基于高效液相色谱特征图谱分析牡丹皮配方颗粒过程控制的质量

陈培胜[1],张 侠[1],孙婷婷[1],孟繁民[1],李 振[1],童佳兵[2],李泽庚[3]

(1.安徽济人药业有限公司,安徽 亳州 236800;2.安徽中医药大学第一附属医院,安徽 合肥 230031;3.安徽中医药大学,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 建立牡丹皮配方颗粒中间产品及成品的高效液相色谱特征图谱,分析生产过程控制的质量。**方法** 采用高效液相色谱法,色谱柱为Agilent HC-C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱,检测波长254 nm,体积流量为1.0 mL/min,柱温30 ℃。以特征图谱为对照,对药材-饮片-浸膏粉及颗粒进行相关性评价。**结果** 牡丹皮10批药材、饮片、浸膏粉和颗粒特征图谱均呈现12个共有特征峰,有良好的相关性。**结论** 建立的牡丹皮药材-饮片-浸膏粉及颗粒的高效液相色谱特征图谱,为牡丹皮配方颗粒的工艺研究和过程控制提供参考。

[关键词]牡丹皮;配方颗粒;特征图谱;过程控制;量值传递

[中图分类号]R927.11 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2019.05.020

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.的干燥根皮[1],主产于安徽、四川、河南、山东等省。其中,产于安徽铜陵、南陵者,习称“凤丹皮”,为正品牡丹皮药材来源,在全国牡丹皮中,其产量最大、品质最佳,畅销全国各地[2]。文献报道,以丹皮酚含量为指标,安徽南陵、亳州和铜陵产区的牡丹皮品质最佳[3]。牡丹皮配方颗粒是以牡丹皮药材为原料,经加工炮制、提取、浓缩、干燥、制粒而成,具有剂量准确、卫生、安全、服用方便、易于携带等特点[4]。高效液相色谱(high performance liquid chromatograph,HPLC)特征图谱技术作为一种分析手段,近年来应用越来越广泛,可实现对中成药、中药材中大量化学成分信息的提取及量化[5],适用于控制中药配方颗粒在生产过程中各环节中间体及成品的质量[6]。本研究通过建立牡丹皮药材-饮片-浸膏粉及颗粒的HPLC特征图谱,分析中间产品及成品主要物质群的量值传递,为牡丹皮配方颗粒工艺研究、过程控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent Technologies 1260高效液相色谱仪(G1329B自动进样系统,DT-230C柱温箱,G1311B四元泵,VWD检测器):美国安捷伦公司;BT25S型电子天平:德国赛特利斯;HH型数显恒温水浴锅:常州国宇仪器制造有限公司;JK-300DB型数控超声波清洗器:合肥金尼克机械制造有限公司。

1.2 试药 芍药苷(批号110736-201640,纯度95.2%):中国食品药品检定研究院;丹皮酚(批号110708-201407,纯度99.9%):中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯:河北四友卓越科技有限公司;水为纯净水;其余试剂均为分析纯。牡丹皮药材采集或购买,产地为安徽省铜陵市、南陵县牡丹皮种植基地,经安徽中医药大学金传山教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.的干燥根皮。

牡丹皮饮片、浸膏粉、颗粒由安徽济人药业有限公司中药配方颗粒工程技术研究中心制备,来源及编号见表1。

表1 样品来源及编号

药材来源	对应药材编号	对应饮片编号	对应浸膏粉编号	对应配方颗粒编号
铜陵市钟鸣镇钱村	M1-1	M2-1	M3-1	M4-1
铜陵市钟鸣镇钱村	M1-2	M2-2	M3-2	M4-2
铜陵市钟鸣镇钱村	M1-3	M2-3	M3-3	M4-3
铜陵市钟鸣镇钱村	M1-4	M2-4	M3-4	M4-4
铜陵市钟鸣镇钱村	M1-5	M2-5	M3-5	M4-5
芜湖南陵河湾镇牙山下岩村	M1-6	M2-6	M3-6	M4-6
芜湖南陵河湾镇牙山下岩村	M1-7	M2-7	M3-7	M4-7
芜湖南陵河湾镇牙山下岩村	M1-8	M2-8	M3-8	M4-8
芜湖南陵河湾镇牙山下岩村	M1-9	M2-9	M3-9	M4-9
芜湖南陵河湾镇牙山下岩村	M1-10	M2-10	M3-10	M4-10

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent HC-C_{18}色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(45∶55);检测波长274 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温25 ℃;进样量20 μL;理论板数按丹皮酚峰计算应不低于5 000。

基金项目:安徽省科技重大专项(17030801009)

作者简介:陈培胜(1963-),男,研究员

2.2 对照品溶液的制备 取丹皮酚对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1 mL含20 μg的溶液，冷藏备用。

2.3 供试品溶液的制备 取样品药材、饮片粗粉各0.5 g，浸膏粉、颗粒粉末各1.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇50 mL，密塞，称定质量，超声处理(功率300 W，频率50 kHz)30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取续滤液1 mL，置10 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4 样品测定 分别取对照品溶液、供试品溶液20 μL，按“2.1”项下的色谱条件下依次进样检测。实验结果见表2。

表2 各样品中丹皮酚含量

样品	n	丹皮酚/%
药材(M1)	10	2.64±0.752
饮片(M2)	10	2.14±0.433*
浸膏粉(M3)	10	0.98±0.053*#
颗粒(M4)	10	0.94±0.045*#

注：与药材(M1)比较，* $P<0.05$；与饮片(M2)比较，# $P<0.05$

对药材、饮片、浸膏粉、颗粒中丹皮酚含量进行单因素方差分析，结果显示，饮片中丹皮酚的含量低于药材中丹皮酚的含量($P<0.05$)，说明药材在炮制过程中，丹皮酚有所损失；浸膏粉中丹皮酚的含量明显低于饮片中丹皮酚的含量($P<0.05$)，说明提取、浓缩、干燥工序出现丹皮酚损失，主要原因是采用水蒸气蒸馏法收集牡丹皮酚，丹皮酚有部分挥发损失和转移率不高；颗粒中丹皮酚的含量与浸膏粉中丹皮酚的含量比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，说明在浸膏粉制粒过程中丹皮酚损失不大，主要原因是干法制粒后无需再烘干，减少了挥发性和热敏性成分的损失，这也说明了干法制粒工艺适合牡丹皮配方颗粒的生产。

2.5 特征图谱的建立

2.5.1 色谱条件 Agilent HC-C_{18}色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；以乙腈为流动相A，以0.1%甲酸溶液为流动相B，梯度洗脱程序：0～20 min，10%～14% A；20～45 min，14%～35% A；45～80 min，35%～90% A。体积流量1.0 mL/min；柱温30 ℃；检测波长254 nm；进样量10 μL；分析时间80 min。

2.5.2 对照品溶液的制备 取芍药苷、丹皮酚各2 mg，精密称定，置5 mL容量瓶中，分别加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，冷藏备用。

2.5.3 供试品溶液的制备 取样品药材、饮片、浸膏粉及颗粒粉末各1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，回流提取30 min，放冷，滤过，取续滤液，即得。

2.5.4 测定 分别取对照品溶液、供试品溶液10 μL，按“2.5.1”项下的色谱条件依次进样检测，记录色谱图，见图1—图6。

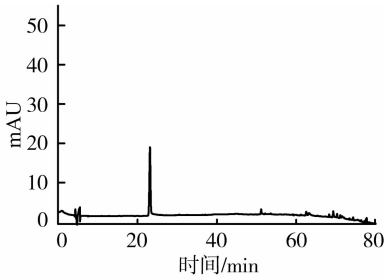


图1 芍药苷HPLC色谱图

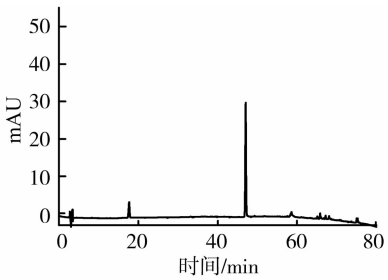
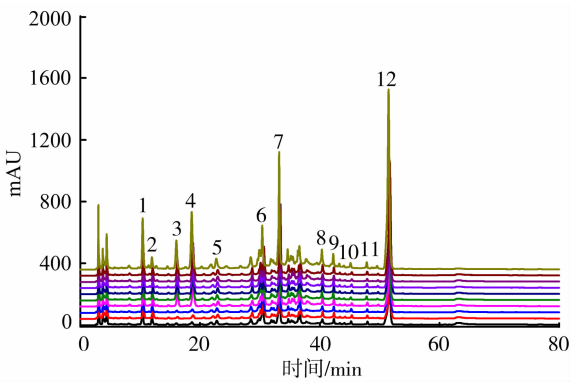


图2 丹皮酚HPLC色谱图



注：5.芍药苷；10.丹皮酚(下图同)

图3 10批牡丹皮药材HPLC特征图谱

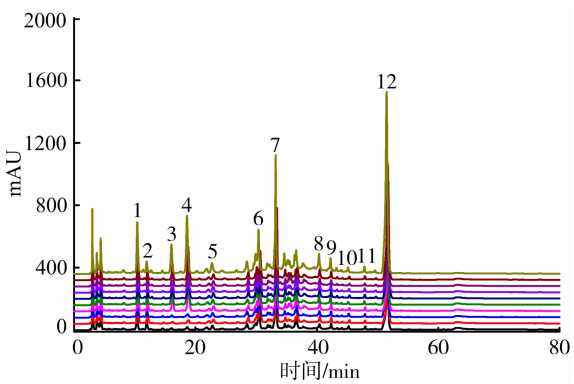


图4 10批牡丹皮饮片HPLC特征图谱

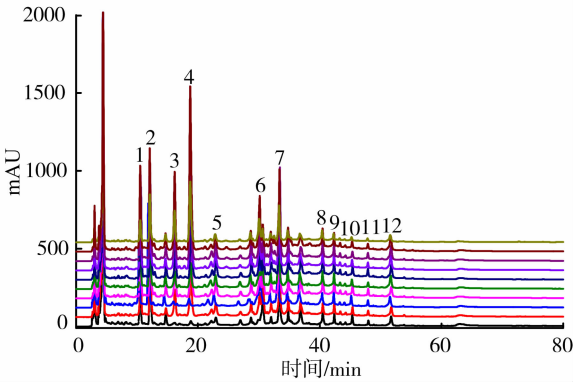


图5 10批牡丹皮浸膏粉HPLC特征图谱

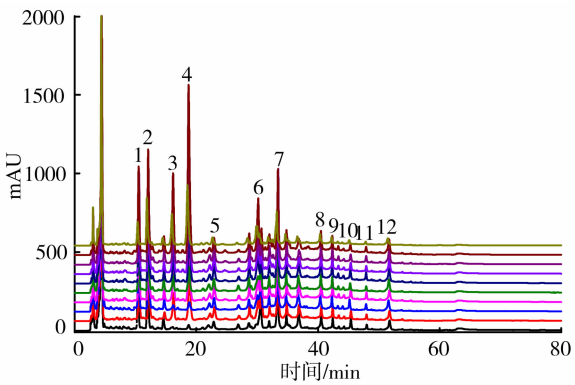


图6 10批牡丹皮颗粒HPLC特征图谱

2.6 方法学考察

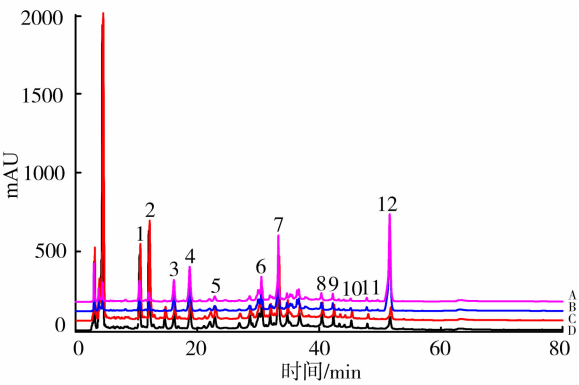
2.6.1 精密度试验 取同一份供试品溶液，按“2.5.1”项下方法连续进样6次，以10号峰(丹皮酚)为参照峰，测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%，表明精密度良好。

2.6.2 重复性试验 取同一批样品6份，按“2.5.3”项下操作制备供试品溶液，按“2.5.1”项下方法分别进样，以10号峰(丹皮酚)为参照峰，测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD均小于3.0%，表明重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液，按“2.5.1”项下方法分别在0、3、6、9、24、48 h进样测定。以10号峰(丹皮酚)为参照峰，其各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD均小于3.0%，表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.7 共有峰的标定及特征指纹图谱的建立 将各批颗粒样品的HPLC特征图谱数据依次导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件，同法采集药材、饮片和浸膏粉的特征图谱，进行匹配，确定了12个共有峰，其中由对照品指认2个，分别为5号峰(芍药苷)和10号峰(丹皮酚)，建立了共有模式见图7，并进行了相似度计算，见表3。

对牡丹皮药材、饮片、浸膏粉、颗粒的特征图谱相似度进行单因素方差分析，结果显示，4种样品特征图谱的相似度比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，说明牡丹皮药材、饮片、浸膏粉、颗粒的特征图谱相似度较高，其主要物质群是一致的。



注：A.药材；B.饮片；C.浸膏粉；D.颗粒；5.芍药苷；10.丹皮酚

图7 牡丹皮药材、饮片、浸膏粉和颗粒HPLC特征图谱

表3 各图谱的相似度计算结果

样品	n	相似度
药材(M1)	10	0.986±0.111
饮片(M2)	10	0.986±0.111
浸膏粉(M3)	10	0.978±0.134
颗粒(M4)	10	0.982±0.116

2.8 牡丹皮配方颗粒生产过程控制的质量分析 牡丹皮药材、饮片、浸膏粉及颗粒特征图谱确定了12个共有峰，各批次特征图谱相似度分别在0.96～0.99、0.96～0.99、0.95～0.99、0.95～0.99，均在0.95以上，说明铜陵钟鸣镇和南陵县河湾镇的10个牡丹皮药材种植基地所产牡丹皮主要物质群差异较小[7]。

牡丹皮药材中的主要色谱峰在饮片、浸膏粉及颗粒的色谱图中均得到体现，4种样品特征图谱相似度较高，药材中主要物质群在饮片、浸膏粉、颗粒中得到较好的传递，说明牡丹皮配方颗粒的生产工艺合理，生产过程质量控制良好[8]。

3 讨论

对不同提取溶剂考察结果表明，选择甲醇为牡丹皮的提取溶剂为优；对超声、回流2种不同提取方法考察结果表明，回流提取为优；对料液比、提取时间的考察结果表明，最佳料液比为25 mL/g，最佳提取时间为加热回流提取30 min。

考察了乙腈-0.1%甲酸二元梯度洗脱[9]，并对上述洗脱条件进行调整，结果表明以“2.5.1”项下方法梯度洗脱，各峰的分离效果好，12个主要色谱峰峰形较好。建立的牡丹皮药材、饮片、浸膏粉、颗粒的HPLC特征图谱，能够反映生产过程中物质群传递信息，主要色谱峰分离较好。下一步将结合有效

成分或指标成分转移率、出膏率及浸出物测定等，开展中药配方颗粒中间产品及成品主要药效物质群的量值传递关系分析，以期评价中药配方颗粒生产工艺和质量控制的合理性，及药材、饮片、浸膏粉、配方颗粒的质量一致性。

参考文献：

[1] 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，2015.
[2] 张朋. 牡丹皮产地与采收加工的沿革与变迁[J]. 甘肃中医，2008，21(9)：48.
[3] 彭福. 黄连、牡丹皮道地药材的品质研究[D]. 成都：成都中医药大学，2011：73-74.
[4] 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.
[5] 姚玲文，刘燕，郑笑为，等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用[J]. 中国新药杂志，2018，27(8)：934-939.
[6] 张慧，陈燕，汪佳楠，等. 指纹图谱技术在中药配方颗粒质量评价及过程控制中的应用[J]. 中国中药杂志，2018，43(19)：3822-3827.
[7] 祝明，陈碧莲，石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典2015年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学，2016，33(5)：611-614.
[8] 方雯雯，成守玲，陈培胜，等. 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[J]. 中草药，2016，47(18)：3211-3214.
[9] 许舜军，李鹏，杨柳，等. 牡丹皮高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志，2006，31(20)：1677-1678.

(收稿日期：2019-04-04；编辑：曹健)

Quality of Process Control of Cortex Moutan Formulated Granule Based on Specific Chromatogram of High-performance Liquid Chromatography

CHEN Pei-sheng[1], *ZHANG Xia*[1], *SUN Ting-ting*[1], *MENG Fan-min*[1], *LI Zhen*[1], *TONG Jia-bing*[2], *LI Ze-geng*[3]

(1. *Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Anhui Bozhou* 236800, *China*; 2. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230031, *China*; 3. *Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230012, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) specific chromatogram of semifinished and finished products of Cortex Moutan formulated Granule, and to investigate the quality of production process control. **Methods** HPLC was performed on an Agilent HC-C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution for gradient elution, at a detection wavelength of 254 nm, a flow rate of 1.0 mL/min, and a column temperature of 30 ℃. With the specific chromatogram as a control, the correlation between medicinal material, decoction pieces, extract powder, and granules was evaluated. **Results** A total of 12 common characteristic peaks were identified for all the 10 batches of medicinal material, decoction pieces, extract powder, and granules of Cortex Moutan, suggesting a good correlation between them. **Conclusion** The HPLC specific chromatogram is established for medicinal material, decoction pieces, extract powder, and granules of Cortex Moutan, which provides a reference for the technical study and process control of Cortex Moutan formulated Granule.

[**Key words**] Cortex Moutan; Formulated Granule; Specific chromatogram; Process control; Quantity value dissemination