

赤芍配方颗粒特征图谱分析及结果快速评价

LC-232

摘要： 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，参考《赤芍（芍药）配方颗粒》标准中的色谱条件，对赤芍配方颗粒特征图谱进行分析。实验结果显示：在本系统下，芍药苷色谱峰的理论塔板数远大于 3000，符合系统适用性要求；空白溶液在各特征峰位置处无明显色谱峰，不干扰特征图谱分析；对照药材参照物溶液连续进样 6 次，各特征峰保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.027%~0.263% 和 0.223%~1.304% 之间，仪器精密度高；待测样品特征图谱通过 LabSolutions CS 网络化软件 Multi-Data Report 功能进行自动计算和结果判定，并在批处理样品分析结束后自动出具报告结果，待测样品中指定特征峰的相对保留时间及相对峰面积均符合标准规定。此外，本实验采用 LabSolutions 软件自带的同时注入（Co-injection）功能，在不影响灵敏度的情况下轻松解决溶剂效应问题。另外，通过多项实验发现对照药材参照物中的峰 2 可能非标准中标识的原儿茶醛，本文对此结果进行了原因分析和讨论。

关键词： Nexera LC-40 高效液相色谱仪 赤芍配方颗粒 特征图谱

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根。赤芍性味苦，微寒，归肝经。具有清热凉血，散瘀止痛的作用，用于热入营血，温毒发斑，吐血衄血，目赤肿痛，肝郁胁痛，经闭痛经，癥瘕腹痛，跌扑损伤，痈肿疮疡。

本实验采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪参考 2019 年发布的赤芍（芍药）配方颗粒标准进行

了特征图谱分析，该系统稳定性好，重复性高，满足特征图谱分析的要求。同时，本实验采用岛津 LabSolutions CS 网络化软件进行数据分析，该软件不仅符合数据完整性法规要求，其 Multi-Data Report 功能还可自动地对特征图谱分析结果进行快速评价，提高分析效率。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 XR 超高效液相色谱仪，具体配置为：

| | | | |
|--------|-------------|--------|--------------|
| 系统控制器： | CBM-40 Lite | 脱气机： | DGU-405 |
| 输液泵： | LC-40B XR | 自动进样器： | SIL-40C XR |
| 柱温箱： | CTO-40S | 检测器： | SPD-M40 (2D) |

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 色谱柱（250 mm× 4.6 mm I.D., 5 μm）
（P/N: 227-30017-08，岛津（上海）实验器材有限公司）

流动相：A: 0.05% 磷酸水溶液；B: 乙腈

流速：1.0 mL/min

柱温：30°C

检测波长：0-25 min 210 nm; 25-60 min 230 nm

进样体积：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 5%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 25 | Pumps | Pump B Conc. | 15 |
| 34 | Pumps | Pump B Conc. | 18 |
| 35 | Pumps | Pump B Conc. | 20 |
| 44 | Pumps | Pump B Conc. | 20 |
| 45 | Pumps | Pump B Conc. | 45 |
| 55 | Pumps | Pump B Conc. | 47 |
| 56 | Pumps | Pump B Conc. | 5 |
| 60 | Controller | Stop | |

■ 样品前处理

对照药材参照物溶液的制备：取赤芍对照药材 0.4 g，加水 50 mL，加热回流提取 45 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加稀乙醇 25 mL，超声处理（功率 200 W，频率 53 kHz）30 分钟，取出，放冷，滤过，取续滤液即得。

对照药材参照物溶液的制备：取没食子酸对照品、原儿茶醛对照品、儿茶素对照品、芍药苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 ml 含没食子酸、原儿茶醛、儿茶素各 40 μg，含芍药苷 80 μg 的混合溶液，作为对照品参照物溶液。

供试品溶液的制备：取本品，研细，取 0.1 g，置具塞锥形瓶中，加稀乙醇 25 mL，密塞，超声处理（功率 200 W，频率 53 kHz）30 分钟，取出，放冷，滤过，取续滤液，即得。

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

按照 1.2 中色谱分析条件，取空白溶剂、对照品参照物溶液、对照药材参照物溶液和供试品溶液分别上机分析，空白溶剂色谱图如图 1，目标物出峰处无干扰。对照品参照物、对照药材参照物和供试品色谱图见图 2-4。

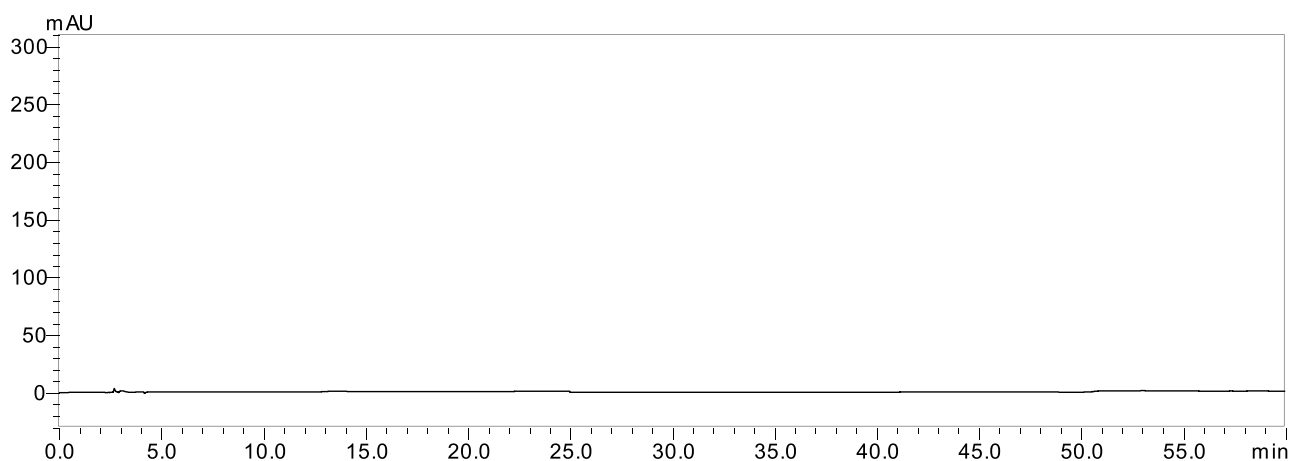


图 1 空白溶剂色谱图

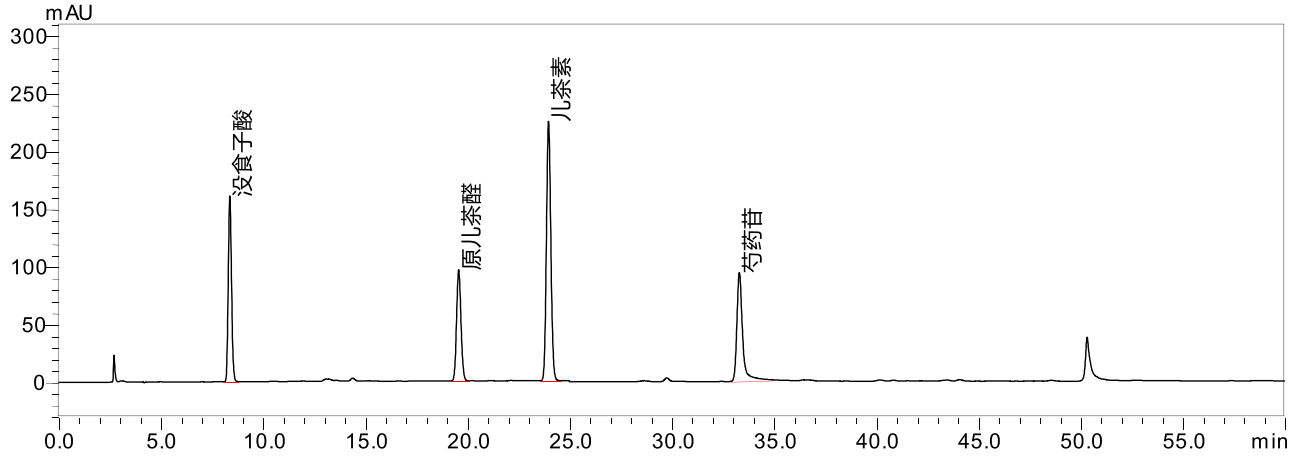


图2 对照品参照物溶液色谱图

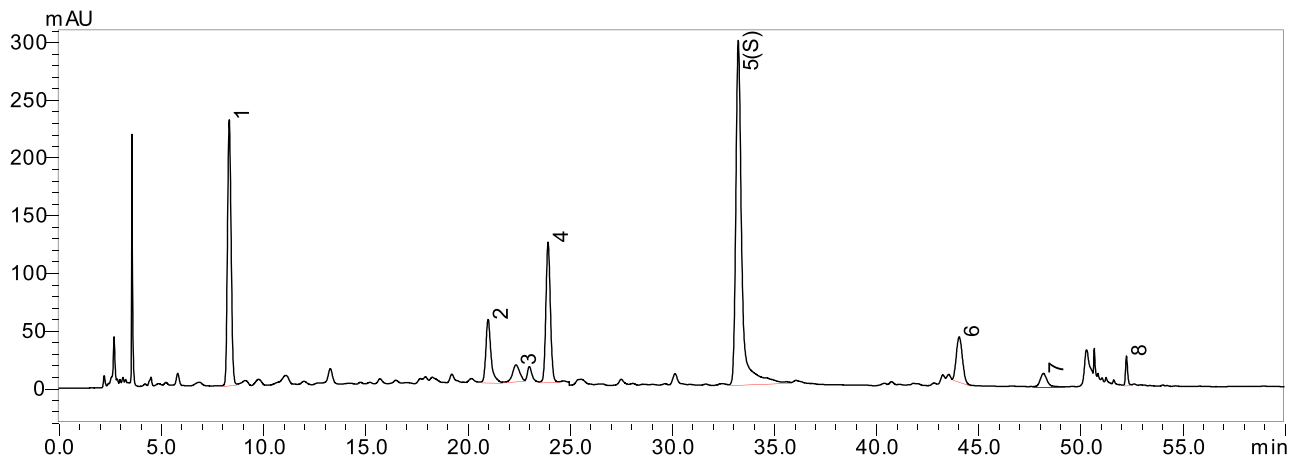


图3 对照药材参照物溶液色谱图

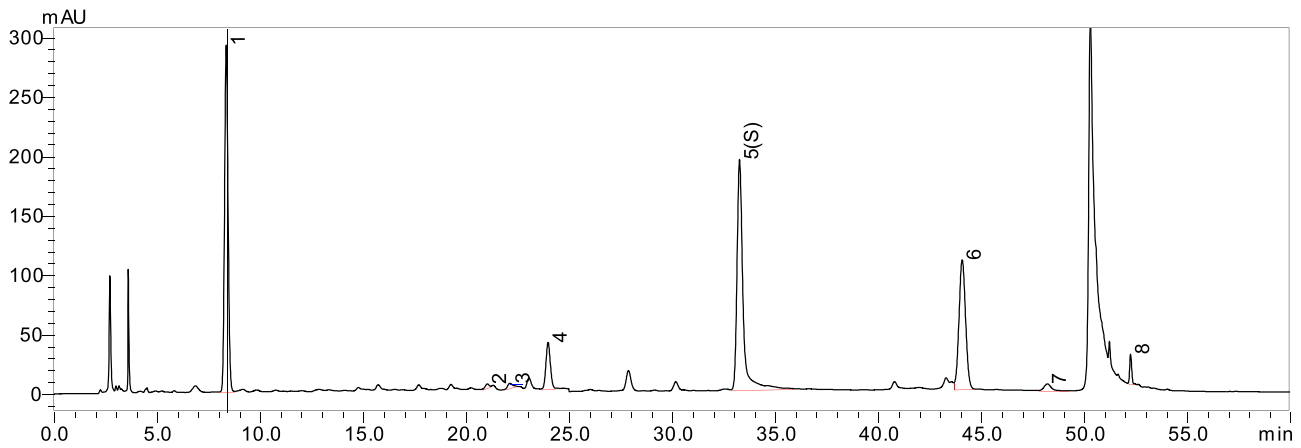


图4 供试品溶液色谱图

峰1: 没食子酸 峰2: 未知物 峰4: 儿茶素 峰5(S): 芍药苷 峰8: 苯甲酰芍药苷

3.2 系统适用性考察结果

对照品参照物溶液、对照药材参照物及供试品溶液中芍药苷特征峰的系统适用性结果如下表所示：

表 2 系统适用性结果

| 名称 | 对照品参照物溶液 | 对照药材参照物溶液 | 供试品溶液 |
|-------|----------|-----------|-------|
| 理论塔板数 | 80148 | 79117 | 80490 |

各溶液中芍药苷的理论塔板数均远大于 3000，本实验结果符合标准规定。

3.3 精密度实验

取对照药材参照物溶液连续进样 6 次，考察仪器精密度。8 个特征峰的保留时间和峰面积 RSD 值分别在 0.027%~0.263% 和 0.223%~1.304% 之间，表明仪器精密度良好，详见图 5 和表 3~4。

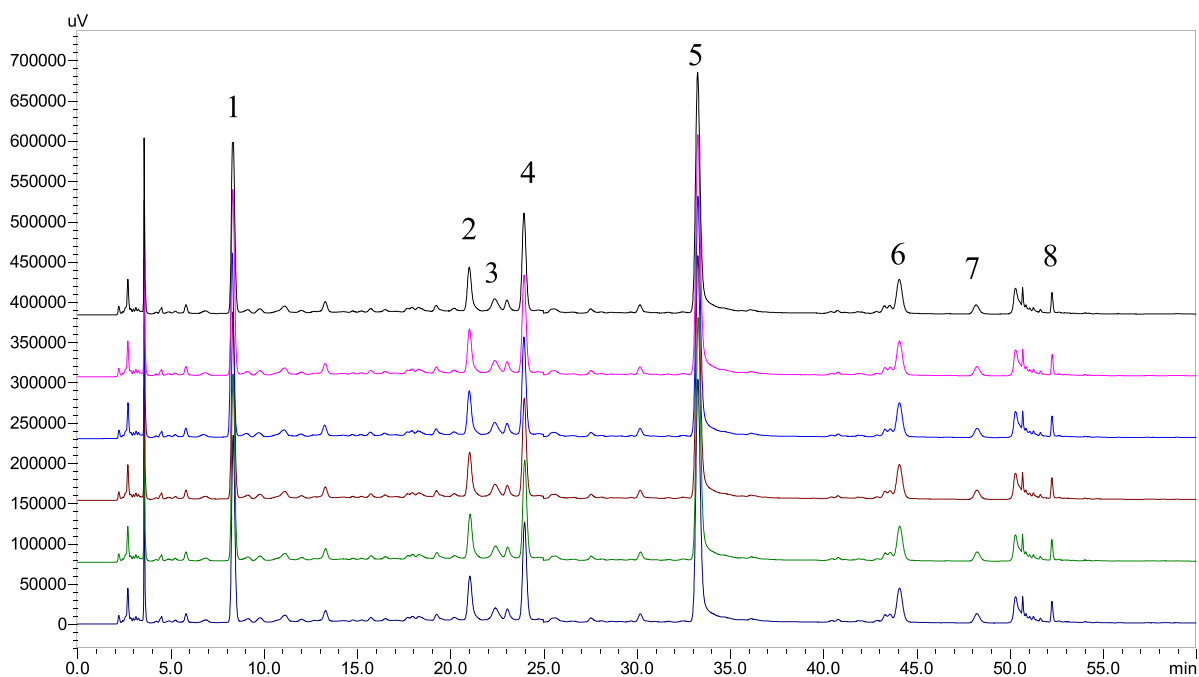


图 5 对照药材参照物溶液精密度测试色谱图 (n=6)

表 3 对照药材参照物溶液精密度测试结果 - 保留时间 (n=6)

| 保留时间 (min) | 峰 1 | 峰 2 | 峰 3 | 峰 4 | 峰 5 | 峰 6 | 峰 7 | 峰 8 |
|------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 8.355 | 21.026 | 22.390 | 23.958 | 33.268 | 44.078 | 48.200 | 52.264 |
| 2 | 8.349 | 21.035 | 22.397 | 23.961 | 33.283 | 44.088 | 48.245 | 52.273 |
| 3 | 8.305 | 21.028 | 22.390 | 23.956 | 33.284 | 44.085 | 48.251 | 52.266 |
| 4 | 8.356 | 21.044 | 22.407 | 23.973 | 33.282 | 44.086 | 48.241 | 52.259 |
| 5 | 8.360 | 21.067 | 22.430 | 23.996 | 33.296 | 44.103 | 48.254 | 52.259 |
| 6 | 8.366 | 21.056 | 22.420 | 23.988 | 33.282 | 44.093 | 48.239 | 52.264 |
| RSD(%) | 0.263 | 0.078 | 0.074 | 0.070 | 0.027 | 0.019 | 0.041 | 0.010 |

表 4 对照药材参照物溶液精密度测试结果 - 峰面积 (n=6)

| 次数 | 峰 1 | 峰 2 | 峰 3 | 峰 4 | 峰 5 | 峰 6 | 峰 7 | 峰 8 |
|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 1 | 2799947 | 882277 | 326143 | 1826690 | 6014795 | 790300 | 260105 | 171865 |
| 2 | 2802412 | 882467 | 328049 | 1825524 | 6023341 | 771300 | 259857 | 172129 |
| 3 | 2800117 | 889322 | 327574 | 1825564 | 6032168 | 768083 | 259830 | 171347 |
| 4 | 2816707 | 897226 | 325718 | 1834802 | 6067825 | 785027 | 260714 | 172086 |
| 5 | 2817102 | 885233 | 323153 | 1833483 | 6066867 | 789337 | 260229 | 172025 |
| 6 | 2811952 | 891105 | 320782 | 1829818 | 6056131 | 791060 | 259765 | 171340 |
| RSD(%) | 0.290 | 0.652 | 0.854 | 0.223 | 0.381 | 1.304 | 0.137 | 0.212 |

3.4 供试品特征图谱分析结果及讨论

3.4.1 特征峰结果讨论

参考《赤芍（芍药）配方颗粒》特征图谱项的对照特征图谱可知，供试品和对照药材参照物色谱图中呈现了 8 个特征峰，8 个特征图谱的保留时间结果如表 3 所示。其中有 3 个峰与对照品参照物峰的保留时间对应，分别是峰 1、峰 4 和峰 5，供试品及对照药材参照物色谱图中峰 2 的保留时间约为 21.0 min，与对照品参照物峰原儿茶醛色谱峰保留时间（约 19.6 min）相差较大，与《赤芍（芍药）配方颗粒》质量标准中定义的峰 2 为原儿茶醛的信息不一致。为更好地对比峰 2 和原儿茶醛色谱峰之间的差异，本文将对照药材参照物色谱图和对照品参照物色谱图进行叠加，如图 6 所示。

表 5 供试品和对照药材参照物色谱图中特征峰的保留时间 (min)

| 色谱峰保留时间 | 供试品 | 对照药材参照物 | 对照品 |
|---------|--------|---------|--------|
| 峰1 | 8.363 | 8.355 | 8.378 |
| 峰2 | 21.040 | 21.026 | 19.578 |
| 峰3 | 22.137 | 22.390 | |
| 峰4 | 23.986 | 23.958 | 23.974 |
| 峰5 (S) | 33.279 | 33.268 | 33.310 |
| 峰6 | 44.088 | 44.078 | ----- |
| 峰7 | 48.221 | 48.200 | |
| 峰8 | 52.261 | 52.264 | |

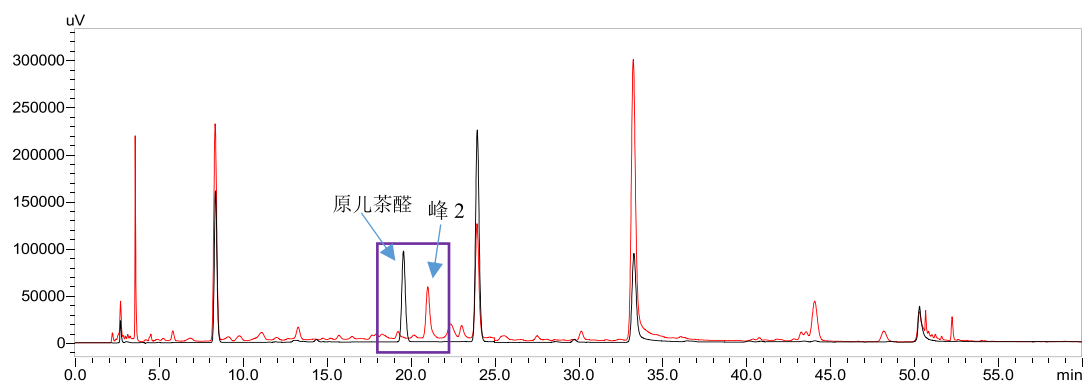


图 6 叠加色谱图（红色：对照药材参照物，黑色：对照品参照物）

由于峰 2 和原儿茶醛色谱峰保留时间存在明显差异,推断峰 2 可能非原儿茶醛。为进一步对该结果进行确认,本实验采用 PDA 检测器考察了两者之间的光谱图,如图 7 所示,二者的光谱相似度为 0.757,推测峰 2 可能为其他未知物。

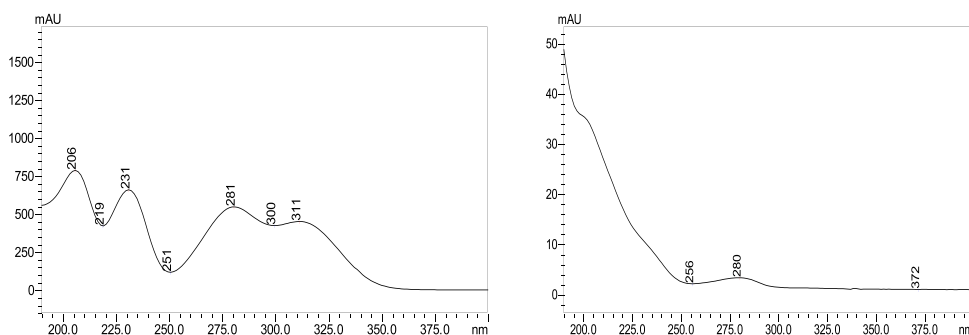


图 7 光谱图(左:原儿茶醛,右:峰 2)

《赤芍(芍药)配方颗粒》标准中峰 2 判定为原儿茶醛的原因分析:在标准色谱条件下,采用某液相色谱系统进行分析,峰 2 与原儿茶醛的保留时间一致。本实验对比过相同液相色谱条件下,同一套液相色谱仪不同延迟体积的情况下,峰 2 和原儿茶醛保留时间的差异不同,在特定延迟体积条件下,峰 2 与原儿茶醛的保留时间一致。故在进行色谱峰判识时,考虑保留时间的同时,可结合 PDA 光谱数据及其他分析手段。

3.4.2 溶剂效应

《赤芍(芍药)配方颗粒》标准中对照药材和供试品均采用稀乙醇作为进样溶剂,对照品采用纯甲醇作为进样溶剂,而流动相的起始有机相比例为 5%,在进样量为 10 μ L 的情况下会容易造成色谱峰前沿甚至分叉,即产生溶剂效应。岛津 LabSolutions 软件自带多种样品预处理功能,如本实验中采用同时注入(Co-injection)功能,自动进样器可自动吸取一定量的溶剂与样品进行混合进样,该功能可在不影响灵敏度的情况下解决溶剂效应问题,获得良好的色谱峰形。

3.4.3 特征图谱分析结果快速评价

中药配方颗粒特征图谱分析通常采用色谱峰保留时间、峰面积比值等进行结果评价。赤芍(芍药)配方颗粒标准中规定了各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的评价指标。

供试品色谱中应呈现 8 个特征峰,并应与对照药材参照物色谱中的 8 个特征峰的保留时间相对应,其中,4 个峰应与相应对照品参照物峰的保留时间相对应,与芍药苷参照物峰相对应的峰为 S 峰,计算其余各特征峰与 S 峰的相对保留时间,其相对保留时间应在规定值的 $\pm 8\%$ 范围之内。规定值为:0.64(峰 3)、1.36(峰 6)、1.46(峰 7)、1.67(峰 8);峰 7、峰 8 与 S 峰的峰面积比值均不应低于 0.020。

岛津 LabSolutions CS 网络化软件 Multi-Data Report 功能可根据用户需求灵活编辑各种数据报告模板,并符合数据完整性法规要求。如对于特征图谱的结果评价,Multi-Data Report 可自动提取待测样品色谱图中各特征峰的保留时间、峰面积,并自动计算相对保留时间和相对峰面积结果,同时根据质量标准要求进行结果的自动判断(如符合规定、不符合规定),并在样品批处理分析结束后自动出具特征图谱结果评价报告,无需将分析结果复制至 Excel 等工具进行再次计算,简化分析流程。

|  LabSolutions特征图谱结果评价报告 | | | | | | | |
|---|---------|---------|-----------|----------|-----------------------------|-------|------|
| 样品信息 | | | | | | | |
| 项目名称: | 中药配方颗粒 | | | 分析者: | System Administrator | | |
| 文件名称: | 供试品.lcd | | | 分析日期/时间: | 2020/10/23 22:48:02(+08:00) | | |
| 供试品特征图谱分析结果: | | | | | | | |
| 峰号 | 保留时间 | 峰面积 | 相对保留时间规定值 | 相对峰面积规定值 | 相对保留时间 | 相对峰面积 | 结论 |
| 1 | 8.363 | 3455254 | — | — | 0.251 | 0.893 | — |
| 2 | 21.040 | 33941 | — | — | 0.632 | 0.009 | — |
| 3 | 22.137 | 58153 | 0.64±8% | — | 0.665 | 0.015 | 符合规定 |
| 4 | 23.986 | 570851 | — | — | 0.721 | 0.148 | — |
| 5(S) | 33.279 | 3868848 | — | — | 1.000 | 1.000 | — |
| 6 | 44.088 | 2409551 | 1.36±8% | — | 1.325 | 0.623 | 符合规定 |
| 7 | 48.221 | 131278 | 1.46±8% | ≥0.020 | 1.449 | 0.034 | 符合规定 |
| 8 | 52.261 | 163276 | 1.67±8% | ≥0.020 | 1.570 | 0.042 | 符合规定 |

■ 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，参考 2019 年发布的《赤芍（芍药）配方颗粒》中的色谱条件，对赤芍配方颗粒特征图谱进行了分析。实验结果显示在液相色谱系统符合赤芍配方颗粒特征图谱分析各项要求。同时，本实验利用 LabSolutions CS 网络化软件 Multi-Data Report 功能，对指定特征峰的相对保留时间和相对峰面积进行自动计算并快速出具特征图谱结果评价报告，大大简化了分析流程。针对实验中出现的溶剂效应问题，采用 LabSolutions 软件自带的同时注入（Co-injection）功能，在不影响灵敏度的情况下轻松获得良好色谱峰形。此外，本文通过实验发现对照药材参照物中的峰 2 可能非标识的原儿茶醛，并对此结果进行了原因分析和讨论。

岛津应用云

