

文章编号:1001-6880(2015)6-1047-05

# HPLC 法同时测定不同栽培年限亳芍中芍药苷和芍药内酯苷的含量

陈乃东<sup>1,2,3\*</sup>, 陈 翰<sup>1</sup>, 陈乃富<sup>1,2</sup>, 李 清<sup>1</sup>, 陈 琼<sup>1</sup>, 谢小乐<sup>1</sup><sup>1</sup>皖西学院生物与制药工程学院; <sup>2</sup>皖西中药与天然药物工程技术研究中心, 六安 237012; <sup>3</sup>安徽医科大学, 合肥 230032

**摘要:**为了探讨栽培年限对亳芍中芍药总苷类成分含量的影响,为亳芍规范化栽培、质量评价提供依据,本文建立同时测定亳芍中芍药苷和芍药内酯苷含量的高效液相色谱检测方法,采用 Lanbo Service 4000 高效液相色谱仪、Waters Symmetry C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);以乙腈;0.1% 磷酸溶液梯度洗脱;流速 1.0 mL/min;检测波长 230 nm;柱温 30 ℃。结果表明,芍药苷和芍药内酯苷色谱峰分离度较好,分别在 0.1250 ~ 2.5000 μg 和 0.0225 ~ 0.4500 μg 呈良好的线性关系,相关系数分别为 0.9960 和 0.9994,加样回收率(*n* = 6)分别为 100.56%、101.30%。该方法用于安徽亳州地区人工栽培 1 至 7 年的亳芍中芍药苷及芍药内酯苷的测定,发现不同年栽培年限亳芍中均含有芍药苷和芍药内酯苷,二者的含量存随年份变化表现出一定差异,其中以 3 年株龄亳芍中芍药苷含量最高,以 2 年株龄亳芍中芍药内酯苷含量最多。研究结果对亳芍临床用药有一定参考价值。

**关键词:**亳芍;芍药苷;芍药内酯苷;高效液相色谱法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.020

## Simultaneous Determination of Paeoniflorin and Albiflorin in Different Years-old Bozhou Peony *Paeonia lactiflora* by HPLC

CHEN Nai-dong<sup>1,2,3\*</sup>, CHEN Han<sup>1</sup>, CHEN Nai-fu<sup>1,2</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, CHEN Qiong<sup>1</sup>, XIE Xiao-le<sup>1</sup><sup>1</sup>College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Anhui Lu'an 237012, China;<sup>2</sup>West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine, West Anhui University, Anhui Lu'an 237012, China; <sup>3</sup>Anhui Medical University, Anhui Hefei 230032, China

**Abstract:** In order to explore the accumulation of glucosides in Bozhou Peony *Paeonia lactiflora* with different cultivation ages and to provide references for the standardized cultivation and quality evaluation of Bozhou Peony, a HPLC-DAD method was developed and applied for the simultaneous determination of paeoniflorin and albiflorin in *P. lactiflora*. A Lanbo Service 4000 system was used with Waters Symmetry C<sub>18</sub> column (4.6mm × 150mm, 5μm) at 30 ℃ with a gradient elution of acetonitrile and 0.1% phosphonic acid. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 230 nm. The calibration curves of paeoniflorin and albiflorin were linear over the ranges of 0.1250-2.5000 μg and 0.0225-0.4500 μg. The average recoveries (*n* = 6) were 100.56% and 101.30%, respectively. The developed method was successfully applied for the analysis of Bozhou Peony *P. lactiflora* of different plant ages from its Geo-authentic habitats-Bozhou region, Anhui province, China. The results also indicated that remarkable variation of the contents of paeoniflorin and albiflorin were existed in Bozhou Peony with different plant ages. In our experimental conditions, the highest contents of paeoniflorin and albiflorin were the Bozhou Peony cultivated for 3 years and 2 years, respectively. Our research results provided some references for the clinical medicamentation of Bozhou Peony.

**Key words:** Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*; paeoniflorin; albiflorin; HPLC

收稿日期:2014-07-28 接受日期:2014-12-02

基金项目:国家自然科学基金(81274021);中国博士后基金面上项目(2014M551791);安徽省人事厅博士后研究项目,安徽高校省级科学的研究重点项目(KJ2012A277);六安市定向委托皖西学院市级研究重点项目(2011LWA001);皖西学院本科生优秀毕业设计(论文)培育计划立项项目(pyjh2014054);皖西学院学生研究性学习项目(wxxxy2014119)

\* 通讯作者 E-mail:2004cnd@163.com

亳芍(Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*),即亳白芍,是芍药科植物芍药或其变种毛果芍药栽培品的根<sup>[1]</sup>,为安徽道地药材之一,主产安徽省亳州地区。味苦、酸、甘,性微寒,具养血敛阴柔肝止痛、平抑肝阳等功效<sup>[2]</sup>,以芍药总苷为主要活性成分,其中芍药苷和芍药内酯苷约占总苷 70% 以上<sup>[3]</sup>。现代药

理研究表明,芍药苷具有增加冠脉流量,扩张冠状动脉,对抗急性心肌缺血,抑制血小板凝聚及降低血压等作用<sup>[4]</sup>,芍药内酯苷具有镇痛、镇静、抗惊厥作用<sup>[5-7]</sup>。芍药苷和芍药内酯苷的含量对亳芍临床用药具有重要影响。

中药的活性成分积累与栽培年限密切相关。截止目前,有关白芍中芍药苷和芍药内酯苷的含量研究主要集中在不同提取方法和不同产地的含量比较<sup>[8-10]</sup>,尚未见栽培时间对亳芍主要活性成分芍药苷、芍药内酯苷积累的影响的报道。

本文建立了一种同时测定芍药苷和芍药内酯苷的检测方法,在此基础上,对不同生长年限亳芍中的芍药苷及芍药内酯苷进行含量变化研究,为探讨中药亳芍的最佳药材采收时期、规范化种植、质量评价及临床用药提供依据。

## 1 仪器与材料

分析天平(FA1004型,中国上海精科有限公司),超声清洗器,Lanbo Service 4000高效液相色谱仪(EZchrom Elite软件,UV4000二极管阵列检测器,美国Lanbo公司),循环水式多用真空泵(SHB-3S型,郑州长城科工贸有限公司)。标准对照品芍药苷(含量测定用,含量≥98%,批号:B10091)、芍药内酯苷(含量测定用,含量≥98%,批号:B10102)均购自上海士峰生物科技有限公司。乙腈(色谱纯,上海星可高纯溶剂有限公司),水为市售娃哈哈纯净水,其余试剂均为国产分析纯。

实验材料亳芍 2013 年 8 月于亳芍道地产区安徽省亳州市 6 个不同的亳芍种植基地,品种经皖西中药与天然药物工程技术研究中心陈乃东博士鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 干燥的根。6 个不同栽培基地分别挖取栽培 1~7 年的亳芍,共 42 个样品,洗净,去皮,晾干,备用。

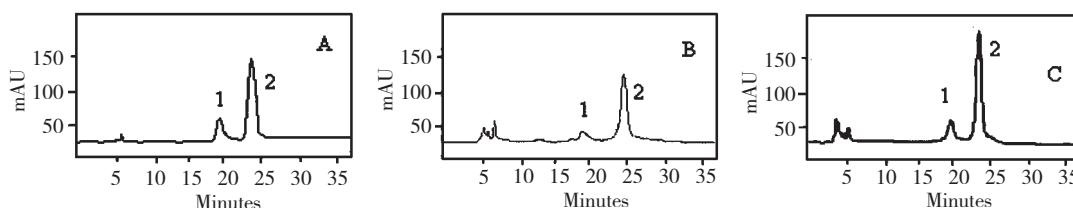


图 1 芍药苷和芍药内酯苷混合对照品溶液(A)、样品溶液(B)及样品溶液与对照品混合溶液(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A), Bozhou Penoy (B) and mixed solution of standards and Bozhou Penoy sample (C)

注:1. 芍药内酯苷;2. 芍药苷

Note: 1. Albiniflorin; 2. Paeoniflorin

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的配制

以 50% 乙醇配制成浓度 125.0 μg/mL、22.5 μg/mL 芍药苷和芍药内酯苷对照品溶液适量,0.45 μm 微孔滤膜过滤、备用。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密称取亳芍粉末 0.5 g, 置 50 mL 容量瓶中, 加 50% 的乙醇 35 mL, 60 °C 超声处理(240 W, 45 kHz)30 min, 冷却, 加 50% 的乙醇定容至刻度, 过滤, 精密量取续滤液 2 mL 以 50% 的乙醇定容到 8 mL, 微孔滤膜过滤, 得供试品溶液。

### 2.3 色谱条件

Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序如下:0~5 min, 5%~10% A; 10~15.0 min, 10~15% A; 15.0~17.0 min, 15~30% A; 17~30.0 min, 30% A; 30.0~35.0 min, 30~100% A; 35~40.0 min, 100% A。流速:1.0 mL/min; 检测波长:230 nm; 柱温为 30 °C。

在上述色谱条件下,对照品和供试品溶液 HPLC 检测结果如图 1 所示。

### 2.4 方法学考察

#### 2.4.1 线性关系考察

分别精密吸取 2.1 项下配制的芍药苷、芍药内酯苷对照品溶液各 1、5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.3 项下色谱条件, 测定芍药苷、芍药内酯苷峰面积, 平行测定三次, 取平均峰面积。以色谱峰面积为纵坐标(Y), 对照品质量进样量(μg)为横坐标(X), 分别得到的芍药苷和芍药内酯苷回归方程: $y = 1.2 \times 10^{10}x - 3.5 \times 10^6, R^2 = 0.9960$ ;  $y = 1.1 \times 10^6x - 3.9 \times 10^5, R^2 = 0.9994$ 。结果表明, 芍药苷和芍药内酯苷在 0.1250~2.5000 μg 和 0.0225~0.4500 μg 范围内, 分别与对应峰面积呈良好的线性关系。

### 2.4.2 稳定性试验

称取亳芍样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液10.0 μL,分别于0、4、8、12、16、20、24、48 h进样。结果表明芍药内酯苷、芍药苷峰面积的RSD分别为0.96%和0.85%,说明样品溶液在48 h内稳定较好。

### 2.4.3 重复性试验

称取同一批次亳芍样品粉末6份,按2.2项方法制备供试品溶液,精密吸取10.0 μL,按2.3色谱条件测定。结果显示芍药内酯苷和芍药苷峰面积的RSD分别为1.83%、1.79%,表明本测定方法重复性良好。

### 2.4.4 精密度试验

精密吸取2.1项项下配制的芍药苷和芍药内酯对照品溶液各10.0 μL,按2.3项述方法,连续进样6次,测得二者峰面积RSD均小于1.5%,说明仪器精密度良好。

### 2.4.5 回收率试验

精密称取0.5 g已知含量的亳芍样品粉末9份,每3份一组,依次精密加入高、中、低3个水平芍药苷对照品5.0、1.0、0.1 mg和药内酯苷2.0、0.5、0.1 mg,按2.2项方法制备供试品溶液,按2.3项方法进行测定,计算回收率。结果芍药内酯苷的平均回收率为101.30%,RSD为2.57%;芍药苷的平均回收率为100.56%,RSD为2.10%。

### 2.5 样品含量测定

精密称取栽培1~7年的亳芍样品粉末各0.5 g,按2.2项方法制备成供试品溶液,精密吸取10.0 μL按2.3项方法进行测定,测得不同栽培年限的亳芍中芍药苷和芍药内酯苷HPLC色谱图(图2),记录芍药苷和芍药内酯苷的峰面积,利用建立的芍药苷和芍药内酯苷标准曲线,计算样品中芍药苷和芍药内酯苷的含量(图3)。

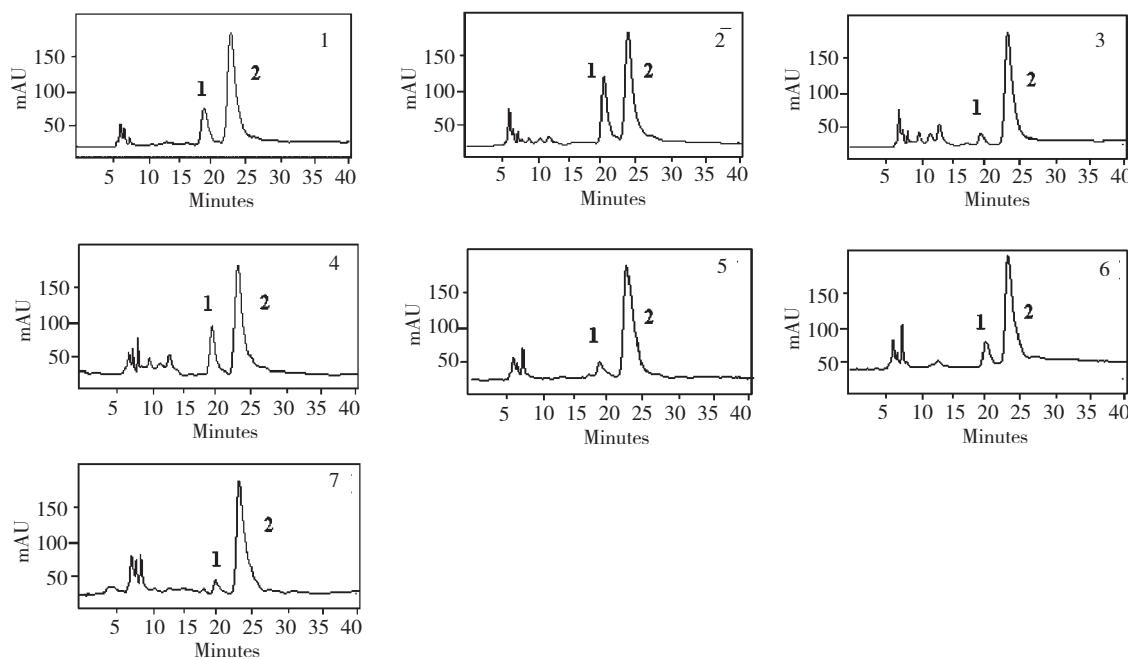


图2 不同株龄的亳芍芍药苷、芍药内酯苷 HPLC 检测结果

Fig. 2 HPLC analysis of paeoniflorin and albiflorin in different years-old of Bozhou Peony *P. Lactiflora*

注:1~7:指株龄1~7年的亳芍样品

Note: 1-7 indicated 1 to 7 years-old Bozhou Peony *P. Lactiflora*

1~7年株龄亳芍的芍药苷含量依次为:3.26 ± 0.20%、4.97 ± 0.18%、5.84 ± 0.20%、3.57 ± 0.06%、3.38 ± 0.12%、3.37 ± 0.07%、2.70 ± 0.03%。1~7年株龄亳芍的芍药内酯苷含量分别为:0.66 ± 0.09%、1.71 ± 0.09%、0.48 ± 0.07%、

0.83 ± 0.02%、0.48 ± 0.02%、0.47 ± 0.03%、0.27 ± 0.04%。上述检测结果表明,亳芍中芍药内酯苷的含量远少于芍药苷,芍药苷和芍药内酯苷的含量因株龄的不同存在一定差异。1~7年株龄亳芍,以3年株龄的芍药苷含量最多,2年株龄的芍药内酯苷

含量最多。

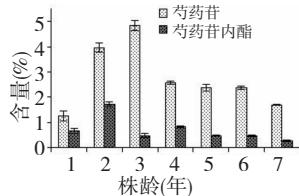


图3 不同株龄的亳芍芍药苷和芍药内酯苷含量

Fig. 3 The contents of paeoniflorin and albiflorin from different years-old of Bozhou Peony *P. lactiflora*

株龄1~7年的亳芍中芍药苷和芍药内酯苷含量的方差分析显示,芍药苷在1~3年含量呈递增趋势,3年后含量降低,4~7年株龄的芍药苷含量差别无统计学意义(表1),说明栽培3年后,亳芍中芍药苷含量趋于稳定;芍药内酯苷在1~2年呈递增趋势,2年后含量降低,5~7年含量平稳无统计学意义(表2),说明随着栽培年限增加,芍药内酯苷含量趋于稳定。上述结果表明,如以芍药苷含量为评价标准,以栽培3年的亳芍药材品质较好。如以芍药内酯苷为依据,亳芍栽培2年做药效果较好。

表1 不同生长年限的亳芍芍药苷含量方差分析结果

Table 1 The ANOVA results of paeoniflorin contents in Bozhou Peony *P. lactiflora* with different growth years

方差 Variance	第1年 The 1 <sup>st</sup> year	第2年 The 2 <sup>nd</sup> year	第3年 The 3 <sup>rd</sup> year	第4年 The 4 <sup>th</sup> year	第5年 The 5 <sup>th</sup> year	第6年 The 6 <sup>th</sup> year	第7年 The 7 <sup>th</sup> year
第1年 The 1 <sup>st</sup> year	-	-1.71667 *	-2.58333 *	-0.31000 *	-0.12333	-0.11000	0.55333 *
第2年 The 2 <sup>nd</sup> year	1.71667 *	-	-0.86667 *	1.40667 *	1.59333 *	1.60667 *	2.27000 *
第3年 The 3 <sup>rd</sup> year	2.58333 *	0.86667 *	-	2.27333 *	2.46000 *	2.47333 *	3.13667 *
第4年 The 4 <sup>th</sup> year	0.31000 *	-1.40667 *	-2.27333 *	-	0.18667	0.20000	0.86333 *
第5年 The 5 <sup>th</sup> year	0.12333	-1.59333 *	-2.46000 *	-0.18667	-	0.1333	0.67667 *
第6年 The 6 <sup>th</sup> year	0.11000	-1.60667 *	-2.47333 *	-0.20000	-0.01333	-	0.66333 *
第7年 The 7 <sup>th</sup> year	-0.55333 *	-2.27000 *	-3.13667 *	-0.86333 *	-0.67667 *	-0.66333 *	-

\* 表示有统计学意义( $P=0.05$ )。

\* indicated significant difference ( $P=0.05$ ).

表2 不同生长年限的亳芍芍药内酯苷含量方差分析结果

Table 2 The ANOVA results of albiflorin contents in Bozhou Peony *P. lactiflora* with different growth years

方差 Variance	第1年 The 1 <sup>st</sup> year	第2年 The 2 <sup>nd</sup> year	第3年 The 3 <sup>rd</sup> year	第4年 The 4 <sup>th</sup> year	第5年 The 5 <sup>th</sup> year	第6年 The 6 <sup>th</sup> year	第7年 The 7 <sup>th</sup> year
第1年 The 1 <sup>st</sup> year	-	-1.04667 *	0.18000 *	-0.17000 *	0.18667 *	0.19000 *	0.39333 *
第2年 The 2 <sup>nd</sup> year	1.04667 *	-	1.22667 *	0.87667 *	1.23333 *	1.23667 *	1.44000 *
第3年 The 3 <sup>rd</sup> year	-0.18000 *	-1.22667 *	-	-0.35000 *	-0.00667	-0.1000	-0.21333 *
第4年 The 4 <sup>th</sup> year	0.17000 *	-0.87667 *	0.35000 *	-	0.35667 *	0.36000 *	0.56333 *
第5年 The 5 <sup>th</sup> year	-0.18667 *	-1.23333 *	0.00667	-0.35667 *	-	-0.00333	-0.20667 *
第6年 The 6 <sup>th</sup> year	-0.19000 *	-1.23667 *	0.1000	-0.36000 *	-0.00333	-	0.20333 *
第7年 The 7 <sup>th</sup> year	-0.39333 *	-1.44000 *	0.21333 *	-0.56333 *	-0.20667 *	-0.20333 *	-

\* 表示有统计学意义( $P=0.05$ )。

\* indicated significant difference ( $P=0.05$ ).

### 3 结论

首次对不同生长年限的安徽道地药材——亳芍中芍药苷和芍药内酯苷含量进行对比研究,研究发现三年株龄亳芍中芍药苷含量最高,两年株龄芍药内酯苷含量最多。研究结果对亳芍采收时期的确定、质量标准研究和亳芍的药物作用机制及临床应

用提供新的参考依据。

### 参考文献

- 1 Sun J(孙婕),Ling NS(凌宁生). Comparison of the determination methods for paeoniflorin in *Radix paeoniae Alba*. *Chin Tradit Herb Drugs*,2004,35:1372-1374.
- 2 The State Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of People's Republic of China (Part I)*. 2005. 109.

- 3 Zhang XY(张晓燕), Li X(李锐), Gong JH(工金辉). A study on the chemical constituents of *Paeonia lactiflora* Pall. *J Shenyang Pharm Univ*, 2001, 18:30-32.
- 4 Liu YX(刘鹰翔), Ma YZ(马玉卓). Advances in research of chemistry and pharmacology of *Radix paeoniae Alba*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 1995, 26:437-440.
- 5 Lee B, Shin YW, Bae EA, et al. Antiallergic effect of the root of *Paeonia lactiflora* and its constituents paeoniflorin and paeonol. *Arch Pharm Res*, 2008, 31:445-450.
- 6 Xiao L, Wang YZ, Liu J, et al. Effects of paeoniflorin on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Life Sci*, 2005, 784:413-420.
- 7 Tomoda M, Matsumoto K, Shimizu N, et al. An acidic poly-
- saccharide with immunological activities from the root of *Paeonia lactiflora*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17:1161-1164.
- 8 Jeon MH, Kwon HJ, Jeong JS, et al. Detection of albiflorin and paeoniflorin in *Paeoniae radix* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr A*, 2009, 1216:4568-4573.
- 9 Huang SJ(黄山君), Yang QW(杨琪伟), Shi YH(石燕红), et al. Simultaneous assay of paeoniflorin and albiflorin in *Paeoniae Radix Alba* by QAMS. *China J Chin Mater Med*, 2011, 19:780-783.
- 10 Kim N, Park KR, Park IS, et al. Application of novel HPLC method to the analysis of regional and seasonal variation of the active compounds in *Paeonia lactiflora*. *Food Chem*, 2006, 96:496-502.

(上接第 1055 页)

- 4 Sun SQ(孙素琴). Analysis of Traditional Chinese Medicine by Infrared Spectroscopy. Beijing: Chemical Industry Press, 2010. 33.
- 5 Yang HX(杨红霞), Ma F(马芳), Du YZ(杜玉枝), et al. Study on the Tibetan medicine *Swertia mussotii* Franch and its extracts by fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2014, 34: 2973-2977.
- 6 Wu YW(武彦文), Xiao XH(肖小河), Sun SQ(孙素琴), et al. Study on traditional Chinese medicine extracts of *Rhizoma Coptidis* by FTIR. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2009, 29:93-96.
- 7 Weng SF(翁诗甫). Fourier Translation Infrared Spectroscopy. Beijing: Chemical Industry Press, 2010. 73-74.
- 8 Huang DL(黄冬兰), Chen XK(陈小康), Xu YQ(徐永群), et al. Analysis of different parts of *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara by FT-IR. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2013, 35:113-117.
- 9 Ma F(马芳), Zhang F(张方), Tang J(汤进), et al. Analysis and identification of *Poria cocos* peels harvested from different producing areas by FTIR and 2D-IR correlation spec-
- troscopy. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2014, 34: 376-380.
- 10 Liu F(刘飞), Wang YZ(王元忠), Yang CY(杨春艳), et al. Identification of *Dendrobium* varieties by infrared spectroscopy. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2014, 34:2968-2972.
- 11 Du J(杜娟), Peng XY(彭惜媛), Ma F(马芳), et al. Analysis and identification of Semen Glycines Nigrae and Semen Pharbitidis by infrared spectroscopy. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2014, 34:2429-2433.
- 12 Li JR(李建蕊), Chen JB(陈建波), Zhou Q(周群), et al. Analysis of different parts and tissues of *Panax notoginseng* by fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2014, 34:634-637.
- 13 Hu Y(胡燕), Qi GN(齐桂年). Study on the FTIR finger-printing of Dark Teas from different regions in china. *Acta Agric Nucl Sin* (核农学报), 2014, 28:684-691.
- 14 Wu XD(武晓丹), Jin ZX(金哲雄), Sun SQ(孙素琴). Discrimination of seven species of *Agrimonia pilosa* Ledeb and its extracts by FTIR and 2D-IR. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2010, 30:3222-3227.