

白芍饮片 HPLC 指纹图谱的定量标示研究

赫 炎¹, 赵慧东², 唐力英², 王祝举², 张启伟^{2*}

(1. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨如何应用 HPLC 指纹图谱的计量技术对白芍炒制过程及白芍饮片进行质量控制。方法:中试生产研制白芍饮片, HPLC, PFA (principal factor analysis)。结果:获得了较稳定的白芍饮片 HPLC 图谱;在不同产地和不同饮片品种图谱的 10 个特征峰中,通过各个峰之间的联带变化在不同饮片中的分布规律,运用 PFA 的信息处理技术,抽取能反映对 HPLC 谱中峰群有影响的 2 个公共因子,其累计贡献率为 64.8%,根据各峰对因子的载荷和 communality 筛选出的 7 个峰可作为主要反映图谱形状变化的目标峰群。结论: HPLC 指纹图谱和 PFA 可用于白芍的炒制工艺过程和饮片的质量控制。

[关键词] 白芍; PFA; HPLC; 色谱指纹图谱

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2007)12-1161-04

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根。味苦、酸,性微寒。具有平肝止痛,养血调经,敛阴止汗的功效。中医临床用于头痛眩晕,胁痛,腹痛,四肢挛痛、血虚萎黄,月经不调,自汗,盗汗等。白芍药用多为炮制品。现行的白芍炮制方法有酒炒制和炒制。但尚无对饮片含量限定的计量指标^[1]。为了探讨对白芍炮制过程中的质量控制,作者对白芍饮片 HPLC 图谱的具体检测和计量标识技术进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Waters 600 型四元液相色谱泵, 996 型光电二极管阵列检器, Millennium 2010 色谱管理系统;乙腈和纯水 (HPLC 级),其他试剂均为分析纯。芍药苷购自中国药品生物制品检定所 (批号 07362200219)。

白芍药材由安徽沪谯饮片厂提供。饮片包括安徽,浙江和四川产白芍药材的中试生产饮片及市售饮片,具体饮片品种有白芍片、炒白芍和酒白芍 (表 1)。药材均由中国中医研究院吴连英研究员鉴定。

1.2 色谱分析 Diamonsil C₁₈ 分析柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 乙腈-B 水 (每 100 mL 水加磷酸 0.01 mL),线性梯度洗脱, 0 ~ 20 min, 10% ~ 30%A; 20 ~ 50 min, 30% ~ 40%A; 50 ~ 60

表 1 样品编号及炮制方法

编号	药材产地	饮片品种	炮制
1	亳州	白芍片	软化切制阴干
2	亳州	炒白芍	软化切,炒制
3	亳州	酒白芍	软化切,酒炒制
4	浙江	炒白芍	软化切,炒制
5	浙江	酒白芍	软化切,酒炒制
6	浙江	白芍片	软化切制阴干
7	四川	炒白芍	软化切,炒制
8	四川	酒白芍	软化切,酒炒制
9	四川	白芍片	软化切制阴干
10	安徽 (市售)	炒白芍	
11	安徽 (市售)	炒白芍	
12	安徽 (市售)	白芍片	
13	安徽 (市售)	炒白芍	
14	安徽 (市售)	炒白芍	
15	安徽 (市售)	酒白芍	
16	安徽 (市售)	炒白芍	

min,保持 40%A。流速 1 mL · min⁻¹;检测波长 230 nm;柱温 35 °C;进样量 20 μL。

1.3 参照物溶液的制备 称取芍药苷 2.0 mg,置于 5 mL 量瓶中,加 50%甲醇定容。

1.4 供试品液制备 称取样品粉末约 1.25 g,置于 10 mL 量瓶中,用 50%甲醇定容,超声 30 min,放置室温,定容至刻度,过滤备用。

1.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL,重复进样 5 次,测定 10 个共有峰面积,计算 RSD,各峰面积的 RSD 2.1% ~ 3.1%,精密度良好。

1.6 重复性试验 取同一样品粉末 5 份,分别制备供试品溶液,在所选色谱条件下测定各峰面积,计算其 RSD,各峰的 RSD 2.3% ~ 4.1% (n = 5),表明该

[收稿日期] 2006-03-28

[通讯作者] *张启伟, Tel: (010) 64014411-2848

方法重复性良好。

1.7 稳定性试验 取供试品溶液方法制备供试品, 在所选色谱条件下分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样测定, 所测各峰面积 RSD 在 1.3% ~ 2.8%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2 HPLC 图谱的计量研究

图 1 为等量混合饮片的 HPLC 图谱, 其中 5 号峰为芍药苷。图 2 为不同饮片的 HPLC 指纹图谱。分别以 HPLC 图谱中 10 个共有峰的面积图谱特征值, 计算饮片之间相关系数 (表 2) 作为图谱之间相似程度。结果显示安徽亳州产地的炒白芍和酒白芍很相似 ($r=0.99$)。但他们同白芍片比较略有不同 ($r=0.86$)。提示炒制对饮片的整体药用成分的组成是具有一定影响。但在杭芍和川芍中, 未见有这种明显差异。说明仅从图谱的相似度尚不能灵敏反映出饮片品种之间的图谱结构变化。提示需对图谱做进一步的结构分析。因此本研究采用了因子分析对图谱中峰群变化的共性规律进行了追踪和分离。

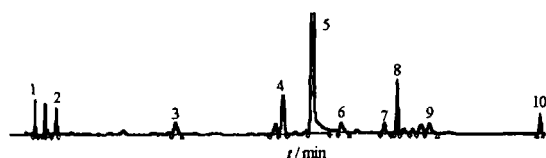


图 1 白芍 HPLC 图

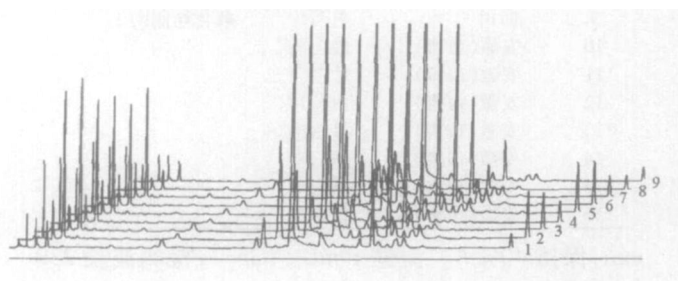


图 2 不同白芍饮片的 HPLC 图

表 2 饮片之间 HPLC 图相似度

样品	峰号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.00									
2	0.86	1.00								
3	0.86	0.99	1.00							
4	0.84	0.95	0.95	1.00						
5	0.85	0.89	0.89	0.98	1.00					
6	0.83	0.95	0.95	0.99	0.97	1.00				
7	0.89	0.78	0.77	0.87	0.92	0.83	1.00			
8	0.85	0.73	0.72	0.85	0.92	0.81	0.99	1.00		
9	0.87	0.85	0.84	0.94	0.98	0.91	0.96	0.96	1.00	

注: 样品号见表 1

以不同产地饮片 HPLC 图谱的 10 个共有峰面

积为定量依据 (见图 1), 通过它们在不同饮片中相关的变化规律, 运用 PFA (principal factor analysis) [21] 抽取出能反映影响峰群的公共因子作为计量尺度 (2 个因子的累计贡献率为 64.8%), 从而追踪影响药用物质基础整体变化的质量控制因素。并依据各共有峰对该计量尺度变异的贡献大小 (Loading), 对各峰群在炮制过程质量控制中反应和变化进行了研究, 见表 3。

表 3 显示 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10 峰在不同样品中的变化主要是由 2 个因子和样品特有属性决定。其中 Communalities 显示这 2 个共性因素所引起的变异占各相应峰总变异的比值。由于它们均大于 70%, 所以说明这些峰主要由这 2 个因素共同影响, 决定指纹图谱形状变异。而 1, 4, 6 峰的变化主要与样品的自有属性相关, 无明显变化规律。图 3 显示了不同产地药材不同饮片品种的图谱取值在这两个主因子 1 和因子 2 形成平面的分布。结果因子 1 可以明显将川芍、杭芍的饮片与亳芍区分开来 (其中, 根据市场调研, 市售饮片的药材均来至于安徽产地), 表 3 显示因子 1 主要影响 2, 3, 5, 7 峰, 既反映在芍药苷和芍药内酯苷等化合物变化。应属于反映药材产地属性, 说明产地与药用物质基础之间的重要关系, 即药材的道地性。而因子 2 主要影响 8, 9, 10 峰。既与苯甲酰芍药苷和其他 2 个配糖基化合物变化有关。从图 3 可见, 它可随工艺的变化而变。但由于本研究所收集的样品仅为 16, 与所分析的峰群数比仅为 1.6 倍, 只能从探索性研究的角度提供研究信息, 进一步的验证性研究还有待于大样本收集和检测。

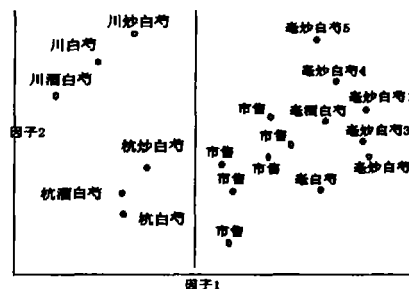


图 3 不同饮片在主因子平面上的分布

3 讨论

2005 年版《中国药典》白芍项下虽然收录了酒白芍、炒白芍和白芍片 3 种炮制品, 且对药材芍药苷的含量作了限定标准, 但尚无相应饮片质量标准。

表 3 PFA 分析结果

峰号	旋转前共性因子负荷		Communalities			旋转后共性因子负荷 (Varimax)	
	因子 1	因子 2	从因子 1	从因子 2	Multiple R-Square	因子 1	因子 2
1	-.375	.451	.141	.344	.794	.199	.551
2	.736	.421	.542	.720	.824	-.835	.145
3	-.895	-.305	.802	.895	.937	.946	.018
4	-.241	.464	.058	.273	.969	.069	.518
5	-.915	-.205	.837	.879	.958	.930	.119
6	-.099	.143	.010	.030	.957	.045	.168
7	.910	.193	.829	.866	.971	.790	.492
8	-.040	.954	.002	.912	.978	-.362	.884
9	-.709	.536	.502	.789	.928	.484	.745
10	.048	.881	.002	.779	.981	-.345	.812

白芍炮制过程中有药材的软化、切片、炒制多个加工环节,其中软化中又涉及到具体浸泡时间和用水量,炒制也涉及到辅料、用量、加热温度、加热时间等因素。这些参数的不同无疑会影响饮片的药用物质基础整体改变。显然仅用芍药苷为限定含量标准无法整体反映和控制饮片的质量。作者在酒白芍、炒白芍和白芍片 3 个饮片品种的炮制研究中,发现仅以芍药苷和 / 或饮片的浸出物含量为过程质量控制指标,在相同的产地药材和工艺条件下,不同批次饮片的含量变化作为质量标示,其可信度 (reliability) 不大,仅以它们作为质量标准无法灵敏地反映大生产中不同生产批次之间物质基础的差异。为此本研究引入饮片 HPLC 指纹图谱,并对其图谱计量标示技术进行了探讨。以期为整体反映饮片药用物质基础改变提供灵敏的指标。

在具体分析中,若直接采用 PCA (主成分分析) 对峰群进行分析,其累计贡献率较比 PFA 的略大 (贡献率为 68%),但考虑各样品的固有特性的存

在,既峰面积不随产地和加工等因素影响而变化的变异部分,本研究采用了 PFA 的技术,以复相关系数平方替代了各峰的总变异,抽取能最灵敏反映峰群之间共变的潜在因子,而 PCA 是以各峰的总变异 (标化后为 1),因此 PCA 是提炼能最灵敏反映总变量 (峰群) 所有的变异的潜在因子。即从信息量的角度寻找和解释图谱变异。忽视了峰群的变化既由共性和个性因素所致,因此抽取的因子往往不能有效地反映图谱的结构变化,可信度低,且缺少直观意义。而 PFA 是抽取能最灵敏反映峰群之间的协方差 (即图谱之间的形状变化) 的潜在因子。由于这些因子是反映峰群变化的共性问题,对追踪影响峰群共振的主要炮制因素尤为适用。因此作者对其在中药炮制的质量控制的应用进行了探讨。

[参考文献]

[1] 中国药典[S].一部. 2000: 68
[2] 赫炎,张启伟,张永欣,等. 色谱指纹图谱在制南星饮片质量标准研究的应用[J]. 中国中药杂志, 2004, 29 (9): 874.

Quantitative study for chromatographic fingerprints of processed products of *Paeonia lactiflora*

HE Yan¹, ZHAO hui-dong², TANG Li-ying², WANG Zhu-ju², ZHANG Qi-wei²

(1 Institute of Basic Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To explore the utility of Principal Factor Analysis (PFA) in chromatographic data for quality control **Method:** Chromatographic fingerprints of processed root pieces of *Paeonia lactiflora* were determined by HPLC, the PFA was used for data processing **Result:** The quantitative differences among different growing areas and different processing batches were found with the method **Conclusion:** The method could be used in quality control for monitoring between-batch products of traditional Chinese

pharmaceutical process

[Key words] Principal Factor Analysis; *Paeonia lactiflora*; chromatographic fingerprints

[责任编辑 鲍 雷]

大孔吸附树脂法分离精制逍遥丸

杨志欣*, 裴广杰, 李永吉, 王艳宏, 王 锐, 刘 俊

(黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:通过对 12 种大孔吸附树脂筛选,寻找适用于分离精制逍遥丸的树脂种类及方法。方法:以芍药苷、柴胡皂苷 A、阿魏酸、甘草酸的静态、动态吸附量和脱附率为指标大范围筛选树脂,通过单因素试验确定分离精制逍遥丸的优选操作条件。结果:D-101-1 树脂具有较好的吸附性能和解吸效果。吸附完全后,先以水洗脱,除去杂质,再收集 50%及 70%乙醇洗脱液,药材与树脂(干重)的比例为 5:1。结论:D-101-1 树脂综合性能良好,适用于逍遥丸的分离精制。

[关键词] 逍遥丸;大孔吸附树脂;精制方法

[中图分类号] R 283 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2007)12-1164-04

逍遥丸是由柴胡、白芍、当归、白术、茯苓、薄荷、甘草等 7 味中药组方制成,源于宋代《太平惠民和剂局方》,可疏肝健脾、养血调经,目前临床多用于妇科疾病^[1,2],疗效肯定。然而该制剂服用量大、质量不易控制,亟待工艺现代化,尤其是精制工艺的深入研究。大孔吸附树脂^[3]是一种新型的有机高聚物吸附剂,由于其具有操作简便、树脂易再生、有机溶剂用量小等优点,近年来被广泛地应用于中药单、复方的分离精制。本实验采用大孔树脂精制逍遥丸,方法简单可行,取得了令人满意的效果。

1 仪器与试剂

美国 Waters 公司 2695 型高效液相色谱仪, 2996 型紫外检测器, empower 工作站。柴胡等药材购自哈尔滨市药材公司,经黑龙江中医药大学药教研室鉴定为 2005 年版《中国药典》正品。芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0736-9913)、阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0773-9708)、甘草酸单铵盐对照品(美国 Sigma 公司)、柴胡皂苷 A 对照品(上海医药研究所,批号 050106)。甲醇、乙腈(色谱纯);水(超纯水);其余

为分析纯。大孔树脂(HPD100, HPD-100A, HPD300, HPD400, HPD450, HPD500, 沧州宝恩化工有限公司;LSA30, LSA40, 西安蓝晓科技有限公司;D101, D-101-1, DM301, DS-401, 天津市海光化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 大连物理化学研究所 C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 220 mm, 5 μ m), 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 柴胡皂苷 A 的流动相乙腈-水(37:63), 检测波长 208 nm;芍药苷、阿魏酸的流动相甲醇-水(1%醋酸)(25:75), 芍药苷检测波长 232 nm, 阿魏酸检测波长 323 nm;甘草酸单胺盐的流动相甲醇-1%醋酸(70:30), 检测波长 252 nm。

2.1.2 标准曲线考察 精密称取柴胡皂苷 A 对照品 3.68 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度。分别用微量移液器精密移取 125, 250, 500, 750, 1 000 μ L 的对照溶液, 稀释至 1 mL, HPLC 进样 10 μ L。精密称取芍药苷对照品 3.45 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度。分别用微量移液管精密移取 150, 400, 600, 800, 1 000 μ L 的对照溶液, 置 2 mL 量瓶, 定容。精密称取阿魏酸 2.08 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度。分别用微量移液管精密移取 400, 800, 1 200, 1 600 μ L, 置 2 mL 量瓶, 定容。

[收稿日期] 2005-12-10

[通讯作者] * 杨志欣, Tel: (0451) 82195724, E-mail: yangzhi

1021@sina.com

· 1164 ·