

白芍标准汤剂的化学成分鉴定及其质量传递规律研究

摘要 目的：系统研究白芍水煎液的化学物质基础，建立同时适用于白芍饮片及其标准煎液的多指标含量测定方法，结合转移率指标揭示两者之间的质量传递规律。方法 采用高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱（UHPLC-Q-OrbitrapHRMS）对白芍标准汤剂的化学成分进行鉴别，根据化合物的质谱信息，将其与标准品、标准谱图库及文献内容比对，标准谱图库可以与参考文献进行比对，以达到对药物的化学信息进行更迅速、精确地鉴定。采用高效液相色谱-二极管阵列检查方法（UPLC-PDA）建立白芍药材及其标准汤剂的含量测定方法，测定三批白芍饮片及其标准汤剂中芍药苷、芍药内酯苷的质量转移规律。结果 鉴定了白芍标准汤剂中的 33 个化学成分，建立了同时测定芍药苷和芍药内酯苷的 UPLC 含量测定方法，可同时适用于白芍饮片其标准汤剂的检测。芍药苷从白芍饮片到白芍标准煎液的转移率为 70.70%~80.33%，芍药内酯苷从白芍饮片到白芍标准煎液的转移率为 11.65%~24.67%。结论：本研究通过液质联用技术鉴定了白芍标准煎液的化学物质基础，建立了适用于白芍饮片及其标准汤剂中含有的芍药苷和芍药内酯苷的含量测定方法，明确了二者之间的质量传递规律，为含白芍标准煎液制剂的全程质量控制和质量评价方法的建立提供参考。

关键词 白芍；液质联用；质量传递规律；标准煎液

Study on chemical composition identification and quality transfer law of paeonia lactiflora standard decoction

Abstract Objective : To systematically study the chemical basis of paeonia lactiflora decoction, establish a multi-index content determination method suitable for paeonia lactiflora decoction and its standard decoction, and reveal the mass transfer law between them by combining the transfer rate and the extraction rate. Methods : UHPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to systematically identify the chemical constituents of paeonia lactiflora decoction. According to the MS1 and MS / MS information of the compounds, and compared with the standard, standard spectral library and references, the chemical information of the drug was quickly and accurately identified. UPLC-PDA was used to establish the content determination method of paeonia lactiflora decoction pieces and paeonia lactiflora standard decoction, and the mass transfer rules of paeoniflorin and albiflorin in three batches of paeonia lactiflora decoction pieces and their standard decoction were determined. Results : 33 chemical constituents in the standard decoction of paeonia lactiflora were systematically identified, and a UPLC method for simultaneous determination of paeoniflorin and albiflorin was established, which could be applied to the detection of paeonia lactiflora decoction and its standard decoction. The transfer rate of paeoniflorin from paeonia lactiflora decoction pieces to paeonia lactiflora standard decoction was 70.70 % - 80.33 %, and the transfer rate of albiflorin from paeonia lactiflora decoction pieces to paeonia lactiflora standard decoction was 11.65 % -24.67 %. Conclusion : In this study, the chemical basis of the standard decoction of paeonia lactiflora was identified by liquid chromatography-mass spectrometry, and the content determination methods of paeoniflorin and albiflorin suitable for paeonia lactiflora decoction pieces and their standard decoctions were established. The quality transfer law between the two was clarified, which provided a reference for the establishment of the whole quality control and quality evaluation method of the standard decoction of paeonia lactiflora.

Keywords paeonia lactiflora UPLC-MS quality transfer law standard decoction

目 录

1 前言	1
2 仪器与材料	2
2.1 仪器	2
2.2 试剂与标准品	2
2.3 材料	3
3 方法	4
3.1 基于 UPLC-MS 鉴定白芍标准煎液的化学成分	4
3.1.1 白芍标准煎液的制备	4
3.1.2 白芍标准煎液供试品制备	4
3.1.3 标准物质的制备	4
3.1.4 色谱及质谱条件	4
3.1.5 数据处理	5
3.2 白芍“饮片-标准煎液”的质量传递规律研究	5
3.2.1 白芍药材供试品溶液的制备	5
3.2.2 对照品溶液的制备	5
3.2.3 色谱条件	6
3.2.4 方法学考察	6
4 结果与分析	8
4.1 基于 UPLC-MS 的白芍标准煎液的化学成分鉴定	8
4.1.1 鞣质类化学成分鉴定	12
4.1.2 单萜苷类化学成分鉴定	12

4.2 白芍质量传递规律研究.....	13
4.2.1 方法学考察.....	13
4.2.2 专属性试验.....	13
4.2.3 线性关系考察	14
4.2.4 精密度考察.....	16
4.2.5 重复性考察.....	16
4.2.6 稳定性考察.....	17
4.2.7 中间精密度考察	17
4.2.8 加样回收率考察	18
4.2.2 白芍质量传递结果	19
5 结论.....	20
6 参考文献	22
致谢.....	24

1 前言

白芍是我国重要的中药材之一，其资源丰富，药用历史悠久，芍药药用始见于《神农本草经》^[1]，在历代本草著作中，都有对其记载。2020年版《中国药典》规定，白芍 *Paeoniae Radix Alba* 来源于毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根^[2]，具有养血调经，平肝止痛，敛阴止汗的功效。目前研究发现，白芍中含有单萜及其糖苷类、三萜类、黄酮类、鞣质类等多种化学成分^[3]。现代药理研究表明，白芍具有抗炎、镇痛、保肝、促进造血功能、抗血栓、抗肿瘤、抗氧化^[4-10]。

根据国家中医药管理局发布的关于《古代经典名方目录（第一批）》，有 26 首经典名方中含有芍药药材，比例约为 1/4，其中明确配伍白芍的复方共 14 首^[11]。赵佳琛等在考证含有芍药类药材的复方制剂中发现，宋代推崇白芍，于是将前代处方中带有“芍药”字样的均改正为“白芍”，因此，对于宋代之前含有芍药字样的经典处方，应根据其功效和方组变化，确定其药材基源，宋代之后的处方则应以处方记载中“赤芍”“白芍”为准。在其余 12 首含芍药而未知药材基源的复方制剂中，应对其所含有的芍药字样的经典名方进行本草考证，可通过组方中药物发挥的作用功能，来确定其基源。白芍时常作为一种组方药材在经典名方中出现，因此，白芍具有相对重要的研究意义。

2019 年发布的《古代经典名方中药复方制剂物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》中提出“药材、饮片和物质基准的质控项目之间应具有较好的相关性，且应以出膏率(浸出物)、含量测定、指纹图谱或特征图谱等指标对药材、饮片及物质基准之间的质量传递进行研究”^[12]。本研究将通过液质联用技术，鉴定白芍标准煎液中特征化合物的质谱信息，明确白芍标准煎液的主要化学成分基础，基于白芍标准煎液的主成分筛选质控指标成分，建立同时适用白芍饮片和白芍标准煎液的含量测定方法，探讨了白芍“饮片-标准汤剂”之间的质量传递规律，为含白芍制剂的全程质量控制方法及其制剂的质量评价方法的建立提供参考。

2 仪器与材料

2.1 仪器

主要仪器（见表 1）

表 1 主要仪器

仪器	型号	公司厂家
万分之一电子分析天平	ME104/02 型	瑞士梅特勒-托利多仪器公司
十万分之一电子天平	SQP 型	德国赛多利斯科学仪器公司
四极杆-静电场轨道阱 质谱仪	Q-Exactive 高性能 台式组合型	Thermo Fisher Scientific
数控超声清洗仪	KQ-300DE 型	昆山市超声仪器有限公司
旋转蒸发器	N-1300	东京理化
真空干燥箱	DZF-6056	上海一恒科学仪器有限公司

2.2 试剂与标准品

试剂与标准品（见表 2）

试剂、标准品	公司厂家
质谱级甲醇、乙腈	Merck
质谱级甲酸	Fisher, LC-MS
色谱级甲醇、乙腈	Oceanpak
色谱级磷酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
二次重蒸水	屈臣氏
芍药苷	中国食品药品检定研究院, 批号 110736-201741

表 2 试剂与标准品

芍药内酯苷

成都普菲德生物技术有限公司，批号 1701302

2.3 材料

白芍饮片分别购自安徽亳州（批次 BS180404）、浙江磐安（批次 BS180325），四川中江（批次 BS180313）。

3 方法

3.1 基于 UPLC-MS 鉴定白芍标准煎液的化学成分

3.1.1 白芍标准煎液的制备

煎制白芍饮片前需将其粉碎并用 24 目筛网过滤，得到粗粉样品后进行包煎。再将 800 mL 纯净水加入其中，浸泡 10 分钟，然后用武火煮沸，再转为文火煎制，直至药液体积减少到初始加水量的 80%，挤渣，用 200 目筛网过滤，在 60℃ 条件下减压浓缩至浸膏浓度约为 0.8 g/mL，60℃ 条件下恒温减压干燥，研细，即得白芍标准煎液基准样品。

3.1.2 白芍标准煎液供试品制备

取 3.00 g 白芍标准煎液基准样品，按梯度萃取法进行分极性萃取，加 20 ml 水溶解，超声至完全溶解，加入 20 ml 正己烷萃取 3 次，合并有机层，减压浓缩，至有机层挥发，加入 2 ml 甲醇溶解；水层继续用 20 ml 乙酸乙酯分别萃取 3 次，合并有机层，减压浓缩，至有机层挥发，加入 5 ml 甲醇溶解；水层继续用 20 ml 水饱和正丁醇萃取 3 次，合并有机层，减压浓缩，至有机层挥发，加入 20 ml 甲醇溶解，即得不同极性部位的白芍质谱鉴别用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇部位供试品溶液。

3.1.3 标准物质的制备

精密称取芍药苷、芍药内酯苷各 1.03、1.01 mg，加 5 ml 甲醇溶解，配置芍药苷、芍药内酯苷浓度为 0.206 $\mu\text{g/mL}$ 、0.22 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

3.1.4 色谱及质谱条件

液相色谱条件：色谱柱为岛津 Inertsil ODS-3 C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm ）；流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~5 min，9%~10%乙腈；5~10 min，10%~11%乙腈；10~22 min，11%~15%乙腈；22~30 min，15%~17%乙腈；30~34 min，17%~20%乙腈；34~42 min，20%~27%乙腈；42~53

min, 27%乙腈; 53~60 min, 27%~32%乙腈; 60~90 min, 32%~74%乙腈; 检测波长为 230 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30°C;

质谱条件: 加热电喷雾电离离子源 (HESI), “+、-”离子检测模式, 正离子扫描喷雾电压 3.5 kv, 负离子扫描喷雾电压 -3.2 kv; 鞘气流 55 arb (L/min), 辅助气流 15 arb (L/min), 离子传输管温度为 350°C, 干燥气温度为 300°C; 一级质谱扫描范围 m/z100~1500, 分辨率为 70000, AGCtarget 为 106, 最大注入时间为 100 ms, 二级质谱采用动态数据依赖性扫描 (dd-MS2), 分辨率为 17500, AGCtarget 为 105, 最大注入时间为 50 ms, NCE15~35。

3.1.5 数据处理

建立了白芍药材的化学成分数据库。借助于 CNKI 和 Pubchem 等数据库, 检索白芍药材相关的文献, 并尽可能全面地包含了中药中所含化合物的分子式、分子质量和化学名称等信息。将原始数据导入 CompoundDiscoverer3.0 软件, 根据仪器采集的精确分子量进行拟合, 确定可能的元素组成。然后, 将拟合结果与在线数据库 ChemSpider、mzCloud 和 OTCML 中的二级质谱数据进行比对, 推测白芍水煎液中化学成分的结构。初步确定白芍水煎液中的化学成分结构。

3.2 白芍“饮片-标准煎液”的质量传递规律研究

3.2.1 白芍药材供试品溶液的制备

分别精密称取 3 批不同产地的白芍粗粉和白芍标准煎液 0.2 g, 将待测样品置于一个 50 ml 容量瓶中, 并加入 35 ml 的 50%乙醇, 使用超声仪器处理 30 分钟后, 将其放置在室温下冷却。接着, 再加入 50%乙醇至瓶口刻度线, 摇匀混合。将混合液使用 0.22 μm 滤膜进行滤过, 取续滤液即可得到待测样品的溶液。

3.2.3 对照品溶液的制备

精密称取芍药苷、芍药内酯苷各 1.05、1.07 mg, 加 1 ml 甲醇溶解, 配置芍药苷、芍药内酯苷浓度为 1.050 mg/mL、1.070 mg/mL

的对照品溶液。分别取 200、100 μl 芍药苷、芍药内酯苷对照品溶液，甲醇定容至 1 ml，按 2、4、8、16、32 倍进行逐级稀释，用于线性关系考察。

3.2.3 色谱条件

采用色谱柱美国菲罗门 Luna5 μm C18(2)100A (4.6 \times 250 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) -0.1%磷酸 (B) 溶液，梯度洗脱 (0~10 min, 5% \rightarrow 7%A; 10~15 min, 7% \rightarrow 13%A; 15~25 min, 13%A; 25~40 min, 13% \rightarrow 25%A; 40~65 min, 25% \rightarrow 55%A)；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：10 μl ；流速：1.0 ml/min；检测波长：230 nm。

3.2.4 方法学考察

具体操作(见表 3)

表 3 方法学考察操作

方法学	具体操作
(1)线性关系试验	分别精密吸取芍药苷、芍药内酯苷对照品，加入稀乙醇溶液，两倍稀释 1、2、4、8、16、32 倍的标准品溶液，按“3.2.3”项下色谱条件进样测定，得峰面积积分值，对照品峰面积积分值为纵坐标 (Y)，以质量浓度为横坐标 (X)，并绘制标准曲线。
(2)精密度试验	按“3.2.1”项下方法制备白芍标准煎液供试品溶液 6 份，按“3.2.3”项下色谱条件测定，分别进样次，测定芍药苷、芍药内酯苷的峰面积计算峰面积，计算峰面积 RSD。
(3)稳定性试验	按“3.2.1”项下方法制备浓度白芍标准煎液供试品溶液 1 份，按“3.2.3”项下色谱条件，分别于 0、4、10、18、24、30h 进样测定，测定芍药苷、芍药内酯苷的峰面积，计算峰面积 RSD
(4)重复性试验	精密称取同一批白芍标准煎液样品，按“3.2.1”项下方法制备平行制备 6 份。按“3.2.3”项下色谱条件测定，测定芍药苷、芍药内酯苷的峰面积，计算峰面积 RSD。

(5)中间精密度试验	精密称取同一批白芍标准煎液样品，分别让 3 位不同实验人员分别制备 5 份供试品溶液，共 15 份供试品溶液，在一天早中晚随机测定，测定芍药苷、芍药内酯苷的峰面积，计算峰面积 RSD
(续上表 3 方法学考察操作)	
(6)加样回收率试验	按“3.2.1”项下方法制备水溶性供试品溶液 9 份，分别按芍药苷、芍药内酯苷的含量 1: 1, 1: 1.2, 1: 0.8 加入标准品，按“3.2.3”项下色谱条件测定，分别进样，测定芍药苷、芍药内酯苷的峰面积，计算回收率。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/255112000343011134>