

独活药材香豆素类成分的高效液相色谱指纹图谱研究

王 斌^{1,2}, 周 安¹, 杨 沫¹, 刘先华¹, 韩燕全³

(1. 安徽中医药大学科研实验中心, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038; 3. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031)

[摘要]目的 建立独活中香豆素类成分的高效液相色谱指纹图谱分析方法, 为独活药材的质量控制提供依据。**方法** 采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以水-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.2 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 330 nm。**结果** 建立了独活药材香豆素类成分的高效液相色谱特征指纹图, 标定了 15 个共有色谱峰, 采用相似度评价、聚类分析、主成分分析对所收集的 15 批样品进行指纹图谱模式识别研究, 对 6 个共有峰借助对照品进行了指认, 采用高效液相色谱-电喷雾离子源-质谱技术并结合文献报道对其余 9 个共有峰进行了初步归属。15 批独活药材的相似度结果为 0.797~0.979。运用聚类分析, 15 批独活药材可大致聚成 5 类。**结论** 该法所建立的独活药材香豆素类成分指纹图谱特征性强, 为该药材的质量控制提供了实验依据。

[关键词]独活; 香豆素; 高效液相色谱; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

[中图分类号]R282.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.01.022

独活始载于《神农本草经》, 被列为上品。“主风寒所击, 金疮止痛, 奔豚痲瘖, 女子疝瘕, 久服轻身耐老。”对其植物来源, 历代本草诸说不一^[1]。现在所用品种也依地区不同而差异很大。《中药大辞典》共收录了 13 种之多, 直到 1959 年的《中药志》^[2] 根据实际调查才逐步理清, 独活来源于 2 科多种植物, 主要为川独活类型(来源于当归属植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan), 香独活类型(来源于当归属毛当归 *A. pubescens* Maxim.), 牛尾独活类型(来源于独活属 *Heracleum* 植物)及九眼独活类型(来源于五加科植物 *Aralia cordata* Thunb.)。《中华人民共和国药典》规定独活正品为伞形科植物重齿毛当归的干燥根, 临床上主要用于风寒湿痹、腰膝疼痛、少阴伏风头痛等症。现代植物化学提取分离研究已经证实, 独活中主要含有伞形花内脂、二氢欧山芹醇乙酸酯、蛇床子素、二氢欧山芹素等数十种香豆素类化合物^[1]。现代药理研究表明, 独活有抗炎、抗肿瘤、抗菌等作用^[1,3]。

羌活药材因外观与独活药材相似, 市场上常将羌活与独活药材混用。因此, 为了保障药材质量, 对独活药材的质量控制显得尤为重要。然而, 目前对独活药材的质量控制主要集中于药材中几种主要成分的含量测定。如 2010 年版《中华人民共和国药典》一部^[4] 以蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯作为独活药材含量检测指标控制药材质量。然

而, 含有数十种药理活性成分的药材仅通过几个指标成分的含量测定尚不能全面评价药材质量的优劣。鉴于此, 笔者在前期研究^[3,5] 基础上, 收集了包括 GAP 种植基地在内的不同产地的 15 批独活药材, 建立了独活药材香豆素类成分高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC) 指纹图谱, 并对指纹图谱中 15 个共有峰进行指认与推断, 首次从定性角度深入分析独活药材, 通过数据化处理并结合相似度评价、模糊聚类分析等方法从整体角度进一步评价, 以期能为全面控制该药材的质量提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 型 HPLC(包括在线脱气机、二元泵、恒温自动进样器、柱温箱、紫外检测器); 美国安捷伦公司; Finnigan Surveyor-LCQ XL 二维线性离子阱液质联用仪, 质谱(Mass, MSⁿ) 配有电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 高效液相色谱仪: 美国 Thermo Finnigan 公司; BP211D 型十万分之一电子天平: 德国赛多利斯公司; HS10260D 型超声清洗器: 天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

1.2 试剂 对照品蛇床子素(批号 110822-201308) 和补骨脂素(批号 110739-201115): 中国食品药品检定研究院; 对照品伞形花内酯、佛手柑内酯、花椒毒素、二氢欧山芹醇当归酸酯: 天津士兰科技有限公司。2 批 GAP 种植基地独活药材于 2014 年 6 月采于湖北省五峰县牛庄乡, 11 批不同产地独活药材(产地: 湖北省、四川省、甘肃省)由安徽省亳州市食

品药品检验所刘军检验员收集,2批市售药材购自北京同仁堂合肥药店和立方大药房合肥药店。所购独活药材经安徽中医药大学第一附属医院孟楣主任药师鉴定为重齿毛当归(*Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan)的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS XB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以水为流动相A、以甲醇为流动相B进行梯度洗脱。洗脱程序:0~10 min, 30% B; 15~17 min, 42% B; 20~30 min, 52% B; 35~45 min, 60% B; 50~60 min, 65% B; 65~70 min, 70% B。流速为 1.2 mL/min,柱温为 25 ℃,检测波长为 330 nm。采用 ESI,喷雾电压为 4.0 kV;鞘气为高纯氮气,压力流速为 35 个单位;碰撞气体为高纯氮气;金属毛细管温度 300 ℃;采用正离子方式检测模式,扫描范围从 *m/z* 80 到 *m/z* 800,二级质谱离子隔离宽度 2(*m/z*),碰撞裂解能量(collision-induce dissociation, CID)为 35%。

2.2 对照品溶液的制备 称取对照品伞形花内酯、补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、蛇床子素和二氢欧山芹素,精密称定,用甲醇-二氯甲烷(容积比为 1:1)溶解,制成质量浓度分别为 0.504、0.916、0.600、0.900、0.571、0.553 mg/mL 的对照品储备液,分别取上述标准品 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶中,定容至 10 mL,得混合对照溶液,进样前用 0.45 μL 微孔滤膜过滤。

2.3 供试品溶液的制备 称取独活药材约 20.0 g,经粉碎机粉碎后过 180 目筛。称取独活药材粉末约 2.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,用甲醇与二氯甲烷混合溶液(容积比为 1:1)超声萃取 3 次,萃取容积依次为 30、30、20 mL,每次 30 min,滤过,合并提取液,旋干,用甲醇与二氯甲烷混合溶液(容积比为 1:1)溶解,并转移至 10 mL 容量瓶中,定容,进样前用 0.45 μL 微孔滤膜过滤。

2.4 方法学考察

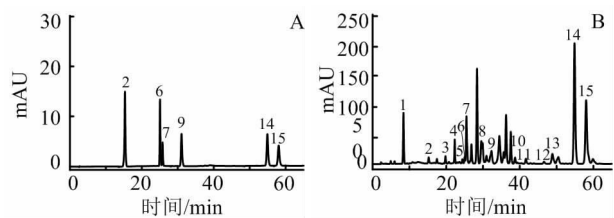
2.4.1 精密度试验 精密吸取 S1 号供试品溶液(甘肃-1),按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录独活 HPLC 图谱。结果显示,以蛇床子素峰为参比峰,15 个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.06%~0.31% 和 0.28%~1.67%。将这 6 张色谱图经中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版)评价,其相似度均大于 0.995,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取 S9 号供试品溶液(湖北五峰-2),采用“2.1”项下的色谱条件,分别在 0、3、6、

9、12、24 h 进样,记录独活 HPLC 图谱。结果显示 15 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积(参比峰为蛇床子素峰)的 RSD 分别为 0.02%~0.63% 和 0.82%~2.29%,将这 6 张 HPLC 图谱经中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版)评价,其相似度均大于 0.994,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.3 重复性试验 称取 S14 号独活供试品(四川-3)6 份,每份约 2.0 g,按标准方法制备供试品溶液,按上述优化的色谱条件进样 10 μL,记录独活的 HPLC 图谱。结果表明,以蛇床子素峰为参比峰,15 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.03%~0.67% 和 0.62%~2.48%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.4.4 独活药材特征峰解析 取 15 批不同产地的独活药材,按标准方法制备样品溶液,并在上述优化的色谱条件下测定样品的 HPLC 图谱。根据指纹图谱软件处理图谱,自动生成独活药材共有模式的对照图谱,见图 1。确定了 15 个色谱峰作为共有特征色谱峰,并对其进行 HPLC-ESI-MSⁿ 分析,各峰的质谱信息见表 1。通过对照质谱信息和保留时间,指认了其中的 6 个峰,通过质谱信息并结合文献报道^[6-12],推断了 15 个特征峰中的另外 9 个峰。



注:1. 腺苷;2. 伞形花内酯;3. 3-O-反式阿魏酰基奎宁酸;4. 紫花前胡苷;5. 二氢欧山芹醇;6. 补骨脂素;7. 花椒毒素;8. 异当归醇;9. 佛手柑内酯;10. 欧芹烯酚;11. 二氢欧山芹醇乙酸酯;12. 川白芷素;13. 当归三醇;14. 蛇床子素;15. 二氢欧山芹醇当归酸酯

图 1 混合对照品色谱图(A)和独活药材的共有模式图(B)

2.5 指纹图谱建立及分析评价

2.5.1 参比峰的选择 从 15 批次独活样品的 HPLC 图谱中可知,14 号蛇床子素色谱峰峰面积最大,保留时间稳定,且为独活的主要活性成分,所以选择其作为参照峰(即 S 峰)。

2.5.2 独活药材 HPLC 指纹图谱的建立 将每个样品的 AIA 格式文件导入相似度评价软件,以湖北省五峰县牛庄乡 GAP 种植基地样品(S9 号,湖北五峰县-2)为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度设为 0.1 min 且对色谱图上保留时间在 5~65 min 时间段的色谱峰进行分析,选定了 15 个色谱峰进行多

点校正,自动匹配,最终获得了15个共有特征峰,见图2。表2为不同产地独活药材的相似度数据。

表1 独活样品中15个共有峰的HPLC-ESI(+)-MSⁿ数据及鉴定

峰号	t_R /min	$[M+H]^+$ m/z	ESI(+)-MS ⁿ 碎片信息: m/z	化合物鉴定	参考
1	8.389	268	MS ² [268]:136;	腺苷(adenosine)	[6]
2	15.242	163	MS ² [163]:119;MS ³ [119]:91	伞形花内酯(umbelliferone)	*
3	20.755	369	MS ² [369]:177;MS ³ [177]:145;MS ⁴ [145]:117	3-O-反式阿魏酰基奎宁酸(3-O-trans-coumaroylquinic acid)	[6]
4	22.319	409	MS ² [409]:247;MS ³ [247]:229;MS ⁴ [229]:187	紫花前胡苷(nodakenin)	[7]
5	24.378	247	MS ² [247]:229;MS ³ [229]:201;MS ⁴ [201]:173	二氢欧山芹醇(columbianetin)	[8]
6	25.015	187	MS ² [187]:143;MS ³ [143]:115	补骨脂素(psoralen)	*
7	25.510	217	MS ² [217]:202;MS ³ [202]:174;MS ⁴ [174]:146	花椒毒素(xanthotoxin)	*
8	29.545	377	MS ² [359]:301;MS ³ [301]:219;MS ⁴ [219]:191	异当归醇(isoangelol)	[9]
9	30.954	217	MS ² [217]:202;MS ³ [202]:174;MS ⁴ [174]:146	佛手柑内酯(bergapten)	*
10	39.325	231	MS ² [231]:175;MS ³ [175]:147;MS ⁴ [147]:103	欧芹烯酚(osthenol)	[10]
11	41.647	289	MS ² [289]:229;MS ³ [229]:187;MS ⁴ [187]:159	二氢欧山芹醇乙酸酯(columbianetin acetate)	[10]
12	46.575	229	MS ² [229]:187;MS ³ [187]:159;MS ⁴ [159]:131	川白芷素(angenomalin)	[11]
13	48.860	295	MS ² [295]:277;MS ³ [277]:259;MS ⁴ [259]:241	当归三醇(angelitriol)	[12]
14	54.874	245	MS ² [245]:189;MS ³ [189]:161;MS ⁴ [161]:133	蛇床子素(osthole)	*
15	58.027	329	MS ² [329]:229;MS ³ [229]:187;MS ⁴ [187]:159	二氢欧山芹醇当归酸酯(columbianadin)	*

注: t_R (retention time)为保留时间;*表示与标准品进行对照

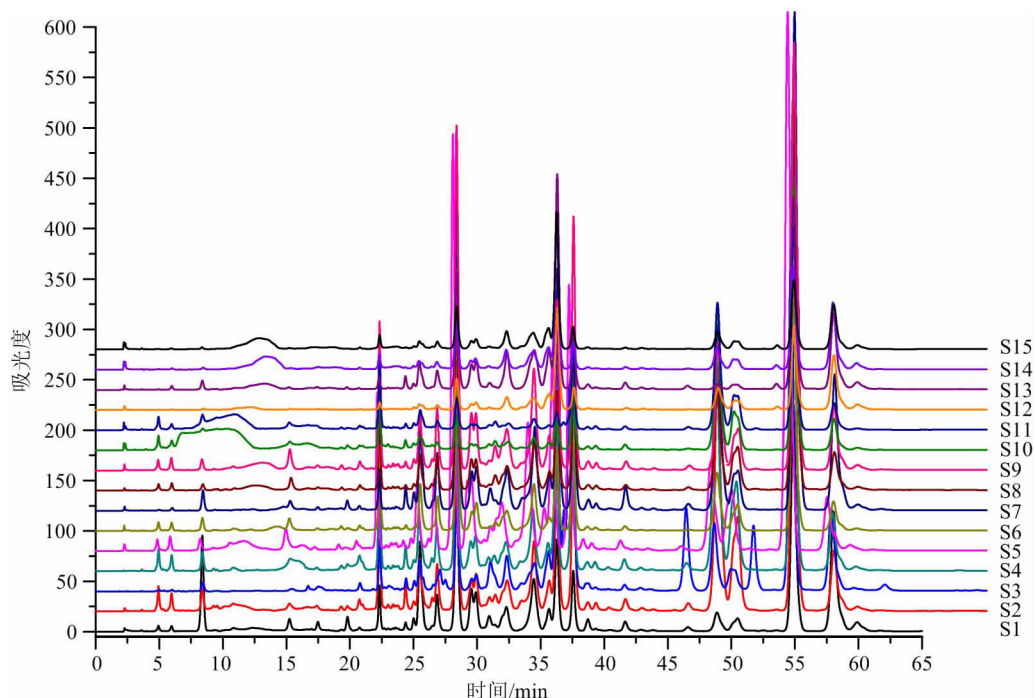


图2 15批独活药材HPLC指纹图谱叠加图

表2 15批不同产地及来源独活药材的
HPLC 指纹图谱共有峰相似度

样品 编号	样品 名称	相似 度	样品 编号	样品 名称	相似 度
S1	甘肃-1	0.908	S9	湖北五峰-2	0.975
S2	甘肃-2	0.950	S10	市售-立方药业	0.874
S3	甘肃-3	0.925	S11	市售-北京同仁堂	0.844
S4	甘肃-4	0.944	S12	四川-1	0.899
S5	湖北-1	0.963	S13	四川-2	0.848
S6	湖北-2	0.977	S14	四川-3	0.922
S7	湖北恩施	0.979	S15	四川-4	0.797
S8	湖北五峰-1	0.974			

2.5.3 独活药材聚类分析 以15个共有峰的峰面积作标,运用SPSS 16.0软件,采用组间平均数联结法,样品相似度的距离公式选择夹角余弦,对15个批次独活样品进行系统聚类,得到聚类树状图。从聚类分析结果可知,15批独活样品被聚为五类,S1、S14聚为I类;S2、S4、S7、S9聚为II类;S3、S5、S8聚为III类;S6、S10、S11聚为IV类;S12、S13、S15聚为V类。

2.5.4 共有峰主成分分析 用SPSS 16.0统计分析软件对原始数据作标准化处理,以主成分的特征根及贡献率作为选择主成分的依据进行主成分分析。取主成分对应的特征值大于1的前4个主成分,对15个样品(观测对象)的15个共有峰(变量)进行主成分分析,结果显示4个主成分累计贡献可以达到89.854%。其中第一、第二、第三和第四主成分特征值分别为7.253、2.718、1.951和1.556,相应的方差贡献率分别为48.357%、18.119%、13.005%和10.374%。分别以第一、第二、第三主成分来建立坐标系,进行投影后可得到所有样本的主成分分析三维投影图,结果显示15个共有峰可大致分为3类。经旋转后得到公共因子载荷矩阵,每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数,再经SPSS 16.0软件计算可得主成分模型,从上述主成分模型可以看出,4个主成分中,A1是特征值最大的峰。第一主成分中前5名变量系数分别为0.330、0.275、0.214、0.202和0.121,分别为指纹图谱中的13号色谱峰(当归三醇)、5号色谱峰(二氢欧山芹醇)、10号色谱峰(欧芹烯酚)、11号色谱峰(二氢欧山芹醇乙酸酯)和14号色谱峰(蛇床子素);系数的大小反映指标成分贡献率的大小。

3 讨论

3.1 共有峰的鉴定 取“2.3”项下的独活提取液10 μ L进行HPLC-ESI-MSⁿ多级质谱分析。本实

验关注的成分主要是香豆素类,为苯并吡喃酮结构。香豆素化合物在进行HPLC-MSⁿ分析时易产生丢失 m/z 28(CO)或 m/z 44(CO₂)的碎片离子。本实验结合前期研究,运用香豆素化合物的HPLC-ESI-MSⁿ裂解规律,对未知峰的多级质谱信息进行分析并结合6个标准品信息,在独活的植物化学提取相关文献报道的基础上,鉴定了全部共有峰。1号峰, $t_R=8.389$ min,正离子模式可见 m/z 268[M+H]⁺,分子中应含有奇数氮原子,将[M+H]⁺峰进行MS²分析,通过丢失132的核糖基碎片而产生 m/z 136离子,结合文献[6]报道推测为腺苷。3号峰, $t_R=20.755$ min,正离子模式可见 m/z 369[M+H]⁺,对该[M+H]⁺峰进行MS²分析,通过丢失192的碎片产生 m/z 177离子,将 m/z 177离子进行MS³和MS⁴分析,通过连续丢失CO产生 m/z 145和 m/z 117离子,结合文献[6]报道推测为3-O-反式阿魏酰基奎宁酸。4号峰, $t_R=22.319$ min,正离子模式可见 m/z 409[M+H]⁺,对该[M+H]⁺峰进行MS²分析,通过丢失162的葡萄糖基碎片产生 m/z 247离子,后将 m/z 247离子进行MS³和MS⁴分析,通过连续丢失H₂O和C₃H₆产生 m/z 229和 m/z 187离子,结合文献[7]报道推测为紫花前胡苷。5号峰, $t_R=24.378$ min,正离子模式可见 m/z 247[M+H]⁺,将[M+H]⁺峰进行MS²分析,通过丢失水分子产生 m/z 229离子,再将 m/z 229离子进行MS³和MS⁴分析,通过连续丢失CO产生 m/z 201和 m/z 173离子,结合文献[8]报道推测为二氢欧山芹醇。8号峰, $t_R=29.545$ min,正离子模式可见 m/z 377[M+H]⁺,将[M+H]⁺峰进行MS²分析,通过丢失18 Dau的水分子产生 m/z 359离子,再将 m/z 359离子进行MS³和MS⁴分析,通过连续丢失CH₃COCH₃、C₅H₆O和CO产生 m/z 301、 m/z 219和 m/z 191离子,结合文献[9]报道推测为异当归醇。10号峰, $t_R=39.325$ min,正离子模式可见 m/z 231[M+H]⁺,对该[M+H]⁺峰进行MS²分析,通过丢失C₄H₈的丁烯碎片产生 m/z 175离子,后将 m/z 175离子进行MS³和MS⁴分析,通过连续丢失CO和CO₂产生 m/z 147和 m/z 103离子,结合文献[10]报道推测为欧芹烯酚。11号峰, $t_R=41.647$ min,正离子模式可见 m/z 289[M+H]⁺,对该[M+H]⁺峰进行MS²分析,产生 m/z 229的川白芷素型特征离子,对该 m/z 229离子进行MS³和MS⁴分析,通过连续丢失C₃H₆和CO产生 m/z 187和 m/z 159离子,结合文献[10]报道推测为二氢欧山芹醇乙酸酯。12号峰, $t_R=46.575$ min,

正离子模式可见 m/z 229 $[M+H]^+$, 对该 $[M+H]^+$ 峰进行 MS^2 分析, 通过丢失 C_3H_6 的丙烯碎片产生 m/z 187 离子, 对该 m/z 187 离子进行 MS^3 和 MS^4 分析, 通过连续丢失 CO 产生 m/z 159 和 m/z 131 离子, 结合文献[11]报道推测为川白芷素。13 号峰, $t_R = 48.860$ min, 正离子模式可见 m/z 295 $[M+H]^+$, 对 $[M+H]^+$ 峰进行 MS^2 、 MS^3 和 MS^4 分析, 结果显示, 通过连续丢失 H_2O 产生 m/z 277, m/z 259 和 m/z 241 离子, 结合文献[12]报道推测为当归三醇。

3.2 相似度评价 15 批相似度为 0.797~0.979。其中 2 批市售独活药材(S10, S11)与 3 批四川产地独活药材(S12, S13, S15)相似度小于 0.900, 4 批样品(S1, S3, S4, S14)的相似度为 0.908~0.950, 6 批样品(S2, S5, S6, S7, S8, S9)的相似度大于 0.950。以上数据反映不同来源的独活药材的质量间存在一定的差异。甘肃和湖北产地的药材具有较高的均一性。

3.3 聚类分析 聚类分析是根据相似度大小将样品归类。从聚类分析结果可知, 市售药材(S10 和 S11)聚为一类, 而产地相近的药材并未全部聚为一类, 如四川产地药材(S12, S13, S15)聚为一类, 而甘肃产地(S2, S4)和湖北产地(S7, S9)药材交叉聚为一类。值得一提的是, 同为 GAP 种植基地药材(S8 和 S9)却未能聚为一类, 这些差异性表明, 地理环境中的土壤酸碱度、光照时间、水分以及药材的采收季节等因素可能会对独活中化学成分的含量变化产生一定影响。聚类分析结果与相似度结果基本一致。

3.4 主成分分析 在中药材鉴别方面, 主成分分析方法有较多应用。本实验选取 15 个主要色谱峰的相对峰面积作为变量(将蛇床子素的峰设为参照峰), 根据主成分分析法的降维对独活药材的 HPLC 指纹图谱数据快速分析, 不仅能判别药材的真伪与优劣, 还可以作为独活药材质量检测的一种手段。

3.5 真伪药材鉴别 常艳旭等^[13]报道了独活的指纹图谱研究, 主要侧重于对指纹图谱方法的建立及含量测定, 而本实验在建立独活指纹图谱的基础上, 采用相似度分析、聚类分析、主成分分析和 HPLC- MS^n 分析对独活指纹图谱进行更深入的定性研究, 并将市售药材和 GAP 种植基地药材纳入指纹图谱评价范围内, 应用范围更广。在与独活混品羌活的对比研究中发现, 独活药材中峰面积最大的蛇床子素峰和二氢欧山芹素峰在羌活药材中几乎未被发

现, 由此可将本实验所建立的指纹图谱用于独活与其混品的鉴别。

本实验首次采用指纹图谱结合 HPLC-ESI- MS^n 、聚类分析等方法对包括 GAP 种植基地在内的 15 批独活药材进行质量评价, 建立了独活药材香豆素类成分的 HPLC 指纹图谱, 选取 15 个共有特征峰进行分析, 采用对照品、LC-MS 信息和文献报道等多手段对共有峰进行指认和推断, 主要包括 1 个腺苷和 14 个香豆素类成分, 首次从定性角度深入分析独活药材。单纯的中药指纹图谱由于缺乏对指纹峰化学信息的了解而不能反映中药的药物活性。因此, 本研究从指纹图谱的整体性入手, 为独活的质量评价以及临床应用提供更完善的依据。

(致谢: 北京大学杨秀伟教授和湖北省中医药研究院王克勤研究员在采购 GAP 种植基地独活药材上给予了热心帮助, 安徽省亳州市食品药品检验所刘军检验员帮助收集不同产地独活药材, 在此一并感谢!)

参考文献:

- [1] 柳江华, 徐绥绪, 姚新生. 独活的化学成分与药理研究进展[J]. 沈阳药学院学报, 1994, 59(11): 143-150.
- [2] 单锋, 袁媛, 郝近大, 等. 独活、羌活的本草源流考[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3399-3403.
- [3] WANG B, LIU X H, ZHOU A, et al. Simultaneous analysis of coumarin derivatives in extracts of *Radix Angelicae pubescentis* (Duhuo) by HPLC-DAD-ESI- MS^n technique[J]. Analysis Methods, 2014, 6: 7996-8002.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 246.
- [5] 贾淑云, 王斌. HS-GC-MS 法测定独活中挥发性成分[J]. 安徽医药, 2014, 18(8): 1429-1433.
- [6] 杨秀伟, 郭庆梅, 张才煜, 等. 独活化学成分的进一步研究[J]. 解放军药学报, 2008, 24(5): 389-392.
- [7] 丁希飞, 冯煦, 董云发, 等. 中药独活化学成分的研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 516-518.
- [8] 王志学, 沈玉强, 陈英杰, 等. 中药独活活性成分的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1988, 5(3): 183-188.
- [9] 潘竞先, LAMY K, ARISON B, 等. 重齿毛当归(独活)中异当归醇、毛当归醇及其它香豆素的分离与鉴定[J]. 药学学报, 1987, 22(5): 380-384.
- [10] 陈尚齐, 张涵庆, 袁昌齐, 等. 中药川独活和浙独活中香豆素成分的研究[J]. 药学学报, 1982, 17(5): 392-394.
- [11] 张才煜, 张本刚, 杨秀伟. 独活化学成分的研究[J]. 解放军药学报, 2007, 23(4): 241-245.
- [12] 丁希飞, 冯煦, 董云发, 等. 独活香豆素类成分的研究[J]. 中成药, 2009, 31(7): 1102-1104.

[13] 常艳旭,朱子微,李晋,等.高效液相色谱法同时测定独活中七种有效成分含量及在质量评价中应用[J].内蒙古

古大学学报,2011,42(2):215-233.

(收稿日期:2018-10-09;编辑:曹健)

A Study on the Fingerprints of Coumarins from Radix Angelicae Pubescentis by High-performance Liquid Chromatography

WANG Bin^{1,2}, ZHOU An¹, YANG Mo¹, LIU Xian-hua¹, HAN Yan-quan³

(1. Experimental Research Center, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 3. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

[Abstract] Objective To develop a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the fingerprint analysis of coumarins from Radix Angelicae Pubescentis, and to provide a reference for its quality control. **Methods** HPLC was performed on a C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of water-methanol for gradient elution at a flow rate of 1.2 mL/min, a column temperature of 25 °C, and a detection wavelength of 330 nm. **Results** The HPLC characteristic fingerprints of coumarins from Radix Angelicae Pubescentis were established, and there were 15 common chromatographic peaks in the fingerprints. Fingerprint pattern recognition was performed on 15 batches of samples by similarity evaluation, cluster analysis, and principal component analysis. Among the 15 common peaks, 6 were confirmed with reference to the retention time (t_R) and mass spectrum of the reference standard, and the remaining 9 peaks were preliminarily classified by HPLC-ESI-MSⁿ as well as literature reference. The similarity of the fingerprints of 15 batches of samples was 0.797-0.979. The 15 batches of samples could be generally classified into 5 clusters using cluster analysis. **Conclusion** The fingerprints of coumarins from Radix Angelicae Pubescentis established by this method are highly characteristic, and may provide an experimental basis for the quality control of Radix Angelicae Pubescentis.

[Key words] Radix Angelicae Pubescentis; Coumarin; High-performance liquid chromatography; Fingerprint; Principal component analysis; Cluster analysis