

白芍的高效液相色谱指纹图谱研究

杨 柳^{1*}, 许舜军², 田润涛³, 谢培山³, 王峥涛⁴

(1. 广州中医药大学 附属广东省中医院中心实验室, 广东 广州 510120; 2. 暨南大学 生命与健康工程研究院, 广东 广州 510632; 3. 珠海科曼中药研究有限公司, 广东 珠海 519000; 4. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要: 利用 HPLC-DAD 方法, 研究白芍的高效液相色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。测定了 28 批白芍药材样品, 并应用 LC-MS, MS/MS 技术指认指纹图谱共有模式中共有峰的归属。结果表明, 28 批白芍样品得到的色谱指纹图谱有 11 个共有峰, 并指认了 9 个峰, 分别为 (+)-儿茶素, 没食子酸甲酯, 芍药内酯苷, 芍药苷, 四没食子酰葡萄糖, 没食子酰芍药苷, 五没食子酰葡萄糖, 牡丹皮苷 1 和苯甲酰芍药苷。可见, 白芍的指纹图谱特征性及专属性强, 可结合含量测定用于全面控制白芍的质量。

关键词: 白芍; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)01 - 0071 - 04

HPLC fingerprinting of Radix Paeoniae Alba

YANG Liu^{1*}, XU Shun-jun², TIAN Run-tao³, XIE Pei-shan³, WANG Zheng-tao⁴

(1. Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Zhuhai Keman Ltd., Zhuhai 519000, China; 4. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

Abstract: To establish a sensitive and specific HPLC method for quality control of Radix Paeoniae Alba, HPLC method was applied for quality assessment of Radix Paeoniae Alba. HPLC analysis was performed on a Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm, Waters, USA). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and water containing 0.1% (v/v) phosphoric acid (solvent B) at a constant flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. An increasing linear gradient (v/v) of solvent A was used (t/m in, %A): (0, 10), (5, 10), (25, 15), (45, 22), (46, 65), (50, 80) and (60, 80). The column temperature was set at 25 °C. The chromatograms were monitored at 230 nm and the on-line UV spectra were recorded in the range of 190 - 400 nm. The HPLC chromatographic fingerprinting of Radix Paeoniae Alba, showing 11 characteristic peaks, was established from 28 lots of Radix Paeoniae Alba. The areas of main chromatographic peaks were found to complied with the following rule: paeoniflorin > 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-glucos > albiflorin > methyl gallate > other compounds. The chromatographic fingerprinting of Radix Paeoniae Alba with high specificity can be used to control its quality and assure lot-to-lot consistency.

Key words: Radix Paeoniae Alba; HPLC; fingerprinting

《中国药典》(2005年版一部) 记载的白芍来源于毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥

根^[1]。白芍的化学成分复杂, 主要有单萜类、有机酸类、鞣质类化合物。目前对白芍的质量控制, 多以芍药苷作为考察指标^[2], 这种对单一成分的检测显然不足以说明药材的质量, 并且也缺乏专属性。中药色谱指纹图谱用于中药质量控制, 比目前沿用的方法提供的信息要丰富。建立和比较不同品种、不同产地、不同规格白芍药材液相色谱指纹图谱, 可为

收稿日期: 2006-04-11.

基金项目: 国家中医药管理局重点资助项目(国中医药科 2001 ZDZX005); 广东省科技厅地市重点引导项目 (2004B33001007).

* 通讯作者 Tel: 86 - 20 - 81887233 - 30904,
E-mail: yangliume@yahoo.com.cn

规范白芍药材的生产及确保相关产品内在质量的均一性和稳定性提供全面的质量控制手段。

材料与amp;方法

材料与仪器 本实验所有白芍药材均于药材主产地和各大药材集散地收集,由珠海科曼中药研究有限公司谢培山主任中药师鉴定。儿茶素、芍药苷对照品由中国药品生物制品检定所提供,芍药内酯苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷均为自制,根据 HPLC-UV 归一化法,纯度均大于 98%;乙腈为美国 Fisher 公司产品,色谱纯;其余所用试剂皆为分析纯。

美国 Waters 高效液相色谱仪: Waters 600 型泵, 996 型二极管阵列检测器, Millennium 2010 工作站。QSTAR XL 型液相串联飞行时间质谱仪 (Applied Biosystems/MDS Sciex, 加拿大)。

Chromafinger 2005 色谱指纹图谱系统解决方案软件 (珠海科曼中药研究有限公司)。

色谱分析 色谱柱: Waters symmetry C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm); 流动相: 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 磷酸 (v/v); 梯度洗脱条件: 0 ~ 5 min, A-B (10: 90); 5 ~ 25 min, 10: 90 → 15: 85; 25 ~ 45 min, 15: 85 → 22: 78; 45 ~ 46 min, 22: 78 → 65: 35; 46 ~ 50 min, 65: 35 → 80: 20, 维持 80: 20, 10 min。流速: 0.8 mL · min⁻¹; 色谱峰光谱采集范围: 190 ~ 400 nm; 检测波长: 230 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

液质联用分析 液相条件参见前一项所述,其中 0.1% 磷酸采用 0.1% 甲酸代替; 柱后分流, 分流比: 1: 50; 进样量 20 μL; 柱温 25 °C; ESI 源; 源电压 - 3.2 kV; 负离子检测; 雾化气 (GAS1): 35, 帘气 (CUR): 16, 去簇电势 (DP): - 20 V, 聚焦电势 (FP): - 80 V, 去簇电势 2 (DP2): - 20 V, 检测器电压 (CEM): - 2.2 kV。TOF 扫描质量范围 *m/z* 100 ~ 700。

对照品溶液的制备 取儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷对照品适量,精密称定,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得含 0.5 mg · mL⁻¹ 对照品溶液。

供试品溶液的制备 取白芍药材粉末 (40 目) 约 2 g,精密称定,加 50% 甲醇 20 mL 浸泡 0.5 h,水浴回流 3 次 (分别为 20, 20 和 10 mL), 每次 0.5 h, 滤过,合并滤液于 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻

度,摇匀;精密量取上述溶液 5 mL,减压浓缩至干,加水反复溶解,置 5 mL 量瓶中,混合均匀,取 1 mL 通过已活化的 Agilent C₁₈ 小柱 (100 mg),加水 2 mL 冲洗,弃去水洗液,再以 70% 甲醇 1 mL 洗脱,收集洗脱液于 1 mL 量瓶中,加 70% 甲醇至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤器,收集续滤液。

结果

1 精密度与重现性

取药材样品,按供试品溶液制备方法进行制备,连续进样 5 次,检测指纹图谱。结果表明,测得各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 5%,表明仪器精密度良好。取同一白芍药材样品 5 份,按供试品溶液制备方法制备,检测指纹图谱。结果表明,各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 5%,表明其重复性较好,符合指纹图谱要求。

2 样品稳定性考察

取同一药材样品,按供试品溶液制备方法进行制备,分别在 0, 2, 4, 8, 24 和 48 h 检测指纹图谱,测得各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 5%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

3 白芍 HPLC-DAD 指纹图谱共有模式的建立及主要色谱峰的辨认

建立了 28 批不同产地或收集地白芍药材样品的 HPLC-DAD 指纹图谱,结果见图 1A。构建白芍药材共有模式所采用的参数如下,特征峰筛选使用中位数法,特征峰值计算采用了数学均数,以获得该类样本较稳健的特征,计算得到的共有模式见图 1B。实验中为了尽可能多地了解 HPLC 指纹图谱中各成分的结构信息,采用高效液相色谱串联飞行时间质谱对样品进行进一步地分析,确定了 9 个色谱峰的归属。分析和指认的结果见表 1。综合所有样本指纹图谱的规律来看,白芍指纹图谱主要特征峰的峰面积排序依次为:芍药苷 > 五没食子酰葡萄糖 > 芍药内酯苷 > 没食子酸甲酯 > 其他色谱峰。

峰 1, 4, 5, 8, 10 与对照品对照分别鉴定为 (+)-儿茶素,芍药内酯苷,芍药苷,1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷。

峰 2 鉴定为没食子酸甲酯, *M_r* 为 184, 碎片离子 *m/z* 124 为羰基 α 裂解产生的三羟基苯离子。

峰 6 的 *M_r* 为 788, 其带双电荷的离子 *m/z* 393 丰度较高,提示为没食子酰葡萄糖类成分,二级质谱图显示,其连续丢失没食子酸产生 *m/z* 617, *m/z* 447 和 *m/z* 277 的子离子,再丢失 1 个没食子酰基团

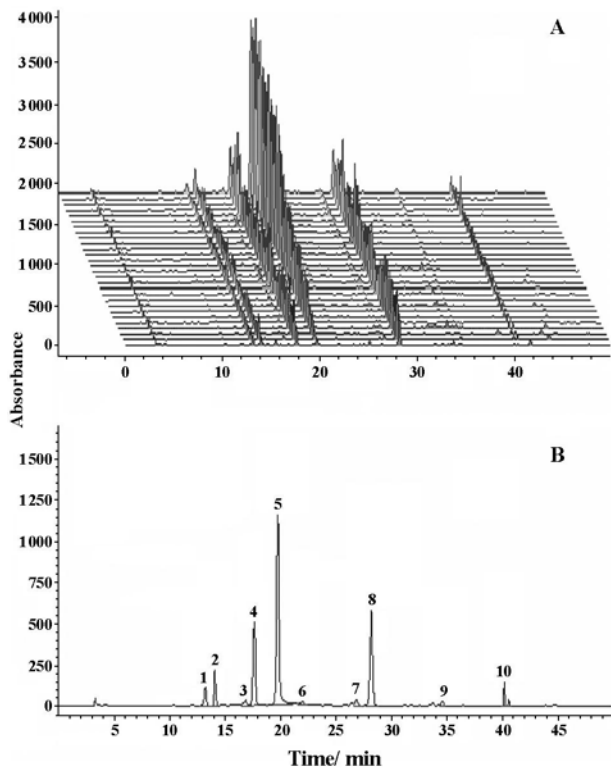


Figure 1 The HPLC fingerprints of 50% methanol extracts of 28 batches of Radix Paeoniae Alba (A) and the common pattern of the HPLC fingerprinting of Radix Paeoniae Alba of one of the 28 batches (B). Peaks 3 is unknown, the others are shown in Table 1

Table 1 Identification of the major common peaks of the HPLC fingerprinting of Radix Paeoniae Alba using LC-MS and MS/MS

Peak No.	Assigned identity	UV λ_{max} /nm	[M - H] ⁻ m/z	HPLC-ESI/MS ² m/z	Ref.
1 [*]	(+)-Catechin	-	289	245, 221, 161, 151, [3] 137, 125, 109	
2	Methyl gallate	-	183	124, 95, 78, 49	[4]
4 [*]	Albiflorin	231, 267	479	449, 357, 283, 121	[5]
5 [*]	Paeoniflorin	231	479	449, 327, 165, 121	[6]
6	Tetragalloyl glucose	220, 270	787	617, 465, 447, 313, [7] 295, 277, 169	
7	Galloylpaeoniflorin	224, 277	631	613, 491, 399, 313, [3] 271, 169, 165	
8 [*]	1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl glucose	220, 270	939	785, 635, 465, 301, [7] 275, 169	
9	Mudanpioside I	-	479	357, 345, 327, 283, [8] 121	
10 [*]	Benzoylpaeoniflorin	230, 267, 281	583	535, 431, 265, 165, [5] 121	

^{*} Identified by the reference standards

扫描产生脱水离子 m/z 613,再丢失 1 分子苯甲酸 (m/z 122)产生的碎片离子 m/z 491, m/z 165 为蒽烷骨架离子,还可见到 m/z 169 和 m/z 125 子离子,表明该化合物中存在 1 个没食子酰基团, m/z 313 对应于去质子没食子酰葡萄糖残基,表明该没食子酰基连接在葡萄糖环上,又因 [M - H - 30]⁻ 离子没有出现,故可判断为没食子酰基连接在葡萄糖环上的 6 位羟基上。 m/z 271 碎片离子是分子中的葡萄糖环上发生 ^{1,2} X 裂解所致。 m/z 211 子离子来源于同时丢失没食子酰葡萄糖残基和苯甲酰基。

峰 9 与芍药苷、芍药内酯苷互为同分异构体,准分子离子峰亦为 m/z 479。其二级质谱亦可见 m/z 121 的苯甲酸碎片离子, m/z 357 的 [M - H - 122]⁻ 进一步表明了苯甲酰基的存在。 m/z 195 的子离子为准分子母离子中性丢失了苯甲酰葡萄糖碎片 ([M - H - 284]⁻),而 m/z 283 子离子(去质子苯甲酰葡萄糖残基)的存在进一步证实了这一点。这一特征可用于该化合物与芍药苷、芍药内酯苷的区分。结合文献^[8]可判断该化合物为牡丹皮苷 I。

4 样本指纹图谱的相似度分析

将所有 28 批药材样本与计算得到的白芍药材共有模式相比较,计算夹角余弦相似度。结果显示有 7 批样品由于白芍苷色谱峰面积比值在其指纹图谱中不占主导地位,故属离群样本,相似度低于 0.95。相似度计算结果见图 2。

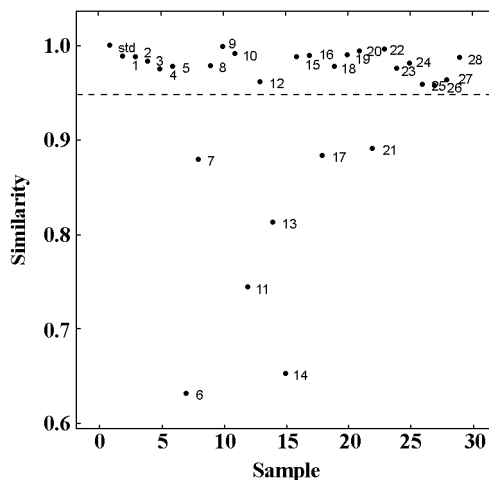


Figure 2 The similarity evaluation of HPLC fingerprints of 28 commercial samples. std: Standard

5 芍药苷的定量

将芍药苷对照品溶液稀释成 0.019 5, 0.039, 0.195, 0.39 和 0.78 mg • mL⁻¹,分别进样分析,记录流出曲线。以样品峰面积对样品浓度作图,得到芍

(152)产生 m/z 125 碎片离子, m/z 169 为产生的没食子酸负离子,故可鉴定为四没食子酰葡萄糖。

峰 7 的准分子离子峰为 m/z 631,其二级子离子

药苷校正曲线: $Y = 3.0449 \times 10^7 X + 15267$, 相关系数 $r^2 = 0.9999$, 线性范围 $0.39 \sim 15.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Table 2 The content (%) of paeoniflorin in the samples from different provenances determined by HPLC-DAD

No.	Collective site	Provenance	Content/%
1	Bozhou, Anhui	Bozhou, Anhui	2.73
2	Bozhou, Anhui	Bozhou, Anhui	1.58
3	Nanning, Guangxi	Zhejiang	1.26
4	Shanghai	Jilin	2.83
5	Shanghai	Guangxi	2.23
6	Guangzhou, Guangdong	-	0.15
7	Bozhou, Anhui	Anhui	0.63
8	Guangzhou, Guangdong	Anhui	1.01
9	Hebei	Bozhou, Anhui	2.05
10	Guiyang, Guizhou	-	2.13
11	Zigong, Sichuan	Henan	0.37
12	Zhengzhou, Henan	Hangzhou	0.82
13	Hongkong	-	0.35
14	Hongkong	-	0.12
15	Taipei, Taiwan	-	0.85
16	Taipei, Taiwan	-	0.93
17	Chengdu, Sichuan	-	0.61
18	Chengdu, Sichuan	-	1.18
19	Chengdu, Sichuan	Bozhou, Anhui	2.17
20	Chengdu, Sichuan	Zhongjiang, Sichuan	2.65
21	Chengdu, Sichuan	Bozhou, Anhui	0.60
22	Nanchang, Jiangxi	-	1.30
23	Puning, Guangdong	Zhejiang	2.83
24	Puning, Guangdong	Bozhou, Anhui	2.35
25	Hangzhou, Zhejiang	Bozhou, Anhui	1.20
26	Product No. 0905-9805*	-	2.83
27	Product No. 0905-200106*	-	2.58
28	Product No. 0905-200407*	-	2.64

* The standard herbal drug from National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products; - : Unknown

讨论

不同产地测试样品的 HPLC 指纹图谱较为相似, 说明白芍药材在化学成分上比较稳定。用于指纹图谱分析的 28 批药材中有 7 批药材差异稍大, 相似度低于 0.95, 它们的差异主要表现在 5 号峰芍药苷含量的相对比例变化较大。从芍药苷含量测定的结果也可得出同样的结论, 7 批相似度较低的离群样本芍药苷含量偏低, 为 28 批样品中芍药苷含量最低的几个样本。这说明白芍液相色谱指纹图谱相似度分析与药材中芍药苷含量测定所归纳的结果是一致的。白芍的质量评价采用指纹图谱结合主要成分含量测定的方法更为全面、科学。

分别采用乙腈-0.1%甲酸、甲醇-0.1%甲酸、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.1%磷酸等度和不同线性梯

度进行洗脱。结果表明, 以乙腈-0.1%磷酸线性梯度分离效果较好, 基线漂移小, 色谱峰分布均匀, 峰形好, 且保留时间稳定。实验时, 以梯度洗脱程序运行 50 min, 然后以 80%乙腈等度洗脱运行到 60 min 后回到起始浓度, 为确保色谱峰的峰形及分离度, 每次进样前用初始流动相平衡 10 min。

对 190 ~ 400 nm 扫描的各波长下的色谱图进行分析比较, 由于单萜苷类成分为芍药的主要活性成分, 这类成分多在 230 nm 处有较高的灵敏度, 且在此波长下记录的色谱图基线平稳, 色谱峰数目较多, 各色谱峰紫外吸收较强, 故检测波长确定为 230 nm。

芍药中主要的化学成分是单萜及其苷类、鞣质、有机酸等, 这些化合物的结构中含有较多的羟基, 容易形成稳定的氧负离子, 故供试品溶液采用质谱负离子检测有较好的响应, 在正离子模式下, 由于这些化合物不电离或电离很少, 检测灵敏度较低。无机酸因其不具挥发性而难以运用于质谱, 故在 LC-MS 分析中以 0.1%甲酸替代, 替代后各成分的保留值较稳定, 仅芍药苷峰形拖尾。

References

- [1] State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 68.
- [2] Wang BQ. Study on Quality Control and Standard Samples of Traditional Chinese Patent Medicine (中成药质量标准与标准物质研究) [S]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science & Technology Publishing House, 1994: 608.
- [3] Shibutani S, Nagasawa T, Oura H, et al. Effect of extract from Paeoniae Radix on urea-nitrogen concentration in rat serum. [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29: 874.
- [4] Ma YB, Wu DG, Liu JK. Paeonivayin, a new monoterpene glycoside from *Paeonia delavayi* [J]. Chin Chem Lett, 1999, 10: 771.
- [5] Kaneda M, Iitaka Y, Shibata S. The absolute structures of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from Chinese peony root [J]. Tetrahedron, 1972, 28: 4309.
- [6] Shibata S, Nakahara M. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. VIII. Paeoniflorin, a glucoside of Chinese peony root [J]. Chem Pharm Bull, 1963, 11: 372.
- [7] Nishizawa M, Yamagishi T, Nonaka G, et al. Isolation and characterization of galloylglucoses from Paeoniae Radix and their effect on urea-nitrogen concentration in rat serum [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31: 2593.
- [8] Ding HY, Wu YC, Lin HC, et al. Glycosides from *Paeonia suffruticosa* [J]. Chem Pharm Bull, 1999, 47: 652 - 655.