技有限公司,批号:070017-202011,纯度≥98%);阿魏酸(中国药品生物制品检定所,批号:0773-9910,纯度≥98%);绿原酸(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号:L-007-171216,纯度≥98%)。乙腈(色谱纯,Merck),甲醇(分析纯,天津百世化工有限公司,批号:20200604),磷酸(分析纯,四川西陇化工有限公司,批号:190802)。

表 1 18 批当归饮片及配方颗粒的来源信息

样品名称	编号	批号	备注
当归饮片	S1~S6	190403、190502、190601、190707、190806、191002	甘肃康乐药业有限责任公司
配方颗粒(厂家 A)	S7~S12	9050523、9060413、9082023、1102543、1102873、1109513	每克颗粒相当于临床使用饮片 3.3 g
配方颗粒(厂家 B)	S13~S18	19110060、19210230、19400203、20060406、20130303、21080105	每袋装 100 g 相当于饮片 600 g

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%A→10%A;5~25 min, 10%A→30%A;25~40 min, 30%A→95%),流速:1.0 mL/min;检测波长 260 nm;柱温:30 ℃;进样量 10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液制备 分别称取绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯对照品适量,加甲醇溶解,定容,使成终浓度分别为 51.20、104.00、32.30、200.00 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取当归饮片 1.00 g,加水浸泡 30 min(料液比 1:20),煎煮两次(每次 30 min),过滤,滤液合并、醇沉(加甲醇至终浓度 50%,4 h),离心半径 5 cm,5000 r/min 离心 10 min,取上清液,蒸干,用 50% 甲醇复溶并定容至 100 mL 容量瓶中,过 0.22 μm 针孔滤器;分别取当归配方颗粒(广东一方、四川新绿色)各 0.30 g,加水溶解(料液比 1:5),醇沉(加甲醇至终浓度 50%,4 h),离心半径 5 cm,5000 r/min 离心 10 min,取上清液,蒸干,用 50% 甲醇复溶并定容至 100 mL 容量瓶中,过 0.22 μm 针孔滤器,即得。

2.1.4 重复性试验 取当归饮片(样品编号 S1)6 份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以阿魏

酸为参照,记录各色谱峰的相对保留时间和峰面积,结果显示:各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.04%~1.11%,相对峰面积 RSD 为 0.36%~1.83%,表明方法重复性良好。

2.1.5 精密度试验 取当归饮片供试品溶液(样品编号 S1),按“2.1.1”项下色谱条件进样,连续测定 6 次,记录色谱图。以阿魏酸为参照,记录各色谱峰的相对保留时间和峰面积,结果显示:各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.03%~0.42%,相对峰面积 RSD 为 0.07%~0.68%,表明方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取当归饮片供试品溶液(样品编号 S1),分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以阿魏酸为参照,记录各色谱峰的相对保留时间和峰面积,结果显示:各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.16%~1.30%,相对峰面积 RSD 为 1.19%~1.82%,表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 指纹图谱建立 分别取当归饮片、配方颗粒(厂家 A、厂家 B)各 6 批(来源信息见表 1),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。将各图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,均以 S1 为参照图谱,采用中位数法生成叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R)。结果显示有 18 个共有峰,见图 1—2。

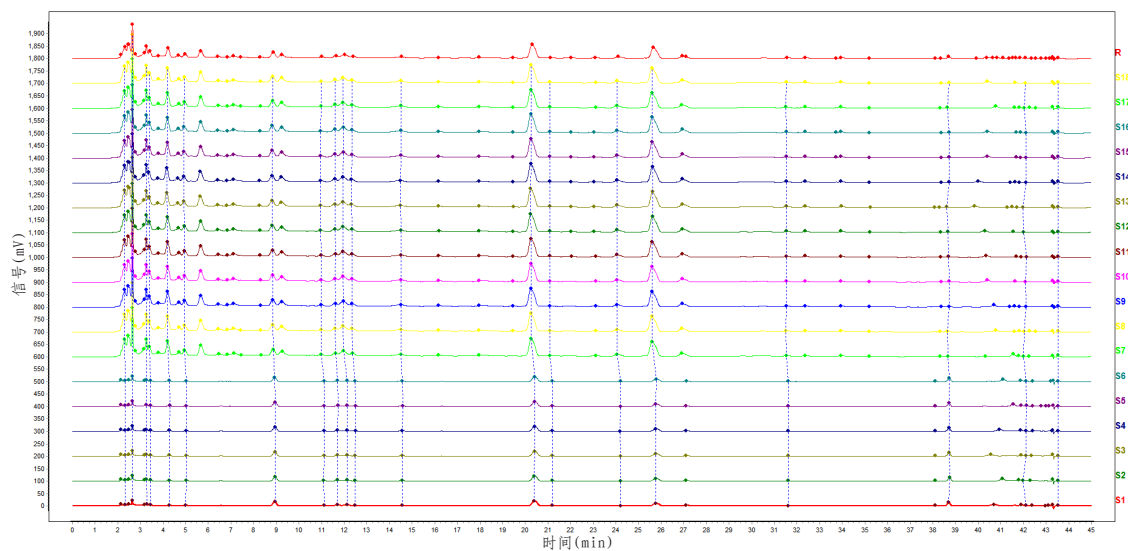


图1 18批当归饮片、配方颗粒(厂家A、厂家B)HPLC叠加指纹图谱

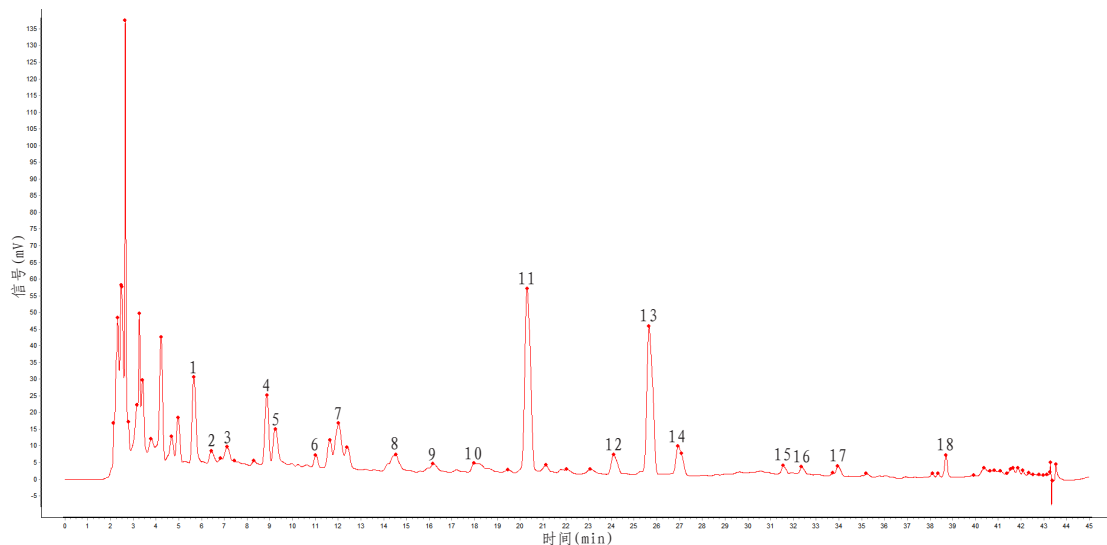


图2 18批当归饮片、配方颗粒(厂家A、厂家B)HPLC对照指纹图谱

2.1.8 共有峰指认 通过与混合对照品溶液图谱(“2.1.2”项下混合对照品溶液同法测定)保留时间比较,指认4个特征峰:6(绿原酸)、11(阿魏酸)、13(洋川芎内酯 I)、18(藁本内酯)。因阿魏酸为当归的主要成分,且保留时间适中,分离度好,故选其为参照峰。见图3。

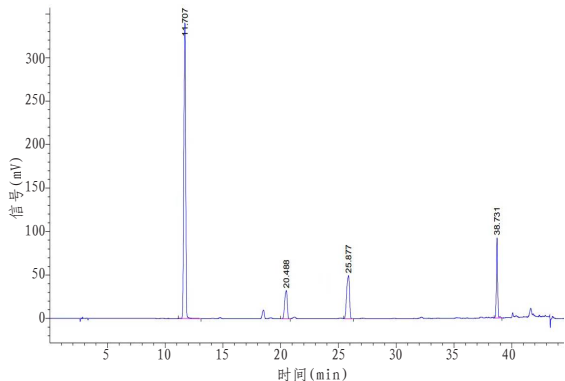


图3 混合对照品 HPLC 图谱

2.1.9 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”对18批样品进行相似度评价。结果显示:与对照指纹图谱(R)相比,18批样品的相似度分别为1.000、0.931、0.977、0.928、0.948、0.950、0.708、0.708、0.708、0.700、0.702、0.698、0.722、0.721、0.701、0.708、0.700、0.757,在0.698~1.000之间,表明18批样品之间质量差异较大。

2.2 聚类分析 以18批样品指纹图谱中18个共有峰的相对峰面积为变量,利用SPSS 22.0软件,运用Ward法以平方Euclidean距离为测度进行聚类分析。结果显示:当距离为1时,18批样品可聚为三类,其中S1~S6、S7~S12、S13~S18各聚为一类;当距离为2时,18批样品可聚为二类,其中S1~S6、S7~S18各聚为一类;与相似度评价结果一致。结果表明,当归饮片与配方颗粒的化学成分存在差异,不同厂家配方颗粒之间差异较小。聚类分析树状图见图4。

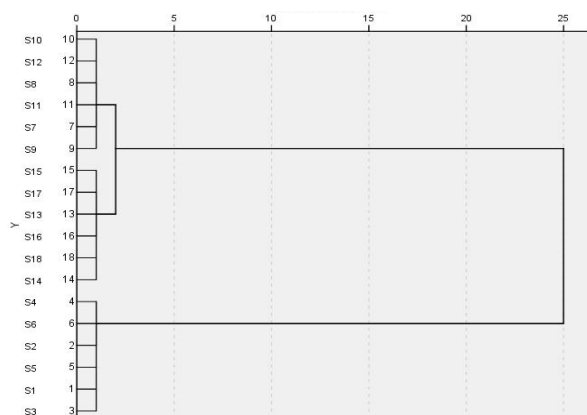


图4 使用ward联接的树状图

## 2.3 含量分析

2.3.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.3.2 溶液制备 混合对照品溶液的制备同“2.1.2”项,供试品溶液的制备同“2.1.3”项。

2.3.3 系统适用性试验 取供试品溶液(编号:S1、S7、S13),按“2.3.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。结果显示:绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯色谱保留时间与混合对照品溶液一致,与相邻色谱峰的分度度均大于1.5,理论塔板数按阿魏酸计不低于3000。见图5。

2.3.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液,加甲醇稀释,制得绿原酸质量浓度分别为1.02、2.05、3.07、4.10、5.12  $\mu\text{g/mL}$ ,阿魏酸质量浓度分别为2.08、4.16、6.24、8.32、10.40  $\mu\text{g/mL}$ ,洋川芎内酯 I 质量浓度分别为0.65、1.29、1.95、2.58、3.23  $\mu\text{g/mL}$ ,藁本内酯质量浓度分别为4.00、8.00、12.00、16.00、20.00  $\mu\text{g/mL}$ 的系列浓度混合对照品溶液。取此系列溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度为横坐标、对应峰面积为纵坐标进行线性回归。得绿原酸的回归方程为:  $Y=$

$8.5183X+40.389$  ( $R^2=0.9995$ ),阿魏酸的回归方程为:  $Y=19.951X+4.7477$  ( $R^2=0.9994$ ),洋川芎内酯 I 的回归方程为:  $Y=52.466X+17.971$  ( $R^2=0.9994$ ),藁本内酯的回归方程为:  $Y=5.03X+6.68$  ( $R^2=0.9993$ );表明绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯在各自的质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 取“2.3.2”项下供试品溶液(编号S1),按“2.3.1”项下色谱条件测定6次,记录峰面积。结果显示,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯峰面积的RSD分别为0.41%、0.88%、0.98%、1.11% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取当归饮片(样品编号S1)6份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样,记录峰面积并按标准曲线法计算四种成分的含量,结果显示,绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯峰成分含量的RSD分别为0.52%、0.63%、1.10%、1.27% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.3.2”项下供试品溶液(编号S1),分别于0、2、4、6、8、12、24 h按“2.3.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。结果显示:绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯峰面积的RSD分别为0.62%、1.17%、1.09%、1.23% ( $n=7$ ),表明供试品于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取样品6份(编号S1),每份约0.5 g,分别精密加入“2.1.2”项下混合对照品贮备液2 mL,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果显示:绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯的平均加样回收率分别为99.60%、99.09%、98.13%、98.09%,RSD分别为0.38%、0.11%、0.29%、0.12% ( $n=6$ ),表明该方法准确度良好。见表2。

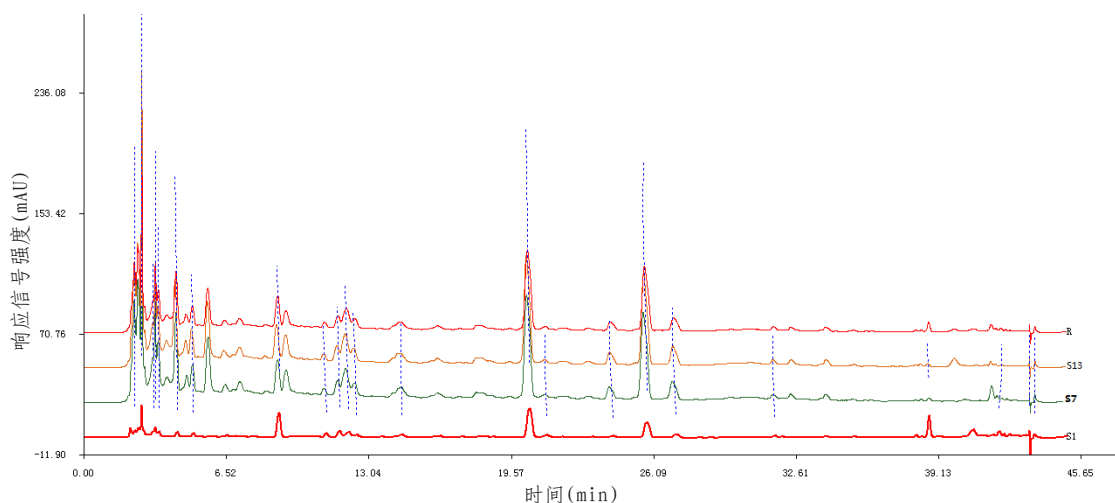


图5 供试品溶液HPLC图谱



表2 加样回收率测定结果 (n=6)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	加样回收率(%)	平均加样回收率(%)	RSD(%)
绿原酸	92.25	102.40	194.22	99.78	99.60	0.38
	91.05	102.40	192.75	99.64		
	91.25	102.40	191.69	98.99		
	91.40	102.40	193.84	100.02		
	90.90	102.40	191.97	99.31		
	91.40	102.40	193.47	99.83		
阿魏酸	206.25	208.00	409.90	98.95	99.09	0.11
	205.85	208.00	410.00	99.07		
	206.05	208.00	410.90	99.24		
	205.85	208.00	410.46	99.18		
	206.00	208.00	409.78	98.98		
	206.20	208.00	410.51	99.11		
洋川芎内酯 I	90.45	64.60	152.88	98.60	98.13	0.29
	91.00	64.60	152.16	97.79		
	90.15	64.60	152.00	98.22		
	90.40	64.60	151.76	97.91		
	89.55	64.60	151.30	98.15		
	80.20	64.60	142.02	98.08		
藁本内酯	426.50	400.00	811.79	98.22	98.09	0.12
	447.65	400.00	829.93	97.91		
	423.70	400.00	808.21	98.12		
	435.30	400.00	819.35	98.09		
	431.80	400.00	816.66	98.18		
	430.05	400.00	813.37	97.99		

2.3.9 含量测定 取当归饮片及配方颗粒样品共计18批,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,按照标准曲线法计算其中四种成分(绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、藁本内酯)的含量。见附表1。

3 讨论

3.1 当归饮片临床汤剂的制备 依据“中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求”,制订当归饮片临床汤剂的提取方法(包括浸泡时间、煎煮次数、加水量、煎煮时间)。

3.2 供试品溶液的制备 由于汤剂成分复杂,需要进行检测前的处理。通过对不同的提取溶剂(甲醇、乙醇、乙酸乙酯)进行筛选,50%的甲醇提取后杂质少、峰形好。本实验尝试将当归饮片临床汤剂浓缩、干燥后和配方颗粒进行50%的甲醇提取,与当归饮片临床汤剂和配方颗粒水溶液直接甲醇醇沉对比,两者HPLC图谱基本一致,但后者更接近临床用药习惯,亦更为便捷,故制订文中所用方案。

3.3 色谱条件选择 本实验对流动相(有机相:甲醇、乙腈,酸的种类:冰醋酸、磷酸),梯度洗脱条

件,吸收波长(260 nm、280 nm)进行考察,结果表明:在260 nm处、以乙腈-0.1%磷酸水为流动相、依文中方法梯度洗脱、所得色谱峰形较好,分离理想。所建立的方法中,精密度、稳定性、重复性的RSD均小于1.19%,适合用于当归饮片、配方颗粒的特征图谱检测。

3.4 当归饮片、配方颗粒相关性评价及多成分分析 本实验结果表明,当归饮片与两种来源配方颗粒的对照图谱的主要峰基本一致,说明三者具有相同的药用物质基础。但是相似度未全达到0.8,说明当归配方颗粒在制备过程中,其成分发生了一些变化,如两种配方颗粒中都增加了2号峰;并且可以看出成分比例上也有明显的改变,如藁本内酯的比例在配方颗粒中明显降低,而阿魏酸、洋川芎内酯 I 的比例明显升高。两种配方颗粒色谱峰基本一致,相似度高,但绿原酸和藁本内酯的含量差异较大,可能和所用药材来源有关。因此,应用指纹图谱技术对临床常用的当归饮片和配方颗粒进行相关性分析,有助于实现临床用药的一致性和安全性。

参考文献

[1] 泮玉华,王文霞. 当归饮片质量控制标准与相关探讨[J]. 新中医, 2019, 51(2): 8-10.

[2] 李文涛,杨世海. 当归质量评价研究现状[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 517-523.

[3] 张平,王晓琳,马潇,等. 当归道地产区岷县土壤中无机元素与岷当归药材质量相关性分析[J]. 西部中医药, 2021, 34(11): 65-72.

[4] 孙莺,王玉梅,尉鹏,等. 甘肃两种道地药材当归及党参中药饮片微生物污染状况研究[J]. 西部中医药, 2022, 35(4): 17-20.

[5] 孟祥云,汪永锋,郭树明,等. 当归多糖对STZ诱导的糖尿病大鼠糖化血清蛋白、免疫反应及氧化应激的影响[J]. 西部中医药, 2022, 35(2): 27-31.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 139.

[7] 于姗姗,李伟剑,宋希贵. 当归饮片质量标准的探索性研究[J]. 中国执业药师, 2016, 13(2): 34-35.

[8] 刘彩凤,梁军,杨海菊,等. 基于指纹图谱及化学模式对当归酒洗前后的比较分析[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(3): 234-241.

[9] 汪英俊,严辉,黄胜良,等. 当归HPLC指纹图谱建立及化学计量学评价[J]. 中成药, 2020, 42(2): 514-519.

[10] 陈健,张越,王洪兰,等. 当归标准汤剂HPLC指纹图谱及多指标成分定量研究[J]. 中草药, 2019, 50(20): 4942-4949.

[11] 孟颖,池玉梅,严国俊,等. 当归药材及当归身饮片高效液相色谱特征图谱研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(4): 539-545.

[12] 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.

[13] 郭怡祯. 当归药效物质基础的红外表征与体内外吸收代谢的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[14] 王笑涵,桑珍,沈云辉,等. 中药配方颗粒境外发展现状分析与对策[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5131-5134.

[15] 喻录容,侯毅. 中药配方颗粒与中药饮片的临床疗效比较[J]. 当代临床医刊, 2021, 34(2): 42.

[16] 李慧峰,田凡玉,孟霜,等. 酒五味子的指纹图谱建立及化学模式识别分析[J]. 中国药房, 2021, 32(24): 3008-3013.

[17] 黄小兰,何旭峰,周浓,等. 浙贝母配方颗粒的指纹图谱建立及3种成分的含量测定[J]. 中国药房, 2021, 32(20): 2473-2478.

收稿日期: 2023-11-20

\*基金项目: 甘肃省中医药科研项目(GZK-2019-18); 甘肃省卫生行业专项(GSWSKY2018-46)。

作者简介: 郭敏(1983—), 女, 博士学位, 副主任药师。研究方向: 中药质量标准化及活性筛选。

△通讯作者: 王红丽(1978—), 女, 硕士学位, 主任药师。研究方向: 中药制剂药效物质基础。E-mail: 1439662482@qq.com。

附表1 各指标含量测定结果(mg/g)

样品	编号	绿原酸		阿魏酸		洋川芎内酯 I		藁本内酯	
		含量	平均含量	含量	平均含量	含量	平均含量	含量	平均含量
饮片	S1	0.1845	0.1827	0.4125	0.4121	0.1809	0.1806	0.8530	0.8650
	S2	0.1821		0.4117		0.1820		0.8953	
	S3	0.1825		0.4121		0.1803		0.8474	
	S4	0.1828		0.4117		0.1808		0.8706	
	S5	0.1818		0.4120		0.1791		0.8636	
	S6	0.1828		0.4124		0.1804		0.8601	
	S7	0.1716		0.5794		0.3843		0.0573	
	S8	0.1725		0.5839		0.3872		0.0607	
配方颗粒(厂家A)	S9	0.1720	0.1716	0.5812	0.5810	0.3855	0.3851	0.0627	0.0671
	S10	0.1703		0.5804		0.3844		0.0845	
	S11	0.1719		0.5808		0.3850		0.0850	
	S12	0.1714		0.5802		0.3846		0.0527	
	S13	0.0699		0.6115		0.3137		0.1403	
	S14	0.0745		0.6133		0.3154		0.1623	
配方颗粒(厂家B)	S15	0.0729	0.0740	0.6145	0.6149	0.3123	0.3151	0.1198	0.1386
	S16	0.0769		0.6153		0.3159		0.1229	
	S17	0.0754		0.6134		0.3151		0.1626	
	S18	0.0746		0.6214		0.3181		0.1240	