

芍药不同部位和不同采收期 6 个化学活性成分含量的比较

简在友¹, 俞敬波¹, 王文全^{1,2*}

(北京中医药大学 1. 中药学院, 2. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

摘要: 运用 RP-HPLC 法检测了赤芍不同采收期、不同生长年限和原植物不同部位的没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸和丹皮酚的含量。结果表明: 秋季采收的赤芍药材中儿茶素和芍药苷含量最高, 苯甲酸含量较低; 生长年限越长的赤芍儿茶素和芍药苷含量越高; 芍药根部的儿茶素和芍药苷含量最高, 鲜叶中也含有芍药苷。研究提示, 赤芍应以秋季采收成年植株为佳; 芍药苷在叶中已开始合成, 而儿茶素在叶中未检测到, 在根部占较大比例。

关键词: 赤芍; RP-HPLC; 采收期

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0489-05

RP-HPLC determination of main chemical components in different parts and different harvest periods of *Paeonia lactiflora*

JIAN Zai-you¹, YU Jing-bo¹, WANG Wen-quan^{1,2*}

(1. School of Chinese Pharmacy, 2. The Engineering Research Center for Chinese Medicine Standardized Production of Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: The contents of gallic acid, catechin, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid and paeonol extracted in different growth years, collecting season and of different parts of *Paeonia lactiflora* were determined. The results showed that the contents of catechin and paeoniflorin in *Paeonia lactiflora* collected in autumn are the highest, and the contents of benzoic acid was lower than that of those collected at other time. The longer is the age of *Paeonia lactiflora*, the higher is the contents of catechin and paeoniflorin. The contents of catechin and paeoniflorin in the root of *Paeonia lactiflora* were higher than those in other parts of the plant. There is a certain content of paeoniflorin in the leaves of *Paeonia lactiflora*. Judging from the result, paeoniflorin is synthesized in the leaf and then transported to the root. Catechin is not synthesized in the leaf, but mainly in the root. *Paeonia lactiflora* should be collected in autumn, and immature plant should not be collected.

Key words: *Paeonia lactiflora*; RP-HPLC; harvest season

赤芍 (*Radix Paeoniae Rubra*) 是常用中药, 来源于芍药科 (*Paeoniaceae*) 植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 或川赤芍 (又名赤芍) (*P. veitchii* Lynch) 的干燥根^[1, 2]。传统认为赤芍应是野生芍药或川赤芍的直接干燥根, 其品质高于以加工成白芍为主的栽培芍药^[3]。赤芍具有清热凉血、散瘀止痛功效, 用于温毒发斑、吐血衄血、目赤肿痛等^[1]。

芍药苷是中国药典中规定的赤芍质量指标成分^[1]; 儿茶素也被称为赤芍精, 具有抗氧化活性及活血化瘀作用, 也是赤芍中的重要药效成分^[3-5]; 没食子酸具有清除活性氧自由基等作用, 能抗氧化和抗血小板凝集^[6, 7]; 苯甲酸是赤芍中的有毒或有害成分^[8-10]。中国药典 (2005 版) 规定赤芍的采收期为春秋二季, 赤芍中芍药苷含量不得低于 1.8%^[1], 分析表明绝大多数赤芍的芍药苷含量高于这一指标, 但赤芍中上述这些活性成分含量在一年四季中有何变化目前还不是十分清楚, 而且芍药或川赤芍的不同生长部位

收稿日期: 2009-09-14.

*通讯作者 Tel: 86-10-84738623, Fax: 86-10-84738611,

E-mail: wwq57@126.com

以及生长年限与主要药效成分含量的关系也值得深入研究。野生芍药是赤芍的主要来源^[3], 作者采用 RP-HPLC 法测定了野生芍药不同部位和不同采收期的药材中主要活性化学成分含量, 分析了这些成分在不同部位、时期及年限的变化规律, 为合理综合利用赤芍资源提供理论基础。

材料与方法

仪器和试剂 Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (G1379A 脱气器; G1311A 四元泵; G1314A 型 UVD 检测器; G132813 进样器; Agilent 1100 色谱工作站)。

没食子酸 (批号: 110831-200302), 儿茶素 (批号: 110877-200001), 芍药苷 (批号: 110736-200630), 苯甲酸 (批号: 100419-200301), 丹皮酚 (批号: 110708-200505) 和芍药内酯苷 (含量 99.5%), 均于 2009 年 3 月购自中国药品生物制品检定所。芍药对照药材购自中国药品生物制品检定所 (批号 121093-200402)。

不同采收时期和不同部位的材料于 2008 年 6 月~2009 年 5 月采自河北省围场县御道口乡牧场 (距赤芍道地产区多伦 36 km), 每次分别在不同地点采 30 株根部粗细一致的成年 (开花) 野生芍药植株。野生芍药种子播种的实生苗和野生芍药芽头栽培的分株苗材料于 2008 年 10 月采自有大量野生芍药分布的吉林省梨树县十家堡乡何家村 (这些材料来自同一块平缓的山坡地), 每类材料在不同栽培行随机取样 10 株。样品材料原植物经中国中医研究院中药研究所冯学峰教授鉴定为芍药。

标准曲线 精确配制含芍药苷 $1.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、芍药内酯苷 $0.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、儿茶素 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、没食子酸 $0.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、苯甲酸 $0.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、丹皮酚 $0.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 然后分别稀释 2、4、8、32、64 和 128 倍, 在色谱条件下分别进样测定各对照品色谱峰面积, 利用 SPSS 统计软件计算各对照品浓度与色谱峰面积的线性回归方程和 r 值。

供试品溶液 样品干燥粉碎后过 80 目筛, 混匀后在电子天平上称取样品粉末 0.20 g, 用 50%乙醇 20 mL 浸泡 30 min, 然后 90 °C 下回流提取 2 次, 每次回流 2 h, 回流后用定性滤纸过滤。滤液减压旋转蒸发至膏状 (75 °C, 0.08 MPa), 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀后再过 0.45 μm 的滤膜, 取续滤液。

色谱条件 色谱柱: DiamonsilC₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm ID, 5 μm)。流动相: 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.025% 磷酸水溶液。梯度洗脱条件: 0~18 min, A: 5%→12%; 18~22 min, A: 12%→15%; 22~32 min,

A: 15%; 32~45 min, A: 15%→20%; 45~55 min, A: 20%; 55~75 min, A: 20%→40%; 75~80 min, A: 40%。流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。检测波长: 230 nm。柱温: 室温 (25 °C, 空调控制)。进样量: 5 μL 。理论板数按芍药苷峰计算不低于 5 000。

方法学考察

精密度 精密称取没食子酸 0.20 mg、儿茶素 0.10 mg、芍药内酯苷 0.10 mg、芍药苷 2.00 mg、苯甲酸 0.30 mg 和丹皮酚 0.08 mg 配成 2 mL 溶液, 连续进样 6 次 (5 μL), 记录特征图谱。

重复性 精密称取 0.20 g 赤芍药材样品 6 份, 按供试品溶液制备方法操作, 各进样 1 次 (5 μL), 记录特征图谱。

稳定性 精密称取赤芍药材样品 0.20 g, 按供试品溶液制备方法操作, 分别在制备后 2、8、14、20、32 和 44 h 时进样 (5 μL) 测定, 记录特征图谱。

加样回收率 精密称取已测定含量的赤芍样品 3 份, 每份 0.10 g, 分别精密加入含没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸和丹皮酚各一定量的对照品溶液。按供试品溶液制备方法制成供试品溶液, 各进样 1 次 (5 μL), 记录指纹图谱。

结果

1 方法学考察

1.1 芍药根的色谱分离 芍药根部典型色图谱见图 1。

1.2 标准曲线、精密度、重复性和稳定性 6 个对照品浓度 (x) 与对应的峰面积 (y) 线性回归方程见表 1。比较各色谱峰的相对保留时间和其峰面积, 计算得 RSD 值。

1.3 回收率 没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸和丹皮酚回收率结果 RSD 分别为 5.07%、4.67%、1.16%、2.21%、4.86% 和 1.53%。

2 芍药不同部位的主要化学成分含量差异

2008 年采自河北省围场县的芍药不同部位各主要化学成分含量经 HPLC 检测见表 2。

野生芍药各部位化学成分含量检测结果表明, 虽然儿茶素、芍药苷等药效成分在茎、种子和根茎中也有少量分布, 但主要还是分布在根部。夏季芍药鲜叶和茎中含有没食子酸和芍药苷, 但在秋季干燥的老茎叶中芍药苷含量已很少或在检测限以下。另外, 在干燥的老茎叶中有较高含量的没食子酸和芍药内酯苷, 鲜叶中也有较大比例的芍药内酯苷。

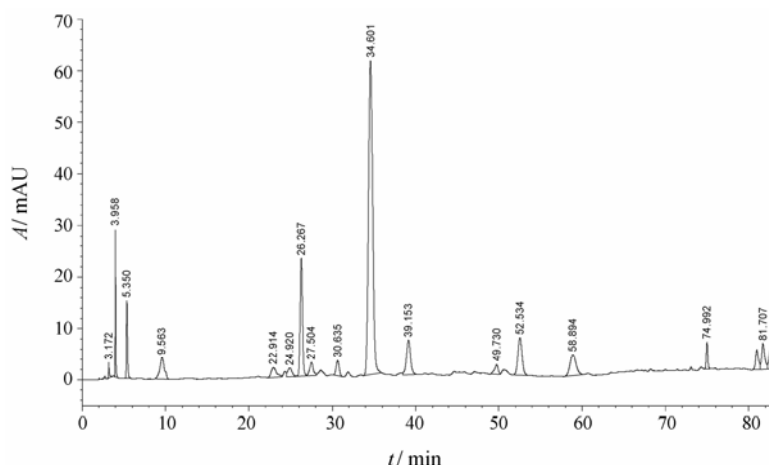


Figure 1 Chromatograms of *Paeonia lactiflora*. The retention times (9.563, 26.267, 30.635, 34.601, 52.534, and 81.707 min) represent gallic acid, catechin, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid, and paeonol, respectively

Table 1 Standard curves of references and their limits and verifying the HPLC method(RSD of peak areas: %)

Component	Formula	<i>r</i>	Limit /%		Precision	Repeatability	Stability
			Max.	Min.			
Gallic acid	$y = 10\,018.8x + 24.23$	0.999	4.268	0.013	2.16	10.8	6.25
Catechin	$y = 20\,917x + 83.78$	0.996	0.491	0.002	2.44	3.39	5.99
Albiflorin	$y = 6\,563.8x + 42.55$	0.999	1.014	0.003	3.79	4.52	4.69
Paeoniflorin	$y = 6\,135.1x + 437.27$	0.999	8.232	0.026	2.54	3.87	2.75
Benzoic acid	$y = 27\,448x + 164.68$	0.999	4.310	0.003	2.61	3.95	4.68
Paeonol	$y = 23\,413x - 9.4672$	0.999	1.529	0.005	2.34	4.14	4.12

Table 2 Difference of main constituent contents between different parts of *P. lactiflora* (%)

Part	Gallic acid	Catechin	Albiflorin	Paeoniflorin	Benzoic acid	Paeonol
Green leaf in July*	0.021 4	Below limit	0.615 1	0.929 1	0.046 0	Below limit
Green stem in July*	0.025 4	Below limit	Below limit	1.850 0	0.006 4	0.008 6
Fresh flower in May*	Below limit	0.024 4	0.082 6	Below limit	Below limit	Below limit
Dry stem in Oct.	0.779 0	0.030 6	0.633 5	0.162 7	0.023 2	0.036 7
Dry leaf in Oct.	0.363 3	0.014 5	0.415 1	Below limit	Below limit	0.049 4
Fruit in Oct.	0.126 2	0.081 5	0.149 5	Below limit	0.010 7	Below limit
Seed in Oct.	Below limit	0.102 7	0.079 5	1.480 5	0.031 4	Below limit
Rhizoma in Aug.	0.059 7	0.168 6	0.942 7	3.593 1	0.018 4	0.037 5
Root in Aug.	0.047 5	0.138 8	0.241 4	6.887 5	0.040 3	0.059 3
Reference	Below limit	0.022 6	0.098 3	4.939 6	0.142 9	0.056 3

*Drought at 50 °C before extracting

3 芍药不同采收时期根中主要化学成分含量差异

在河北省围场县按不同时期采集芍药根, 经 HPLC 检测各主要化学成分含量见表 3。

不同采收时期芍药根中所测的化学成分含量差异较大。主要药效成分芍药苷含量在夏季最低, 春季时含量高于夏季, 秋季时含量最高。儿茶素含量也是秋季时最高, 春季时最低。没食子酸和芍药内酯苷含量在 5 月份最高。苯甲酸含量在 5 月份较低, 其他时期变化不大。

4 不同年龄芍药实生苗根中主要化学成分含量差异

在吉林省梨树县分别采集当地野生芍药种子播

种的 1 年生、4 年生和 6 年生的实生苗根部药材, 经 HPLC 检测各主要化学成分含量见表 4。

野生芍药种子播种 1 年后没食子酸和芍药苷含量都较低, 也没有检测出儿茶素含量, 只有芍药内酯苷含量稍高。播种 4 年后主要药效成分含量已达到较高水平, 播种 6 年后芍药苷含量略有增加, 儿茶素含量明显增大, 而苯甲酸含量没有明显变化。

5 芍药芽头移栽不同年限根中主要化学成分含量差异

在吉林省梨树县分别采集当地野生芍药芽头移栽 1 年、2 年、3 年和 7 年的根部药材, 经 HPLC 检测各主要化学成分含量见表 5。

Table 3 Difference of main constituent contents between different harvest season (%)

Time	Gallic acid	Catechin	Albiflorin	Paeoniflorin	Benzoic acid	Paeonol
Mar. 20	0.062 1	0.097 2	0.203 1	6.643 1	0.030 2	0.019 4
May 15	0.151 0	0.015 2	0.482 4	5.529 0	0.003 1	0.029 4
June 14	0.078 4	0.137 1	0.293 0	6.268 4	0.033 9	0.098 2
Aug. 20	0.047 5	0.138 8	0.241 4	6.887 5	0.040 3	0.059 3

Table 4 Difference of main constituent contents between different ages of seedlings (%)

Age/year	Gallic acid	Catechin	Albiflorin	Paeoniflorin	Benzoic acid	Paeonol
1	0.013	Below limit	0.230 3	2.825 4	0.057 9	0.009 8
4	0.041 1	0.061 1	0.074 1	6.864 6	0.058 6	0.038 1
6	0.050 2	0.120 2	0.130 0	6.911 8	0.057 3	0.032 5

Table 5 Difference of main constituent contents between different growth years of transplanted rhizome (%)

Age/year	Gallic acid	Catechin	Albiflorin	Paeoniflorin	Benzoic acid	Paeonol
1	0.028 89	Below limit	0.053 0	1.196 7	0.055 4	0.021 8
2	0.031 9	0.194 5	0.028 1	3.885 4	0.013 6	0.014 3
3	0.164 6	0.035 7	0.041 8	3.436 7	0.036 7	0.018 6
7	0.048 2	0.234 1	0.018 5	4.902 2	0.032 9	0.022 0

芍药芽头移栽不同年限后根部药材各主要化学成分含量有一定差异。芽头移栽 1 年后根部芍药苷含量明显比移栽 2 年以上的药材中芍药苷含量低,也未测出儿茶素,但芍药内酯苷含量较高,移栽 2 年后芍药苷含量已达到中国药典 2005 版要求,移栽 7 年后根部芍药苷和儿茶素含量最高,而且芽头移栽 7 年后根部苯甲酸含量也较低。

讨论

赤芍主要药效成分在芍药各部位分布差异明显,根部分布较多。芍药苷在芍药新鲜的叶和茎中就存在,而在枯萎的干叶和茎中没有或含量很低,在根部含量最高。因此推测芍药苷在叶中就已合成,之后经茎运向根部。胡世林等^[11]也曾检测到芍药叶中含有芍药苷。儿茶素在新鲜的叶和茎中未测出含量,在枯萎的干叶和茎中很少,说明儿茶素是在根部合成的。芍药内酯苷在鲜叶和干燥茎中也有较高的含量,但在根中含量远没有芍药苷含量高。芍药内酯苷与芍药苷结构很相近,都属于单萜类化合物,区别在于一个内酯环^[12],单萜类化合物生物合成途径主要是异戊二烯途径,因此芍药内酯苷和芍药苷合成途径相近,推测二者含量上的较大差异与其稳定性或转运方式有关,但需要进一步证实。

中国药典 (2005 版) 规定赤芍的采收期为春秋二季^[1]。作者分别检测了在 3、5、6 和 8 月份采收的野生芍药根部药材中没食子酸、儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸和丹皮酚的含量 (表 4)。结果发现虽

然春秋季节芍药苷的含量比夏季的高,但秋季儿茶素和芍药苷的含量还是要比春季的相对高些,春季赤芍药材中丹皮酚的含量也明显偏低。实验结果还显示没食子酸和芍药内酯苷的含量在夏季较高。儿茶素具有抗氧化活性及活血化瘀作用,也是赤芍中的重要药效成分^[3-5]。因此秋季赤芍比春夏季好。至于冬季野生芍药根部药材中相应成分含量的高低有待进一步研究。

野生芍药种子播种 1 年后没食子酸、芍药苷和丹皮酚的含量明显偏低,也未检测出儿茶素,但芍药内酯苷含量相对较高。播种 4 年后药材中主要药效成分已达到较高水平。在芍药生长过程中儿茶素含量一直在增长,但苯甲酸含量却没有明显增长,这与盛振华等^[8]的研究结果相近。野生芍药芽头栽培后也有同样趋势,栽培 2 年后芍药苷已达到中国药典 (2005 版) 规定的水平。有研究^[13]认为白芍中芍药苷含量也是随着栽培年限的延长而增大。因此作者分析芍药生长年限短的幼嫩部位没食子酸、儿茶素和芍药苷不如生长年限长的成熟部位积累的多,而幼嫩部位的芍药内酯苷积累较多。生长年限越长的赤芍儿茶素含量越高,作者推测这正是赤芍品质与生长年限相关的理论基础。苯甲酸是赤芍中的有毒或有害成分^[8-10],生长年限短的赤芍苯甲酸含量也不低。此外,根据作者的调查,野生芍药根茎较短,自然分蘖繁殖能力弱,植株更新和种群扩展主要靠种子繁殖。而野生芍药种子苗生长 6~7 年根才能达到采收大小。由此作者建议采收赤芍时要留下小苗,这样不仅使赤芍资源能

够持续地利用, 而且采收的药材质量也高。

当然, 仅仅根据赤芍中一种或少数几种化学成分含量的大小来评价药材质量不完全合理。最终的评价标准应该是药材药效的大小, 但这种方式程序复杂且费用高, 目前还是主要检测化学成分含量, 不过这些主要化学成分含量之间的相关性值得继续深入研究。

References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 109.
- [2] Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. Flora of China (Volume 27) (中国植物志) [Z]. Beijing: Science Press, 1979: 37–59.
- [3] Zhou HT, Luo YQ, Hu SL, et al. A comparative study on content of major constituents between Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba by HPCE [J]. China Pharm J (中国药学杂志), 2003, 38: 654–657.
- [4] Zhang YY, Zhao WX. Study on the effect of Chi Shao on liverish disease and its mechanism [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med (陕西中医), 2003, 24: 655–656.
- [5] Huang HL, Wang GM, Xu B. Study on antioxidant activity and constituents of radix *Paeonia veitchii* [J]. Food Sci (食品科学), 2007, 28: 76–82.
- [6] Yang XQ, Sheng R. Mechanism of scavenging effects of (–)-epi-galloatechin gallate on active oxygen free radical [J]. Acta Pharmacol Sin, 1994, 15: 350–353.
- [7] Wu KX, Li MY, Chen L, et al. Synthesis of gallic acid esters and their antibloodplatelet aggregation [J]. Fine Chem (精细化工), 1998, 15: 9–12.
- [8] Sheng ZH, Yu CH, Wu QF. Determination of peoniflorin and benzoic acid in duration of cultivation of plant in Radix Paeoniae Rubra [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2008, 26: 1106–1107.
- [9] Song JY, Zeng XY. Analysis on the content of peoniflorin and benzoic acid in different parts in *Paeonia lactiflora* [J]. Zhejiang Clin Med J (浙江临床医学), 2006, 8: 1231.
- [10] Lü N. Experiment with the toxicity of sodium benzoate and its abnormalities [J]. J Toxicol (毒理学杂志), 2006, 20: 326–327.
- [11] Hu SL, Fu GL, Feng XF, et al. Content determination of peoniflorin in Chi Shao in different locations and came from different part of plant [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2000, 25: 714–716.
- [12] Shen TY, Zhang GB, Lü JN. Analysis on chemical constituents of *Paeonia lactiflora* Pall. Produced in Inner Mongolia by HPLC-DAD/ESI-MS [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28: 256–259.
- [13] Hong YS, Tian YM, Li ZQ. Determining the content of peoniflorin in different ages in Bai Shao [J]. Shandong Pharm Ind (山东医药工业), 2002, 21: 13–14.