

白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究

方雯雯¹, 成守玲², 陈培胜^{2*}, 储晓琴³, 廖彩霞²

1. 安徽黄山市中医院, 安徽 黄山 245000

2. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

3. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 建立白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 对其相关性进行评价。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 检测波长 320 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温: 25 ℃。以特征图谱为对照, 对药材-饮片-提取物及配方颗粒进行相关性评价。结果 白芷 10 批药材、饮片、提取物及配方颗粒特征图谱均呈现 10 个共有特征峰, 呈良好的相关性。结论 建立了白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 反映了白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒多成分的整体面貌, 为白芷配方颗粒质量控制提供借鉴。

关键词: 白芷药材; 饮片; 提取物; 配方颗粒; HPLC; 特征图谱; 相关性

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)18-3211-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.012

Correlation study on HPLC characteristic spectrum of raw herb-decoction pieces-extract-dispensing granules of *Angelicae Dahuricae Radix*

FANG Wen-wen¹, CHENG Shou-ling², CHEN Pei-sheng², CHU Xiao-qin³, LIAO Cai-zhen²

1. Huangshan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huangshan 245000, China

2. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

3. College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To establish an HPLC characteristic spectrum of raw herbs-decoction pieces-extract-dispensing granules of *Angelicae Dahuricae Radix* (ADR) and evaluate the correlation among them. **Methods** Gradient elution was performed with mobile phase of acetonitrile-water, detection wavelength of 320 nm, flow rate of 1.0 mL/min, and column temperature of 25 ℃, by setting the characteristic spectrum as control and evaluating the correlation of raw herbs-decoction pieces-extract-dispensing granules. **Results** There were 10 common characteristic peaks in all characteristic spectra of 10 batches of raw herbs, decoction pieces, extract, and dispensing granules of ADR, presenting a good correlation. **Conclusion** This study established an HPLC characteristic spectrum and reflected the whole picture of multi-component of raw herbs, decoction pieces, extract, and dispensing granules of ADR provides the reference for quality control of dispensing granules of ADR.

Key words: *Angelicae Dahuricae Radix*; decoction pieces; extract; dispensing granules; HPLC; characteristic spectrum; correlation

白芷 *Angelicae Dahuricae Radix* 为伞形科 (Umbelliferae) 植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根^[1]。安徽亳州是白芷的主要种植基地, 2004 年以来, 亳州年产白芷药材达 4 000 t 以上, 其种植历史悠久, 质量优、

产量大。白芷配方颗粒是以白芷药材为原料, 经加工炮制、提取、浓缩、干燥、制粒而成^[2]。本研究建立了白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 对其相关性进行评价, 为白芷配方颗粒质量控制提供借鉴。

1 仪器与材料

YP1002N 型电子天平、FA2104SN 型电子天平,

收稿日期: 2016-05-16

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项 (2013ZX02)

作者简介: 方雯雯 (1965—), 女, 副主任中药师, 研究方向为中药品质与资源。Tel: (0559)2519825 E-mail: 1159715856@qq.com

*通信作者 陈培胜 (1963—), 男, 研究员, 研究方向为中药制剂。Tel: (0558)5586999 E-mail: cps2010@126.com

上海精密科学仪器有限公司; Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; HH 型数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂; 岛津 UV1700 紫外分光光度计, 日本岛津仪器科技有限公司; HU10260B 型超声波清洗器, 天津恒奥科技发展有限公司。

10 批白芷药材分别于 2013 年 8—12 月收集于亳州谯城区不同乡镇的白芷种植基地, 经安徽中医药大学金传山教授鉴定为伞形科当归属植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根, 由济人药业配方颗粒工艺研究室制成同批号白芷饮片、提取物干膏粉、配方颗粒, 编号及药材具体来源见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of sample sources

药材来源	对应药材编号	对应饮片编号	对应提取物编号	对应配方颗粒编号
安徽济人药业十八里镇基地	A1	B1	C1	D1
安徽济人药业十八里镇基地	A2	B2	C2	D2
十九里郭井村	A3	B3	C3	D3
十九里郭井村	A4	B4	C4	D4
五马泗河集李伟村	A5	B5	C5	D5
五马镇蔡楼村	A6	B6	C6	D6
魏岗镇董庄	A7	B7	C7	D7
华佗镇邢阁	A8	B8	C8	D8
沙土镇张机房村	A9	B9	C9	D9
谯东镇徐小庄	A10	B10	C10	D10

对照品欧前胡素 (批号 110826-201415, 质量分数 99.7%)、异欧前胡素 (批号 110827-201109, 质量分数 99.6%), 中国食品药品检定研究院; 乙醇、甲醇, 分析纯, 郑州派尼化学试剂厂; 甲醇, 色谱纯, 郑州派尼化学试剂厂; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性^[1]

色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (60:40); 检测波长 300 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 理论板数按欧前胡素峰计算不低于 3 000。

2.2 对照品溶液制备

精密称取欧前胡素对照品 5.0 mg 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得

10 μg/mL 的欧前胡素对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

称取白芷药材、饮片、提取物及配方颗粒粉末各 0.4 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 45 mL, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 1 h, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 样品定量测定

分别取对照品溶液、供试品溶液 20 μL, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 药材 A1~A10 中欧前胡素分别为 0.189%、0.184%、0.226%、0.225%、0.258%、0.331%、0.157%、0.255%、0.170%、0.185% ($n=2$), 均值为 0.218%; 饮片 B1~B10 中欧前胡素分别为 0.181%、0.176%、0.127%、0.201%、0.180%、0.219%、0.087%、0.223%、0.140%、0.145% ($n=2$), 均值为 0.168%; 提取物 C1~C10 中欧前胡素分别为 0.423%、0.345%、0.584%、0.524%、0.608%、0.568%、0.303%、0.531%、0.352%、0.359% ($n=2$), 均值为 0.417%; 配方颗粒 D1~D10 中欧前胡素分别为 0.369%、0.320%、0.540%、0.469%、0.691%、0.559%、0.342%、0.532%、0.460%、0.348% ($n=2$), 均值为 0.426%。结果显示 10 批白芷药材中欧前胡素质量分数在 0.157%~0.331%, 均大于 0.080%, 符合《中国药典》2015 年版的要求; 10 批白芷饮片中欧前胡素质量分数在 0.087%~0.223%, 表明由药材加工成饮片会有少量的香豆素类成分的丢失; 饮片经溶剂提取浓缩干燥, 得提取物膏粉, 10 批提取物中欧前胡素质量分数平均值为 0.417%, 10 批配方颗粒欧前胡素质量分数平均值为 0.426%, 表明在现代制粒条件下, 提取物到配方颗粒的制备过程对欧前胡素质量分数无明显影响; 但从饮片加工成提取物时, 存在欧前胡素转移率不高的现象, 原因有待进一步研究。

2.5 白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒特征图谱的建立

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~50 min, 5%~65%乙腈; 50~70 min, 65%~95%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 320 nm; 进样量 10 μL; 分析时间 100 min。

2.5.2 对照品溶液的制备 分别取欧前胡素、异欧前胡素对照品 2 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度。

2.5.3 供试品溶液的制备 取白芷药材、饮片、提

取物及配方颗粒粉末各 0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 分别精密加入甲醇溶剂 25 mL, 回流提取 0.5 h, 滤过, 蒸干, 加甲醇溶解并定容到 10 mL, 分别用微孔滤膜 (孔径 0.45 μm) 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.5.4 定量测定 分别取对照品溶液、供试品溶液 10 μL , 按“2.5.1”项下的色谱条件测定, 记录 100 min 色谱图, 见图 1~5。

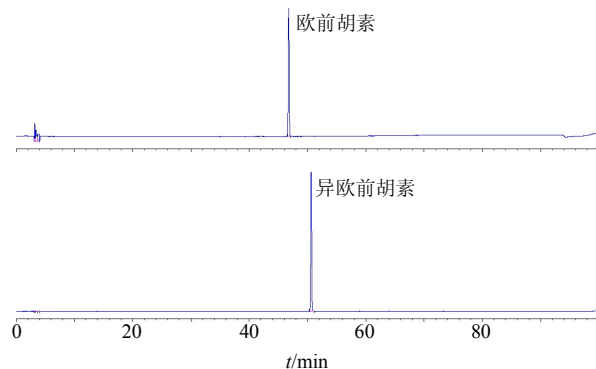


图 1 对照品欧前胡素和异欧前胡素的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference imperatorin and isoimperatorin

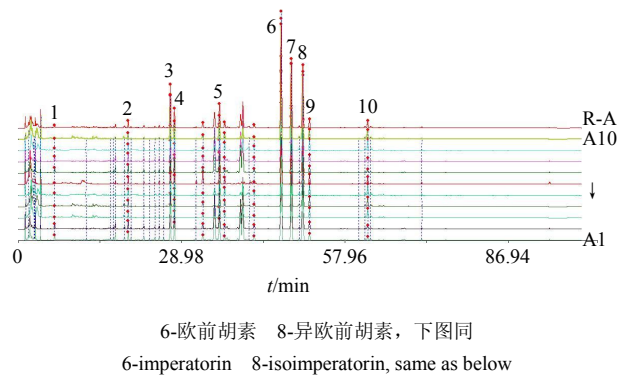


图 2 10 批白芷药材 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R-A)

Fig. 2 HPLC characteristic spectrum of 10 batches of medicinal material of ADR and its reference characteristic spectra (R-A)

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取“2.5.3”项下同一供试品 (编号 A1) 溶液, 连续进样 6 次, 考察进样精密度, 结果各共有峰保留时间的 RSD $<2.1\%$, 各共有峰峰面积的 RSD $<3.0\%$, 表明仪器精密度良好。

2.6.2 重复性试验 取同批次药材 (编号 A1), 按“2.5.3”项方法分别制备 6 份供试品溶液, 平行测定, 结果各共有峰保留时间的 RSD $<2.4\%$, 各共有峰峰面积的 RSD $<3.0\%$, 表明方法重复性良好。

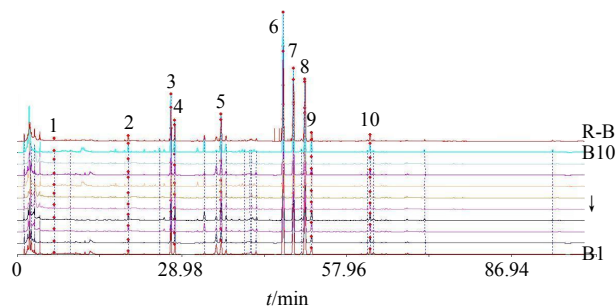


图 3 10 批白芷饮片 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R-B)

Fig. 3 HPLC characteristic spectrum of 10 batches of decoction pieces of ADR and its reference characteristic spectra (R-B)

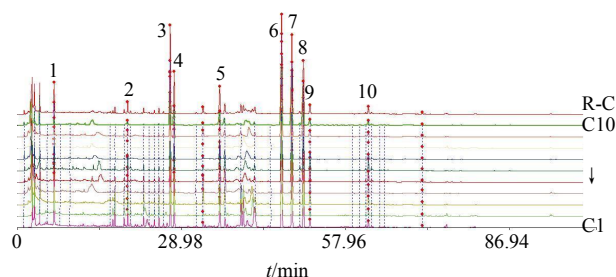


图 4 10 批白芷提取物 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R-C)

Fig. 4 HPLC characteristic spectrum of 10 batches of extract of ADR and its reference characteristic spectra (R-C)

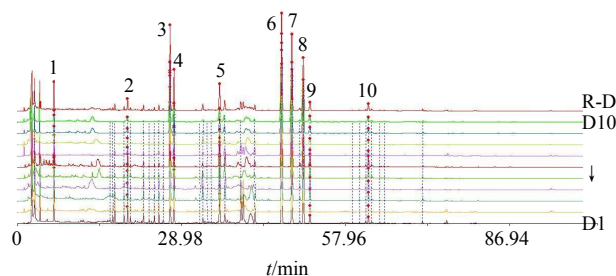


图 5 10 批白芷配方颗粒 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R-D)

Fig. 5 HPLC characteristic spectrum of 10 batches of ADR dispensing granules and its reference characteristic spectra (R-D)

2.6.3 稳定性试验 取“2.5.3”项下相同供试品溶液, 分别在 0、3、6、9、24、48 h 进样测定。结果各共有峰保留时间的 RSD $<2.3\%$, 各共有峰峰面积的 RSD $<3.0\%$, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.7 共有峰的标定

将各批配方颗粒的 HPLC 特征图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件” (2004A

版),选择时间窗宽度为 0.10,平均数法生成对照图谱,对色谱图进行多点校正后,自动匹配,生成图谱,经比较分析后确定 10 个共有峰。同法采集白芷药材、饮片和提取物的特征图谱,发现提取物、药材、饮片均有 10 个共有峰。与欧前胡素、异欧前胡素对照品色谱图进行比对,确认配方颗粒样品图中 6 号峰为欧前胡素,8 号峰为异欧前胡素。对照品色谱图见图 1,白芷药材、饮片、提取物和配方颗粒对照特征图谱见图 6。由图 6 可见,1~10 号峰是药材、饮片、提取物和配方颗粒的共有峰。各图谱的相似度见表 2。结果显示,10 批药材特征图谱与对照特征图谱的相似度在 0.911~0.968;饮片在 0.894~0.968;提取物在 0.941~0.994;配方颗粒在 0.953~0.993。结果提示,药材、饮片、提取物和配方颗粒整体具有相似性。

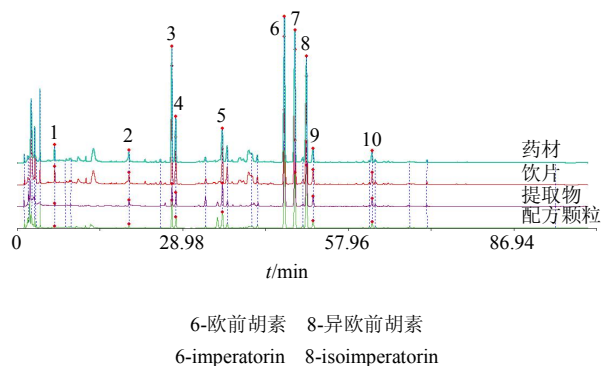


图 6 白芷药材、饮片、提取物和配方颗粒 HPLC 对照特征图谱的比较

Fig. 6 Comparison on HPLC reference characteristic spectra of raw herbs, decoction pieces, and extract with ADR dispensing granules

表 2 各图谱的相似度计算结果

Table 2 Similarity of characteristic chromatograms

样品	相似度									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
药材	0.916	0.930	0.911	0.968	0.949	0.964	0.956	0.962	0.926	0.966
饮片	0.916	0.930	0.911	0.968	0.894	0.964	0.956	0.962	0.926	0.966
提取物	0.962	0.967	0.988	0.990	0.990	0.984	0.990	0.966	0.941	0.994
配方颗粒	0.963	0.964	0.988	0.991	0.990	0.983	0.990	0.983	0.953	0.993

2.8 相关性分析

从整体上看,白芷药材、饮片、提取物及配方颗粒 HPLC 特征图谱的 1~10 号峰是药材、饮片、提取物和配方颗粒的共有峰,见图 6。结果显示, S1~S10 批次白芷药材、饮片、提取物、配方颗粒

特征图谱相似度分别在 0.916~0.963、0.930~0.967、0.911~0.988、0.968~0.991、0.894~0.990、0.964~0.984、0.956~0.990、0.962~0.983、0.926~0.953、0.966~0.994,其化学成分相关性较好。将白芷药材、饮片、提取物、配方颗粒的特征图谱进行重叠比较,白芷药材中主要色谱峰在饮片、提取物及配方颗粒的色谱图中均有体现,而饮片、提取物及配方颗粒的主要色谱峰也能在药材的图谱中找到追溯。将特征图谱用于中药配方颗粒全过程监控,可以反映生产过程各环节的量质传递变化规律^[3]。

3 讨论

欧前胡素、异欧前胡素是白芷药材中已知的主要有效成分,也是评价药材质量的主要指标成分^[4],但这 2 种香豆素类成分在水中溶解度小,水提取有效成分转移率低。本实验采用了醇提加水提的白芷配方颗粒生产工艺:加 10 倍量 60%乙醇,回流提取 2.5 h,药渣再加 9 倍量水,提取 1.5 h。按此法制得配方颗粒,较单一用水提取较大限度地提高欧前胡素和异欧前胡素的提取率,使白芷配方颗粒保留了原料中的主要活性成分群。

对不同提取溶剂及热回流、超声不同提取方法进行考察,从提取的全面性、稳定性、操作便捷性等方面考察,选择甲醇为白芷的提取溶剂,回流提取为白芷的提取方法。选择料液比、提取时间优化白芷配方颗粒特征图谱的提取工艺,优化所得的白芷加热回流最佳工艺为料液比 25 mL/g,加热回流提取 0.5 h。

本实验对色谱条件中的流动相体系进行考察,考察了甲醇-水二元梯度洗脱^[5],乙腈-0.5%磷酸水溶液二元梯度洗脱^[6],并对上述洗脱条件进行调整,结果表明以乙腈-水为流动相、梯度洗脱,所得色谱峰有 10 个明显的主峰,峰形较好,峰分离理想。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈培胜,朱月信. 中药配方颗粒行业标准研究思路 [J]. 中医杂志, 2012, 53(6): 469-472.
- [3] 孙源源,施 萍. 借助中药配方颗粒推进中药国际化的对策研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 929-934.
- [4] 常新全,丁丽霞. 中药活性成分分析手册 [M]. 北京: 学苑出版社, 2002.
- [5] 袁亚洲,倪永年. 不同产地白芷药材高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 分析科学学报, 2009, 25(2): 26-28.
- [6] 张翠英,李振国,王青晓. 白芷饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2007, 30(11): 1374-1376.