

白芍药材 UPLC 特征指纹图谱研究

张琦¹, 王振中², 萧伟², 张靓琦¹, 李清³, 毕开顺³, 贾英^{1*}

(1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016;

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

3. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立白芍药材的 UPLC 特征指纹图谱分析方法, 为快速评价白芍药材的质量, 完善白芍的质量控制方法提供依据。方法: 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈-0.05% 磷酸水溶液, 检测波长 230 nm。结果: 建立了白芍药材的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 15 个共有峰, 指认了其中 5 个共有峰, 15 批白芍药材的相似度为 0.891 ~ 0.996。结论: 该方法快速, 可用于评价白芍药材质量。

[关键词] 白芍; 特征指纹图谱; UPLC

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。其味苦、酸, 微寒。归肝、脾经。具有养血调经, 敛阴止汗, 柔肝止痛, 平抑肝阳之功效。用于血虚萎黄, 月经不调, 自汗, 盗汗, 胁痛, 腹痛, 四肢挛痛, 头痛眩晕^[1]。目前, 多采用芍药苷这单一成分作为白芍的质量控制指标, 难以全面控制白芍的内在质量, 并对其真伪优劣做出判断。通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱, 并将相似度分析技术应用于药材的指纹图谱已有文献报道^[2-3], 但采用 UPLC 建立白芍药材的指纹图谱分析方法国内还未见报道。

超高效液相色谱(UPLC)是以 1.8 μm 的超细色谱柱填料为核心技术的新型色谱分离分析技术, 相对于常规 HPLC 而言, UPLC 有更好的分离效率及灵敏度^[4-5]。本试验首次采用 UPLC 法建立白芍药材的特征指纹图谱分析方法, 其谱峰的保留时间全部在 9 min 内, 极大地缩短分析时间, 提高分析效率, 为高效、快速地评价白芍药材质量提供方法。

1 材料

ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管

阵列检测器、Empower2 色谱工作站), BP210S 电子天平(德国 Sartorius 公司), AB135-S 1/10 万天平(METTLER TOLEDO 仪器有限公司)。

对照品没食子酸、儿茶素、白芍苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷均为自制(经核磁和质谱鉴定, 采用峰面积归一化法计算, 纯度均大于 98%); 乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯, 乙醇为分析纯, 水为娃哈哈纯净水; 白芍药材经沈阳药科大学中药学院贾英副教授鉴定为正品, 密封保存于阴凉干燥处, 其来源见表 1。

表 1 白芍药材样品的来源

No.	药材来源	特征指纹图谱编号
1	安徽 亳州 1	S1
2	安徽 太和 1	S2
3	安徽 亳州五年生	S3
4	安徽 亳州三年生	S4
5	安徽 亳州二年生	S5
6	河南 温县	S6
7	浙江 永康	S7
8	山东 菏泽	S8
9	安徽 凤台	S9
10	安徽 太和 2	S10
11	安徽 亳州 2	S11
12	安徽 亳州 3	S12
13	安徽 亳州 4	S13
14	安徽 亳州 5	S14
15	安徽 亳州 6	S15

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100

[稿件编号] 20110211007

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-003, 2009ZX09504-004)

[通信作者] * 贾英, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础与质量控制研究, E-mail: jiayingssphu@yahoo.com.cn

mm, 1.8 μm); 流动相乙腈(A) -0.05% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱: 0~0.5 min, 7%~14% A; 0.5~2.5 min, 14% A; 2.5~3 min, 14%~20% A; 3~6 min, 20%~22% A; 6~6.5 min, 22%~40% A; 6.5~8 min, 40%~50% A; 梯度曲线均为直线。流速 0.5 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 1 μL 。

2.2 对照品溶液的制备

取没食子酸、儿茶素、白芍苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇配制成含没食子酸、儿茶素、白芍苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷质量浓度分别为 0.112 5, 0.037 50, 0.434 7, 1.127, 0.030 15 g $\cdot$ L⁻¹ 的混合对照品溶液, 冷藏备用。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇 8 mL, 超声处理 30 min, 放至室温, 加 50% 乙醇至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液, 按 2.1 项下方法连续进样 6 次, 测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按 2.3 项下操作制备供试品溶液, 按 2.1 项下方法分别进样, 测得其各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 按 2.1 项下方法分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定, 其各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 样品测定

取 15 批白芍药材样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 在 2.1 项下的色谱条件下依次进样检测, 记录色谱图, 共获得 15 个共有峰, 指认其中 5 个共有峰, 分别为没食子酸(3 号峰)、儿茶素(5 号峰)、白芍苷(6 号峰)、芍药苷(7 号峰) 和苯甲酰芍药苷(14 号峰)。典型白芍药材色谱图见图 1。

2.6 特征指纹图谱的建立

2.6.1 参比峰的选择 在各批次样品图谱中芍药苷的色谱峰(6 号峰) 分离良好, 峰位居中, 峰面积较大且为所有样品共有, 所以确定芍药苷为参照峰。

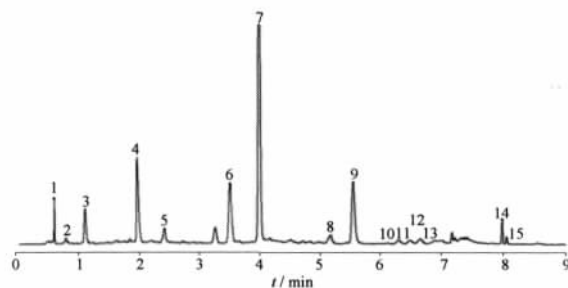


图1 白芍药材的 UPLC 图

2.6.2 特征指纹图谱的建立及相似度评价 将所得的 15 批白芍药材 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版》软件, 以 S1 批药材谱图作为参照谱进行指纹匹配, 确定了 15 个共有峰, 建立了共有模式见图 2, 并进行了相似度计算, 15 批样品的相似度见表 2。

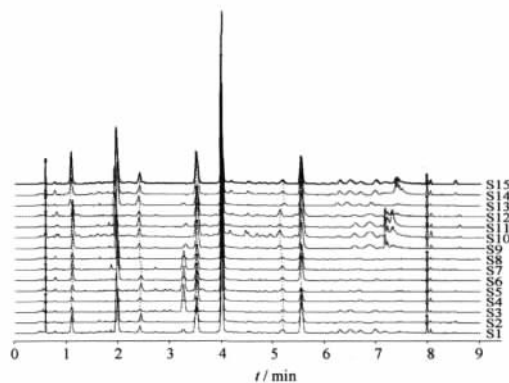


图2 15 批白芍药材 UPLC 特征指纹图谱

表2 15 批药材的相似度分析

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.937	S9	0.996
S2	0.988	S10	0.958
S3	0.891	S11	0.914
S4	0.954	S12	0.964
S5	0.924	S13	0.986
S6	0.996	S14	0.955
S7	0.979	S15	0.953
S8	0.979		

3 讨论

提取溶剂的考察结果表明, 在所比较的 4 种提

取溶剂甲醇, 50% 甲醇, 乙醇, 50% 乙醇中, 以 50% 乙醇提取的样品色谱峰个数较多, 峰面积较大, 故提取溶剂选择 50% 乙醇。对超声、回流 2 种不同提取方法的考察结果表明, 2 种提取方法提取效率相当, 考虑到超声操作较简便, 故提取方法选择超声。对不同的提取时间 15, 30, 45, 60 min 的考察结果表明 30 min 后各时间点的提取效率基本一致, 故选择超声时间为 30 min。所以确定用 50% 乙醇超声 30 min 为提取方法。

本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水 4 个流动相系统, 结果发现采用乙腈-磷酸水流动相系统, 各峰的分离度较好, 且基线平稳, 有利于指纹图谱的分析, 因此最终采用乙腈-磷酸水系统作为流动相系统。

本实验使用 Waters 的 PDA 检测器进行紫外区全波长扫描, 在 230 nm 波长下, 色谱图基线噪音较低, 特征峰响应较高, 色谱峰信息较完全, 综合比较

后, 选择 230 nm 作为为本实验的检测波长。

超高效液相色谱法 (UPLC) 采用 1.8 μm 的超细色谱柱填料, 从而大大提高柱效, 使药材中的物质在 9 min 内分离成为可能; 另外由于柱效高, UPLC 所需的色谱柱长就短, 本实验采用的 HSS T3 柱是一种 10 cm 的色谱柱, 这也是 UPLC 分离速度快的又一重要原因。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 96.
- [2] 王巧, 刘荣霞, 于海兰, 等. 白芍与赤芍 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(8): 581.
- [3] 赫炎, 赵慧东, 唐力英, 等. 白芍饮片 HPLC 指纹图谱的定量标示研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1161.
- [4] 周新, 陈会明, 白桦, 等. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(4): 56.
- [5] 刘少华, 金郁, 周大勇, 等. 超高效液相色谱 (UPLC) 用于丹参药材水溶性成分指纹图谱研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2007, 9(6): 46.

UPLC characteristic chromatographic profile of *Paeoniae Radix Alba*

ZHANG Qi¹, WANG Zhenzhong², XIAO Wei², ZHANG Liangqi¹, LI Qing³, BI Kaishun³, JIA Ying^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;

3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an UPLC method of determining the characteristic chromatographic profiles of *Paeoniae Radix Alba* for quality control. **Method:** The UPLC characteristic chromatographic profiles of fifteen batches of *Paeoniae Radix Alba* were determined on an HSS T3 Column (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm) eluted with the mobile phases of water containing 0.05% phosphoric acid and acetonitrile in gradient mode. The detection wavelength was set at 230 nm. **Result:** The common mode of the UPLC characteristic chromatographic profile was set up. There were 15 common peaks, five of which were identified, and the similar degrees of the fifteen samples to the common mode were between 0.891 and 0.996. **Conclusion:** The method was time-saving and can be used for the quality control of *Paeoniae Radix Alba*.

[Key words] *Paeoniae Radix Alba*; characteristic chromatographic profile; UPLC

doi: 10.4268/cjcm20110613

[责任编辑 马超一]