

白芍药材及其配方颗粒的UPLC指纹图谱研究

刘红云^{1*}, 杨小松¹, 吴红梅^{1#}, 王祥培²

¹贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

²贵州民族大学民族医药学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年6月11日; 录用日期: 2023年7月7日; 发布日期: 2023年7月13日

摘要

目的: 建立白芍药材及其配方颗粒的UPLC指纹图谱。方法: 色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 以0.05%磷酸水溶液 - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速为0.1 mL/min; 检测波长为254 nm; 柱温为30℃; 采用中药色谱指纹图谱评价系统进行相似度分析。结果: 20批白芍药材及其配方颗粒的UPLC指纹图谱共确认11个共有峰, 并指认出芍药苷和没食子酸两种化学成分。结论: 该方法准确、可行、重现性好, 反映白芍药材及配方颗粒多成分的整体面貌, 可为白芍药材及其配方颗粒质量评价提供参考。

关键词

白芍, UPLC指纹图谱, 配方颗粒

Study on UPLC Fingerprint of *Paeonia lactiflora* Pall. and Its Formula Granules

Hongyun Liu^{1*}, Xiaosong Yang¹, Hongmei Wu^{1#}, Xiangpe Wang²

¹School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

²School of Chinese Ethnic Medicine, Guizhou Minzu University, Guiyang Guizhou

Received: Jun. 11th, 2023; accepted: Jul. 7th, 2023; published: Jul. 13th, 2023

Abstract

Objective: To establish the UPLC fingerprint of *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules.
Methods: The chromatographic column is ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with

*第一作者。

#通讯作者。

acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous solution as the mobile phase in a gradient mode at the flow rate of 0.1 mL/min. The detection wavelength is 254 nm and the column temperature is 30°C. The similarity is evaluated using a traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint evaluation system. Results: A total of 11 common peaks were identified in the UPLC fingerprint of 20 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. and their formula granules, and two chemical components, paeoniflorin and gallic acid, were identified. Conclusion: This method is accurate, feasible, and has good reproducibility, reflecting the overall appearance of multiple components in *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules. It can provide a reference for the quality evaluation of the *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules.

Keywords

Paeonia lactiflora Pall., UPLC Fingerprint, Formula Granules

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根, 主要产于浙江、安徽、四川等地, 其气微, 味苦、酸, 性微寒, 具有养血调经、柔肝止痛、敛阴止汗和平抑肝阳等功效, 是临床常用的中药[1]。白芍主要含有单萜及其苷类、三萜及其苷类、黄酮类、鞣质类等化学成分[2]。其中, 芍药苷为白芍的主要活性成分, 具有镇痛[3]、抗炎[4]、保肝[5]、抗抑郁[6]、抗肿瘤[7]等药理作用, 2020版《中国药典》将其作为白芍药材质量控制标准[8]。

白芍配方颗粒是以白芍饮片为原料, 经提取、浓缩、干燥、制粒等工艺制成, 具有一定规格的直接用于临床使用的颗粒[9]。中药配方颗粒成分复杂, 其质量受很多因素影响, 如原药材来源、生产工艺等[10]。中药指纹图谱是一种多指标的质量控制模式, 可以较为全面地反映所含化学成分的种类和数量, 能够全面、系统、直观地反应药品质量好坏, 从而更好地评价中药及其制剂的质量。因此, 本研究利用 UPLC 法建立了白芍药材及其配方颗粒的指纹图谱, 对其相关性进行评价, 为其配方颗粒的质量控制提供借鉴。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器

WatersAcquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); PDA 检测器(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); AL204-IC 万分之一分析天平(METTLER TOLEDO 仪器有限公司); KQ-100E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2.2. 试剂与试药

试剂: 色谱纯甲醇、乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司), 色谱纯磷酸(国药集团化学试剂有限公司), 水为哇哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

试药: 没食子酸(批号: 110831-200302, 中国药品生物制品检定所)、芍药苷(批号: S-010-180416, 成都瑞芬思生物科技有限公司)。

2.3. 药材

10批白芍药材经贵州民族大学民族医药学院王祥培教授鉴定,均为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根,20批白芍药材及其配方颗粒均来源于广东一方制药有限公司,见表1。

Table 1. Sample information and number

表 1. 样品信息及编号

NO	类型	批号	NO	类型	来源
S1	药材	J2018090201-01	S11	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S2	药材	J2018090202-01	S12	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S3	药材	J2018090203-03	S13	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S4	药材	J2018090204-01	S14	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S5	药材	J2018090205-01	S15	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S6	药材	J2018090301-03	S16	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S7	药材	J2018090302-03	S17	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S8	药材	J2018090303-03	S18	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S9	药材	J2018090304-03	S19	配方颗粒	广东一方制药有限公司
S10	药材	J2018090305-03	S20	配方颗粒	广东一方制药有限公司

3. 实验方法

3.1. 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流速 0.1 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 30℃; 进样量 2 μL; 流动相 0.05% 磷酸水溶液(A)-乙腈(C), 梯度洗脱: 0 min~1 min, 5%~10% C, 1 min~3 min, 10%~16% C, 3 min~5 min, 16%~27.5% C, 5 min~5.5 min, 27.5%~32% C, 5.5 min~6 min, 32%~36.5% C, 6 min~10 min, 36.5%~50% C, 10 min~18 min, 50%~53% C。

3.2. 对照品溶液的制备

取没食子酸、芍药苷对照品适量,精密称定,用 50% 甲醇配制成含没食子酸、芍药苷质量浓度分别为 10.2 μg/mL、141 μg/mL 的对照品溶液,冷藏备用。

3.3. 供试品溶液的制备

精密称定各批次白芍药材粉末(过四号筛) 0.5 g, 置锥形瓶中,加 50% 甲醇 25 mL, 称重,超声提取(功率 250 W, 频率 35 kHz) 30 min, 放冷,加 50% 甲醇补重,摇匀,过滤,取续滤液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,得白芍药材供试品溶液(S1-S10)。另精密称定各批次白芍配方颗粒(过四号筛) 1.0 g, 按照上述方法制备,得白芍配方颗粒供试品溶液(S11-S20)。

3.4. UPLC 指纹图谱建立

3.4.1. 精密度试验

取同一批次白芍药材样品,按“3.3.”项下方法制备供试品溶液,按“3.1.”项下色谱方法连续进样

6次,并记录各共有峰的保留时间和峰面积。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,表明仪器精密度良好。

3.4.2. 稳定性试验

取同一批次白芍药材样品,按“3.3.”项下方法制备供试品溶液,按3.1.项下色谱方法分别于0h、2h、4h、8h、12h、24h进样测定,并记录各共有峰的保留时间和峰面积。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,表明样品溶液在24h内稳定。

3.4.3. 重复性试验

取同一批次白芍药材样品6份,按“3.3.”项下方法平行制备供试品溶液6份,按“3.1.”项下色谱方法分别进样,并记录各共有峰的保留时间和峰面积。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,表明该方法重复性良好。

3.4.4. 指纹图谱的建立

分别精密称取20批白芍药材及其配方颗粒粉末(过四号筛),按“3.3.”项下的方法制备供试品溶液,按“3.1.”项下的色谱条件进行进样测定,记录20批样品的UPLC色谱图,分别导入中药指纹图谱相似度评价系统(2004A),得到白芍药材、白芍配方颗粒、白芍药材及配方颗粒色谱指纹图谱及对照色谱指纹图谱(见图1~图6)。

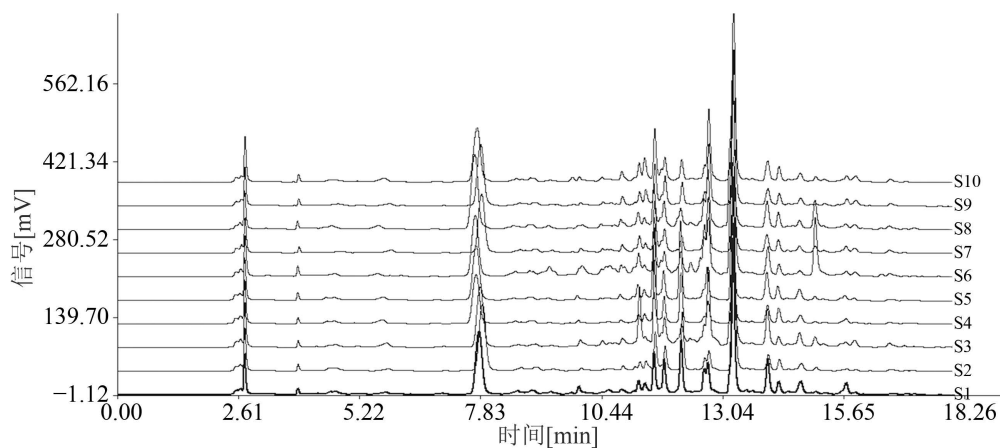
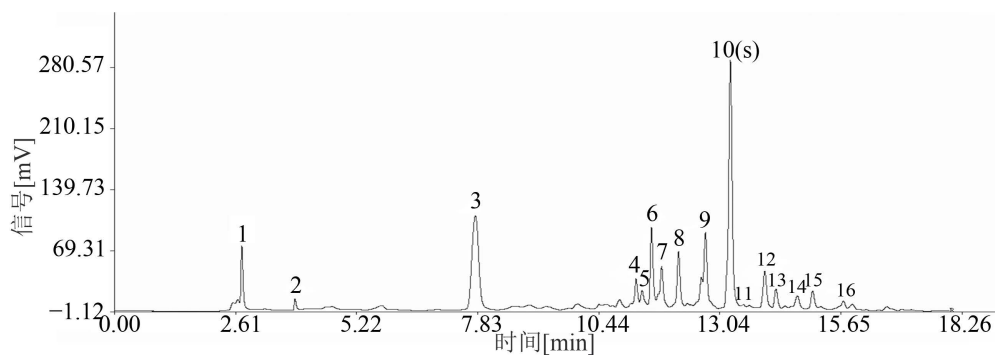


Figure 1. UPLC fingerprint of 10 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules
图1. 10批白芍药材 UPLC 指纹图谱



3: 没食子酸; 10: 芍药苷。

Figure 2. UPLC control spectrum of *Paeonia lactiflora* Pall.
图2. 白芍药材 UPLC 对照图谱

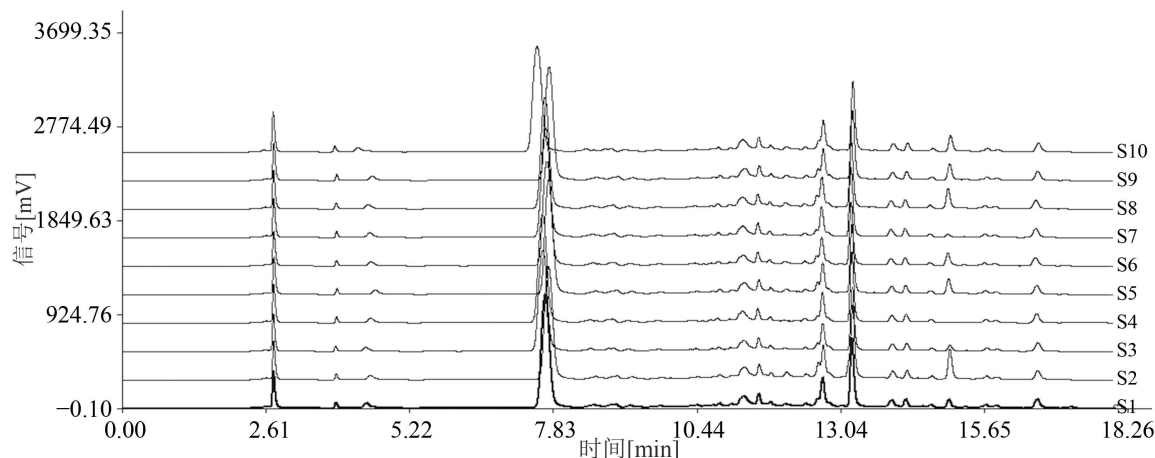
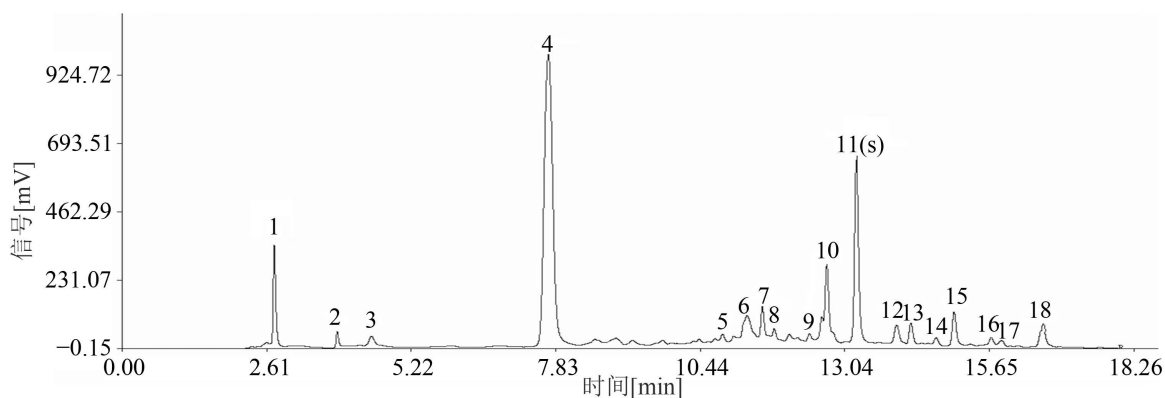


Figure 3. UPLC fingerprint of 10 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. formula granules

图 3. 10 批白芍配方颗粒 UPLC 指纹图谱



4: 没食子酸; 11: 芍药苷。

Figure 4. UPLC control spectrum of 10 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. formula granules

图 4. 白芍配方颗粒 UPLC 对照图谱

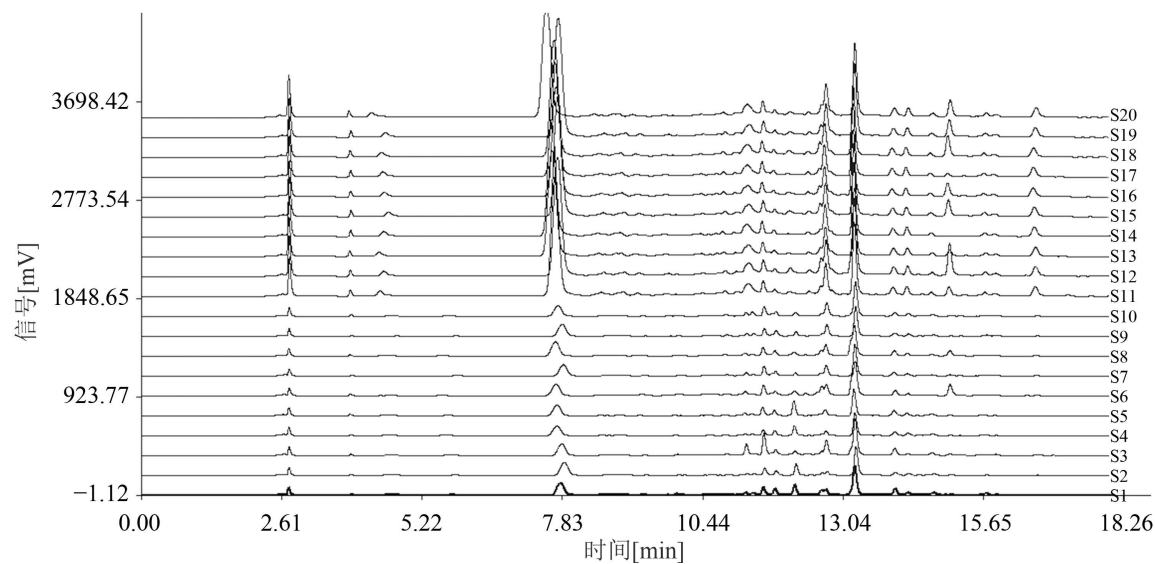
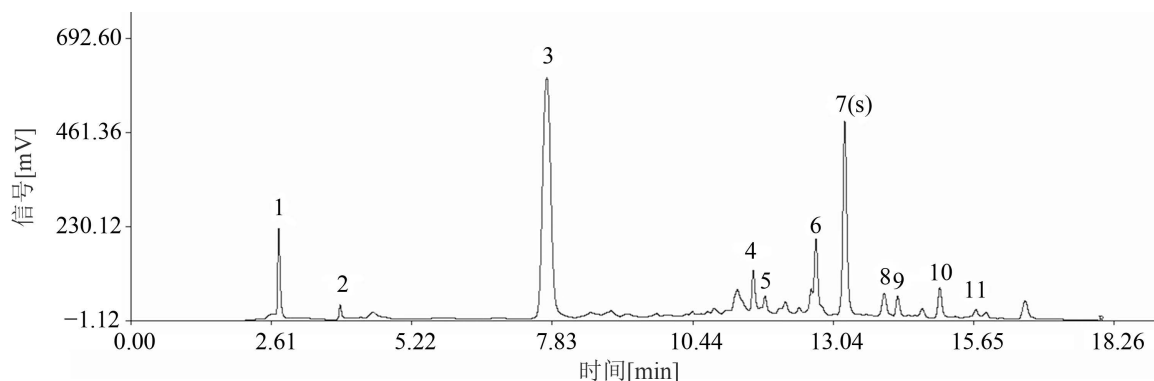


Figure 5. UPLC fingerprint of 20 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules

图 5. 20 批白芍药材及配方颗粒 UPLC 指纹图谱



3: 没食子酸; 7: 芍药苷。

Figure 6. UPLC control spectrum of 20 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules

图 6. 白芍药材与配方颗粒 UPLC 对照图谱

3.4.5. 共有峰的确定

建立白芍药材及其配方颗粒的指纹图谱, 10 批白芍药材确定 16 个共有色谱峰, 10 批白芍配方颗粒确定 18 个共有色谱峰, 10 批白芍药材与 10 批配方颗粒共确定 11 个共有峰。在所有样品图谱中, 通过与没食子酸、芍药苷对照品图谱比较, 在白芍药材及其配方颗粒指纹图谱中指认出了没食子酸、芍药苷色谱峰。芍药苷为白芍中的主要成分之一, 且色谱峰的分较好, 峰面积大小适中, 在图谱中较稳定且为所有样品共有, 因此确定白芍苷为参比峰(S), 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积, 见表 2、表 3。

3.4.6. 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版), 以生成的对照谱图为参照, 各批次供试品指纹图谱与对照谱图进行比较, 分别计算其相似度, 结果显示 10 批白芍药材、10 批白芍配方颗粒相似度分别为 0.967~0.993、0.995~0.999, 表明各批样品一致性好, 制剂工艺稳定可行。而两者相似度在 0.756~0.989 范围内, 说明两者相关性较好, 该方法可用于颗粒质量评价。

4. 讨论

本文建立 21 批白芍药材及白芍配方颗粒的 UPLC 指纹图谱, 考查其相似度, 并对其相关性进行评估, 同时指认芍药苷和没食子酸。指纹图谱结果显示, 白芍药材加工为白芍配方颗粒后化学成分个数增加, 这可能与白芍配方颗粒的制备过程中要经过一系列的浓缩、干燥、制粒过程, 化学成分受到影响有关。另外, 相似度评价结果显示, 20 批白芍药材及其配方颗粒指纹图谱相似度存在差异。因此, 对中药配方颗粒生产过程中的提取工艺如加水量、提取温度、分离纯化、提取时间和浓缩技术等一系列工艺参数也要进行统一, 让中药配方颗粒的生产走向现代化、规范化[11]。而中药饮片质量不稳定会直接影响中药配方颗粒的质量和疗效, 如土壤环境、气候问题、不同产地、不同年份的中药材中的有效成分含量有着明显差异[12], 因此保障原料质量稳定是中药配方颗粒质量得到保障的前提。

本实验建立白芍药材及其配方颗粒的 UPLC 指纹图谱, 克服了单一成分信息量不全的缺点, 较为系统的反应白芍药材及其配方颗粒的化学组成。方法学考察中精密性、重复性、稳定性的 RSD < 3%, 表明该方法的重复性、可行性及准确度良好, 可用于白芍配方颗粒的质量控制。

基金项目

贵州省一流课程重点建设项目(项目合同编号: 黔教高发[2017]158)。

Table 2. Relative retention time of common peaks in 20 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules
表 2. 20 批白芍药材及配方颗粒共有峰的相对保留时间

序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
1	0.2067	0.2068	0.2073	0.2081	0.2062	0.2066	0.2067	0.2067	0.2076	0.2060	0.2073	0.2073	0.2075	0.2078	0.2075	0.2074	0.2067	0.2068	0.2072	0.2074
2	0.2933	0.2933	0.2932	0.2954	0.2941	0.2924	0.2936	0.2929	0.2941	0.2926	0.2931	0.2931	0.2935	0.2925	0.2939	0.2931	0.2931	0.2929	0.2929	0.2926
4	0.5861	0.5861	0.5860	0.5908	0.5858	0.5855	0.5866	0.5857	0.5869	0.5852	0.5802	0.5841	0.5761	0.5759	0.5848	0.5817	0.5797	0.5787	0.5851	0.5689
6	0.8469	0.8473	0.8465	0.8531	0.8464	0.8473	0.8476	0.8460	0.8471	0.8472	0.8513	0.8512	0.8513	0.8509	0.8518	0.8514	0.8511	0.8511	0.8512	0.8518
8	0.8720	0.8720	0.8720	0.8778	0.8728	0.8717	0.8725	0.8713	0.8727	0.8718	0.8719	0.8724	0.8712	0.8715	0.8719	0.8712	0.8714	0.8719	0.8723	0.8729
9	0.8884	0.8880	0.8889	0.8946	0.8890	0.8887	0.8882	0.8879	0.8891	0.8883	0.8882	0.8882	0.8881	0.8878	0.8892	0.8879	0.8880	0.8878	0.8884	0.8879
12	0.9596	0.9596	0.9596	0.9675	0.9590	0.9592	0.9603	0.9587	0.9587	0.9610	0.9598	0.9600	0.9586	0.9605	0.9595	0.9610	0.9597	0.9592	0.9587	0.9612
13(S)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	1.0740	1.0742	1.0736	1.0823	1.0747	1.0730	1.0741	1.0733	1.0750	1.0736	1.0743	1.0746	1.0740	1.0739	1.0750	1.0737	1.0745	1.0737	1.0753	1.0743
19	1.1088	1.1088	1.1083	1.1172	1.1087	1.1084	1.1090	1.1087	1.1094	1.1089	1.1086	1.1091	1.1078	1.1091	1.1086	1.1074	1.1091	1.1079	1.1095	1.1088
21	1.1836	1.1839	1.1831	1.1930	1.1831	1.1836	1.1836	1.1829	1.1847	1.1832	1.1838	1.1835	1.1837	1.1838	1.1840	1.1838	1.1838	1.1828	1.1853	1.1835

Table 3. Relative peak area of common peaks in 20 batches of *Paeonia lactiflora* Pall. and its formula granules
表 3. 20 批白芍药材及配方颗粒共有峰的相对峰面积

序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S1	S15	S16	S17	S18	S19	S20
1	0.1283	0.1269	0.0960	0.1058	0.0925	0.1738	0.1931	0.1075	0.1546	0.1275	0.3070	0.2651	0.3363	0.3325	0.3056	0.3144	0.3294	0.3193	0.3015	0.3430
2	0.0285	0.0298	0.0322	0.0280	0.0288	0.0398	0.0354	0.0211	0.0298	0.0260	0.0567	0.0454	0.0674	0.0574	0.0518	0.0544	0.0567	0.0557	0.0546	0.0663
4	0.6077	0.8261	0.7309	0.7426	0.5214	0.8380	0.8763	0.5569	0.9498	0.7387	3.2286	2.7132	3.3279	3.3202	3.2313	3.2629	3.3375	3.2274	3.2030	3.3014
6	0.0981	0.0907	0.0851	0.1121	0.1067	0.1094	0.0764	0.2714	0.0634	0.0859	0.3986	0.3535	0.4029	0.3979	0.4111	0.3102	0.4020	0.4169	0.4063	0.4200
8	0.2528	0.2445	0.1971	0.2820	0.2154	0.2963	0.2461	0.4676	0.2374	0.2354	0.2684	0.2477	0.2248	0.2208	0.2835	0.2796	0.2304	0.2916	0.2784	0.2393
9	0.1386	0.1907	0.1456	0.1566	0.1199	0.2542	0.2462	0.1628	0.1915	0.2248	0.1459	0.1428	0.1454	0.1376	0.1585	0.1554	0.1420	0.1646	0.1556	0.1605
12	0.4097	0.4148	0.3043	0.3545	0.2648	0.2487	0.1926	0.4250	0.1372	0.1890	0.4192	0.3955	0.4171	0.4215	0.4253	0.4240	0.4179	0.4432	0.4219	0.5430
13(S)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	0.0857	0.0833	0.0783	0.0867	0.0521	0.1158	0.1415	0.0538	0.0857	0.0862	0.1468	0.1305	0.1457	0.1443	0.1486	0.1467	0.1444	0.1508	0.1465	0.1513
19	0.0633	0.0677	0.0497	0.0551	0.0325	0.1224	0.1089	0.0833	0.0810	0.1193	0.0730	0.0667	0.0708	0.0692	0.0774	0.0740	0.0701	0.0773	0.0743	0.0745
21	0.0437	0.0545	0.0254	0.0519	0.0274	0.0438	0.0522	0.0242	0.0178	0.0991	0.0785	0.0734	0.0802	0.0787	0.0881	0.0829	0.0791	0.0852	0.0822	0.0830

参考文献

- [1] 吴玲芳, 王晓晴, 陈香茗, 等. 白芍化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(3): 175-187.
- [2] 陈琪, 何祥玉, 周曼佳, 等. 白芍的化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(11): 187-189.
- [3] 吴丽, 王丽丽, 费文婷, 等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对 β -EP、PGE₂ 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 915-918.
- [4] 刘俊彤, 李轶聪, 董丽强, 等. 芍药苷对抗炎反应因子 TNF- α 和 IL6 的作用研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(30): 1, 6.
- [5] 刘玲, 赵建龙. 芍药苷对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(5): 433-436.
- [6] 王蕾, 郑昌吉, 崔然吉. 芍药苷作为抗抑郁药的神经保护作用机制[J]. 人参研究, 2023(1): 29-31.
- [7] 高卓维, 陈广鸿, 符路娣. 芍药苷抑制 Src/STAT3 信号通路协同替莫唑胺抑制胶质瘤细胞增殖和迁移[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(23): 3199-3205.
- [8] 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, 2020: 108.
- [9] 孙叶芬, 岳倩侠, 杜倩倩, 等. 基于质量标志物的白芍配方颗粒量值传递规律及工艺优化研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(6): 76-82.
- [10] 张伟, 孙叶芬, 金传山, 等. 中药配方颗粒研究现状与展望[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7221-7233.
- [11] 王菁, 祝浩东. 中药配方颗粒质量控制与发展策略研究[J]. 中医药管理杂志, 2022(17): 216-218.
- [12] 魏锋, 程显隆, 荆文光, 等. 中药材及饮片质量标准研究有关问题思考[J]. 中国药学杂志, 2022(18): 1493-1503.