

HPLC 测定当归中 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 的含量

罗镭¹, 马临科¹, 刘帅英², 祝明^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定当归中 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 含量的方法。方法 采用 Inertsil ODS-3 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05%三氟乙酸水溶液梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 325 nm, 柱温为 30 °C。结果 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 进样量在 0.023 36~1.168 0 μg($r=1.000\ 0$) 内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 95.33%, RSD 为 1.88%。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可为当归药材的质量控制提供参考。

关键词: 当归; 高效液相色谱法; 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)09-1296-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.017

引用本文: 罗镭, 马临科, 刘帅英, 等. HPLC 测定当归中 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1296-1299.

Determination of the 1-(3',4'-Dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol in Angelicae Sinensis Radix by HPLC

LUO Lei¹, MA Linke¹, LIU Shuaiying², ZHU Ming^{1*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Lishui Inspection Institute for Food and Drug & Quality and Technology Control, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol in Angelicae Sinensis Radix. **METHODS** Inertsil ODS-3 C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted with a mobile phase of acetonitrile-0.05% trifluoroacetic acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 325 nm and the column temperature was 30 °C. **RESULTS** The good linearity with peak areas was achieved in the rang of 0.023 36~1.168 0 μg ($r=1.000\ 0$) for 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol. The average recovery was 95.33%, and the RSD was 1.88%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of Angelicae Sinensis Radix.

KEY WORD: Angelicae Sinensis Radix; HPLC; 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol; content determination

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥根, 为临床常用中药, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[1]。现代研究表明, 当归具有抗氧化、清除自由基、促进造血功能及抗肿瘤等多种药理活性^[2-4]。文献[5-7]报道, 当归药材主要含挥发油、有机酸、香豆素等化学成分, 挥发油成分主要有藁本内酯、川芎内酯、新当归内酯和松柏醇阿魏酸酯等, 有机酸成分主要为阿魏酸; 香豆素类成分主要有紫花前胡素、蛇床子素、欧前胡素等。中国药典 2015 年版含量测定项目为检测当归中阿魏酸的含量^[1], 另外当归中藁本内酯、紫花前胡素、松柏醇阿魏酸酯等指

标成分的检测方法已有文献报道^[8-12]。目前, 研究人员对当归中挥发油类小极性成分研究较多, 从当归中分离得到藁本内酯、川芎内酯、新当归内酯、紫花前胡素、蛇床子素、欧前胡素等小极性化学成分。但中药的传统服用方式为水煎煮服用, 挥发油类成分与水不互溶, 在水煎液中溶解性较差, 提取效率低。所以笔者尝试研究当归中极性较大的水溶性成分, 通过研究当归的 HPLC 指纹图谱, 找到了当归中极性大的水溶性特征成分 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol。Cardoso 等^[13]采用红外光谱、质谱、核磁等波谱技术鉴定了该化合物的结构。该成分化学结构新颖,

基金项目: 浙江省中医药科技计划(2017ZA097)

作者简介: 罗镭, 男, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)87180345
Tel: (0571)867354991 E-mail: zhumingd@hotmail.com

E-mail: luolei33988@163.com *通信作者: 祝明, 女, 主任中药师

不同于以往报道的当归中藁本内酯、蛇床子素类结构骨架类型。Wang 等^[14]从酸樱桃中分离得到该化合物,并经生物活性检测表明该化合物具有较强的抗氧化活性,其抗氧化活性与商业抗氧化剂叔丁基对苯二酚的抗氧化活性相当。基于上述研究目的及该化合物的强抗氧化活性,笔者选取该化合物作为指标,首次建立该成分的含量测定方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), XPE205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), Elmasonic P 超声波清洗器(德国 Elma 公司)。

1.2 试药

收集 8 批当归药材,经浙江省食品药品检验研究院中药所郭增喜主任中药师鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 对照品为实验室自制,纯度>98%,结构式见图 1。

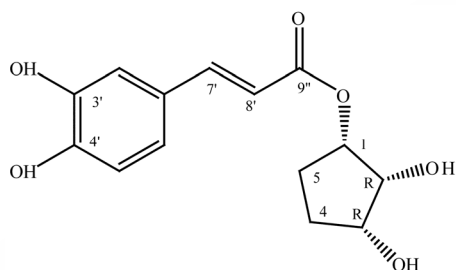


图 1 化合物 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 的结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of compound 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),流动相为乙腈(A)-0.05%三氟乙

酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 5%→20% A),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 325 nm,柱温为 30 °C。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 对照品 5.84 mg,置于 50 mL 量瓶中,用 70%甲醇溶解并定容,摇匀,即得 0.116 8 mg·mL⁻¹ 对照品储备液。精密吸取对照品储备液 3 mL,置于 15 mL 量瓶中,用 70%甲醇溶解并定容,得到 0.023 36 mg·mL⁻¹ 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理 45 min(功率为 250 W,频率为 35 kHz),放冷,再称定重量,加 70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 系统适用性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂各 10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,见图 2。在该色谱条件下,供试品溶液色谱图中具有与对照品溶液色谱图中 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 化合物相同保留时间的色谱峰,空白溶剂在此峰位无吸收,证明阴性无干扰。样品中待测目标物与其他成分均可达到基线分离,分离度均>1.5,分离效果好。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下 0.023 36 mg·mL⁻¹ 对照品溶液 1, 3, 5, 10 μ L 及 0.116 8 mg·mL⁻¹ 对照品储备液 3, 5, 10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标,对照品进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程 $Y=1481.35X-3172.54$ ($r=1.0000$),结果表明 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 进样量

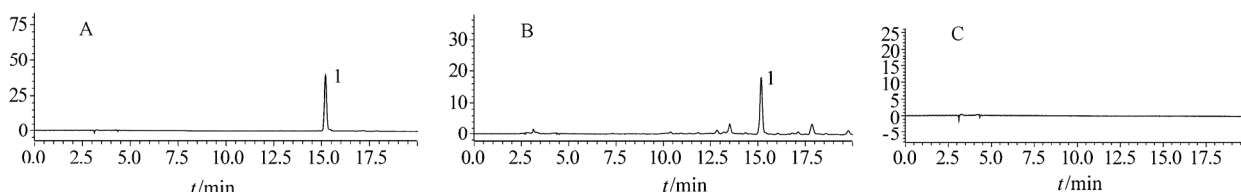


图 2 高效液相色谱图

A-对照品溶液(0.023 36 mg·mL⁻¹); B-供试品溶液; C-空白溶剂; 1-1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-reference substance(0.023 36 mg·mL⁻¹); B-sample; C-blank; 1-1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol。

在 0.023 36~1.168 0 μg 内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取“2.2”项下 0.023 36 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 10 μL ，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测定色谱峰面积，结果 RSD 为 0.11%，表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批(批号 20160901)当归药材粉末，按“2.3”项下方法平行制备 6 份，依法测定含量，结果当归中化合物 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 的含量为 0.029%，RSD 为 0.55%，表明方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取“2.7”项下同一供试品溶液，分别在 0, 2, 6, 10, 14, 20 h 进样，计算 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 峰面积的 RSD 为 0.23%，表明供试品溶液在 20 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

称取已知含量的当归药材粉末(批号 20160901)6 份，每份约 0.5 g，精密称定，分别加入 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 对照品溶液(0.116 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)1 mL，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定含量，计算回收率，结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery tests($n=6$)

取样量/ g	样品中 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
0.484 6	0.139 9	0.116 8	0.250 9	95.03	95.33	1.88
0.484 7	0.140 0	0.116 8	0.250 1	94.26		
0.499 5	0.144 2	0.116 8	0.256 9	96.49		
0.486 7	0.140 5	0.116 8	0.249 4	93.24		
0.493 6	0.142 5	0.116 8	0.253 1	94.69		
0.491 0	0.141 8	0.116 8	0.256 6	98.29		

2.10 样品测定

取不同批号的当归样品 1 g，各 3 份，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，并用外标法计算样品中 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopentane-2,3-diol 的含量，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Results of sample determination($n=3$)

编号	产地	采集时间	批号	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1	甘肃渭源	2016.06	160819	345.9
2	甘肃岷县	2016.06	20160901	293.6
3	甘肃岷县	2016.06	161101	188.8
4	云南鹤庆	2016.09	201315	280.1
5	四川成都	2016.09	201516	407.1
6	甘肃渭源	2016.06	9202	311.2
7	甘肃岷县	2016.06	200104	230.3
8	甘肃岷县	2016.06	200505	260.5

3 讨论

3.1 提取条件的优化

以 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 的含量为指标，对甲醇、70%甲醇、50%甲醇作为当归提取溶剂的提取效率进行了考察，结果显示，70%甲醇提取效果最好；甲醇提取存在明显溶剂效应，峰型分裂；50%甲醇提取溶液高速离心后，样品溶液有浊光，澄清度不如 70%甲醇提取溶液。比较了超声提取和回流提取的提取效率，结果显示无统计学差异，因超声提取操作简便，最终选择超声提取。

3.2 流动相的选择

本实验首先采用乙腈-水系统洗脱，结果发现无论怎么调节流动相比比例及梯度，目标成分出峰很快，几乎不保留。后采用乙腈-0.05%三氟乙酸系统洗脱，结果显示目标成分出峰正常。比较了等度洗脱方式和梯度洗脱方式，结果发现梯度洗脱峰形良好，基线平稳，分离度高。

3.3 回收率结果分析

加样回收率结果均<100%，平均值为 95.33%，RSD 为 1.33%，回收率结果稍微偏低，原因可能是中药基质复杂，待测成分含量低，存在基质对待测成分的少量吸附作用，从而引起回收率结果偏低。

试验过程中比较了 3 个不同品牌的色谱柱及 3 个不同品牌的高效液相色谱仪，检测结果均一致，表明该方法耐用性良好。

本研究建立了 HPLC 测定当归中 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol 化合物含量的方法，该方法简便、准确、重复性好，可为当归药材的质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 133-134.
- [2] BO H B, CHEN Q Z, SHEN H, et al. Mechanism of Danggui-buxue-tang regulating bone marrow hematopoietic and anfluence on hematopoietic microenvironment [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2013, 32(10): 824-828.
- [3] DONG Q, CHEN M C. Chemical composition and pharmacological research progress of Angelica [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2016, 12(2): 32-34.
- [4] LUO H Y, HUANG Y H. Protective effect of Angelicae Sinensis Radix volatile oil on acute myocardial ischemic injury in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(2): 159-162.
- [5] YAO H P. Chemical composition research progress of Angelica [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2003, 17(2): 56-58.
- [6] ZHANG L B, LV J L, CHEN L H, et al. Research progress of structures and pharmacological activities of phthalides from *Angelica sinensis* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(2): 167-176.
- [7] LU X H, ZHANG J J, LIANG H, et al. Chemical constituents of *Angelica sinensis* [J]. J Chin Pharm Sci(中国药理学: 英文版), 2004, 13(1): 1-3.
- [8] ZHANG Z H, WU J K, CHEN Z F, et al. Determination of ferulic acid from different habitats of Angelica [J]. Beijing J Tradit Chin Med(北京中医药), 2011, 30(8): 624-625.
- [9] WANG Z J, TANG L Y, HE B X, et al. Determination of ligustilide in Angelica by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(21): 1699-1700.
- [10] YU Y, ZHANG Q W, WANG Y T, et al. A rapid HPLC method for determination of coniferyl ferulate in Angelica sinensis and Ligusticum chuanxiong [J]. J Chin Pharm Sci(中国药理学: 英文版), 2007, 16(3): 197-201.
- [11] HU F. Determination of decursin from different habitats of Angelica by HPLC [J]. Chin J Med Guid(中国医药导刊), 2015, 17(5): 533-535.
- [12] CHEN W M, YAO X M, ZHANG H Q. Determination of two coumarin contents in the root of Angelica by HPLC method [J]. J Plant Resour Envir(植物资源与环境学报), 2000, 9(4): 51-52.
- [13] CARDOSO C L, BOLZANI V S, SILVA D H, et al. The absolute configuration of 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl) cyclopentane-2,3-diol from the Amazonian tree *Chimarrhis turbinata* [J]. J Nat Prod, 2006, 69(7): 1046-1050.
- [14] WANG H, NAIR M G, STRASBURG G M, et al. Novel antioxidant compounds from Tart Cherries [J]. J Nat Prod, 1999, 62(1): 86-88.

收稿日期: 2017-03-23
(本文责编: 蔡珊珊)