

Study on Quality of Radix Paeoniae Alba of Different Origin and Different Growth Stages*

Yuefeng Li, Xingke Yan

TCM College of Gansu, Lanzhou
Email: lyfyxk@126.com

Received: Apr. 17th, 2012; revised: Apr. 25th, 2012; accepted: May 4th, 2012

Abstract: To compare the quality on different Radix Paeoniae Alba using HPLC methods. Column: Hypersil C18 column (4.6 × 200 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile-H₂O (acidified to 0.05% with phosphoric acid) (14:86); UV test: 230 nm; flow-rate: 1.0 ml/min; column temperature: 25°C. There was the highest content of paeoniflorin in Radix Paeoniae Alba of two-year-growing time, harvest time in October and short storage time from Bozhou. The assay methods are simple, rapid and with good reproducibility.

Keywords: Radix Paeoniae Alba; Paeoniflorin; TLC; HPLC; Quality

不同产地和不同生长期白芍质量研究*

李越峰, 严兴科

甘肃中医学院, 兰州
Email: lyfyxk@126.com

收稿日期: 2012年4月17日; 修回日期: 2012年4月25日; 录用日期: 2012年5月4日

摘要: 采用 HPLC 法测定不同白芍药材中芍药苷含量, 确定哪种白芍含芍药苷最高。方法: 采用色谱柱: Hypersil C18 柱(4.6 × 200 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈/0.05%磷酸水(14:86); 检测: UV 230 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25°C。结果表明: 2年生、10月份采收贮存期短的亳白芍芍药苷含量最高。该方法简便, 准确可靠, 重复性好。

关键词: 白芍; 芍药苷; 薄层色谱; 高效液相色谱; 质量

1. 引言

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根^[1]。味苦、酸、甘, 性微寒。归肝、脾经。具有养血调经, 柔肝止痛, 敛阴止汗之功^[2]。经药学研究发现, 白芍主要含有芍药苷(Paeoniflorin)、芍药内酯苷(Albiflorin)、氧化芍药苷(Oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷(Benzoylpaeoniflorin)、芍药花苷、牡丹酚成分, 此外尚含挥发油、脂肪油、树脂、鞣质、糖、淀粉、粘液质、β-谷甾醇等^[3]。现代药理研究结果标明, 芍药

苷具有镇静、镇痛作用, 能延长环己巴比妥钠对小鼠的睡眠时间, 对五甲烯四氮唑所致的惊厥有拮抗作用; 芍药苷能扩张冠状动脉, 增加冠脉血流量, 对抗急性心肌缺血, 抑制血小板聚集及降低血压等作用; 此外芍药苷还具有抗炎、抗溃疡、抗过敏、解热、解痉等作用^[4]。药代动力学研究标明, 犬、兔、大鼠灌胃后生物利用度均低, 原因主要是灌胃后, 药物大部分在胃肠道内发生了结构转化。有关动物及人肠道菌群介导的芍药苷代谢转化, 已有许多报告, 芍药苷口服给药后在肠道细菌酶的作用下先后经水解、开裂、闭环反应生成新的代谢物, 其中芍药代谢素 I (Paeonimetalbolin-I, PM-I)最为重要, 且生物活性大大提高。肠

*资助信息: 国家自然科学基金项目资助(81073077); 2010年度甘肃省自然科学基金项目资助(1010RJZA212); 教育部科学技术研究重点项目(212186)。

道菌群对芍药苷的代谢反应中首先是肠道菌群产生的 β -葡萄糖苷酶将芍药苷水解脱去葡萄糖,但芍药苷却不能为大鼠肝脏 β -葡萄糖苷酶水解,说明肠道菌群在芍药苷体内代谢中起着重要作用^[5-8]。具有抗炎,抗病毒,解痉镇痛,护肝等多种药理活性。因此,白芍的质量控制得到了许多专家和学者的关注,从而建立了多种质量控制方法,这些方法的建立为白芍的质量控制和评价发挥了重要作用,同时也反映了中药质量控制的现状。白芍是一味常用中药,因此对其质量控制非常重要。白芍中主要有效成分芍药苷主要溶解于乙醇等有机溶剂,定性方面,2010版中国药典收载了对照品薄层鉴别等方法,文献中以指纹图谱为代表的定性方法具有诸多优越性,关键是要进一步成熟,并选择其中一种方法进行法定化,以促进质量标准的统一和提高。定量方面,2010版中国药典收载了芍药苷的高效液相含量测定方法,白芍药材及各种制剂均以芍药苷含量为质量控制标准。

2. 仪器材料与方法

2.1. 仪器与试剂

CAMAG 点样器 Linomat 5, CAMAG 双槽展开箱, CAMAG 薄层色谱摄影仪(REPROSTAR 3); 超声波清洗器(上海超声波仪器厂)。高效液相色谱仪(四元泵、柱温箱、MVD 检测器、Agilent1100 色谱工作站)、电子分析天平 AE240(十万分之一,瑞士, METTLER-TOLEDO Co.); 硅胶 G(60 型)预制板 10 × 20 cm(青岛海洋化工集团公司出品国家药典会监制), 乙腈为色谱纯(Merk Co.), 水为双蒸水, 其它试剂均为分析纯, 购自江西南昌市东方仪器试剂公司。水为双蒸水(自制)。

2.2. 材料

对照品与对照药材: 芍药苷(Paeoniflorin, 编号: 0900-200102, 含量测定用); 芍药对照药材(编号: 1243-0301), 均购于中国药品生物制品检定所, 白芍药材经甘肃中医学院药用植物学科组鉴定符合 2005 年版《中国药典》白芍项下标准。

2.3. 方法

2.3.1. 薄层鉴别

1) 对照品溶液的制备: 称取芍药苷对照品适量,

加乙醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2) 供试品溶液的制备: 取本品粉末 0.5 g, 加乙醇 10 ml, 超声提取 15 分钟, 放冷, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。

3) 对照药材溶液制备: 称取白芍对照药材 0.5 g, 同“供试品溶液的制备”方法制备, 即得。

4) 展开剂: 氯仿/乙酸乙酯/甲醇/甲酸(40:5:10:0.2)。

5) 显色剂: 5%香草醛硫酸溶液。

6) 薄层板: 硅胶 G 板。

7) 方法: 分别吸取供试品溶液、对照药材溶液和对照品溶液 10 μ l, 点样, 展开, 取出, 晾干, 喷 5% 香草醛硫酸溶液, 加热板 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 日光下检视。

2.3.2. HPLC 测定白芍中芍药苷的含量

1) 对照品溶液制备: 精密称取白芍对照品适量, 加 50%乙醇制成每 1 ml 含 60 g 的溶液, 摇匀, 即得。

2) 供试品溶液的制备: 精密称取本品干燥的粉末 0.5 g, 置 50 ml 容量瓶中, 精密加入 50%乙醇 35 ml, 超声提取 30 分钟, 冷却, 加 50%乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 再过 0.45 μ m 滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

3) 色谱条件: 色谱柱: Hypersil C18 柱(4.6 × 200 mm, 5 μ m)(大连 Elite 公司); 流动相: 乙腈/0.05%磷酸水(14:86); 检测: UV 230 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。理论塔板数以芍药苷峰计算不得低于 2000。在上述色谱条件下, 取对照品溶液、供试品溶液各进样 10 μ l 进行 HPLC 测定。由图中可见供试品中芍药苷与芍药苷对照品峰保留时间一致, 并且与样品中其它组分达到了很好的分离。

4) 线性关系考察: 精密称取芍药苷对照品 0.02480 g, 置 50 ml 容量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 即得到 2.48 mg/ml 的芍药苷对照品溶液, 从中分别精密吸取 0.25 ml、0.5 ml、2.5 ml、5.0 ml、10.0 ml、和 15.0 ml 的对照品溶液, 分别置 6 个 25 ml 的容量瓶中, 用稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液各 10 μ l, 绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 1809.3984x + 2.2135$, $r = 0.99999$ 。

5) 提取方法的确定: 本实验对提取溶剂、提取溶剂的浓度、提取时间、提取方法等进行综合考察, 最后确定供试品溶液的制备方法为: 用 50%乙醇超声提

取 30 分钟即可。

6) 精密度试验: 精密吸取同一份供试品溶液 10 μ l, 重复进样 6 次, 测定芍药苷峰面积积分值, RSD 为 0.80%。

7) 重现性试验: 按“供试品溶液的制备”方法, 对同一批样品分别制备 6 份供试品溶液, 各吸取 10 μ l 进样测定, 测得芍药苷含量 RSD 为 0.72%。

8) 稳定性试验: 取同一份供试品溶液在上述色。

9) 回收率试验: 采用加样回收测定法。采用加样回收测定法。分别精密称取已知含量(芍药苷 1.778%) 的样品约 0.25 g, 共 6 份, 分别加入一定量的对照品(浓度为 0.88 mg/ml, 精密加入 5 ml), 按“供试品溶液的制备”方法制备供试品溶液, 进行 HPLC 测定, 测得芍药苷的平均回收率为 99.92%, RSD 为 1.36%; 结果见表 1。结果表明, 本法回收率高。

Table 1. Recovery test results
表 1. 回收率试验结果

编号	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	实际测得量(mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	4.450	4.40	8.930	101.82		
2	4.471	4.40	8.832	99.11		
3	4.520	4.40	8.911	99.80	99.92	1.36
4	4.561	4.40	8.890	98.39		
5	4.313	4.40	8.770	101.30		
6	4.362	4.40	8.723	99.11		

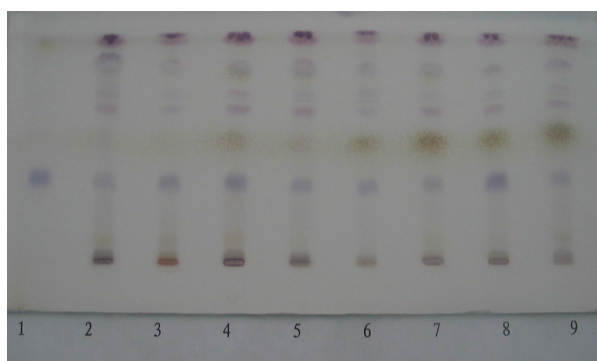


Figure 1. TLC of Radix Paeoniae Alba: Legend: 1. Paeoniflorin; 2. Hangzhou white peony; 3. Peony root of the original ingredients (camphor production); 4. Gansu white peony root (Lanzhou); 5. Wuhan white peony; 6. Peony root reference drug; 7. Bozhou white peony 5 years old; 8. Bozhou white peony 4 years old; 9. White peony gun baked goods (Anhui Province)

图 1. 白芍 TLC 图: 图注: 1. 芍药苷标准品; 2. 杭白芍; 3. 白芍原药材(樟树产); 4. 甘肃白芍(甘肃兰州); 5. 武汉白芍; 6. 白芍对照药材; 7. 亳州白芍 5 年生; 8. 亳州白芍 4 年生; 9. 白芍炮炙品(安徽产)

3. 结果

3.1. TLC 结果显示

供试品色谱图与对照药材、对照品色谱图相同位置上显相同颜色的斑点, 各供试品斑点分离清晰, 层析效果好, 可以达到鉴别的目的。TCL 图谱见图 1。

3.2. 白芍及其对照品色谱图, 见图 2、图 3

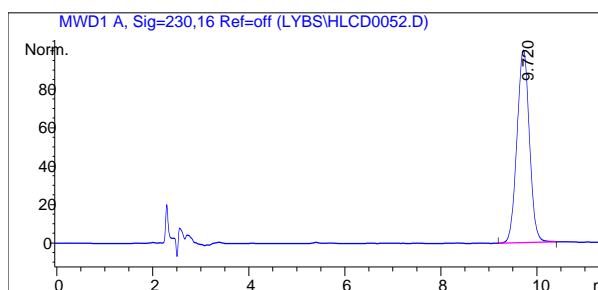


Figure 2. Content of Paeoniflorin
图 2. 芍药苷对照品含量图

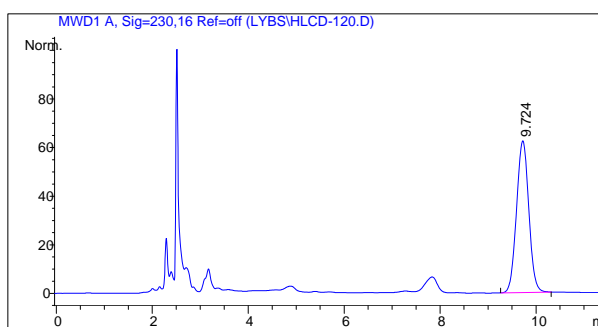


Figure 3. Content of Paeoniflorin in Radix Paeoniae Alba
图 3. 白芍样品中芍药苷含量图

3.3. 样品含量测定

精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ l 进样测定, 结果见表 2。

4. 讨论

4.1. 薄层色谱定性鉴别

本实验所采用的上述以芍药苷为对照品对白芍药材进行薄层色谱定性鉴别的方法简便、可靠、重现性好, 对原药材具有较强的专属性鉴别作用。但在白芍中芍药苷含量测定中, 采用 HPLC 法进行测定, 在定量方面, HPLC 法更优于薄层色谱定性鉴别的方法, HPLC 法进行定量测定更准确, 更可靠, 更稳定。

Table 2. Content determination results of Paeoniflorin of 16 batch of samples (n = 2)

表 2. 16 批样品的芍药苷含量测定结果(n = 2)

编号	样品名称	芍药苷含量(%)	样品来源
1	亳州白芍 1 年生	1.895	2009/10 安徽亳州
2	亳州白芍 2 年生	2.184	2009/10 安徽亳州
3	亳州白芍 3 年生	1.952	2009/10 安徽亳州
4	亳州白芍 4 年生	1.901	2009/10 安徽亳州
5	亳州白芍 5 年生	1.884	2010/10 安徽亳州
6	山东白芍	1.611	2010/7 山东青岛
7	陕西白芍	1.427	2010/10 陕西宝鸡
8	白芍饮片-1(贮存 1 年)	1.818	2009/10 浙江杭州 中药饮片厂
9	白芍饮片-3(贮存 2 年)	1.745	2009/10 江西南昌
10	白芍饮片-4(贮存 3 年)	1.730	2009/10 四川泸州
11	四川白芍-1	1.801	2010/10 四川遂宁
12	四川白芍-2	1.716	2010/9 四川遂宁
13	四川白芍-3	1.388	2010/8 四川遂宁
14	武汉白芍	1.224	2010/9 武汉
15	杭白芍	1.830	2010/10 杭州
16	白芍炮炙品	1.195	2010/9 杭州

4.2. 不同产地芍药苷含量差异

从芍药苷含量测定结果看,不同产地的白芍芍药苷含量各不相同。其主要成分芍药苷含量以亳州产白芍最高;本实验所用亳州白芍为带皮的根,与文献[9]报道的未去皮白芍药材中芍药苷含量最高相符。

4.3. 不同采收期芍药苷含量差异

从芍药苷含量测定结果看,以四川白芍为例,采收期 8 月份、9 月份、10 月份芍药苷含量不同,采收期在 10 月份芍药苷含量最高,与文献[10]报道的采收期在 10 月份芍药苷含量最高相符。

4.4. 贮存期对芍药苷含量的影响

从白芍饮片 1(贮存 1 年)、白芍饮片 3(贮存 2 年)、白芍饮片 4(贮存 3 年)芍药苷含量测定结果看,随贮存期的延长,白芍中芍药苷的含量呈下降趋势,所以白芍的贮存期不宜太长。

4.5. 不同生长年限对芍药苷含量的影响

不同生长期亳白芍中芍药苷的含量不同,以 2 年生者含量最高,随着生长期的延长,芍药苷的含量呈下降趋势。据有关文献报道可能因为生长期长,淀粉含量增加,芍药苷在体内转化分解。这提示合理利用亳白芍资源,可缩短生长期,增加芍药苷含量,即经济又有效。

总之,根据上述测定结果,可见本法操作简单,重现性好,可作为白芍质量控制的有效方法。

参考文献 (References)

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 2005 版一部[M]. 国家药典委员会, 2005: 68-69.
- [2] 雷载权. 中药学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 302.
- [3] 张晓燕, 李锐. 白芍的化学研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1): 70-73.
- [4] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 332.
- [5] 韩国柱. 中草药药代动力学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 358.
- [6] M. Hattori, et al. Metabolism of Paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1985, 33(9): 3838-3846.
- [7] 陈光亮等. 芍药苷在兔和大鼠体内药理学研究[J]. 中国药理学杂志, 1992, 8(4): 278-280.
- [8] 蒋学华, 刘世瑞, 徐萍. 反相高效液相色谱法测定血浆中芍药苷含量[J]. 中成药, 1993, 15(2): 29-30.
- [9] 施大文, 董欣, 何婉霞. 白芍的品质评价[J]. 中药材, 1988, 11(4): 39-40.
- [10] 陈丙鑫, 杭悦宇, 周义锋等. 收获期芍药根中芍药苷含量动态变化[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(2): 25-28.