

以选定检测波长为 280 nm。

3.3 样品提取方法的选择:根据对照品的溶解性,选择以甲醇为溶剂。考察了甲醇质量分数、提取方式、时间、温度和提取次数对样品中所测成分的影响,以直铁线莲宁 B 的峰面积为评价指标,结果表明 60% 甲醇 60 °C 下超声提取 1 h 为最佳提取条件。

3.4 量的限定:板蓝根药材的主产地为河北、河南、安徽、江苏等地,对主产地药材定量测定结果表明,不同产地板蓝根药材直铁线莲宁 B 的量差别较大,以江苏、吉林、安徽、河北量较高。各产地平均量为 0.041%,以降低 20% 为限度计,板蓝根药材中直铁线莲宁 B 的量应不低于 0.033%。

板蓝根抗病毒的有效成分不明确,导致其原药

材及其制剂的质量控制方法相对落后。本实验是建立在对板蓝根抗病毒有效成分已进行系统筛选的基础上,在水提取物中已经分离得到 31 个化合物中,以木脂素糖苷直铁线莲宁 B 的量最高,且具有明显的抗病毒及抗氧化活性,此前对该物质的定量测定方法未见报道。

参考文献:

- [1] Hirano H, Takashi T, Toshio Y, et al. Isolation of free radical scavenger from *Coptidis Rhizoma* [J]. *Nat Med*, 1997, 51(6): 5391.
- [2] 俞善昌. 氧自由基与清除剂 [J]. 中国实用儿科杂志, 1993, 8(2): 78.
- [3] 张永文, 俞敏倩, 陈玉武, 等. 板蓝根中的木脂素双葡萄糖苷 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 395-399.

RP-HPLC 法测定赤芍药材中没食子酸、儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酸

董 玄, 高文远*, 高 颖

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘 要:目的 建立了用 RP-HPLC 对赤芍中没食子酸、儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酸同时定量的方法,并对不同产地赤芍药材进行考察。方法 高效液相色谱法,色谱柱为 Waters Sunfire columns C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱;检测波长采用变波长检测;柱温为 40 °C;进样量为 10 μL。同时测定了赤芍中没食子酸、儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酸的量。结果 没食子酸在 0.013~0.506 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 6$)、儿茶素在 0.025~0.993 6 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 7$)、芍药苷在 0.200~8.017 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 6$)、芍药内酯苷在 0.030~1.184 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 6$)、苯甲酸在 0.037~1.485 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 6$)。平均回收率没食子酸为 98.08%,RSD 为 1.65%;儿茶素为 101.80%,RSD 为 3.07%;芍药内酯苷为 99.18%,RSD 为 3.25%;芍药苷为 95.95%,RSD 为 1.39%;苯甲酸为 101.85%,RSD 为 1.35%。结论 本方法测定了不同产地、不同批号赤芍样品中 5 种化学成分的量,该方法分离度好,快速,简便,重现性好。

关键词:赤芍; 没食子酸; 儿茶素; 芍药苷; 芍药内酯苷; 苯甲酸; 高效液相色谱法

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)12-1897-03

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根^[1]。主产于内蒙古、辽宁、河北、黑龙江、吉林等地,甘肃、山西、青海等地亦产^[2]。赤芍的功能为清热凉血、散瘀止痛^[1]。赤芍总苷中主要含有芍药苷 (paeoniflorin)、芍药内酯苷 (albiflorin)、羟基芍药苷 (oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin) 等单萜类化合物,还有儿茶素 [(+)-catechin]、没食子酸 (galic acid) 等多酚类物质。此

外,赤芍中还含有苯甲酸 (benzoic acid, BA)^[3,4]。本实验采用 RP-HPLC 法测定了赤芍中有效成分没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷的量,同时对苯甲酸也进行了定量。

1 仪器与试药

美国 HP1100 色谱仪 Agilent 公司, G1311A 四元泵, G1322A、G1314AVWD 检测器, HPRV. A0501 化学工作站;甲醇、乙腈为色谱纯,康科德公司生产;实验用水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分

收稿日期:2008-06-22

基金项目:天津市科技创新专项资金项目 (06FZZDSH00404)

作者简介:董 玄(1985—),女,天津人,在读硕士,主要从事中药资源学及中药质量控制方法研究。

* 通讯作者 高文远 Tel/Fax: (022) 87401895 E-mail: pharmgao@tju.edu.cn

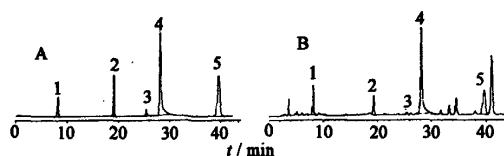
析纯。本研究收集了不同产地的赤芍药材5批,经天津大学高文远教授鉴定为正品赤芍。

芍药内酯苷对照品购自中新药业研究中心,质量分数大于98.0%;其余对照品购自中国药品生物制品检定所,芍药苷批号:110736-200732,没食子酸批号:110831-200302,儿茶素批号:877-200001,苯甲酸批号:100419-200301。

电子天平:Sartorius CP225D (0.01 mg),由北京赛多利斯仪器系统有限公司生产;KQ3200DB型数控超声清洗器,由昆山市超声仪器有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为Waters Sunfire C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相采用三元体系,A为甲醇,B为乙腈,C为0.1%磷酸梯度洗脱,梯度洗脱程序为:0~7 min (1%~1% A,4%~4% B,95%~95% C),体积流量0.5~0.5 mL/min;7~14 min (1%~1% A,4%~12% B,95%~87% C),体积流量0.5~0.8 mL/min;14~15 min (1%~1% A,12%~12% B,87%~87% C),体积流量0.8~0.6 mL/min;15~32 min (1%~1% A,12%~17% B,87%~82% C),体积流量0.6~0.6 mL/min;32~45 min (1%~1% A,17%~17% B,82%~82% C),体积流量0.6~0.6 mL/min。检测波长采用可变波长检测:0~20 min,275 nm;20~45 min,230 nm;柱温40℃;进样量10 μL。对照品及样品的色谱图见图1。



1-没食子酸 2-儿茶素 3-芍药内酯苷 4-芍药苷 5-苯甲酸
1-galic acid 2-(+)-catechin 3-albiflorin 4-paeoniflorin
5-benzoic acid

图1 对照品(A)和赤芍样品(B)的HPLC图谱

Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and *Radix Paeoniae Rubra* sample (B)

2.2 对照品溶液制备方法:精密称取没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸对照品,用甲醇溶解分别配制成一定质量浓度对照品溶液;分别精密吸取上述对照品若干配制质量浓度分别为250、50、60、400、75 μg/mL的混标溶液25 mL;精密吸取上述溶液0.25、1.2、4.6、8 mL置10 mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成一系列不同质量浓度的混和对品溶液。

2.3 供试品溶液制备方法:精密称取赤芍粉末0.2 g至具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇20 mL,称定质量,冷浸16 h,超声提取45 min (功率100 W),取出放冷,50%甲醇补质量,静置,吸取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过即得。

2.4 线性关系考察:在上述色谱条件下,将配制的系列对照品溶液分别进样20 μL,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程分别为:没食子酸 $Y=6\,256.7 X+17.384$, $r=0.999\,6$,在0.013~0.506 μg线性关系良好;儿茶素 $Y=4\,953.4 X-14.493$, $r=0.999\,7$,在0.025~0.993 μg线性关系良好;芍药内酯苷 $Y=1\,088.5 X-18.8$, $r=0.999\,6$,在0.030~1.184 μg线性关系良好;芍药苷 $Y=2\,757.2 X-93.786$, $r=0.999\,9$,在0.200~8.017 μg线性关系良好;苯甲酸 $Y=9\,651.6 X-51.605$, $r=0.999\,6$,在0.037~1.485 μg线性关系良好。

2.5 精密度考察:精密吸取对照品溶液20 μL,连续重复进样5次,记录峰面积,结果没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸峰面积的RSD分别为1.36%、1.25%、1.44%、1.37%、0.63%,表明精密度良好。

2.6 稳定性考察:取同一供试品溶液,按照上述色谱条件,在0.2、4、6、8 h进样,结果表明供试品溶液在8 h内稳定,没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸峰面积的RSD分别为0.54%、1.49%、2.01%、1.19%、0.39%。

2.7 重现性考察:取同一批赤芍药材,制备供试品溶液5份,分别进样10 μL,测定峰面积和质量分数。没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸质量分数的RSD分别为1.84%、1.82%、2.82%、1.48%、1.84%。

2.8 加样回收率试验:精密称取赤芍样品0.1 g,共6份,分别加入一定量对照品,按照2.2项下制备,在上述色谱条件下进样分析,计算回收率。没食子酸平均回收率98.08%,RSD为1.65%;儿茶素平均回收率101.80%,RSD为3.07%;芍药内酯苷平均回收率99.81%,RSD为3.25%;芍药苷平均回收率95.95%,RSD为1.39%;苯甲酸平均回收率101.85%,RSD为1.35%。

2.9 样品测定:取不同产地的赤芍药材,按供试品制备方法制备样品,测得5种成分质量分数,结果见表1。

(下转附4页)

- 放射医学与防护杂志, 1996, 16(1): 61.
- [3] 肖 俐, 何秀兰. “治未病”理论在治疗放疗副反应中的临床应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 13(1): 66.
- [4] 苏文娜, 蒋钦敏. 辐射损伤防治药物的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(3): 307.
- [5] 张长林, 王兆强. 中药抗辐射作用的研究概况[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2006, 4(5): 377.
- [6] 赵莲芳, 郑玉淑, 朴惠顺, 等. 黄芪多糖及人参皂苷对衰老小鼠的抗衰老作用[J]. 延边大学医学学报, 2006, 29(4): 249.
- [7] 邹 丹, 乔海灵, 全宏勋, 等. 三七皂甙对辐射所致小鼠骨髓抑制的对抗作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2000, 20(6): 413.
- [8] 陶明飞, 杨卫东, 王俊和. 刺五加对放射损伤骨髓微血管的保护作用[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(6): 683.
- [9] 陶明飞, 杨卫东, 王俊和. 刺五加注射液、血府逐瘀口服液对小鼠骨髓微循环的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(1): 11.
- [10] 刘振芳, 孙汉英, 刘文励, 等. 川芎嗪促进急性放射损伤小鼠骨髓造血修复作用的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2004, 24(5): 396.
- [11] 孙 岚, 刘文励, 孙汉英, 等. 川芎嗪对放射损伤小鼠骨髓基质细胞血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2004, 12(1): 86.
- [12] 汪德清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪总黄酮对犬模拟肝癌术中放疗抗辐射损伤作用的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1996, 16(6): 399.
- [13] 金 宏, 刘 丽, 王先远, 等. 大豆异黄酮抗辐射作用的实验研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(3): 23.
- [14] 李德远, 张晓宇, 汤 坚, 等. 银杏叶提取物对小鼠的抗辐射效应[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(3): 289.
- [15] 刘丽波, 孙晓玲. 人参二醇组甙对小鼠骨髓细胞染色体的辐射保护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22(2): 114.
- [16] 陈 月, 王宝贵, 桂桂英, 等. 刺五加皂苷的抗辐射损伤作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(3): 423.
- [17] 迟 文, 徐 静, 郭凌燕, 等. 梅多酚对核辐射损伤的血细胞与造血组织的保护作用[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3): 168.
- [18] 隋 萍, 钟进义. 葡萄多酚对骨髓细胞辐射损伤的保护作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(8): 942.
- [19] 钟进义, 于洪升, 栗世如. 葡萄多酚对小鼠急性放射损伤的防护作用研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(5): 345.
- [20] 周丽君, 方允中, 章扬培, 等. 绿茶多酚等五抗辐射药物对质粒 pBR322DNA 辐射损伤防护效应的研究[J]. 华放射医学与防护杂志, 1999, 15(6): 415.
- [21] 刘国康, 康 鑫, 祝霄霞, 等. 茶多酚对 γ -射线辐射体外诱发 CHL 细胞转化的防护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 16(3): 183.
- [22] 唐于平, 楼凤昌, 王景华, 等. 银杏叶中黄酮类成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(4): 231.
- [23] 韩京艳, 邢东明, 孙 虹, 等. 银杏叶提取液内酯及天然配对抗氧化作用的比较[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 115.
- [24] 张 艳, 李京培, 李文方. 银杏叶提取物的体外抗病毒作用[J]. 安徽中医临床杂志, 2000, 12(3): 206.
- [25] 刘哲峰, 赵 宏. 生脉注射液提高机体抗辐射能力临床研究[J]. 科技技术与工程, 2005, 5(14): 980.
- [26] 隋燕霞, 肖 纯, 赵东利. 康艾注射液对乳腺癌患者抗辐射损伤的研究[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(20): 75.
- [27] 纪 辉, 张春霞, 吕志友. 人及动物慢必放射性皮肤溃疡电镜观察[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19: 39.
- [28] 卢金利, 刘小平. 芦荟凝胶对放射性皮炎愈合的影响[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(19): 2226.
- [29] 宇长青, 王 言, 张 永. 巴氏膏治疗急性放射性皮肤损伤的临床观察[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(5): 333.
- [30] 杨晓虹. 郁海香对慢性放射性皮肤损伤的疗效观察[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(1): 80.
- [31] 周富玲, 张金桃, 黄晓艳, 等. 口灵在放射性口咽黏膜损伤中的防治作用[J]. 广西医学, 2004, 26(5): 732.
- [32] 刘雪华, 王阿克, 李铁红. 中药雾化吸入预防放射性口腔黏膜反应 35 例[J]. 中医外治杂志, 2006, 15(5): 20.
- [33] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [34] 王文祥, 廖惠珍, 李锋平, 等. 茶多酚促排铅作用的实验[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(增刊): 270.
- [35] 陈 斌, 周熙成. 天然抗氧化剂对空间辐射的防护作用[J]. 航天医学与医学工程, 2003, 16(增刊): 514.

(上接第 1898 页)

表 1 不同产地赤芍药材中的没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of galic acid, (+)-catechin, albiiflorin, paeoniflorin, and benzoic acid in *Radix Paeoniae Rubra* collected from different habitats ($n=3$)

样品产地	没食子酸/%	儿茶素/%	芍药内酯苷/%	芍药苷/%	苯甲酸/%
甘肃	0.333	0.428	0.164	2.389	0.254
内蒙 I	0.023	0.541	未检出	3.768	0.061
内蒙 II	0.030	0.115	0.113	3.015	0.085
辽宁 I	0.020	0.116	0.142	3.603	0.127
辽宁 II	0.077	0.190	0.280	2.667	0.030

3 讨论

3.1 本研究以没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸为测定指标,考察了 50% 甲醇、75% 乙醇、甲醇的提取效果,结果表明 50% 甲醇提取效果为佳;比较超声和回流两种提取方式,结果表明超声提取效果较好;进而比较了超声提取 15、30、45、60 min 的提取效果,结果表明随提取时间的延长,提取

效率提高,但增高趋势逐渐减缓,综合各因素,最终选择超声提取 45 min。

3.2 本实验采用 RP-HPLC 法对 5 批赤芍样品中的没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸 5 种化学成分同时进行定量测定,结果表明,不同产地赤芍药材中 5 种成分的量变化很大。参照 2005 年版《中国药典》规定,赤芍药材中芍药苷的量不得低于 1.8%,以此为标准所测 5 批药材质量均合格,但采用本方法检测的结果显示除芍药苷外的 4 种成分的量差异较大,5 批赤芍药材质量明显存在优劣。该方法简便、快捷、准确,为全面控制赤芍的质量提供了方法基础。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海:上海人民出版社, 1993.
- [3] 阮金兰, 赵钟祥, 曾庆忠, 等. 赤芍化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(9): 965-970.
- [4] 张克荣, 刘荣霞, 许俊博, 等. RP-HPLC 同时测定赤芍 3 种化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(10): 793-796.