

HPLC 法同时测定赤芍中 9 个活性成分的含量

王 化, 何丹娆, 朱良玉, 于志民, 张 悦*

黑龙江省科学院自然与生态研究所, 林下经济资源研发与利用协同创新中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 建立高效液相色谱 (HPLC) 同时测定赤芍提取物中 9 个活性成分 (芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、苯甲酸、儿茶素、丹皮酚、没食子酸、1,2,3,4,6-*O*-没食子酰葡萄糖) 的方法。方法 采用 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈和 0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C。结果 没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、1,2,3,4,6-*O*-没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚进样量分别在 0.004~1.200、0.010~1.500、0.044~0.660、0.038~1.140、0.042~2.100、0.050~1.250、0.040~0.600、0.042~1.260 和 0.004~1.080 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系, 有良好的精密度、稳定性、重复性和回收率。结论 该方法同时测定赤芍中 9 个活性成分的含量高效、准确、重复性好, 可用于赤芍药材的质量控制。

关键词: 赤芍; 高效液相色谱法; 芍药苷; 氧化芍药苷; 芍药内酯苷; 没食子酰葡萄糖

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0708-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.029

Simultaneous determination of nine components in *Paeoniae Radix Rubra* by HPLC

WANG Hua, HE Dan-rao, ZHU Liang-yu, YU Zhi-min, ZHANG Yue

Institute of Natural Resources and Ecology, Heilongjiang Academy of Sciences, Collaborative Innovation Center for Development and Utilization of Forest Resource, Harbin 150040, China

Abstract: Objective A high performance liquid chromatographic method (HPLC) was established to simultaneously quantify the paeoniflorin, oxypaeoniflora, albiflorin, benzoyl paeoniflorin, benzoic acid, catechin, paeonol, gallic acid, and 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloy-*D*-glucose of *Paeoniae Radix Rubra*. **Methods** The mobile phase comprised of acetonitrile and water containing 0.1% phosphoric acid. Column temperature was 30 °C, flow rate was 1.0 mL/min, and chromatography was monitored at 230 nm. **Results** The correlation coefficients between concentration and chromatographic peak area of gallic acid, oxypaeoniflora, catechin, albiflorin, paeoniflorin, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloy-*D*-glucose, benzoic acid, benzoyl paeoniflorin, and paeonol were respectively over 0.999 in the ranges of 0.004—1.200, 0.010—1.500, 0.044—0.660, 0.038—1.140, 0.042—2.100, 0.050—1.250, 0.040—0.600, 0.042—1.260, and 0.004—1.080 mg/mL, with good precision, stability, repeatability, and recovery. **Conclusion** The method is effective, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of *Paeoniae Radix Rubra*.

Key words: *Paeoniae Radix Rubra*; HPLC; paeoniflorin; oxypaeoniflora; albiflorin; 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloy-*D*-glucose

赤芍是我国传统中药材,为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch. 的干燥根, 味苦、微寒, 归肝经, 具有清热凉血、散瘀止痛之功效^[1]。赤芍中含有芍药苷、芍药内酯苷、儿茶素、没食子酰葡萄糖、丹皮酚、没食子酸等活性成分。其中, 芍药苷含量最高, 历版《中国药典》中也一直以芍药苷作为药材质量检测的目标成分。

近几年的研究发现, 芍药苷具有扩张血管、镇静镇痛、抗炎、抗溃疡、解热、利尿、抗抑郁的作用^[2-3]; 芍药内酯苷具有镇痛、抗炎、补血、抗抑郁等功效^[4-6]; 儿茶素具有抗凝血、保护肝脏、清除自由基等活性^[7]; 没食子酰葡萄糖具有抗炎、抗癌、抗血管生成、抗糖尿病等生物学活性^[8-9]; 丹皮酚在心血管疾病防治方面也显示出良好的药理活性^[10-12]。因此仅以芍药

收稿日期: 2017-09-05

基金项目: 国家重点研发计划“东北森林区生态保护及生物资源开发利用技术及示范”(2016YFC0500300); 黑龙江省科学院科学研究基金“栽培赤芍配方肥研制与应用”(KY2017ZR01); 黑龙江省科技攻关项目(GZ16C010)

作者简介: 王 化 (1981—), 女, 吉林人, 副研究员, 博士, 研究方向为植物学。E-mail: wangh30@126.com

*通信作者 张 悦 (1962—), 男, 研究员, 研究方向为植物学。E-mail: zyszy1962@163.com

昔作为赤芍药材唯一检测指标不够全面, 已经不能满足社会发展对药品质量控制越来越高的要求。建立快捷、方便、可靠的同时测定多种赤芍活性成分检测方法对赤芍药材的质量控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 e2695-2998 液相检测系统; C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters 公司); KQ3200DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (法国默克化工技术有限公司); Minispin 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); BS210S 电子天平 (北京 Sartorius 有限公司); 手提式中药粉碎机 (温岭市大德中药机械有限公司)。

对照品芍药苷 (批号 23180-57-6)、芍药内酯苷 (批号 39011-90-0)、氧化芍药苷 (批号 39011-91-1)、苯甲酰芍药苷 (批号 38642-49-8)、苯甲酸 (批号 65-85-0)、儿茶素 (批号 154-23-4)、丹皮酚 (批号 552-41-0)、没食子酸 (批号 149-91-7)、1,2,3,4,6-*O*-没食子酰葡萄糖 (批号 14937-32-7) 购自于上海源叶生物科技有限公司, 芍药内酯苷质量分数 ≥ 91.4%, 其余对照品质量分数 ≥ 98%; 乙腈为色谱纯 (美国 Sigma 公司); 所检测的样品为 2016 年 8~9 月采集于内蒙古克什克腾旗、阿荣旗、莫力达瓦旗和额尔古纳右旗, 经大兴安岭地区北药办副主任马俊莹鉴定均为芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别称取 9 种活性单体对照品芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、苯甲酸、儿茶素、丹皮酚、没食子酸、1,2,3,4,6-*O*-没食子酰葡萄糖 2 mg, 置于 1 mL 量瓶, 用 50% 乙腈溶解并定容, 制得质量浓度为 2 mg/mL 的溶液。

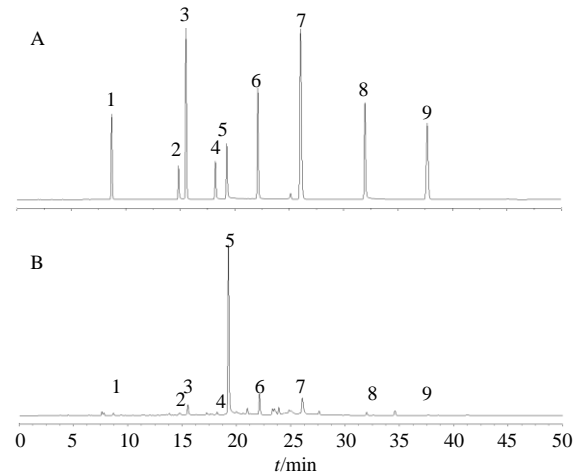
2.2 供试品溶液的制备

精密称取赤芍样品粉末 1 g, 放置于 100 mL 具塞三角瓶中, 加 60% 乙醇溶液 20 mL, 40 °C 超声提取 1 h, 提取液经 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 HPLC 样品瓶备用。

2.3 色谱条件

色谱条件为 C₁₈ 色谱柱; 流动相为乙腈和 0.1% 磷酸水溶液, 流动相梯度洗脱条件为 0 min, 0% 乙腈; 0~40 min, 0~50% 乙腈; 40~42 min, 50%~0 乙腈; 42~50 min, 0% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 230 nm; 柱温 30 °C; 进

样量为 10 μL。9 个对照品分离度良好。芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、苯甲酸均在 230 nm 附近有吸收峰, 而没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、没食子酰葡萄糖、丹皮酚的吸收峰则在 202~279 nm 存在较大差异, 但除氧化芍药苷在 230 nm 处吸光度略小外, 其他活性成分在 230 nm 吸光度均较高。因此, 鉴于本实验建立的测定方法为了达到操作简单、高效、快速的测定目的, 将检测波长定为 230 nm。



1-没食子酸 2-氧化芍药苷 3-儿茶素 4-芍药内酯苷 5-芍药苷
6-1,2,3,4,6-*O*-没食子酰葡萄糖 7-苯甲酸 8-苯甲酰芍药苷
9-丹皮酚
1-gallic acid 2-oxypaeoniflora 3-catechin 4-albiflorin
5-paeoniflorin 6-1,2,3,4,6-penta-*O*-galloy-*D*-glucose 7-benzoic acid
8-benzoyl paeoniflorin 9-paeonol

图 1 混合对照品 (A) 及样品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed standard (A) and samples (B)

2.4 线性关系考察

分别将稀释后 2.0、1.5、1.0、0.8、0.6、0.4、0.08、0.04、0.004 mg/mL 的 9 种对照品溶液 10 μL 进样, 由于每种对照品光谱特征峰的差异, 去除峰高过高和峰高过低的点后 (剩余点不少于 5 个), 以峰面积为横坐标 (X), 对照品质量浓度为纵坐标 (Y), 计算每个单体化合物线性回归方程, 见表 1。

2.5 精密度试验

9 种对照品溶液分别进样 10 μL, 重复进样 6 次, 没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.18%、0.35%、0.27%、0.30%、0.91%、0.16%、0.35%、0.37%、0.18%。

2.6 稳定性试验

在 0、2、4、8、24 h 分别进样 10 μL, 没食子

表 1 9 种化合物线性回归方程

Table 1 Linear regression equation of nine compounds

对照品	回归方程	R ²	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
没食子酸	$Y=6.26 \times 10^{-8} X - 7.18 \times 10^{-3}$	0.999 9	0.004~1.200
氧化芍药苷	$Y=3.39 \times 10^{-7} X + 0.010 7$	0.999 3	0.010~1.500
儿茶素	$Y=3.37 \times 10^{-8} X - 0.010 7$	0.999 1	0.044~0.660
芍药内酯苷	$Y=1.08 \times 10^{-7} X + 9.41 \times 10^{-3}$	0.999 4	0.038~1.140
芍药苷	$Y=6.95 \times 10^{-8} X + 9.37 \times 10^{-3}$	0.999 1	0.042~2.100
没食子酰葡萄糖	$Y=5.42 \times 10^{-8} X - 0.012 3$	0.999 3	0.050~1.250
苯甲酸	$Y=1.89 \times 10^{-8} X - 8.42 \times 10^{-3}$	0.999 4	0.040~0.600
苯甲酰芍药苷	$Y=4.23 \times 10^{-8} X - 2.02 \times 10^{-3}$	0.999 3	0.042~1.260
丹皮酚	$Y=3.26 \times 10^{-8} X + 7.25 \times 10^{-4}$	0.999 9	0.004~1.080

酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.48%、0.60%、0.52%、0.62%、0.57%、0.59%、0.54%、0.85%、0.39%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批样品，按样品制备方法制备 6 份，分别进样 10 μL，没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚质量分数的 RSD 分别为 1.79%、2.09%、2.18%、2.58%、2.31%、2.85%、1.61%、2.56%、2.78%，重复性较好。

2.8 加样回收率试验

按照上述液相色谱条件，将一定量的对照品溶液移取加入到样品溶液中，按照“2.2”项下方法操作，制备供试品溶液，在上述色谱条件下分别进样进行测定，计算回收率。没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚回收率分别为

99.56%、98.71%、98.37%、99.68%、99.13%、100.21%、98.7%、99.42%、100.06%，RSD 分别为 0.86%、1.35%、1.44%、1.75%、1.28%、0.97%、1.61%、1.04%、0.93%。

2.9 样品测定

取内蒙古野生赤芍样品溶液按上述高效液相色谱条件进样分析，根据线性回归方程计算 9 种单体化合物的含量，见表 2。

通过对不同地点赤芍样品的检测结果可以看出，来自克什克腾旗的赤芍中没食子酸、芍药苷、苯甲酸和苯甲酰芍药苷含量较高，而来自阿荣旗的赤芍中芍药内酯苷和没食子酰葡萄糖的含量高于其他 3 个地点样品。

3 讨论

本实验建立了 HPLC 同时测定赤芍提取物中 9 个活性成分的方法，达到操作简单、高效快速的测定目的，将检测波长定为 230 nm，可以一次完成 9 个成分的检测。没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、没食子酰葡萄糖和丹皮酚的最大吸收峰并不在 230 nm，方法学

表 2 不同样品中 9 种单体成分量

Table 2 Percentage of nine compounds in different samples

产地	质量分数/%								
	没食子酸	氧化芍药苷	儿茶素	芍药内酯苷	芍药苷	没食子酰葡萄糖	苯甲酸	苯甲酰芍药苷	丹皮酚
克什克腾旗	0.093±0.004	0.882±0.039	0.282±0.013	0.156±0.004	4.154±0.170	0.384±0.010	0.229±0.010	0.073±0.002	—
阿荣旗	0.023±0.000	0.883±0.028	0.215±0.009	0.455±0.012	3.909±0.135	0.408±0.014	0.083±0.001	0.051±0.002	—
莫力达瓦旗	0.022±0.001	0.820±0.030	0.150±0.005	0.065±0.002	3.917±0.169	0.325±0.015	0.115±0.003	0.020±0.000	0.006±0.000
额尔古纳右旗	0.018±0.000	0.416±0.017	0.076±0.001	0.190±0.005	3.103±0.144	0.251±0.009	0.132±0.003	0.028±0.001	0.009±0.000

—未检出

—not detected

考察结果表明它们在 230 nm 有着很好的线性关系,可以用来定量检测;但如果选择双波长(215、230 nm),甚至3波长(215、230、270 nm)切换法建立检测方法,标准曲线同样可取,可以提高一部分化合物的检测范围。

本实验建立的检测方法虽然是针对赤芍样品建立的,但是也可以应用于白芍,甚至含有赤芍或白芍的中成药成分检测过程中,同样具有高效、准确等优点。样品中多成分含量的同时检测有利于更全面地展示赤芍样品的药效物质基础,有利于更全面、准确地评价赤芍药材的质量,同样有利于实现在赤芍功能评价中更准确定量药效成分含量范围及不同成分间合理配比。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘 卉, 单进军, 康 安, 等. 甘草酸和甘草次酸对芍药苷在大鼠体内药动学参数的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1610-1614.
- [3] 崔广智. 芍药苷抗抑郁作用的实验研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 231-233.
- [4] 赵朕雄. 芍药内酯苷临床前药代动力学研究 [D]. 济南: 济南大学, 2015.
- [5] Fang X H, Wu X, Zhu X M, *et al.* Albiflorin attenuates inflammatory injury by regulating the TLR4 signaling pathway and its negative regulating factor Tollip in experimental models of ulcerative colitis [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2016, 25(5): 366-372.
- [6] 陈 岚, 龚正华, 薛 瑞, 等. 芍药内酯苷对嗅球切除抑郁模型大鼠行为学以及下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 340-344.
- [7] 王苗苗, 韩 杰, 娄海燕. 表没食子儿茶素没食子酸酯对心脑血管缺血再灌注损伤保护作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2732-2736.
- [8] 李惠晨, 胡 伟, 丁井永. 五没食子酰葡萄糖抗肿瘤的作用研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2014(9): 2255-2258.
- [9] 张建博, 谢 雨, 杨浩然, 等. 五没食子酰葡萄糖治疗 2 型糖尿病及其并发症药效机制研究进展 [J]. 药学研究, 2015(6): 344-348.
- [10] 冀兰鑫, 黄 浩, 李长志, 等. 赤芍药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 233-236.
- [11] 耿 帅, 赵育林, 曾 凯, 等. 丹皮酚的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(5): 310-313.
- [12] 高立民, 满其倩. 丹皮酚抗肿瘤作用及作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 300-303.