

杨 兰, 李 欠, 冯彦梅, 等. 定量核磁共振波谱法测定白芷中欧前胡素含量[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4) : 1049-1053.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.034

定量核磁共振波谱法测定白芷中欧前胡素含量

杨 兰, 李 欠, 冯彦梅, 邱黛玉

(甘肃农业大学农学院中草药栽培与鉴定系, 甘肃省中药材规范化生产技术创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为建立定量核磁共振波谱法测定白芷中欧前胡素含量的方法, 以对苯二酚为内标、氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆)为溶剂, 在 400 MHz 光谱仪上进行了 qNMR 测量。选择测定温度为 293.7 K, 谱宽(SWH)为 8 012.8 Hz, 采样时间(AQ)为 4.0 s, 弛豫时间(D1)为 1 s, 脉冲宽度(P1) 14.90 s, 扫描次数(NS)为 32 次, 空扫次数(DS)为 2 次, 以欧前胡素中 δ 7.65 的峰为定量峰, 对苯二酚中 δ 6.55 的峰为内标定量峰。对线性关系、检测限、定量限、精密度、重复性、稳定性和回收率等进行了方法学评价, 结果良好。采用高效液相色谱法加以验证, 2 种方法测定结果基本一致, 表明 qNMR 可用于白芷中欧前胡素含量测定。

关键词: 白芷; 欧前胡素; 定量核磁共振波谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2020)04-1049-05

Determination of imperatorin in *Angelica dahuricae* by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy

YANG Lan, LI Qian, FENG Yan-mei, QIU Dai-yu

(Department of Cultivation and Identification of Chinese Herbal Medicine, Gansu Provincial Key Laboratory of Good Agricultural Productive Technology for Traditional Chinese Medicines, College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: A quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy for determining the imperatorin content in traditional Chinese medicine *Angelica dahuricae* was established. The qNMR measurements were performed on 400 MHz spectrometer with hydroquinone as the internal standard reference in deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d₆) solvent. The temperature was 293.7 K, spectral width (SWH) was 8 012.8 Hz, sampling time (AQ) was 4.0 s, relaxation time (D1) was 1 s, pulse width (P) was 14.90 s, the number of scans (NS) was 32 times, the number of empty sweep (DS) was two times. The peak of δ 7.65 in imperatorin and the peak of δ 6.55 in hydroquinone were selected as quantitative peak and internal standard peak, respectively. The linearity, detection limit, the limit of quantification, precision, reproducibility, stability and recovery were evaluated by methodology, and results were good. The obtained results were validated by high performance liquid chromatography (HPLC) method. The determined contents of imperatorin by qNMR are in accordance with the results by HPLC, indicating that qNMR can be applied to determine imperatorin of *Angelica dahuricae*.

Key words: *Angelica dahuricae*; imperatorin; quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy; high performance liquid chromatography (HPLC)

收稿日期: 2019-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860102); 甘肃省自然科学基金项目(18JR3RA185); 甘肃农业大学引进人才专项(GSAU-RCZX201704); 甘肃农业大学学科建设基金项目(GSAU-XXJS-2018-086); 甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金项目(GSAU-ST51737)

作者简介: 杨 兰(1995-), 女, 甘肃天祝人, 硕士研究生, 从事中药分析研究。(Tel) 15095423067; (E-mail) 2281988971@qq.com

通讯作者: 李 欠, (Tel) 18194222519; (E-mail) liqian1984@gsau.edu.cn。
邱黛玉, (Tel) 13679467228; (E-mail) qiudy@gsau.edu.cn

中药白芷为伞形科植物白芷[*Angelica dahuricae* (Fisch.exHoffm.) Benth.etHook.f.]或杭白芷[*A. dahuricae* (Fisch.exHoffm.) Benth.etHook.f. var. *formosana* (Boiss.) ShanetYuan]的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》, 并列为中品, 因干燥初生根为芷, 色白, 故名白芷, 在中国有着悠久的药食两用的历史^[2]。白芷性温, 气芳香, 味辛, 微苦, 具有解表散寒、通窍止痛、祛

风湿、消肿排脓、抗炎、解热、美白等作用,在临床实践中,广泛应用于风寒感冒、头痛、鼻塞、鼻渊、牙痛、赤白带下、痈疽疮疡、湿盛久泻等病症,特别是用于风寒侵犯阳阴引起的头痛,其疗效较显著^[3-8]。除药用外,在食品、保健品、香料、护肤美容、日用化工等方面也有广泛的应用^[9],特别是其干燥根作为调味料可增香添味,脱臭除异,增进食欲^[10]。

白芷中主要的生物活性成分有香豆素、挥发油、多糖和微量元素^[11]。香豆素主要包括欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯、氧化前胡素、水合氧化前胡素和异珊瑚菜素^[12]。在2015版药典中常用欧前胡素含量对白芷进行质量评价^[13]。目前,欧前胡素的测定多采用高效液相色谱法,该法存在耗时(出峰时间为11.6 min)、样品预处理复杂、标准品价格昂贵等缺点。因此,建立一种快速、可靠的测定白芷中欧前胡素含量的方法具有一定的现实意义^[14-18]。近年来,¹H核磁共振波谱法(¹H qNMR)已被广泛成功地应用于化学药品、中药及植物提取物、液体样品、异构体、食品等的定量分析^[19-20]。该法具有检测时间短、样品预处理简单、仪器操作相对简单、特异性好以及分析过程中不需要昂贵的对照品等优点。其基本原理是特征峰的峰面积与质子数成正比,常用绝对内标定量法,即以待测物与已知内标物的峰面积的比值确定待测物的含量^[21-26]。

本研究采用氢核磁共振建立白芷中欧前胡素含量测定新方法,并对白芷样品进行分析,并用高效液相色谱法(HPLC)验证测定结果。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

核磁共振仪(400 MHz, MestReNova 数据处理软件, Bruker 公司产品);超声清洗器,深圳市得康科技有限公司产品;HH-S 数显恒温水浴锅,江苏正基仪器有限公司产品;电子天平,慈溪市天东衡器厂产品;循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司产品;JFSD-100 粉碎机,上海嘉定粮油仪器有限公司产品;高效液相色谱仪,岛津公司产品。

欧前胡素,上海源业生物科技有限公司产品,≥98%;对苯二酚,上海麦克林生化有限公司产品,≥99%;氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆),剑桥同位素实验室有限公司产品,≥99.9%;甲醇,天津市富宇精细化工有限公司产品,≥99.5%。

白芷购于四川省遂宁市的新桥、大英、新胜等地。

1.2 测试条件

采用zg30脉冲序列,测定温度为293.7 K,谱宽(SWH)为8 012.8 Hz,采样时间(AQ)为4.0 s,弛豫时间(D1)为1 s,脉冲宽度(P1)14.90 s,样品扫描次数(NS)32次,空扫次数(DS)为2次。色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-水(B);流速:1.0 ml/min;柱温:30 °C;检测波长:250 nm;进样量:20 μl。

1.3 溶液制备

内标溶液的制备:准确称取30 mg内标物对苯二酚溶解至6.0 ml DMSO中,制得内标溶液,作为核磁共振波谱法(qNMR)定量的内标样品。供试品溶液制备:采用刘红梅等^[27]的方法进行制备。取白芷粉末(过40目筛)约25 g,精密称量,置于容量瓶中,精密加入甲醇125 ml,超声波处理(40 min, 40 °C),静置冷却,取上清液,重复2次。将2次提取液合并,过滤,滤液水浴加热得粗浸膏,称量粗浸膏质量。取粗浸膏0.06 g,精密称量,加0.5 ml内标溶液,超声波溶解,移置核磁管,用于氢核磁共振法测定。取上述粗浸膏0.06 g,精密称量,加入3 ml甲醇,超声波溶解,过微孔滤膜(0.45 μm),移置进样小瓶,用于高效液相色谱法测定。核磁共振标准品溶液的制备:准确称取3 mg欧前胡素标准品,溶解至0.5 ml内标溶液中,制得标准品溶液,备用。

2 结果与分析

2.1 溶剂、内标与定量峰的选择

测定结果表明,欧前胡素及对苯二酚在DMSO-d₆中均有较好的溶解性,且谱峰不重叠,因而选用DMSO-d₆作为溶剂,对苯二酚作为内标。以欧前胡素中δ7.65峰为定量峰,对苯二酚中δ6.55峰为内标定量峰(图1)。

2.2 定量核磁共振波谱法的方法学验证

2.2.1 线性关系 分别精密称取标准品3 g、4 g、5 g、6 g、7 g、8 g,并各加入0.5 ml内标溶液,制备6个不同浓度的样品溶液,测定¹H NMR波谱。分别对标准品和内标物特征信号峰的峰面积进行积分,每个样品的积分面积取3次积分的平均值。以标准品和内标物的积分面积比值(Y)对标准品和内标物质量比值(x)进行线性回归,得出回归方程(图2)。图2表明标准品与内标物质量比值在1.2至3.2范围内与两者定量峰面积比值呈良好的线性关系。

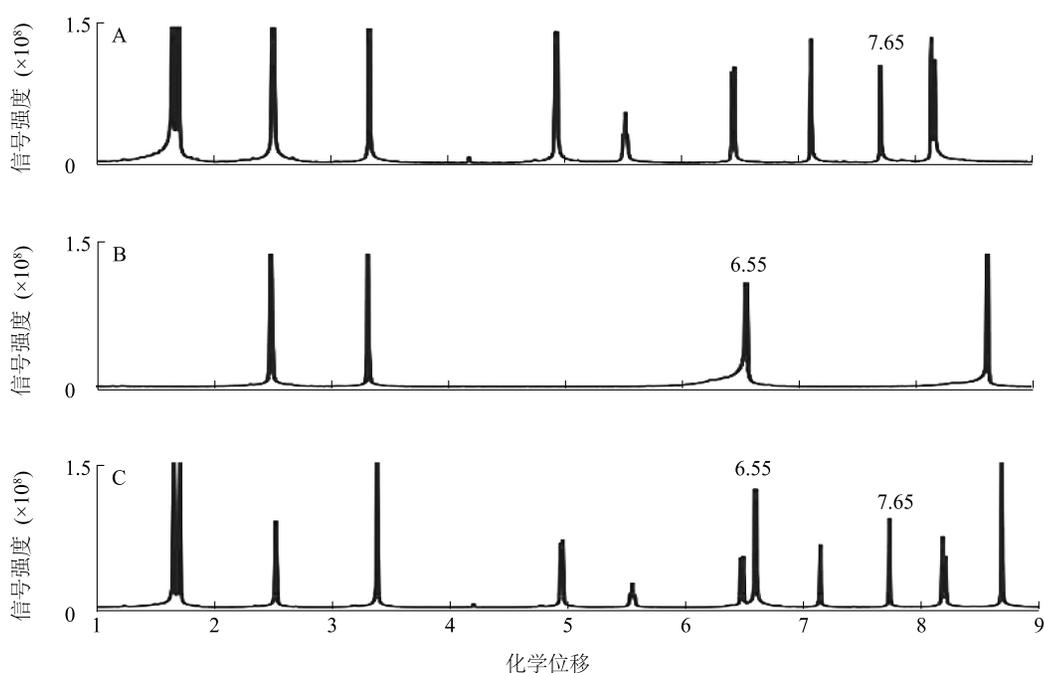


图1 欧前胡素(A)、对苯二酚(B)和两者的混合物(C)的¹H qNMR波谱

Fig.1 ¹H quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectra of imperatorin (A), hydroquinone (B) and their mixture (C)

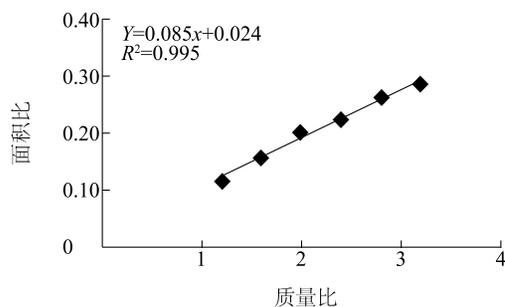


图2 标准品与内标物质量比、面积比的线性关系

Fig.2 The linear relationship of mass ratio and area ratio between standard and internal standard

2.2.2 精密度 取制备的核磁共振波谱法标准品溶液,在核磁共振测试条件下,重复测定5次。以标准品定量峰面积与内标物定量峰面积的比值计算相

对标准偏差(*RSD*), $RSD=0.654\%$ 。

2.2.3 稳定性 取用于氢核磁共振波谱法测定的溶液,分别于0 h、2 h、4 h、8 h、10 h、12 h、24 h进样测定。以样品定量峰与内标物定量峰面积比值计算*RSD*, $RSD=1.339\%$,表明供试品溶液室温放置24 h稳定。

2.2.4 重复性 在核磁共振波谱法测定溶液制备条件下,平行制备6份供试品溶液,在同一试验条件下测定。以样品定量峰面积与内标物定量峰面积的比值计算*RSD*, $RSD=1.837\%$,表明重复性良好。

2.2.5 加样回收率 取同一批已知含量的样品浸膏约0.03 g,精密称量,平行6份,分别精密加入0.5 ml欧前胡素对照品溶液,超声波溶解,移至核磁管,在核磁共振测试条件下测定,计算回收率,结果见表1。

表1 ¹H核磁共振波谱法(¹H qNMR)测定白芷中欧前胡素的回收率

Table 1 Recovery of the imperatorin in *Angelica dahuricae* by the ¹H-qNMR

样品	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (<i>RSD</i>) (%)
1	1.064	1.500	2.619	103.650	102.740	2.503
2	1.023	1.500	2.537	100.922		
3	1.023	1.500	2.619	106.377		
4	1.064	1.500	2.619	103.650		
5	1.064	1.500	2.619	103.650		
6	1.064	1.500	2.537	98.194		

2.3 样品中欧前胡素含量测定及 HPLC 验证

取制备样品 0.06 g, 精密称量, 制备供试品溶液, 进行核磁共振波谱法测定(表 2、图 3)。计算样品中欧前胡素含量(W_1), $W_1 = A_1 W_2 M_1 n_2 / A_2 M_2 n_1$, 式中 W_1 、 W_2 分别为目标物、内标物的质量, A_1 、 A_2 分别为目标物、内标物的积分面积, M_1 、 M_2 分别为目标物、内标物的分子量, n_1 、 n_2 分别为目标物、内标物的质子数。由表 2 可知, 产自新桥、大英和新胜的白芷中欧前胡素含量分别为 0.204%、0.200% 和 0.220%。另外, 采用高效液相色谱法对白芷样品中欧前胡素含量进行测定, 结果表明两种方法所得结

果无显著差异(表 2、图 4)。

表 2 ^1H 核磁共振波谱法(^1H qNMR)和高效液相色谱法(HPLC)测定白芷中欧前胡素含量

Table 2 Content of imperatorin in *Angelica dahuricae* by the ^1H qNMR and high performance liquid chromatography (HPLC)

样品	欧前胡素含量 (%)	
	^1H qNMR	HPLC
新桥样品	0.204	0.203
大英样品	0.200	0.196
新胜样品	0.220	0.211

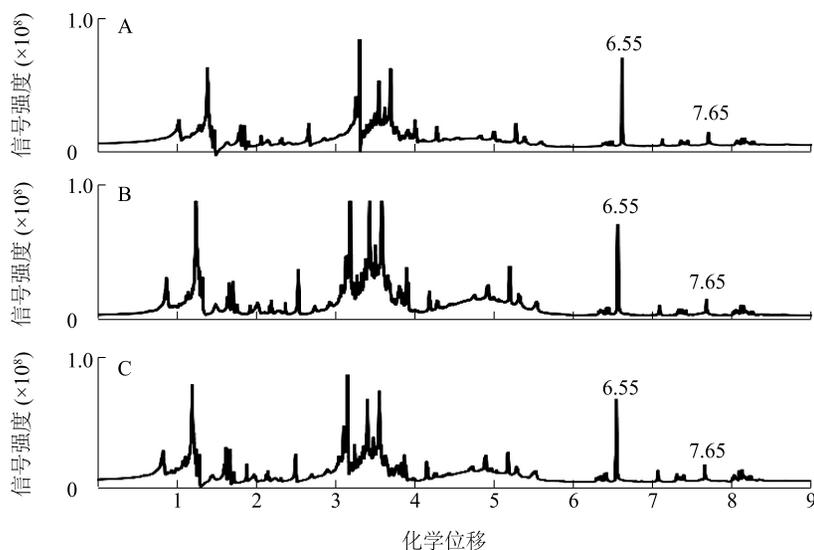


图 3 新桥(A)、新胜(B)、大英(C)白芷提取物的 ^1H 核磁共振波谱图

Fig.3 ^1H qNMR spectra of *Angelica dahuricae* extracts from Xinqiao(A), Xinsheng(B) and Daying(C)

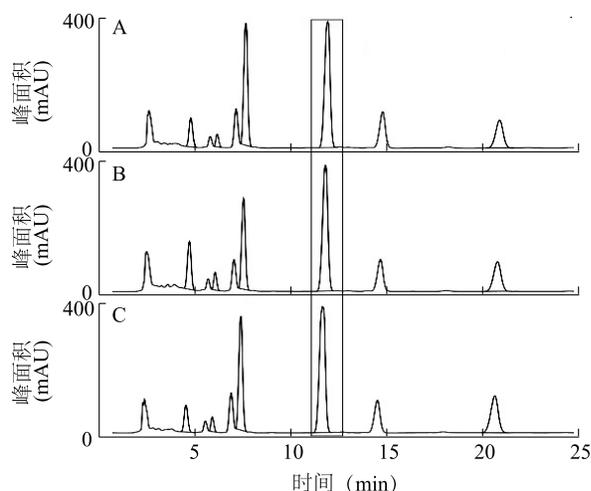


图 4 新桥、新胜、大英白芷提取物的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of *Angelica dahuricae* extracts from Xinqiao(A), Xinsheng(B) and Daying(C)

3 结论

本试验建立了定量核磁共振波谱法测定白芷中欧前胡素含量的方法。该方法具有检测时间短、样品预处理简单、仪器操作相对简单、特异性好、分析过程中不需要昂贵的对照品等优点, 且测定结果与高效液相色谱法基本一致。采用 ^1H qNMR法测定了白芷中欧前胡素含量, 并用 HPLC 法验证。结果表明, ^1H qNMR法和 HPLC 法的定量测定结果基本一致。 ^1H qNMR法可用于白芷中欧前胡素含量的测定, 为白芷质量控制提供了一种快速、有效的新方法。

参考文献:

[1] 赵亮, 曹红. 白芷有效成分提取工艺的优化及其中药材质

- 量研究[J].现代生物医学进展,2011,11(14):2759-2766,2774.
- [2] 崔秋兵,张艺,兰莎.白芷镇痛作用物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):102-104.
- [3] 周淑敏.白芷香豆素的提取及其抑菌活性研究[J].食品工业,2014,35(3):141-144.
- [4] 王 方,王 灿.白芷醇提物延缓皮肤衰老与抗氧化作用的相关性研究[J].中国药房,2012,23(7):599-602.
- [5] 韦 玮,徐 嵬,杨秀伟,等.杭白芷醋酸乙酯部位化学成分研究[J].中草药,2016,47(15):2606-2613.
- [6] LIANG W H, CHANG T W, CHARNG Y C. Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of *Angelica dahuricae* [J]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27(4): 1085-1092.
- [7] JIANG Y, LU X, PENG W, et al. Study on the influence of sulfur fumigation on chemical constituents of *Angelica dahuricae* Radix (Baizhi) [J]. Trop J Pharm Res, 2015, 14(5): 815.
- [8] KANG J, ZHOU L, SUN J, et al. Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furocoumarins in the roots of *Angelica dahuricae* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique [J]. J Pharmaceu Biomed, 2008, 47(4/5):778-785.
- [9] 邓改改,崔治家,杨秀伟.川白芷根极性化学成分研究[J].中国中药杂志,2015,40(19):3805-3810.
- [10] 郑立辉,王鹏君,李 伟,等.白芷精油成分分析及清除 DPPH 自由基活性[J].食品科学,2014,35(14):180-183.
- [11] WANG J, LIAN P, YU Q, et al. Purification, characterization and procoagulant activity of polysaccharides from *Angelica dahuricae* roots [J]. Chem Cent J, 2017, 11(1):17.
- [12] FAN G, DENG R, ZHOU L, et al. Development of a rapid resolution liquid chromatographic method combined with chemometrics for quality control of *Angelica dahuricae* radix [J]. Phytochem Analysis, 2011, 23(4):299-307.
- [13] 中华人民共和国国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:105-106.
- [14] 王志伟,闫慧娇,王晓,等.氢核磁共振法测定中药茜草中大叶茜草素和羟基茜草素的含量[J].山东科学,2017,30(1):1-7.
- [15] 林 珊,苏 娟,叶 霁,等.定量核磁共振技术在中药分析中的应用进展[J].药学实践杂志,2014,32(2):92-95,106.
- [16] 禹 珊.定量核磁共振波谱法分析中药虎杖和板蓝根中的有效成分[D].上海:上海应用技术学院,2015.
- [17] 王思寰,郝海军,王广东,等.氢核磁共振定量法测定黄藤素含量[J].药物分析杂志,2017,37(4):654-658.
- [18] 黄海伟,何 兰,岳昊坤,等.氢核磁共振定量法测定恩替卡韦 [J].药物评价研究,2015,38(5):520-522.
- [19] OWCZAREK A, KLYS A, OLSZEWSKA M A. A validated ¹H-qNMR method for direct and simultaneous quantification of esculin, fraxin and (-)-epicatechin in *Hippocastani cortex* [J]. Talanta, 2019, 192: 263-269.
- [20] 禹 珊,郭强胜,王会琳,等.定量核磁共振波谱法同时测定中药虎杖中白藜芦醇和虎杖苷的含量[J].分析化学,2015,3(1):69-74.
- [21] 王志伟,闫慧娇,陈 跃,等.氢核磁共振法测定何首乌中大黄素和大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2016,36(12):2163-2167.
- [22] 陈燕燕,李晓男,王跃飞,等.解卷积定量核磁共振法测定黄芪注射液 8 种初生代谢成分[J].分析化学,2015,43(8):1210-1217.
- [23] 陈夏霖,耿 婷,黄文哲,等.基于¹H-NMR 技术的银杏二萜内酯原料药含量测定和指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2018,43(7):1404-1409.
- [24] 张继远,樊小瑞,刘晓谦,等.核磁共振氢谱内标法测定常山碱的绝对含量[J].中国中药杂志,2018,43(1):134-138.
- [25] 杨应文,王亚丽,萨日娜,等.不同生长期当归¹H NMR 指纹图谱的研究[J].波谱学杂志,2013,30(1):69-79.
- [26] 黄 挺,张 伟,全 灿,等.定量核磁共振法研究进展[J].化学试剂,2012,34(4):327-332,341.
- [27] 刘红梅,张明贤,刘杨平,等.超临界 CO₂ 萃取白芷中香豆素类成分的工艺优化研究[J].中成药,2004(2):6-9.

(责任编辑:张震林)