



# 基于化学计量学的 HPLC 指纹图谱在当归炮制品质量控制和识别中的应用

郭延生, 华永丽, 杜天玺, 杨洪申, 魏彦明\*

(甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**[摘要]** 目的: 建立当归药材及炮制品的指纹图谱, 对其进行化学识别和验证。方法: 采用高效液相色谱法建立了当归及其炮制品 HPLC 指纹图谱, 并使用主成分分析、系统聚类分析和判别分析对指纹图谱进行了模式识别研究。结果: 当归不同炮制品 HPLC 指纹峰和相对峰面积存在一定差异, 判别分析选择了 6 个色谱峰的相对峰面积为预测变量建立了当归及其炮制品的判别函数, 回代判别率为 100%, 判别分析散点图区分度良好。结论: 建立了当归炮制品 HPLC 指纹图谱, 并结合化学计量学方法对当归炮制品进行准确、可靠的识别和验证, 为当归及其炮制品的质量评价和炮制机制研究提供一定的科学依据。

**[关键词]** 当归; 炮制品; 指纹图谱; 化学计量学

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (oliv.) Diels 的干燥根, 主产于甘肃省岷县, 属甘肃地道药材, 具有补血活血、调经止痛、润燥滑肠等作用, 素有“十方九归”之称, 其药用历史已有 2 000 多年<sup>[1-2]</sup>。目前当归炮制品有当归炭、酒当归、油当归和土当归等法定品种, 在临床实践中被广泛使用<sup>[3]</sup>, 但其炮制机制和炮制前后物质基础的变化尚不明确, 这不但对临床应用造成了一定的难度, 而且对进一步开发该药造成一定的障碍。因此, 本研究采用了中药色谱指纹图谱相似度评价软件和化学计量学方法研究了当归不同炮制品 HPLC 指纹图谱, 为当归炮制前后化学成分的变化规律以及炮制品质量评价提供了依据。

## 1 材料

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪。实验所测不同产地收集的当归原药材及市售当归均经甘肃农业大学动物医学院中兽医学教研室魏彦明教授鉴定。S1 ~ S10 分别自甘肃不同产地的种植基地收集的全归样品, S11 为市售药材, 见表 1。阿魏酸(中国药品生物制品检定所, 批号 0773-9910)。当归炮制品均按《甘肃省中药炮制规范》和《中国药典》要求<sup>[1,4]</sup>, 由甘肃中医学院龙全江副教授指导炮制, T1 ~ T11 为当归

炭样品, Y1 ~ Y12 为油当归样品, J1 ~ J11 为酒当归样品, TU1 ~ TU11 为土当归样品, 采集日期均为 2008 年 9 月, 凭证标本保存于甘肃农业大学动物医学院中兽医实验室。

表 1 当归药材编号和来源

No.	来源
S1	漳县金钟镇
S2	岷县中寨镇
S3	岷县西寨镇
S4	岷县麻子川乡
S5	渭源田家河镇
S6	渭源乌竹镇
S7	岷县会川镇
S8	漳县大草滩乡
S9	漳县石川乡
S10	岷县十里店乡
S11	岷县中药材市场

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

ODS-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 25 cm, 5 μm); 流动相 1% 乙酸水 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱条件: 0 ~ 10 min, 20% ~ 30% B; 10 ~ 20 min, 30% ~ 49% B; 20 ~ 40 min, 49% B; 40 ~ 50 min, 49% ~ 100% B; 50 ~ 60 min, 100% ~ 20% B。流速 1 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 25 °C; 检测波长 280 nm。

### 2.2 阿魏酸对照品溶液制备

称取阿魏酸对照品 4.8 mg, 加甲醇至 100 mL 量瓶中, 得 4.8 mg · L<sup>-1</sup> 对照品溶液。

**[稿件编号]** 20100201005

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (30671541, 30972210)

**[通信作者]** \* 魏彦明, Tel: (0931) 7631077, E-mail: weiy@m.gsau.edu.cn.

**[作者简介]** 郭延生, E-mail: guoys@gsau.edu.cn

## 2.3 供试品溶液制备

精密称取当归粉末(40目)0.5 g,置50 mL具塞三角瓶中,精密量取甲醇-甲酸(95:5)25 mL加入三角瓶中,密封,称重,超声提取60 min,放置至室温,称重,补足失重,0.45 μm滤膜过滤。取续滤液进样10 μL。

## 2.4 指纹峰的鉴定

采用相对保留时间确认指纹峰。本实验以阿魏酸对照品作为参照物,相对保留时间即各指纹峰保留时间与同一图谱中阿魏酸峰的保留时间比值。指纹峰峰面积比值即各指纹峰面积与同一图谱中阿魏酸峰面积的比值。

## 2.5 数据处理

SPSS 13.0 分析软件;国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004版)。

## 3 结果

### 3.1 方法学考察

**3.1.1 参照峰的选择** 由于阿魏酸是当归中的主要有效成分之一,2005年版《中国药典》规定其为评价当归质量的指标性成分,又鉴于该色谱峰峰面积较稳定,故选择阿魏酸色谱峰作为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积。

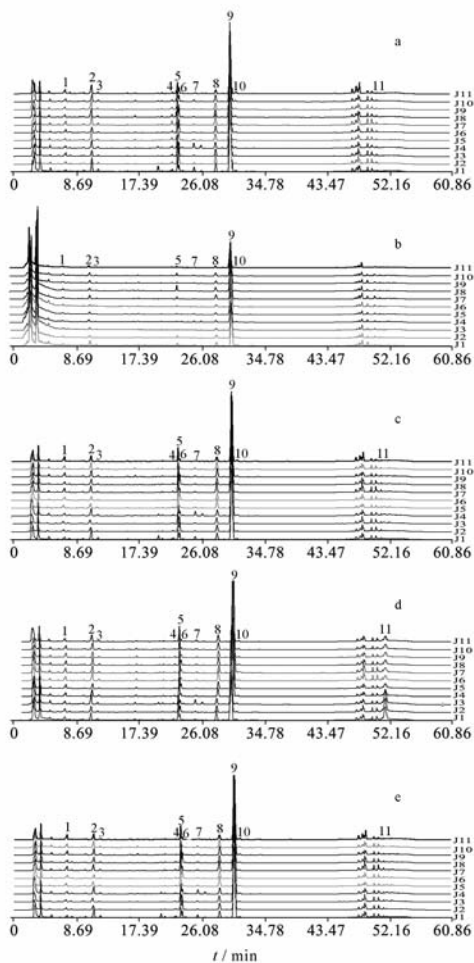
**3.1.2 精密度** 取同一份生当归样品(S1)的供试液,重复进样5次,计算得各主要色谱峰的相对保留时间RSD为0.03%~0.14%,峰面积比值RSD为0.54%~2.7%,符合指纹图谱的检测要求。

**3.1.3 稳定性** 取同一份生当归样品(S1)的供试液,分别于0,3,6,9,12,15 h检测,计算各主要色谱峰的相对保留时间RSD 0.03%~0.12%,峰面积比值RSD 0.29%~2.7%,表明供试液在15 h内基本稳定。

**3.1.4 重复性** 取生当归样品(S1)6份,分别精密称定,按供试品溶液制备方法平行制备供试液,再分别按上述液相色谱条件测定,计算各主要色谱峰的相对保留时间RSD 0.28%~0.46%,峰面积比值RSD 0.75%~1.8%,符合指纹图谱的检测要求。

### 3.2 当归炮制品样品的测定及指纹图谱的建立

按上述液相色谱条件测定了当归炮制品样品,根据各样品图谱中色谱峰的相对保留时间,鉴定了11个共有峰,见图1,2,峰1为阿魏酸,将共有峰的紫外光谱与文献相比较<sup>[5]</sup>,推测峰2~11依次为洋川芎内酯I、洋川芎内酯H、未知、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯A、丁基酞内酯、E-藁本内酯、Z-藁本内



a. 生当归; b. 当归炭; c. 油当归; d. 酒当归; e. 土当归(图2同)。

图1 当归及其炮制品 HPLC 指纹图谱

酯、Z-丁烯基酞内酯、levistolide A。计算共有峰的峰面积比值,建立当归指纹图谱。

**3.2.1 相似度分析** 将当归炮制品样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统<sup>[6]</sup>”,选取“时间窗”宽度为0.5 min,经校准后,生成“对照图谱”见图2,计算出样品与对照谱图的相似度。结果发现同一炮制品样品色谱峰基本相似,相似度均大于0.950。不同炮制品相比,当归炭对照谱与其他炮制品对照谱之间有明显差别,其他炮制品对照谱之间差别不明显,相似度均大于0.950,见表2。

**3.2.2 当归炮制品 HPLC 指纹图谱比较** 比较色谱峰发现,第9个化学成分在生当归、油当归、土当归和酒当归中是最高峰,其相对峰面积是当归炭的2~3倍多,而当归炭中最高峰的保留时间在3.8 min附近,见图2。除此之外,当归炭中第5个色谱

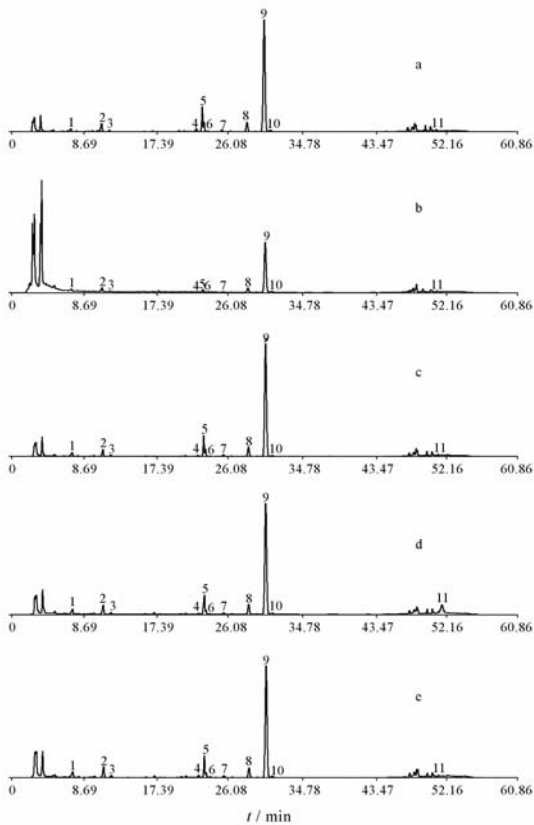
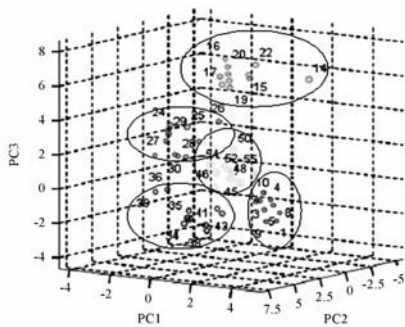


图2 当归及其炮制品 HPLC 指纹对照谱图

表2 当归炮制品指纹图谱相似度评价( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

样品	生当归	当归炭	油当归	酒当归	土当归
生当归	0.991 ± 0.009	0.549	0.994	0.979	0.986
当归炭		0.968 ± 0.014	0.520	0.522	0.561
油当归			0.995 ± 0.003	0.99	0.993
酒当归				0.970 ± 0.016	0.984
土当归					0.964 ± 0.029



1~11. 当归炭样品; 12~22. 酒当归样品; 23~33. 油当归样品;  
33~44. 生当归样品; 44~55. 土当归样品。

图3 当归炮制品主成分3D投影图

峰与其他炮制品相比明显降低,其相对峰面积比其他炮制品低5~7倍,另外,当归炭中第2,4,7,8,10化合物相对峰面积与其他炮制品相比,均有不同程度的降低,见表3。

生当归、油当归、土当归和酒当归之间色谱峰较为相似,第9个化学成分在色谱图中都是最高峰,但从三维主成分投影图反映的指纹图谱综合信息可以看出,各炮制品样品投影区域存在明显的不同,见图3。比较生当归与3种炮制品共有峰的相对峰面积可知,油当归、土当归和酒当归第2,4,5,7,8,10化学成分相对峰面积与生当归相比均有不同程度的下降,而第6,11化学成分相对峰面积与生当归相比均有不同程度的升高。酒当归中第11个化学成分的峰面积明显高于生当归、土当归和油当归,同时也明显高于当归炭,因此用此峰的相对峰面积易与鉴别酒当归,油当归中第9个化学成分相对峰面积略高于生当归,但明显高于酒当归、土当归和当归炭,见图3。

### 3.3 数据处理

**3.3.1 当归炮制品指纹图谱的系统聚类分析** 以共有峰相对峰面积为变量,用SPSS 13.0统计分析软件中的主成分分析法得到4个特征主成分,

进行当归炮制品指纹图谱的系统聚类分析(ward法),结果表明,当聚合距离为5时,当归炮制品聚为一类,生当归及其每种炮制品各自聚为一类;当聚合距离为10时,当归及其炮制品聚为4类,即土当归和油当归聚成一类,而当归炭、酒当归和生当归自成一类。当聚合距离为15时,当归及其炮制品聚为3类,即土当归、油当归和当归炭聚为一类,而酒当归与生当归自成一类。当聚合距离为20时,当归及其炮制品基本可以聚成两大类,生当归聚成一大类,见图4。炮制品聚成另一大类,说明当归经炮制后,11个化合物的含量发生了明显的变化。

**3.3.2 当归炮制品指纹图谱的判别分析** 判别分

表 3 当归炮制品特征峰相对保留时间和相对峰面积( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

No.	$t_R/\text{min}$	相对峰面积				
		生当归	当归炭	油当归	酒当归	土当归
1	7.43	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	11.12	1.95 ± 0.321	0.88 ± 0.086	1.41 ± 0.244	1.54 ± 0.265	1.55 ± 0.172
3	12.04	0.45 ± 0.084	0.60 ± 0.070	0.30 ± 0.050	0.37 ± 0.097	0.45 ± 0.059
4	22.46	0.62 ± 0.161	0.15 ± 0.054	0.24 ± 0.060	0.21 ± 0.044	0.31 ± 0.048
5	23.15	3.15 ± 0.962	0.42 ± 0.099	2.29 ± 0.625	2.59 ± 0.304	2.00 ± 0.604
6	23.83	0.00 ± 0.000	0.20 ± 0.060	0.12 ± 0.027	0.14 ± 0.062	0.17 ± 0.062
7	25.48	0.38 ± 0.089	0.22 ± 0.088	0.29 ± 0.099	0.22 ± 0.057	0.29 ± 0.053
8	28.51	2.17 ± 0.423	0.57 ± 0.158	2.06 ± 0.307	1.53 ± 0.190	1.47 ± 0.233
9	30.56	26.10 ± 3.012	8.00 ± 1.341	28.39 ± 4.481	19.42 ± 3.011	17.78 ± 3.271
10	31.30	0.50 ± 0.336	0.24 ± 0.072	0.31 ± 0.058	0.31 ± 0.064	0.37 ± 0.084
11	51.66	0.00 ± 0.000	0.15 ± 0.019	0.86 ± 0.391	2.21 ± 0.330	0.55 ± 0.166

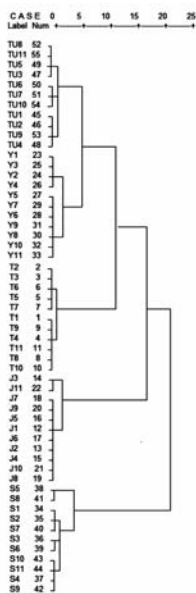


图 4 当归炮制品聚类谱系

析是类别明确的一种分类技术,其根据观测到的某些指标对所研究的某些对象进行分类。在中药质量控制实验中,判别分析可在已知研究对象分成若干类型并取得各种类型的一批已知样品的观测数据的基础上,建立判别式,然后对未知类型的样品进行判别分类。选择当归及其炮制品指纹图谱中的 11 个共有峰的相对峰面积作为变量进行判别分析,有 6 个共有峰的相对峰面积(峰 2,3,4,6,9,11)被用于产生 fisher 线性判别函数,函数表达式:

$$T = 12.778X_2 + 150.640X_3 - 34.763X_4 - 13.150X_6 + 1.621X_9 - 15.933X_{11} - 53.661;$$

$$J = 31.860X_2 + 65.495X_3 - 64.162X_4 - 87.037X_6 + 2.283X_9 + 28.043X_{11} - 78.794;$$

$$Y = 46.192X_2 + 61.446X_3 - 69.363X_4 - 66.419X_6 + 4.172X_9 - 10.877X_{11} - 85.214;$$

$$S = 55.225X_2 + 117.496X_3 - 4.879X_4 - 164.701X_6 + 4.314X_9 - 34.865X_{11} - 136.785;$$

$$TU = 41.580X_2 + 88.853X_3 - 42.721X_4 - 39.669X_6 + 2.730X_9 - 16.419X_{11} - 63.190.$$

判别标准:每个样品的变量代入上述 5 个函数,根据函数最大值确定相应的分组。 $T, J, Y, S, TU$  分别代表当归炭、酒当归、油当归、生当归和土当归, $X$  代表变量。

用此判别函数回代分类,5 种炮制品的判别均与实际相符,准确率均为 100%,判别分析散点图对生当归及其炮制品具有良好的区分效果,见图 5,说明判别函数可信。

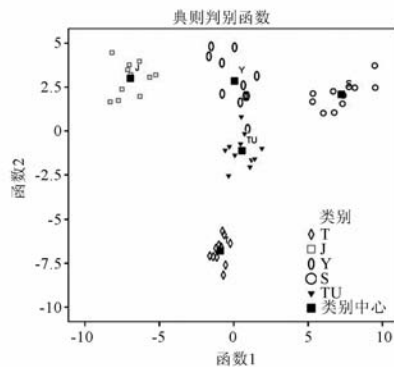


图 5 判别分析散点图

#### 4 结论

HPLC 指纹图谱技术是鉴别和评价天然产物的有力工具,近年来也广泛用于当归的质量控制和评价,但未见对当归炮制品的相关研究。本研究首次



采用 HPLC 指纹图谱比较了当归炮制品化学指纹特征的差异,采用的色谱条件具有重复性好,易于控制的特点。

建立 HPLC 指纹图谱可准确、可靠的鉴别和评价当归及其炮制品,结果表明当归炮制品之间指纹特征存在一定差异,可通过指纹模式和 11 个色谱峰的相对峰面积鉴别当归及其炮制品。三维主成分投影分析和系统聚类结果进一步证明了当归及其炮制品指纹特征存在一定差异。判别分析从 11 个色谱峰中筛选出对分类影响最大的 6 个色谱峰,用其相对峰面积作为变量建立判别函数,判别率为 100%,散点图区分度良好。因此,用 HPLC 指纹图谱,结合主成分分析、系统聚类分析和判别分析等化学计量学方法可对生当归炮制品提供一个更加综合和量化的

的化学模式识别和质量评价方法,该法亦可为进一步阐明为当归炮制品的谱效关系和临床应用提供一定的科学依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:89.
- [2] 中华本草编委会.中华本草.第5卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:893.
- [3] 陈慧珍.当归研究进展[J].海峡药学,2008,20(8):83.
- [4] 甘肃省卫生厅.甘肃中药炮制规范[M].兰州:甘肃人民出版社,1999:53.
- [5] Lu G H, Kelvin C, Liang Y Z, et al. Development of high performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese angelica from related Umbelliferae herbs [J]. J Chromatogr A, 2005, 1073:383.
- [6] 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,2006,41:747.

## Quality control and discrimination of angelica different processed products based on HPLC fingerprints combined chemometrics methods

GUO Yansheng, HUA Yongli, DU Tianxi, YANG Hongshen, WEI Yanming\*

(School of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a chemical fingerprint method for reorganizing and validating angelica different processed products. **Method:** A high-performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint. Principal component analysis, hierarchical cluster analysis and discriminate analysis were applied to study HPLC finger printing and chemical pattern reorganization. **Result:** There were difference of characteristic peaks and its relative peak area of HPLC fingerprints between different processed products. Fish's discriminate functions were generated by using six selected predictor variables, the tested samples of different processed products were classified with 100% accuracy, and discriminate analysis plots for the five groups were well-resolved. **Conclusion:** The developed HPLC finger print, combined with chemometrics, can accurately identify and validate angelica different processed products, the research provide theoretical basis for the processing mechanism and quality assess of angelica different processed products.

[Key words] angelica; processed products; fingerprint; chemometrics

doi: 10.4268/cjmm20101210

[责任编辑 周驰]