

## 栽培年限对亳芍多酚类物质积累的影响研究

陈乃东<sup>1,2,3</sup>, 朱旺生<sup>1</sup>, 陈乃富<sup>1,2</sup>, 姚厚军<sup>1</sup>, 丁欢欢<sup>1</sup>, 谢小乐<sup>1</sup>, 李俊<sup>3\*</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多酚类物质积累的影响, 为亳芍规范化栽培、品质控制及临床用药提供依据, 实验以栽培 1~7 年的亳芍为材料, 利用 TLC 及 HPLC 技术结合多酚的沉淀敲出结果确定乙醇提取物中的多酚类组分。在此基础上, 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)、甲醇-1% 乙酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 分析不同栽培年限亳芍多酚含量的差异。在亳芍乙醇提取物中共检测出 5 种多酚类物质, 不同栽培年限的亳芍, 多酚的种类保持相对稳定, 但含量不同。栽培年限对亳芍多酚积累有明显的影响。

**关键词:** 亳芍; 多酚; 高效液相

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.014

## Effect of Plant Ages on the Accumulation of Polyphenols from Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*

CHEN Nai-dong<sup>1,2,3</sup>, ZHU Wang-sheng<sup>1</sup>, CHEN Nai-fu<sup>1</sup>, YAO Hou-jun<sup>1</sup>,  
DING Huan-huan<sup>1</sup>, XIE Xiao-le<sup>1</sup>, LI Jun<sup>3\*</sup><sup>1</sup>College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University;<sup>2</sup>West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and TraditionalChinese 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 effects of cultivation ages on the accumulation of polyphenols in Bozhou Peony *Paeonia lactiflora* and provide references for the standardized cultivation and quality evaluation of Bozhou Peony, A HPLC-DAD method was established for analyzing the polyphenols in different years-old Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*. The separation was performed on a Lanbo service 4000 and waters Symmetry C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at 30 °C with a gradient elution of methanol and 1% acetic acid as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 280 nm. Five polyphenols were checked in Bozhou peony with different plant years while the contents and ratio of different polyphenols were obviously different. The accumulation patterns of different kinds of polyphenols were noticeably effected on by their cultivation ages.

**Key words:** Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*; polyphenols; HPLC

亳芍即亳白芍, 主产安徽亳州地区, 指芍药科植物芍药或其变种毛果芍药栽培品的根, 为多年生草本植物。每年 8~10 月采挖, 洗净、去皮、晒干后即可入药。加工后的芍药呈粉白色或白色, 故又称“白芍”, 含有萜类、多酚和生物碱等成分<sup>[1-6]</sup>, 具养

血敛阴、柔肝止痛、平抑肝阳等功效<sup>[7]</sup>。

多酚(Polyphenols)是多羟基酚类化合物的总称, 是植物主要的次生代谢产物之一, 具有抗菌消炎、抗氧化、降血压、增强免疫力等作用<sup>[8-11]</sup>, 研究多酚类组分对于亳芍资源开发、揭示亳芍药效物质基础具有重要意义。

目前对亳芍多酚的研究多集中在分离鉴定和药理活性, 但关于不同生长年限亳芍多酚的研究还鲜有涉及, 有鉴于此, 本实验以不同栽培年限的亳芍为研究对象, 运用薄层色谱法和高效液相色谱法探讨其乙醇提取物中多酚的种类及不同年份亳芍多酚含

收稿日期: 2014-10-09 接受日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金(81274021); 中国博士后研究面上项目(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); 皖西学院学生研究性学习项目(wxxyx2014119)

\* 通讯作者 E-mail: 2004cnd@163.com

量变化规律,为亳芍的最佳采收时间、规范化栽培及临床用药提供参考依据。

## 1 材料、仪器和试剂

### 1.1 仪器设备

高效液相色谱仪:Lanbo service4000 高效液相色谱仪(美国 Lanbo 公司);HM-TGL-18R 快速冷冻离心机;GJ14-DGF3006 型电热恒温干燥箱(金坛市荣华仪器制造有限公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市国华电器有限公司);RE-52D 型旋转蒸发器(上海浦沪仪器厂);FA-1004 型电子天平(上海精科天平厂)等。

### 1.2 材料和试剂

#### 1.2.1 材料

实验材料亳芍 2013 年 9~11 月采自安徽省亳州市亳芍种植基地,品种经皖西学院陈乃东博士鉴定为毛茛科植物亳芍(*Bozhou Peony Paeonia lactiflora*)。分别挖取株龄 1~7 年的亳芍,洗净,去皮,晾干,备用。

#### 1.2.2 试剂

无水乙醇(AR,上海振兴化工一厂)、纯净水(怡宝,华润怡宝食品饮料有限公司)、无水三氯化铁(AR,国药集团化学试剂有限公司)、乙酸(AR,上海中试化工总公司)、乙酸乙酯(AR,国药集团化学试剂有限公司)、甲酸(AR,天津博迪化工股份有限公司)等。甲醇(色谱纯,上海星可生化有限公司)。

没食子酸标准品(北京世纪奥科生物技术有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 多酚的提取

精密称取 80 °C 烘干至恒重的亳芍粉末 10.0 g,置于 250 mL 烧瓶中,加入 100 mL 80% 的乙醇溶液(*v/v*),在 60 °C 条件下超声提取 30 min,滤液 5000 rpm 转速离心 10 min,取上清液,挥干溶剂,放置干燥,即得亳芍总多酚提取物。

### 2.2 多酚定性鉴别

总多酚提取物以乙酸乙酯-甲酸-水(12:1:1)系统为展开剂,硅胶板展开后于 254 nm 紫外下检视,继以 5% FeCl<sub>3</sub> 乙醇溶液显色。

### 2.3 亳芍多酚 HPLC-DAD 分析条件的确定

参考相关文献<sup>[12]</sup>,通过反复预实验,确定亳芍总多酚提取物 HPLC-DAD 分析的方法为:waters

Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以甲醇(A):1% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,检测波长 280 nm,柱温 30 °C,梯度洗脱条件为:0~10 min,5% A;10~15 min,5%~30% A;15~45 min,30%~40% A;45~60 min,100% A。

### 2.4 未知亳芍多酚组分的沉淀敲出鉴定

精密称取亳芍多酚提取物,配制成 3.5 mg/mL 的甲醇溶液,精密吸取 1.0 mL,与三氯化铁沉淀试剂(三氯化铁饱和甲醇溶液)等体积混合,摇匀,10 °C 下 15000 rpm 离心 10.0 min,重复沉淀操作三次,获敲除了亳芍多酚组份的上清液,与 2.3 测定的总多酚提取液的 HPLC 结果相比较,消失的或峰面积明显下降的色谱峰为多酚类组分峰。

### 2.5 不同栽培年限的亳芍多酚类物质含量比较

本实验以没食子酸为对照品,采用内标法测定亳芍多酚的含量。

#### 2.5.1 没食子酸标准曲线的制备

精密称取没食子酸,配制 1.0 mg/mL 的标准溶液,按 2.3 建立的色谱方法,分别进样 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μL,测定没食子酸峰面积。以色谱峰面积为纵坐标(Y),对照品进样质量(μg)为横坐标(X),得到的没食子酸回归方程: $y = 8.75 \times 10^8 x + 2.1 \times 10^6$ ,  $R^2 = 0.997$ 。没食子酸在 1.25~10 μg 范围内,与对应峰面积呈良好的线性关系。

#### 2.5.2 亳芍多酚含量测定

按 2.1 操作,制备栽培 1~7 年亳芍多酚总提取物,分别配制成 1.75 mg/mL 的溶液,按 2.3 构建的方法检测,计算多酚的峰面积,对不同年限的多酚物质含量进行比较。实验设三次重复。利用 SPASS 软件对实验结果进行分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 亳芍中未知多酚的 TLC 鉴定结果

254 nm 紫外检测结果如图 1-1 所示。可见,在 254 nm 下,总提取物中 TLC 图中含有多个显色斑,提示所提亳芍样品中可能含有多酚类物质。进一步以 5% FeCl<sub>3</sub> 乙醇溶液显色,呈现 5 个清晰的多酚类物质特征显色斑(图 1-2),说明本实验条件下制备的亳芍亳芍总多酚提取物中至少含有 5 种多酚类物质。

### 3.2 亳芍总多酚提取物 HPLC-DAD 分析结果及未知多酚类组分沉淀敲出结果

按 2.3 操作,测得亳芍总多酚提取物 HPLC 图谱如图 2 A 所示。采用本实验构建的色谱条件,毫

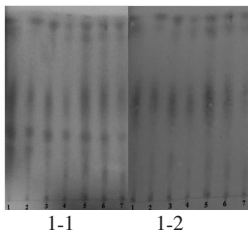


图1 栽培1~7年亳芍总多酚提取物 TLC 检测结果

Fig. 1 Results of the polyphenols in Bozhou Peony *Paeonia lactiflora* of different plant ages

说明:(1)1-1, 254 nm 检测结果;1-2 FeCl<sub>3</sub> 显色结果;(2)1~7 分别代表栽培1~7年的亳芍总多酚

芍总多酚提取物中大多数组分实现基线分离。

多酚总提物沉淀敲出多酚后,HPLC 检测表明,标注为1、2、3、4 峰(图 2B)的峰面积比沉淀前明显减小,峰 5 完全消失,证明峰 1、2、3、4、5 均为多酚。

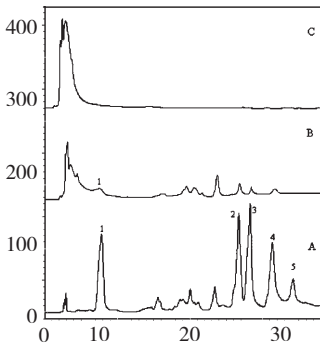


图2 亳芍多酚色谱定性图

Fig. 2 Qualitative chromatograms of polyphenols from Bozhou Peony *P. lactiflora*

A: FeCl<sub>3</sub> 溶液 B: 沉淀后的多酚溶液 C: 沉淀前的多酚溶液

### 3.3 二极管阵列检测器多酚峰纯度分析

采用二极管阵列检测器检测多酚峰 1~5 的纯

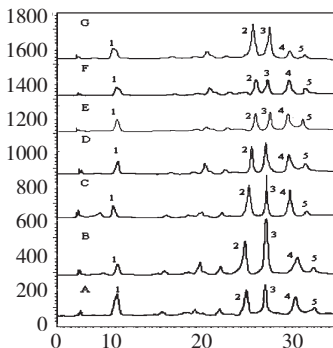


图3 不同栽培年限亳芍总多酚提取物 HPLC 图

Fig. 3 The chromatograms of the extract of polyphenols from one to seven years-old Bozhou Peony *P. lactiflora*

A~F: 1~7 年生亳芍

度,测定结果表明,其峰纯度依次为 99.28%、99.75%、99.33%、99.08% 和 99.13%,表明多酚峰 1~5 为单一物质峰。

### 3.4 不同栽培年限亳芍多酚类物质 HPLC 检测结果对比分析

由下图 3 可看出不同年限的亳芍含有的多酚种类总体来说较稳定,但不同种类的多酚在不同年限的含量不同。从图中来看二年限及三年限的亳芍的 1、2、3、4、5 五个峰的峰面积较大,而五年限及六年限的亳芍的五个峰面积较小,因此,初步预测二、三年限亳芍含多酚较多,五、六年限亳芍含多酚较少。

### 3.5 不同年限多酚类物质含量比较研究结果

由图 4 可知多酚 1 在一年限亳芍中含量最高,多酚 3 在二年限亳芍中含量最高,多酚 2、4 在三年限亳芍中含量最高,多酚 5 在一年限亳芍中含量最高。由图 6 可知二年限亳芍含有的已确定的五种亳芍多酚最多,六年最少。

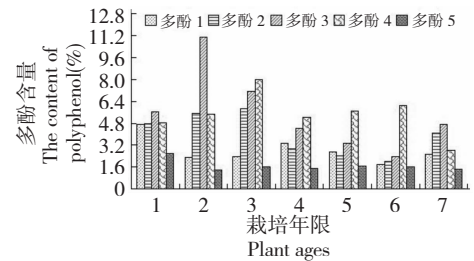


图4 不同栽培年限五种亳芍多酚含量比较

Fig. 4 Comparative analysis of the content of five kinds of polyphenol from Bozhou Peony *P. lactiflora*

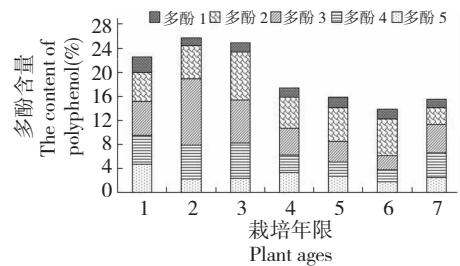


图6 不同栽培年限亳芍总多酚含量比较

Fig. 6 Comparative analysis of the content of 5 kinds of polyphenols from Bozhou Peony *P. lactiflora* of 1-7 plant ages

## 4 结论

本实验旨在探讨不同年份亳芍多酚含量变化规律,为亳芍的采收时间、规范化栽培及临床用药提供

参考依据。通过一系列试验及计算后发现二年限亳芍含所测得的五种多酚最多。但是该实验并没有测出所有亳芍多酚的含量,只是对亳芍中含量较高的多酚进行了测定,导致这一结果的原因主要是由于亳芍多酚总提取物中组分多,在液相色谱条件下难以将其中全部组分分离,另外,有些组分含量太低或者用已有的沉淀试剂不能将其沉淀,因此,本实验仅测定并比较了五种组分的含量。笔者认为该实验虽有不足,但仍可作为亳芍采收的依据,因此可认定亳芍种植二年后采收最合适。

#### 参考文献

- Zhang XY(张晓燕), Li X(李铤), Gong JH(工金辉). A study on the chemical constituents of *Paeonia lactiflora* Pall. *J Shenyang Pharm Univ*, 2001, 18:30-32.
- 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.
- Tomoda M, Mastsumoto K, Shimizu N, et al. An acidic polysaccharide with immunological activities from the root of *Paeonia lactiflora*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17:1161-1164
- Lee SC, Kwon YS, Son KH, et al. Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res*, 2005, 28:775-783.
- Kim N, Park KR, Par 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.
- Chen ND(陈乃东), Zhou F(周飞). Extraction and determination of alkaloids from Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2013, 10(20):49-50.
- Liu YX(刘鹰翔), Ma YZ(马玉卓). Advances in research of chemistry and pharmacology of *Radix Paeoniae Alba*. *Chin Trad Herb Drugs*, 1995, 26:437-440.
- Gong WF(龚文菲), Wang TS(汪铁山), Lin JM(林敬明). Content analysis of total polyphenol in the leaves of *Jatropha curcas L.* *J Southern Med Univ*, 2010, 30:1321-1322.
- Xiong HP(熊皓平), Yang WL(杨伟丽), Zhang YS(张友胜), et al. Comparative study on the determination of polyphenols in *Ampelopsis grossdentata*. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2001, 27:381-383.
- Li JX(李巨秀), Li LX(李利霞), Zeng WM(曾王旻), et al. Study on polyphenol extraction and antioxidant activities in Oat. *J Chin Instit Food Sci Technol*, 2010, 10(5):14-21.
- Lu YR, Yeap FL. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chem*, 1997, 59:187-194.
- Sun HF(孙海峰), Lv HT(吕海涛), Zhou SS(周莎莎), et al. Simultaneous determination of phenolic compounds in apple juice concentrate by high performance liquid chromatography. *Food Sci*, 2008, 28:314-317.
- Do TC, Nguyen TD, Tran H, et al. Analysis of alkaloids in lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) leaves by non-aqueous capillary electrophoresis using ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 2013, 1302:174-180.
- Gu DY, Yang Y, Ba H, et al. Characterization and identification of the chemical compositions in a traditional Uighur medicine prescription *Yizhihao* granule by LC-ESI-QTOF-MS. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2015, 38:229-242.
- Gu DY, Yang Y, Mahinur B, et al. A LC/QTOF-MS/MS Application to Investigate Chemical Compositions in a Fraction with Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity from *Rosa Rugosa* Flowers. *Phytochem Analysis*, 2013, 24:661-670.
- Gu DY, Yang Y, Rahima A, et al. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*, 2012, 26:83-100.
- Li L, Yang Y, Hou X, et al. Bioassay-guided separation and purification of water-soluble antioxidants from *Carthamus Tinctorius* L. by combination of chromatographic techniques. *Sep Purif Technol*, 2013, 104:200-207.
- Yang C, Yang Y, Aisa HA, et al. Bioassay-guided isolation of antioxidants from *Astragalus Altaicus* by combination of chromatographic techniques. *J Sep Sci*, 2012, 35:977-983.
- Ambure P, Kar S, Roy K, et al. Pharmacophore mapping-based virtual screening followed by molecular docking studies in search of potential acetylcholinesterase inhibitors as anti-alzheimer's agents. *Biosystems*, 2014, 116(2):10-20.
- Walker SD, Mceldowney S. Molecular docking: A potential tool to aid ecotoxicity testing in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Chemosphere*, 2013, 93:2568-2577.
- Tamilvanan T, Hopper W. High-throughput virtual screening and docking studies of matrix protein vp40 of ebola virus. *Bioinformatics*, 2013, 9:286-296.

(上接第46页)