

# 白芍药材主根与根茎的HPLC指纹图谱比较研究

宗志勇\*, 郑金凤, 路广义, 秘砚鸿, 苏爽, 王景红<sup>#</sup>(中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

中图分类号 R283.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3865-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.34

**摘要** 目的:建立白芍药材主根与根茎的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并比较两者的异同。方法:色谱柱为Phenomenex C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为230 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以芍药苷为参照,测定白芍药材主根与根茎部分的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行共有峰指认和相似度评价。结果:白芍药材主根与根茎的HPLC图谱有9个共有峰;白芍药材主根与根茎之间相似度>0.9。结论:该研究所建指纹图谱可为白芍药材的鉴别和质量评价提供参考,白芍药材主根与根茎有效成分一致,差异性较小。

**关键词** 白芍;主根;根茎;指纹图谱;相似度分析

## Comparative Study on HPLC Fingerprints of Taproot and Rhizome of *Paeonia lactiflora*

ZONG Zhiyong, ZHENG Jinfeng, LU Guangyi, MI Xianhong, SU Shuang, WANG Jinghong (Wangjing Hospital of Chinese Academy of TCM, Beijing 100102, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprints of taproot and rhizome of *Paeonia lactiflora*, and to compare the similarity and difference of them. METHODS: The determination was performed on Phenomenex C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 230 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using paeoniflorin as reference, HPLC chromatograms of the taproot and rhizome of *P. lactiflora* were established. Common peak identification and similarity evaluation were performed by using TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 edition). RESULTS: There were 9 common peaks in HPLC chromatograms of taproot and rhizome of *P. lactiflora*. The similarity of taproot with rhizome of *P. lactiflora* was higher than 0.9. CONCLUSIONS: Established fingerprints can provide reference for identification and quality evaluation of *P. lactiflora*. The effective constituent of taproot and rhizome of *P. lactiflora* are uniform but have small difference.

**KEYWORDS** *Paeonia lactiflora*; Taproot; Rhizome; Fingerprint; Similarity analysis

白芍是一味常用中药,应用广泛,为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,具有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的作用<sup>[1]</sup>。白芍主产于安徽亳州、浙江杭州、四川中江等地,主要成分为芍药苷和芍药内酯苷等单萜类成分、三萜类成分和黄酮类成分等<sup>[2]</sup>。白芍药材根茎在加工过程中,属于非药用部位,被去除,但目前市场收购者众多;前期试验也表明,同株白芍药材根茎的芍药苷含量高于主根<sup>[3]</sup>。中药指纹图谱可以综合分析多种成分,近年来已成为中药质量控制的主要分析方法,目前以指纹图谱用于白芍药材质量控制的研究较多<sup>[4-6]</sup>。笔者从高效液相色谱(HPLC)指纹图谱角度来分析白芍药材主根和根茎主要成分之间的差异,探讨白芍药材根茎是否可作为药材使用,以期对白芍药材资源的开发利用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200B型HPLC仪,包括G1315C DAD检测器(美国Agilent公司);BP211D型电子分析天平(德国Satoris

公司);KQ5200DB型超声波清洗器(昆山市仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

芍药苷对照品(批号:110736-201337,纯度:>98%)、白芍对照药材(批号:120905-201109)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 药材

取来自同一种植基地3年生白芍药材(经中国中医科学院望京医院王景红主任药师鉴定为真品)10株,洗净,去除杂质、须根,保留其主根和根茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%→15% A; 10~30 min, 15%→20% A; 30~40 min, 20%→45% A; 40~50 min, 45%~65% A; 50~55 min, 65%→80% A; 55~60 min, 80% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芍药苷对照品适量,加乙

\* 主管药师。研究方向:医院药学。E-mail:tonyzong@sina.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:医院药学、临床药学。E-mail:wangjinghong2002@126.com

醇制成芍药苷质量浓度为83.2 μg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品粉末0.2 g,加50%乙醇溶液50 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷至室温,再次称定质量,用50%乙醇溶液补足减失的质量,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 对照药材溶液 精密称取白芍对照药材粉末(过2号筛)适量,按“2.2.2”项下方法制成对照药材溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以芍药苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,9个共有峰相对保留时间的RSD<0.17%,相对峰面积的RSD<0.58%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、1、2、4、6、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以芍药苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,9个共有峰相对保留时间的RSD<0.46%(n=8),相对峰面积的RSD<0.95%(n=8),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批药材样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以芍药苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,9个共有峰相对保留时间的RSD<0.84%(n=6),相对峰面积的RSD<1.23%(n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.4 指纹图谱的生成

2.4.1 HPLC指纹图谱的生成 取10批药材样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材样品(主根、根茎)的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1~图4。

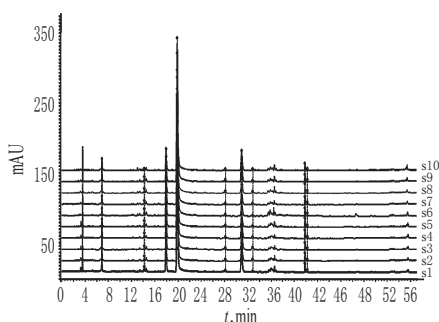


图1 10批药材主根样品HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposed fingerprints of 10 batches of the taproot of medicinal materials

2.4.2 共有峰相关数据分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材样品(主根、根

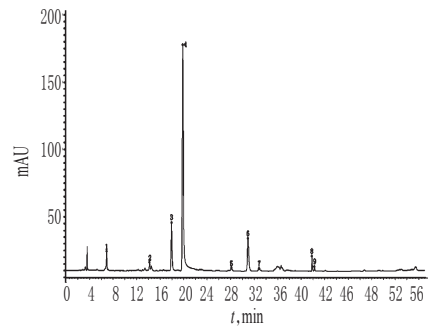


图2 药材主根样品HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprints of the taproot of medicinal materials

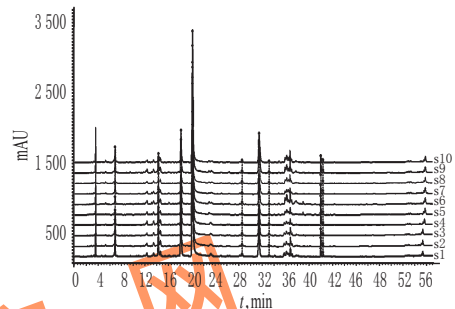


图3 10批药材根茎样品HPLC叠加指纹图谱

Fig 3 HPLC superposed fingerprints of 10 batches of the rhizome of medicinal materials

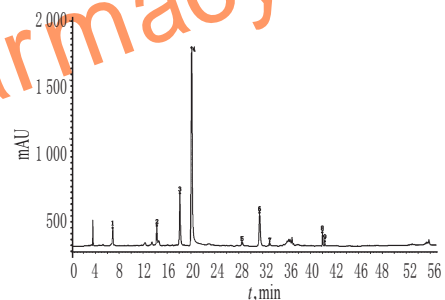


图4 药材根茎样品HPLC对照指纹图谱

Fig 4 HPLC control fingerprint of the rhizome of medicinal materials

茎)的HPLC图谱进行比较分析。10批药材主根、根茎样品均共有9个共有峰,共有峰的峰面积总和大于总峰面积的90%,通过对照品HPLC色谱确定4号峰为芍药苷。以4号峰为参照峰,计算其他共有峰相对于4号峰的相对保留时间,详见表1、表2。

2.4.3 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批药材主根和根茎样品的HPLC图谱进行比较分析<sup>[7]</sup>。结果,10批药材主根和根茎样品相似度均>0.9,详见表3、表4。

2.4.4 药材主根和根茎样品指纹图谱对比 将药材主根和根茎样品生成的指纹对照图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版),进行相似度评价。结果,白芍药材主根和根茎之间相似度为0.997,图谱整体结构基本一致,相似度很高,说明从指纹图谱研究来看,

两者主要成分一致,差异性较小,关系很近。

表1 10批药材主根样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of the taproot of medicinal materials

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD,%
1	0.347	0.347	0.347	0.347	0.347	0.345	0.348	0.349	0.350	0.349	0.348	0.41
2	0.716	0.716	0.715	0.715	0.714	0.710	0.716	0.716	0.717	0.717	0.715	0.29
3	0.903	0.904	0.903	0.903	0.903	0.902	0.904	0.904	0.904	0.904	0.903	0.08
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
5	1.420	1.418	1.419	1.419	1.420	1.420	1.414	1.412	1.414	1.414	1.417	0.22
6	1.566	1.564	1.565	1.565	1.565	1.561	1.552	1.548	1.551	1.551	1.559	0.47
7	1.657	1.655	1.655	1.654	1.654	1.648	1.654	1.655	1.656	1.657	1.655	0.15
8	2.116	2.113	2.111	2.107	2.105	2.078	2.106	2.112	2.114	2.115	2.108	0.53
9	2.136	2.133	2.131	2.128	2.125	2.097	2.126	2.132	2.134	2.135	2.128	0.54

表2 10批药材根茎样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of the rhizome of medicinal materials

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD,%
1	0.350	0.350	0.350	0.349	0.342	0.342	0.341	0.341	0.341	0.341	0.345	1.27
2	0.717	0.716	0.716	0.715	0.708	0.707	0.707	0.706	0.706	0.706	0.711	0.69
3	0.904	0.904	0.904	0.904	0.902	0.901	0.901	0.901	0.901	0.901	0.902	0.17
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
5	1.412	1.411	1.414	1.415	1.425	1.425	1.427	1.427	1.427	1.427	1.421	0.49
6	1.549	1.546	1.550	1.551	1.574	1.574	1.576	1.576	1.576	1.577	1.565	0.88
7	1.656	1.655	1.656	1.656	1.648	1.647	1.646	1.645	1.644	1.645	1.650	0.32
8	2.109	2.107	2.107	2.102	2.082	2.079	2.076	2.074	2.072	2.072	2.088	0.77
9	2.129	2.127	2.127	2.122	2.101	2.098	2.096	2.093	2.092	2.092	2.108	0.77

表3 10批药材主根样品相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation results of 10 batches of the taproot of medicinal materials

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.997	0.999	0.999	0.997	0.998	0.998	1.000	0.998	0.998
S2	0.997	1.000	0.998	0.999	0.993	0.995	0.996	0.997	1.000	0.999
S3	0.999	0.998	1.000	0.998	0.992	0.994	0.995	1.000	0.998	0.999
S4	0.999	0.999	0.998	1.000	0.997	0.998	0.999	0.998	1.000	0.999
S5	0.997	0.993	0.992	0.997	1.000	1.000	0.999	0.994	0.995	0.994
S6	0.998	0.995	0.994	0.998	1.000	1.000	0.999	0.996	0.997	0.996
S7	0.998	0.996	0.995	0.999	0.999	0.999	1.000	0.996	0.998	0.997
S8	1.000	0.997	1.000	0.998	0.994	0.996	0.996	1.000	0.998	0.999
S9	0.998	1.000	0.998	1.000	0.995	0.997	0.998	0.998	1.000	1.000
S10	0.998	0.999	0.999	0.999	0.994	0.996	0.997	0.999	1.000	1.000

### 3 讨论

本试验对白芍药材HPLC指纹图谱的色谱方法进行优化,对色谱柱型号、流动相比例、流速、柱温等进行筛选,建立了白芍药材主根和根茎有效成分的HPLC分析方法。

试验结果表明,白芍药材主根和根茎之间指纹图谱相似度很高,主要成分差异性较小。周学刚等<sup>[8-9]</sup>研究结

表4 10批药材根茎样品相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results of 10 batches of the rhizome of medicinal materials

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	0.995	0.992	0.991	0.987	0.991	0.998	0.995	0.995	0.995
S2	0.995	1.000	0.999	0.997	0.989	0.995	0.995	1.000	1.000	0.997
S3	0.992	0.999	1.000	0.994	0.984	0.992	0.991	0.999	0.999	0.998
S4	0.991	0.997	0.994	1.000	0.997	0.999	0.996	0.996	0.998	0.988
S5	0.987	0.989	0.984	0.997	1.000	0.998	0.995	0.989	0.991	0.978
S6	0.991	0.995	0.992	0.999	0.998	1.000	0.996	0.994	0.997	0.987
S7	0.998	0.995	0.991	0.996	0.995	0.996	1.000	0.995	0.996	0.991
S8	0.995	1.000	0.999	0.996	0.989	0.994	0.995	1.000	1.000	0.998
S9	0.995	1.000	0.999	0.998	0.991	0.997	0.996	1.000	1.000	0.996
S10	0.995	0.997	0.998	0.988	0.978	0.987	0.991	0.998	0.996	1.000

果显示,白芍药材地下各部分中芍药苷含量差异明显,均呈现根茎>须根>主根。白芍药材主根和根茎之间指纹图谱的相似度高,其共性可以说明白芍药材根茎有作为药用资源利用的物质基础。

综上所述,本研究所建指纹图谱可为白芍药材的鉴别和质量评价提供参考,芍药主根与根茎之间有效成分无明显差异。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:105.
- [2] 谭菁菁,赵庆春,杨琳,等.白芍化学成分研究[J].中草药,2010,41(8):1245-1248.
- [3] 郑金凤,王景红,路广义,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(8):928-930.
- [4] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药房,2011,22(19):1819-1822.
- [5] 童黄锦,白发平,汪小莉,等.不同产地白芍药材的指纹图谱研究[J].中医学报,2014,29(9):1326-1329.
- [6] 李红成,夏云华,曹岗.中药白芍指纹图谱的研究进展[J].中华中医药学刊,2013,31(2):282-284.
- [7] 关洪月,李林,刘晓,等.中药指纹图谱相似度计算方法探析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):282-287.
- [8] 周学刚,张丽萍,王艳芳,等.煎制对白芍中芍药苷含量的影响[J].医药导报,2011,30(1):82-85.
- [9] 周学刚,陈淑欣,魏东华,等.不同种质和不同部位白芍原植物中芍药苷和芍药内酯苷的含量测定[J].医药导报,2011,30(11):1477-1480.

(收稿日期:2017-03-07 修回日期:2017-06-20)

(编辑:张 静)