

# 重庆道地药材独活与全国其他产区独活主要药效成分含量对比研究<sup>Δ</sup>

胡太德<sup>1\*</sup>, 陈绍成<sup>2#</sup>, 谭君<sup>2</sup>(1.重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 2.重庆第二师范学院生物与化学工程系, 重庆 400067)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4711-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.36

**摘要** 目的:比较重庆巫山县产区、巫溪县产区与国内其他产区独活中蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯含量的差异。采用高效液相色谱法。色谱柱为Shiseido Capcell Pak C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为330 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯检测质量浓度线性范围分别为0.015 1~0.301 6、0.016 7~0.334 4 mg/ml(*r*均为0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.46%~106.11%(RSD=2.34%,*n*=9)、98.24%~102.69%(RSD=1.29%,*n*=9)。结论:该方法操作简便、重复性好,可用于独活中蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯含量的测定。重庆巫山县产区独活中蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯的含量明显高于巫溪县和国内其他产区。

**关键词** 道地药材;独活;蛇床子素;二氢欧山芹当归酸酯;高效液相色谱法

## Comparative Study on the Main Medical Component Contents of *Angelica pubescens* in Famous Region Chongqing and Other Domestic Areas in China

HU Tai-de<sup>1</sup>, CHEN Shao-cheng<sup>2</sup>, TAN Jun<sup>2</sup> (1.Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 2.Dept. of Biology and Chemistry Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the contents of osthole and columbianadin in *Angelica pubescens* in Wushan county, Wuxi county in Chongqing and other domestic areas in china. METHODS: HPLC was performed on the column of Shiseido Capcell Pak C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 330 nm, column temperature was 30 ℃ and volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.015 1-0.301 6 mg/ml(*r*=0.999 9) for osthole and 0.016 7-0.334 4 mg/ml(*r*=0.999 9) for columbianadin; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 98.46%-106.11%(RSD=2.34%,*n*=9) and 98.24%-102.69%(RSD=1.29%,*n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and good reproducibility, and can be used for the contents determination of osthole and columbianadin in *A. pubescens*. The contents of osthole and columbianadin in *A. pubescens* of Wushan county in Chongqing are obviously higher than Wuxi county and other domestic areas in China.

**KEYWORDS** Famous region drug; *Angelica pubescens*; Osthole; Columbianadin; HPLC

独活始载于《神农本草经》,列为上品,擅治下半身风湿痹证,中医临床常与羌活配对联用。历代本草对其植物来源诸说不一,因其产地不同,差异较大<sup>[1-2]</sup>。我国药典收录的独活正品为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim.的干燥根,具有祛风除湿、通痹止痛的功效,临床多用于风寒湿痹、腰膝疼痛,少阴伏风头痛的治疗<sup>[3]</sup>。有研究报道,独活具有抗肿瘤、抗炎、抗血小板等作用<sup>[2,4-7]</sup>,其中抗肿瘤的主要成分为蛇床子素、补骨脂素、伞形花内脂和异欧前胡素等<sup>[6]</sup>。2010版《中国药典》(一部)以蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯为其指标性

成分对其进行定性定量控制<sup>[8]</sup>。

作为我国独活主产区重庆,近年来大力调整农业产业结构,在市政府的支持下,巫溪县和巫山县政府把独活作为当地主要经济产业来发展,该地区以片区种植为主,正逐步向中药材生产质量管理规范(GAP)规范化种植迈进。为配合政府部门加快推进区域内道地中药独活产业的发展,对当地独活的质量作分析评价很有必要。

近年来,已有学者对独活在不同生长环境和不同采收时期等因素下主要药效活性成分的含量变化进行了研究,并结合指纹图谱进行了分析<sup>[8-10]</sup>。然而,目前对于重庆市道地药材独活不同主产区(巫山县和巫溪县)与全国其他产区独活主要药效活性成分对比研究尚未见报道。本课题组连续3年(2012—2014年)于不同月份收集重庆巫溪县和巫山县独活各9批,其他地区独活7批,采用高效液相色谱(HPLC)法,结合2010年版《中国药典》(一部)收录标准,测定其主要药效活性

Δ 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ121508);重庆高校“创新团队建设计划”项目(No.KJTD201325)

\* 副主任中药师。研究方向:中药鉴定及质量标准。E-mail: htddd@163.com

# 通信作者:主任药师,教授。研究方向:天然药物开发及质量标准。E-mail: csc1966109@sohu.com

成分蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯的含量,对比分析重庆巫山县、巫溪县主产区 and 国内其他产区间独活中上述两种成分含量差异,综合评价分析重庆道地药材独活的质量,以为重庆产独活的品质评价、种质资源保护和GAP规范化种植提供技术参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

e2695型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);AE200型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

蛇床子素对照品(批号:06-2010)、二氢欧山芹当归酸酯对照品(批号:06-2011)均购自上海中药标准化研究中心,纯度均>98%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 药材

本研究收集来自各地的独活(见表1),样品经重庆第二师范学院陈晓麟教授鉴定为真品,标本保存于重庆第二师范学院;样品粉碎,过三号筛,抽真空贮藏,备用。

表1 独活来源

Tab 1 Origin of *A. pubescens*

编号	产地	批号	编号	产地	批号
WX-1	重庆巫溪	20120916	WS-5	重庆巫山	20131019
WX-2	重庆巫溪	20121018	WS-6	重庆巫山	20131117
WX-3	重庆巫溪	20121115	WS-7	重庆巫山	20140917
WX-4	重庆巫溪	20120915	WS-8	重庆巫山	20141019
WX-5	重庆巫溪	20121018	WS-9	重庆巫山	20141117
WX-6	重庆巫溪	20121116	SS-1	浙江嘉兴	dh20130902
WX-7	重庆巫溪	20130916	SS-2	甘肃华亭	dh20130930
WX-8	重庆巫溪	20131018	SS-3	湖北巴东	dh20120928
WX-9	重庆巫溪	20131116	SS-4	四川阿坝	dh 20121010
WS-1	重庆巫山	20120917	SS-5	安徽亳州	dh 20131018
WS-2	重庆巫山	20121019	SS-6	湖北恩施	dh 20131118
WS-3	重庆巫山	20121116	SS-7	重庆武隆	dh 20130927
WS-4	重庆巫山	20130916			

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shiseido Capcell Pak C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~5 min, 20%→28% A; 5~10 min, 28%→36% A; 10~13 min, 36%→41% A; 13~20 min, 41% A; 20~23 min, 41%→75% A; 23~30 min, 75%→95% A; 30~35 min, 95% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:330 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数均不低于5 000,分离度大于1.5,详见图1。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯对照品各适量,加甲醇制成每1 ml含蛇床子素75.40 μg和二氢欧山芹当归酸酯83.60 μg的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇20 ml,密塞,称定质量,超声(功率:250

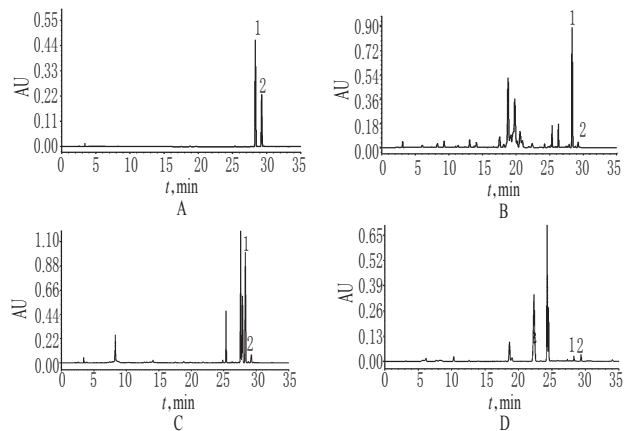


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.巫山县独活;C.巫溪县独活;D.甘肃省独活

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B. *A. pubescens* in Wushan county; C. *A. pubescens* in Wuxi county; D. *A. pubescens* in Gansu province

W, 频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 线性关系考察

分别精密称取蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯对照品7.54、8.36 mg,置于25 ml具塞瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成含蛇床子素0.301 6 mg/ml、二氢欧山芹当归酸酯0.334 4 mg/ml的混合对照品贮备液。分别精密吸取不同体积上述对照品贮备液,以甲醇倍比稀释制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列混合对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯回归方程分别为 $y=3.02 \times 10^7 x + 11\ 030.78$  ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=1.84 \times 10^7 x + 12\ 150.96$  ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯检测质量浓度线性范围分别为0.015 1~0.301 6、0.016 7~0.334 4 mg/ml。

### 2.4 精密度的试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯峰面积的RSD分别为0.16%、0.57% ( $n=6$ ),表明仪器精密度的良好。

### 2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:WX-1)适量,分别于放置0、2、4、12、24、48 h时进样测定,记录峰面积。结果,蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯峰面积的RSD分别为1.18%、1.23% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在48 h内基本稳定。

### 2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:WX-1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯峰面积的RSD分别为1.15%、1.16% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

取已知含量的样品(编号:WX-1)适量,共6份,分别加入高、中、低质量的蛇床子素、二氢欧山芹当归酸酯对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test(n=9)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
蛇床子素	0.251 3	2.126 9	1.131 0	3.285 0	102.39	101.8	2.34
	0.251 9	2.131 9	1.131 0	3.262 9	100.00		
	0.251 0	2.124 4	1.131 0	3.255 8	100.03		
	0.253 1	2.141 8	2.262 0	4.439 3	101.57		
	0.252 4	2.136 0	2.262 0	4.444 8	102.07		
	0.252 2	2.134 3	2.262 0	4.396 3	100.00		
	0.251 6	2.129 4	3.016 0	5.098 9	98.46		
	0.251 7	2.130 2	3.016 0	5.301 8	105.16		
	0.251 9	2.131 9	3.016 0	5.332 0	106.11		
二氢欧山芹当归酸酯	0.251 3	0.406 0	0.209 0	0.613 0	99.02	100.0	1.29
	0.251 9	0.407 0	0.209 0	0.612 3	98.24		
	0.251 0	0.405 6	0.209 0	0.613 5	99.49		
	0.253 1	0.408 9	0.418 0	0.838 1	102.69		
	0.252 4	0.407 8	0.418 0	0.829 0	100.76		
	0.252 2	0.407 5	0.418 0	0.829 2	100.90		
	0.251 6	0.406 5	0.627 0	1.024 7	98.59		
	0.251 7	0.406 7	0.627 0	1.032 4	99.79		
	0.251 9	0.407 0	0.627 0	1.035 6	100.26		

## 2.8 样品含量测定

取不同产地独活各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表3。

## 3 讨论

本研究表明,该方法操作简便、重复性好,可用于独活中蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯含量的测定。重庆巫山县和巫溪县独活中主要药效活性成分(蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯)的含量均高于2010版《中国药典》(一部)规定标准(蛇床子素不得少于0.50%;二氢欧山芹当归酸酯不得少于0.08%),初步认为重庆巫山县和巫溪县产区独特的地理条件与优越的生态环境适于独活的种植。

对比分析重庆巫山县、巫溪县和国内其他产区独活中二者药效成分含量发现,重庆巫山县产区独活中蛇床子素和二氢欧山芹当归酸酯的含量明显优于巫溪县和国内其他产区;巫溪县和国内其他产区中部分独活有效成分含量未达到2010版《中国药典》(一部)标准,需要对其质量进行进一步控制。

本研究还发现,不同产地间独活的化学成分存在一定差异性,这可能与不同产地间地理条件与生态环境差异较大有关,需对其作进一步研究。本研究为重庆道地药材独活的品质评价、种质资源保护和推动当地独活GAP种植规范化提供了一定科学参考依据。

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Results of contents determination of sample(n=3)

编号	产地	批号	蛇床子素,mg/g	二氢欧山芹当归酸酯,mg/g
WX-1	重庆巫溪	20120916	2.588 5	1.283 4
WX-2	重庆巫溪	20121018	5.792 9	1.173 0
WX-3	重庆巫溪	20121115	6.483 7	2.044 2
WX-4	重庆巫溪	20120915	4.171 9	1.240 4
WX-5	重庆巫溪	20121018	4.693 9	1.634 1
WX-6	重庆巫溪	20121116	6.312 9	1.639 6
WX-7	重庆巫溪	20130916	4.832 4	1.224 8
WX-8	重庆巫溪	20131018	5.463 3	1.623 1
WX-9	重庆巫溪	20131116	5.595 7	1.987 4
WS-1	重庆巫山	20120917	5.644 6	0.711 0
WS-2	重庆巫山	20121019	8.202 2	1.566 6
WS-3	重庆巫山	20121116	9.126 7	5.371 8
WS-4	重庆巫山	20130916	8.752 7	1.578 5
WS-5	重庆巫山	20131019	9.726 2	1.587 2
WS-6	重庆巫山	20131117	11.601 8	4.784 1
WS-7	重庆巫山	20140917	9.168 3	1.564 9
WS-8	重庆巫山	20141019	9.467 9	2.749 0
WS-9	重庆巫山	20141117	10.679 8	5.395 5
SS-1	浙江嘉兴	dh20130902	1.604 3	0.237 0
SS-2	甘肃华亭	dh20130930	6.786 2	0.920 8
SS-3	湖北巴东	dh20120928	8.041 1	1.585 0
SS-4	四川阿坝	dh 20121010	5.193 3	0.961 9
SS-5	安徽亳州	dh 20131018	5.587 6	1.206 4
SS-6	湖北恩施	dh 20131118	7.555 0	0.911 0
SS-7	重庆武隆	dh 20130927	0.547 6	0.110 8

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 袁欣.独活主要成分的分离及含量测定研究概况[J].海峡医药,2013,25(6):13.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:246.
- [4] 丁希飞,冯熙,董云发,等.中药独活化学成分的研究[J].中药材,2008,31(4):516.
- [5] 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,2011,23(4):241.
- [6] 林黎,钱晓萍,刘宝瑞.中药独活的化学成分及其抗肿瘤活性的研究进展[J].现代肿瘤医学,2011,19(2):373.
- [7] 周刚,马宝花.中药独活的研究进展[J].中国当代医药,2012,19(16):15.
- [8] 才谦,沙明,杨松松,等.不同地区商品独活中香豆素含量比较[J].中药材,2003,26(12):857.
- [9] 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,2008,20(5):385.
- [10] 鞠成国,王巍,姜海平.独活 HPLC 指纹图谱研究[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(2):128.

(收稿日期:2015-03-30 修回日期:2015-07-26)

(编辑:张静)