

· 中药工业 ·

白芍不同提取方法及指纹图谱的研究[△]张娟¹, 刘美¹, 肖炯昌¹, 李先宽¹, 苏永健², 马琳^{1*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 清华德人西安幸福制药有限公司, 陕西 西安 710043)

[摘要] 目的: 提高白芍有效成分提取率, 优化提取工艺, 完善质量控制方法, 促进白芍加工过程标准化。方法: 采用 HPLC 考察不同提取工艺对白芍药材中芍药苷、芍药内酯苷及没食子酸成分含量的影响; 并对 23 批白芍药材进行指纹图谱分析。结果: 超声时间为 30 min 时, 50% 甲醇对没食子酸、芍药内酯苷的提取率较高; 70% 乙醇对芍药苷的提取率较高; 指纹图谱共有模式中 23 批白芍样品生成 19 个共有峰, 亳白芍和杭白芍指纹图谱之间差异较大。结论: 不同提取溶剂对白芍药材中不同成分的溶出度不同, 超声提取优于回流提取, 提取时间为 30 min 时 3 种成分的提取量最高; 同时实验所建立的指纹图谱重复性好, 有助于全面、科学地评价白芍药材质量。

[关键词] 芍药苷; 芍药内酯苷; 没食子酸; 提取工艺; 指纹图谱;

Study on Different Extraction Methods and Fingerprint of *Paeonia lactiflora*ZHANG Juan¹, LIU Mei¹, XIAO Jiong-chang¹, LI Xian-kuan¹, SU Yong-jian², MA Lin^{1*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tsing Hua De Ren Xi'an Happiness Pharmaceutical Co., Ltd, Shanxi 710043, China)

[Abstract] **Objective:** To improve the extraction rate of effective ingredients, optimize the extraction process, improve the quality control methods, and promote the standardization of *Paeonia lactiflora* processing. **Methods:** HPLC method was applied to investigate the effects of different extraction methods on the contents of paeoniflorin, albiflorin and gallic acid in *P. lactiflora*. Meanwhile the fingerprint analysis was used to analyze 23 batches of *P. lactiflora*. **Results:** Firstly, the extraction rate of gallic acid and albiflorin was higher in the condition of 50% methanol together with 30 minutes ultrasound time. Secondly, the extraction rate of paeoniflorin was higher in the condition of 70% ethanol together with 30 minutes ultrasonic time. Thirdly, there were 19 common peaks in the 23 batches of *P. lactiflora* showing a great difference between fingerprints of *P. lactiflora* in Bozhou and *P. lactiflora* in Hangzhou. **Conclusion:** The extracting solvents has a certain impact on the dissolution rate of different components in *P. lactiflora*. Ultrasonic extraction is superior to reflux extraction. The extraction rate of the three components is the highest with thirty minutes. The fingerprint established by the experiment is well reproducible, which can contribute to a comprehensive and scientific evaluation of the quality of *P. lactiflora*.

[Keywords] paeoniflorin; albiflorin; gallic acid; extraction process; HPLC fingerprint

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180725005

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 性凉, 味苦、辛、酸, 微寒, 归肝、脾经。可止痛平肝、柔肝补血、收汗敛阴、平抑肝阳等, 现代医学研究表明, 白芍在抗氧化活性, 调节免疫系统, 保护心血管系统、中枢神经系统等过程中体现一定的治疗作用^[1-3]。这些治疗作用与白芍中活性成分密切相关, 据研究, 白芍中主要有萜苷类、鞣质类、有机酸类等化合物, 目前对白芍的质量控

制主要以芍药苷为考察指标, 这种单一成分的检测难以全面控制白芍内在质量, 并且随着中药生产工业水平的不断提高, 企业以追求高效无污染、操作简便、成本低、利于储存的中药提取方法也日趋显著, 本研究以白芍中芍药苷和芍药内酯苷及没食子酸的含量为指标, 比较不同的提取工艺对 3 种成分含量的影响, 并建立不同产地、不同规格白芍药材的指纹图谱。以期高效合理地利用白芍药材资源及中药规

[△] [基金项目] 生血宝合剂标准化建设(ZYBZH-C-QIN-46)

* [通信作者] 马琳, 教授, 研究方向: 中药资源与中药生物工程研究; E-mail: malin7983@163.com

范化生产、标准化加工、综合评价药材质量提供一些参考和借鉴,为白芍药材及其他含白芍的中药复方制剂制定质量标准提供数据依据^[4-5]。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 液相色谱仪,二元泵、SPD-20A 紫外-可见光检测器、柱温箱、LCsolution 色谱数据工作站;KH3200B 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DFT-200 中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司);FA2004 电子天平(上海精天电子仪器有限公司);BT125D 分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 试剂

对照品芍药苷、没食子酸(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-201741、110809-201205);对照品芍药内酯苷(购自天津万象恒远科技有限公司,含量大于 98%);乙腈(色谱纯);甲醇(色谱纯);磷酸(分析纯);水为重蒸馏水。

白芍药材经天津中医药大学马琳教授鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* pall 的干燥根,分别产于安徽亳州及浙江杭州。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo hypersil BDS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)梯度洗脱 0.01 min, 5% A; 0.01 ~ 5 min, 13% A; 5 ~ 7 min, 15% A, 7 ~ 18 min, 15% A; 18 ~ 25 min, 25% A; 25 ~ 42 min, 50% A, 42 ~ 45 min, 5% A。检测波长为 230 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL;体积流量为 1 mL·min⁻¹。

2.2 提取工艺的考察

2.2.1 提取方法 超声提取:精密称取白芍样品根的粉末约 0.2 g,置 25 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶解,超声提取 30 min;放冷,加 70% 乙醇定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

加热回流提取:精密称取白芍样品根的粉末约 0.2 g,置 50 mL 单口圆底烧瓶中,用移液管加 70% 乙醇 25 mL,称定重量,球形冷凝管加热回流提取

30 min;放冷,称定重量,加 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。提取方法的考察结果见表 1。

表 1 提取方法考察结果

提取方法	称样量/ g	没食子酸 (%)	芍药内酯苷 (%)	芍药苷 (%)	单萜苷总和 (%)
超声	0.204 2	0.13	0.65	3.64	4.29
加热回流	0.201 3	0.10	0.43	3.54	3.97

结果表明,用 70% 的乙醇超声提取 30 min 时,芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸的含量均比用 70% 的乙醇加热回流提取 30 min 含量高。

2.2.2 提取时间 精密称取白芍样品根的粉末 4 份,每份约 0.2 g,置 25 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶解,分别超声提取(频率为 45 Hz,功率为 240 W) 15、30、45、60 min,放冷,加 70% 乙醇定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。提取时间的考察结果见表 2。

表 2 提取时间考察结果

提取时间/ min	称样量/ g	没食子酸 (%)	芍药内酯苷 (%)	芍药苷 (%)	单萜苷总和 (%)
15	0.201 6	0.10	0.61	3.37	3.98
30	0.208 2	0.15	0.65	3.68	4.33
45	0.204 6	0.09	0.62	3.25	3.87
60	0.208 2	0.12	0.64	3.43	4.07

结果表明,超声时间为 30 min 时,芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸的含量最高,因此制备供试品溶液的最佳提取时间为 30 min。

2.2.3 提取溶剂 精密称取白芍样品根的粉末 6 份,每份约 0.2 g,置 25 mL 容量瓶中,分别加 50% 甲醇、50% 乙醇、70% 甲醇、70% 乙醇、无水甲醇、无水乙醇溶解,超声提取(频率为 45 Hz,功率为 240 W)30 min,放冷,加相应的提取溶剂定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。提取溶剂的考察结果见表 3。

表 3 提取溶剂考察结果

提取溶剂	称样量/ g	没食子酸 (%)	芍药内酯苷 (%)	芍药苷 (%)	单萜苷总和 (%)
50% 甲醇	0.207 1	0.14	0.66	3.60	4.26
50% 乙醇	0.202 8	0.11	0.64	3.51	4.15
70% 乙醇	0.204 2	0.13	0.65	3.68	4.33
70% 甲醇	0.205 1	0.10	0.24	3.49	3.73
无水甲醇	0.208 0	0.07	0.14	3.00	3.14
无水乙醇	0.207 4	0.04	0.06	2.01	2.07

结果表明,70%乙醇提取的样品,芍药苷的含量最高;50%甲醇提取的样品芍药内酯苷和没食子酸的含量最高;但单萜苷的总和(芍药苷和芍药内酯苷)用70%的乙醇提取的含量最高。

通过上表数据可得,当测定白芍中芍药内酯苷、没食子酸的含量时,供试品溶液的制备方法应为取白芍样品根的粉末,精密称定,加50%甲醇定容,超声处理30 min,取出,放至室温,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,离心,即得。测定白芍中芍药苷的含量时供试品溶液的制备方法应为取白芍样品根的粉末,精密称定,加70%乙醇定容,超声处理30 min,取出,放至室温,用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,离心,即得。

2.3 没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷成分的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸对照品适量,置于10 mL棕色容量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,作为对照品溶液,3个对照品溶液的质量浓度分别为75、75、53 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 供试品溶液的制备 同2.1项下所述。

2.3.3 线性关系考察 取芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸对照品精密称定,以甲醇溶解并稀释至5 mL容量瓶中,摇匀,分别配置成质量浓度分别为0.400、0.120、0.076 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,作为母液,依次对倍稀释7个浓度,分别精密吸取10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行回归计算,得3种成分的回归方程,结果表明,各化合物在相应浓度范围内线性关系良好,结果见表4。

表4 线性关系考察结果			
	回归方程	相关系数	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
没食子酸	$Y=2\,630.2X-7\,677.3$	0.999 4	1.187 5~76
芍药内酯苷	$Y=5\,651.2X+6\,097.3$	0.999 8	1.875 0~120
芍药苷	$Y=8\,181.3X+14\,854$	0.999 8	6.250 0~400

2.3.4 精密度试验 精密称取芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸2.00、0.60、0.38 mg,定容到5 mL容量瓶中,制备对照品溶液,连续进样6次。测定峰面积,计算芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸峰面积的RSD分别为1.12%、1.45%、1.85%。结果表明,仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 精密称取白芍样品(AH05)6份,制备供试品溶液,计算芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸峰面积的RSD分别为1.55%、2.69%、2.41%。结果表明,该方法的重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 精密称取白芍样品(AH05)1份,制备供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、24 h注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸峰面积的RSD分别为2.50%、1.47%、1.58%,结果显示供试品溶液在24 h内稳定。

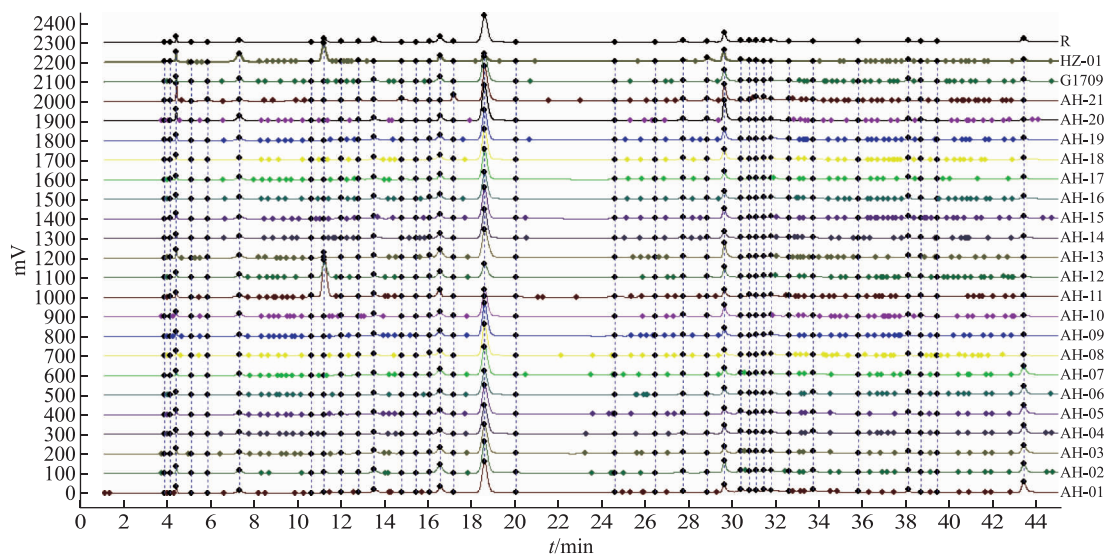
2.3.7 加样回收率 精密称取白芍样品(AH05)6份各40 mg,分别加入没食子酸对照品约0.03 mg、芍药内酯苷对照品约0.23 mg、芍药苷对照品约1.76 mg,按2.3项制成供试品溶液,进行测定,计算回收率,结果芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸的回收率和RSD分别为97.83%、2.7%;100.42%、3.0%;101.00%、2.5%。

2.4 白芍高效液相色谱-二级阵列检测器(HPLC-DAD)指纹图谱共有模式的建立

2.4.1 指纹图谱的采集 按2.2项下供试品溶液的最终制备方法制样,依照2.1项下的色谱条件测定,应用药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版),建立23批白芍药材样品的HPLC-DAD指纹图谱,结果见图1。采用中位数法进行特征峰筛选,AH20作为参照图谱,经多点校正最终得到的共有模式图,确定了19个共有峰,结果见图2。经与对照品定性,图中1号峰为没食子酸,6号峰为芍药内酯苷,8号峰为芍药苷,对照品色谱图见图3。

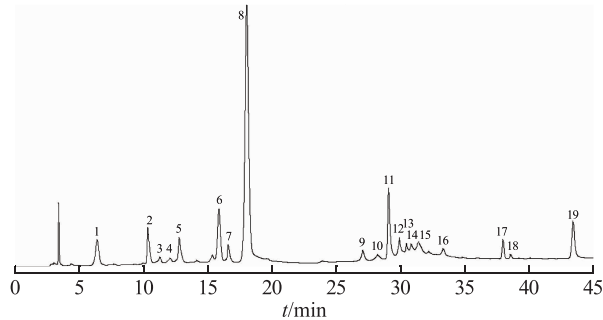
2.4.2 样本指纹图谱相似度分析 将23批药材样本与计算得到白芍药材共有模式相比较,计算夹角余弦相似度。结果显示,有3批样品相似度低于0.9,其他各批次的相似度均在0.9以上。相似度计算结果见图4。

由上图可以看出样本11、样本12和样本23相似度低于0.9,3个样本相似度低的主要原因是芍药苷色谱峰面积比值在其指纹图谱中不占主导地位,故属离群样本,而样本11、12为硫熏白芍,由图1中AH-11、AH-12的色谱图可以看出芍药苷与其他未硫熏白芍样品相比,色谱峰明显偏低。本实验所收集样品除样本23为杭白芍,其相似度低于0.9,其他亳白芍样本相似度均为0.9~1.0,说明同一产地药材的化学组成比较接近,不同产地样本差异性较大。



注：AH01 ~ AH21. 亳白芍(编号 1 ~ 21)；G1709(编号 22)；HZ01. 杭白芍(编号 23)。

图 1 白芍药材色谱叠加图



注：1. 没食子酸；6. 芍药内酯苷；8. 芍药苷。

图 2 白芍指纹图谱共有模式图

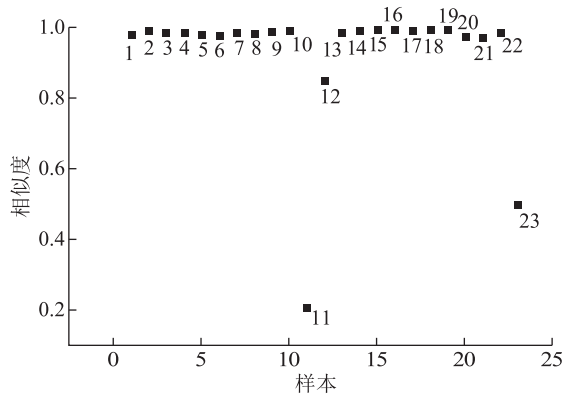
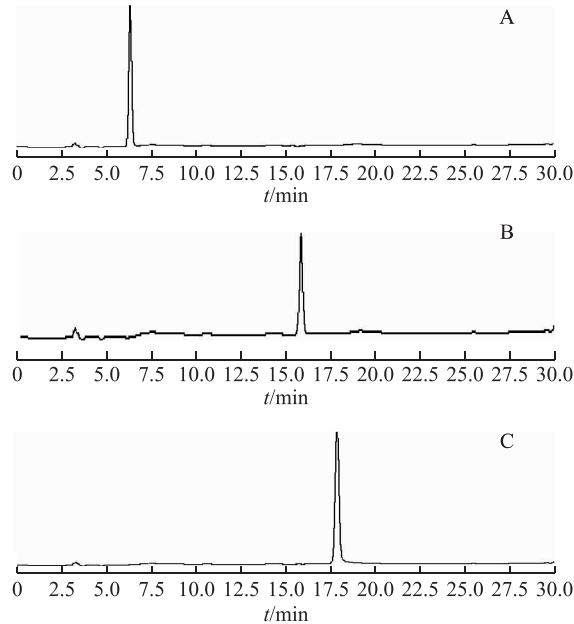


图 4 23 批样品 HPLC-FP 相似度评价结果



注：A. 没食子酸；B. 芍药内酯苷；C. 芍药苷。

图 3 白芍药材对照品的 HPLC 图

3 讨论

文中采用 HPLC 分别考察了不同提取方法、不同提取时间及不同提取溶剂对白芍中没食子酸、芍药苷、芍药内酯苷 3 种成分提取率的影响，以具体数值的形式获得最佳提取工艺，该方法不仅具有实用性，而且还具有可比性，希望可以为白芍中芍药苷、芍药内酯苷及没食子酸成分的深入开发研究提供理论依据。同时严格控制中药材及复方制剂的生产加工，深入研究过程工艺对充分发挥中药活性成分的作用及中药材标准化建设具有十分重要的意义。

查阅白芍近十年有关含量测定及指纹图谱的文献，大部分研究^[6-13]所建立的含量测定及指纹图谱的方法主要以芍药苷和芍药内酯苷为主。中药的成分复杂多样，同时中药的功能具有全方位、多靶点的特征，应更全面、更深入地研究中药中具有药效

作用的活性成分,白芍中芍药内酯苷为芍药苷的同分异构体,在白芍中的含量仅次于芍药苷,是另一种具有代表性的萜苷类化合物。而没食子酸在白芍药材中虽然含量较少但是其抗炎、抗突变、抗自由基等作用不容忽视,具有重要研究价值。因此本实验同时选取了没食子酸及芍药苷、芍药内酯苷3个活性成分^[14]。

根据不同溶剂的考察结果可知,没食子酸、芍药内酯苷的提取量:50%甲醇>70%乙醇>50%乙醇>70%甲醇>无水甲醇>无水乙醇。50%甲醇和70%乙醇的提取率相差不大,考虑到甲醇的毒性较乙醇大,也有文献报道样品在加热提取过程中,甲酯化比乙酯化更容易发生,所以适当的情况下可以考虑用70%乙醇代替50%甲醇提取白芍中的没食子酸及芍药内酯苷^[15]。

本实验分别对芍药苷、芍药内酯苷和没食子酸在200~700 nm波长下扫描,215 nm下没食子酸的吸光度最高,芍药苷及芍药内酯苷在230 nm下的吸光度最高,但215 nm受末端吸收影响,干扰峰较多,230 nm处基线平稳,色谱峰数目较多,故检测波长确定为230 nm。

该实验所建立的指纹图谱同时对比分析了硫熏与未硫熏白芍的成分变化,比较了亳白芍和杭白芍色谱峰的差异性,HPLC指纹图谱相似度分析结果与白芍不同样本中芍药苷的含量高低一致,二者结合可更科学、全面地评价药材质量。且所建立的指纹图谱测定方法中芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸3个指标成分在18 min之前出峰,出峰时间较短,实验方法简便,在企业大批量检测样品时不仅重复性好,而且省时,可为制定实用性的团体标准提供参考。

参考文献

[1] 崔虹,朱佳茜,冯秋芳,等. 中药白芍化学成分及生物活

性研究进展[J]. 海峡药学,2017,29(09):1-5.

- [2] 左志燕,詹淑玉,黄媛,等,姜宁华. 白芍总苷保肝作用的药动学和药效学研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(20):3860-3865.
- [3] 吴芳,杜伟锋,徐姗姗,等. 白芍化学成分及质量评价方法研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2012,36(05):613-615.
- [4] 谭菁菁,赵庆春,杨琳,等. 白芍化学成分研究[J]. 中草药,2010,41(08):1245-1248.
- [5] 金林,赵万顺,郭巧生,等. 响应面法优化白芍提取工艺的研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(15):2988-2993.
- [6] 宗志勇,郑金凤,路广义,等. 白芍药材主根与根茎的HPLC指纹图谱比较研究[J]. 中国药房,2017,28(27):3865-3867.
- [7] 廖彩霞,郑太华,成守玲,等. 白芍道地药材的高效液相指纹图谱研究[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(09):938-940.
- [8] 李伟铭,赵月然,杨燕云,等. HPLC波长切换法同时测定白芍饮片中9个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(12):2208-2212.
- [9] 朱如彩,蔡萍,李雅,等. 不同产地白芍HPLC指纹图谱及芍药苷和芍药内酯苷含量的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(03):34-37.
- [10] 代冬梅,陆萍,江海亮,等. 不同产地及引种栽培白芍药材指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(03):717-719.
- [11] 欧金梅,吴德玲,金传山,等. HPLC法同时测定白芍总苷中4种单萜苷的含量[J]. 中药材,2013,36(03):423-425.
- [12] 郑金凤,王景红,宗志勇,等. 基于HPLC技术分析白芍根茎与主根部分的主成分含量差异[J]. 环球中医药,2016,9(08):928-930.
- [13] 程林,浦锦宝,郑军献,等. 白芍HPLC指纹图谱研究[J]. 中国中医药科技,2012,19(06):512-514.
- [14] 张晓燕,王金辉,李锐. 白芍的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报,2001,6(01):30-32.
- [15] 刘媛,周劲松,陈玉俊,等. 白芍提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(07):1239-1240.

(收稿日期 2018-07-25)