

HPLC、LC-MS 检测 3 种亳白芍栽培品种的质量

田亚男, 杨杰, 刘艳娜, 王强*

(中国药科大学中药分析教研室, 南京 210009)

摘要 目的: 建立用 HPLC、LC-MS 分析亳白芍 3 种栽培品种质量的方法。方法: 采用 LC-MS 方法对 3 种栽培品种的化学成分进行分析; HPLC 方法测定药材及其加工品中芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷的含量。结果: LC-MS 法结合对照品指出 10 个特征峰的归属。分析结果表明, 不同栽培品种间化学成分差异较大; 药材经传统加工后, 芍药苷含量明显增加。选出亳白芍栽培品种中 4 年生“蒲棒”和 5 年生“线条”为最佳品种。结论: 本实验方法简便、快速, 结果准确, 可为科学评价及有效控制亳白芍不同栽培品种的质量提供依据。

关键词 亳白芍; 栽培品种; HPLC; LC-MS; 芍药苷

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2009)03-0227-05

Quality analysis of 3 species of *Radix Paeoniae Alba* cultivated in *Bozhou* by HPLC and LC-MS

TIAN Ya-nan, YANG Jie, LIU Yan-na, WANG Qiang*

Department of Chinese Materia Medica Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To establish the HPLC and LC-MS methods for the quality analysis of the different species of *Radix Paeoniae Alba* cultivated in *Bozhou*. Methods: The LC-MS method was applied to analyze the chemical composition of the cultivated species, the HPLC method was applied to determine the contents of paeoniflorin, benzoic acid and paeonivayin in crude drugs and processing products. Results: 10 characteristic peaks were identified by LC-MS with reference standards. The significant difference was observed in the chemical compositions of 3 cultivated species. The significant difference was observed in the chemical compositions of 3 cultivated species. The content of paeoniflorin was increased significantly after traditional processing. The results indicated the 4-year-old “pubang” and 5-year-old “xiantiao” are the best cultivated species. Conclusion: The methods are simple, rapid and precise to assess and control the quality of different species of *Radix Paeoniae Alba* cultivated in *Bozhou*.

Key words *Radix Paeoniae Alba* in *Bozhou*; cultivated species; HPLC; LC-MS; paeoniflorin

《中华人民共和国药典》(2005 年版一部) 记载的白芍来源于毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根^[1]。据记载我国的白芍“主产浙江、安徽、四川等地”, “安徽产者称为亳白芍, 产量最大”^[2]。本文即对目前产量较大、质量较好、市场占有率较高的亳白芍进行研究。亳州当地药农根据其根的形态特征将其分为“蒲棒”、“线条”、“鸡爪”3 个品种。其特点是: “蒲棒”根分枝略呈纺锤形, 枝条短粗、质松, 生长周期短, 28 个月即可采

挖; “线条”根分枝呈圆柱形, 根条少而长, 粉性足, 质实, 色白净, 但此品种生长周期长, 4 年以上方可挖起; “鸡爪”主根不明显, 多分枝, 分枝呈圆锥形, 外观不佳^[3]。目前对这 3 个栽培品种的质量比较尚未见研究报道, 因此本实验建立了比较这 3 种栽培品种的 HPLC 方法, 应用 LC-MS 技术指出共有峰的归属, 并对芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷进行含量测定。本文可为规范亳白芍的生产及确保相关产品内在质量提供全面的质量控制手段。

1 材料

1.1 样品与试剂

本实验 12 批白芍药材(见表 1)均采自安徽亳州五马镇芍花村,经本研究组王强鉴定。12 批药材经亳州传统加工方法^[3]即水煮、去皮、晒干后得到 12 批加工品(见表 1)。芍药苷、苯甲酸、苯甲酰白芍苷对照品均为自制,根据 HPLC-UV 归一化法,纯度均大于 98%。乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司),水为双蒸水,乙醇(分析纯)。

Table 1 Samples of cultivated species and processed products of *Radix Paeoniae Alba* cultivate in Bozhou

Sample	Cultivated species	Age/year
a, a*, b, b*	Pubang	4
c, c*, d, d*	Pubang	5
e, e*, f, f*	Xiantiao	4
g, g*, h, h*	Xiantiao	5
i, i*, j, j*	Jizhua	4
k, k*, l, l*	Jizhua	5

* Processed product

1.2 仪器

HP 1100 高效液相色谱系统, DAD 检测器(美国 Agilent 公司); H66025T 型超声波仪(无锡超声电子仪器设备厂); BS110S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Shimpack ODS C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 预柱为 Zorbax ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm); 流动相: 溶剂 A(乙腈-甲酸, 100:0.08)和 0.1% 甲酸水梯度洗脱, 梯度程序为: 0~5 min, 溶剂 A 5%; 5~10 min, 溶剂 A 5%~10%; 10~20 min, 溶剂 A 10%~13%; 20~35 min, 溶剂 A 13%~23.5%; 35~45 min, 溶剂 A 23.5%~35%; 45~55 min, 溶剂 A 35%~55%; 55~60 min, 溶剂 A 保持 55%。流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 25 °C; 柱后分流 0.35 mL/min 进质谱检测; MS 同时记录总离子流(TIC)色谱图。扫描范围: 100~1000; 载气流速: 9 L/min; 雾化室压: 40 Pa; 毛细管电压: 3 500 V; 进样量: 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

称取样品粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形

瓶中, 加 50% 乙醇 10 mL, 称重, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定重量, 以 50% 乙醇补足失重, 滤过。取续滤液即得供试品溶液。

2.3 标准品溶液的制备

分别精密称取芍药苷、苯甲酸和苯甲酰白芍苷对照品 38.25, 0.74, 0.61 mg, 置 50 mL 量瓶中, 以 50% 乙醇溶解并定容, 即得混合标准品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密吸取“2.3”项下的混合对照品溶液 0.2, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 以 50% 乙醇稀释至刻度, 取各浓度的混合标准品溶液 20 μL, 注入色谱仪。

2.4.2 精密度 吸取“2.3”项下的混合对照品溶液, 按上述色谱条件连续重复测定 5 次, 进样量 20 μL, 测得各对照品峰面积。

2.4.3 稳定性 取白芍药材 a, 按“2.2”项下制备, 然后分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 进行测定, 进样量 20 μL, 测得峰面积并计算。

2.4.4 重复性 称取白芍药材样品 a, 约 0.2 g ($n=6$), 精密称定, 按“2.2”项下溶液制备方法处理, 依上述色谱条件进样 20 μL, 测定并计算含量。

2.4.5 加样回收率 精密称取已知含量的白芍药材 0.1 g, 共 6 份, 分别加入已知浓度的混合对照品溶液, 按“2.2”项下操作, 分别测定含量, 计算回收率及 RSD。

3 结果

3.1 白芍药材 HPLC-DAD 图谱的建立及分析

3.1.1 共有峰的标定 根据 12 批样品结果(见图 1)表明, 在“蒲棒”、“线条”、“鸡爪”药材的图谱中共标出 15 个共有峰。

峰 5, 11, 14 与对照品对照分别鉴定为芍药苷, 苯甲酸和苯甲酰白芍苷。

LC-MS 图谱确定了 7 个峰的归属, 结合参考文献^[4-9], 分析和指认结果(见表 2)。

峰 1 的 $[M+H]^+$ 为 m/z 171, 二级碎片 127 和 153 峰分别是 $[M+H-CO_2]^+$ 、 $[M+H-H_2O]^+$, 推断这类成分结构上有羧基和羟基, 所以容易丢失小分子 CO_2 、 H_2O , $[M-H]^-$ 为 m/z 169, 二级碎片 125 峰为 $[M-H-CO_2]^-$ 。结合参考文献^[9], 此化合物鉴定为没食子酸。

峰 2 的 $[M+Na]^+$ 为 m/z 665, 二级质谱可见

m/z 543 表明丢失 1 分子苯甲酸(m/z 122), m/z 503 表明丢失 1 分子葡萄糖(m/z 162), m/z 381 表明同时丢失 1 分子苯甲酸和葡萄糖,证明此化合物为芍药苷连 1 分子葡萄糖,结合文献[4],判断此化合物为:isomaltopaeoniflorin。

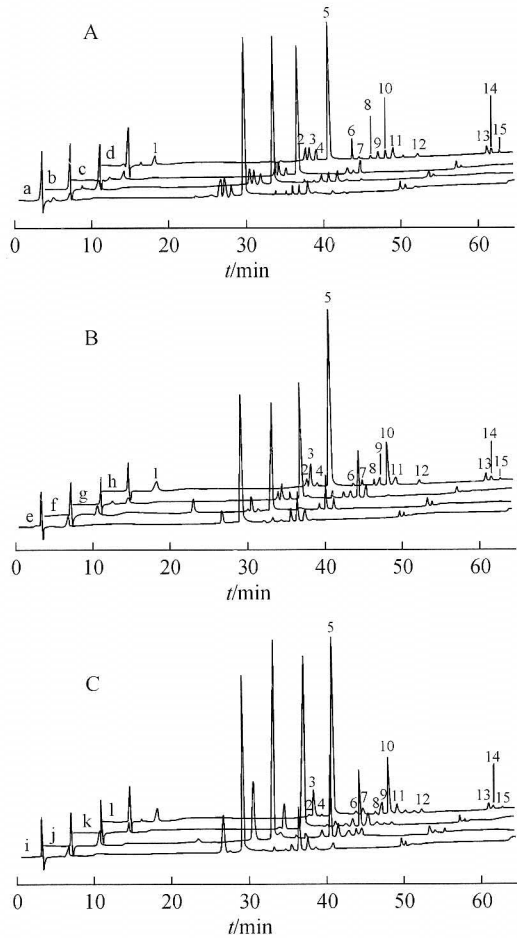


Figure 1 Chromatograms of Radix Paeoniae Alba cultivated in Bozhou
A: Pubang; B: Xiantiao; C: Jizhua

峰3与芍药苷互为同分异构体, $[M-H]^-$ 亦为 m/z 479。其二级质谱可见 m/z 357 的 $[M-H-122]^-$ 表明了苯甲酰基的存在。 m/z 283 (去质子

苯甲酰葡萄糖残基), 这一特征可用于该化合物与芍药苷的区分。结合文献[5], 可判断该化合物为芍药内酯苷。

峰9的 $[M-H]^-$ 为 m/z 631, 其二级离子扫描产生脱水离子 m/z 613, 再丢失 1 分子苯甲酸(m/z 122)产生的碎片离子 m/z 491, m/z 313 对应于去质子没食子酰葡萄糖残基, 表明该没食子酰基连接在葡萄糖环上, 又因 $[M-H-30]^-$ 离子没有出现, 故可判断为没食子酰基连接在葡萄糖环上的6位羟基上。 m/z 271 碎片离子是分子中的葡萄糖环上发生^{1,2}X裂解所致。 m/z 211 子离子来源于同时丢失没食子酰葡萄糖残基和苯甲酰基。结合参考文献[8], 可判断该化合物为没食子酰芍药苷。

峰10的准分子离子是一个典型的双电荷离子, $[M-H]^-$ 为 m/z 469, 在一级扫描中同时存在 m/z 939 的峰, 而且负离子 469 的二级碎片中出现比 469 大的碎片 769, 可以推测 469 可能为多电荷离子或者是 939 的碎片, 通过相对分子质量计算, 推断 469 为双电荷离子 $[M-2H]^{2-}$, 该峰的 M_r 为 940。产生的二级碎片中, 都是丢失中性小分子 m/z 18、170、152 和 125 的峰, 这些中性小分子正好是没食子酸分子和没食子酸的特征碎片离子。推断此化合物为 5 个没食子酸和 1 个葡萄糖脱去 5 分子水缩合而成。结合参考文献[9], 可判断该化合物为 1,2,3,4,6-五没食子酸葡萄糖苷。

峰12与芍药苷、芍药内酯苷互为同分异构体, $[M-H]^-$ 亦为 m/z 479。其二级质谱可见 m/z 357 的 $[M-H-122]^-$ 表明了苯甲酰基的存在。 m/z 195 为丢失了苯甲酰葡萄糖碎片 ($[M-H-284]^-$), m/z 283 (去质子苯甲酰葡萄糖残基) 的存在进一步证实了这一点。结合文献[6], 判断该化合物为牡丹皮苷 I。

Table 2 Identification of 7 compounds in Radix Paeoniae Alba cultivated in Bozhou by HPLC-DAD-ESI-MS²

Peak	Compd.	M_r	$[M-H]^-$	$[M+H]^+$	Ref.
1	Gallic acid	170	169, 125	171, 153, 127	[9]
2	Isomaltopaeoniflorin	642		634, 543, 503, 381	[4]
3	Albiflorin	480	479, 449, 357, 283, 121		[5]
9	Galloyl paeoniflorin	632	631, 613, 491, 399, 313, 271, 169, 165		[8]
10	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> - galloyl glucose	940	939, 785, 635, 465, 301, 275, 169		[9]
12	Mudanpioside I	480	479, 357, 345, 327, 283, 121		[6]
13	Benzoylpaeoniflorin	584		585, 463, 389, 353, 319	[7]

峰13的 $[M + Na]^+$ 为 m/z 607, 二级质谱可见 m/z 485 $[M + Na - BA]^+$ (BA: 苯甲酸), m/z 411 $[M + Na - aglycon]^+$, m/z 375 $[M + Na - C_{13}H_{12}O_4]^+$ 和 m/z 341 $[M + Na - BG]^+$ (BG: 葡萄糖C6'上连接的苯环)的子离子峰。结合文献[7], 可判断该化合物为苯甲酰芍药苷。

3.1.2 共有峰的分析

12批药材样品均以1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 13、14号峰为主要特征峰。2, 3, 4, 10号峰的相对含量

有较大差异。以11号峰为参照峰计算共有峰的相对峰面积, 结果(见表3), “蒲棒”以2, 4号峰的相对含量较高, 3, 10号峰的相对含量较低为主要特征。“鸡爪”以2, 4号峰的相对含量较低, 3, 10号峰的相对含量较高为主要特征。“线条”以10号峰相对含量最高为主要特征。“蒲棒”和“鸡爪”的3号峰相对含量为4年生大于5年生; “线条”的3号峰相对含量为4年生少于5年生; 3个品种的2, 4, 10号峰相对含量都是4年生少于5年生。

Table 3 Ratio of relative peak area for chromatographic peak of Radix Paeoniae Alba cultivated in Bozhou

Sample	Peak						
	1	2	3	4	10	13	11(S)
a	1.330	1.105	1.060	0.552	0.366	0.131	1
b	3.587	1.142	1.118	0.612	0.391	0.134	1
c	5.012	1.330	1.020	0.657	0.405	0.134	1
d	4.928	1.201	1.041	0.631	0.486	0.140	1
e	2.753	0.113	1.275	0.241	2.618	0.243	1
f	4.210	0.300	1.305	0.244	3.218	0.162	1
g	1.751	0.713	2.207	0.458	3.345	0.096	1
h	2.706	0.916	2.336	0.525	3.542	0.204	1
i	1.100	0.141	2.437	0.092	2.335	0.181	1
j	3.114	0.152	2.689	0.073	2.871	0.313	1
k	1.064	0.183	1.754	0.173	2.839	0.159	1
l	3.005	0.165	1.875	0.152	2.878	0.167	1

3.2 方法学考察

线性关系考察按上述的色谱条件梯度洗脱, 以各对照品峰面积 A 对其浓度(c , $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归, 得回归方程(见表4)。

Table 4 Validation parameters for method development

Compd.	Calibration equation	r	Range/($\mu\text{g/mL}$)
Paeoniflorin	$A = 24.918c + 59.329$	0.999 7	15.3-765.0
Benzoic acid	$A = 111.05c - 2.7182$	0.999 9	0.296-14.8
Paeonivayin	$A = 34.999c + 36.011$	0.999 8	0.244-12.2

3.2.1 精密度试验 各主成分峰面积的RSD(%)值分别为芍药苷1.60, 苯甲酸0.50, 苯甲酰芍药苷1.44, 表明精密度良好。

3.2.2 稳定性试验 各成分峰面积的RSD(%)值分别为芍药苷2.44, 苯甲酸2.06, 苯甲酰芍药苷2.03, 表明样品溶液在24 h内稳定。

3.2.3 重复性试验 各成分峰面积的RSD(%)值分别为芍药苷2.40, 苯甲酸2.80, 苯甲酰芍药苷2.90, 表明本方法的重复性好。

3.2.4 加样回收率 回收率(%)分别为芍药苷99.7, 苯甲酸100.2, 苯甲酰芍药苷99.3; RSD(%)分别为芍药苷1.55, 苯甲酸1.34, 苯甲酰芍药苷

1.71, 加样回收率满足要求。

3.3 样品含量测定

取12批药材及其加工品的细粉, 按“2.2”项下制备供试品溶液, 分别进样20 μL , 平行测定3次并计算平均值, 得各批药材中芍药苷、苯甲酸和苯甲酰芍药苷的含量, 因为数据较多, 此处只给出具有代表性的数据, 结果见表5。

Table 5 Contents of paeoniflorin, benzoic acid and paeonivayin in Radix Paeoniae Alba cultivated in Bozhou

Sample	$c/(mg/g)$		
	Paeoniflorin	Benzoic acid	Paeonivayin
a	29.13 $\pm$ 0.70	0.64 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01
c	23.31 $\pm$ 0.61	0.61 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01
e	20.71 $\pm$ 0.55	0.62 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01
g	27.49 $\pm$ 0.71	0.70 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.01
i	33.71 $\pm$ 0.68	0.70 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01
k	26.94 $\pm$ 0.73	0.67 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.01
a*	32.65 $\pm$ 0.40	ND	TR
c*	31.51 $\pm$ 0.54	ND	TR
e*	27.95 $\pm$ 0.32	ND	TR
g*	39.54 $\pm$ 0.77	ND	TR
i*	28.03 $\pm$ 0.38	TR	TR
k*	31.05 $\pm$ 0.66	ND	TR

ND: not detected; TR: trace. * Processed product

4 讨论

4.1 品种对化学成分的影响

亳白芍“蒲棒”品种的主要特征为: isomaltopaeoniflorin 相对含量明显较高,芍药内酯苷和五没食子酰葡萄糖苷相对含量较低。“鸡爪”的主要特征为: isomaltopaeoniflorin 相对含量明显较低,芍药内酯苷相对含量较高。“线条”的主要特征为:五没食子酰葡萄糖苷相对含量最高。

4.2 生长年限对化学成分的影响 “蒲棒”和“鸡爪”中的芍药内酯苷相对含量为4年生高于5年生;“线条”中的芍药内酯苷相对含量则为4年生低于5年生;3个品种的 isomaltopaeoniflorin 和五没食子酰葡萄糖苷相对含量都为4年生低于5年生。

4.3 芍药苷的含量分析

由表5得出,亳白芍及其加工品中芍药苷的含量均高于《中华人民共和国药典》规定的1.6%^[1],质量符合要求。

生长年限为4年的药材中芍药苷的含量:“鸡爪”最高,“蒲棒”其次,“线条”最低;生长年限为5年的药材中芍药苷的含量:“线条”最高,“鸡爪”其次,“蒲棒”最低;得出药材中芍药苷含量由高到低依次为:4年生“鸡爪”,4年生“蒲棒”,5年生“线条”,5年生“鸡爪”,5年生“蒲棒”,4年生“线条”。

药材经传统加工后,芍药苷的含量都有所升高,而各品种之间其含量的差异则有所减小。可能是由 isomaltopaeoniflorin 受热脱去1分子葡萄糖生成芍药苷所致。经比较得出芍药苷含量:4年生“鸡爪”与5年生“线条”相当且含量最高,4年生“蒲棒”与5年生“鸡爪”其次,5年生“蒲棒”与4年生“线条”相当且含量最低。

现行的市售药材等级划分是以白芍的形状、长度、中部直径等作为标准制定的^[3],并没有以其主要活性成分芍药苷的含量为标准制定。因为“鸡爪”的外观不佳,现在已经很少种植^[3]。但是本实验表明其芍药苷的含量较高且生长周期较短。经亳州地区传统方法加工后,5年生“线条”和4年生“蒲棒”中的芍药苷含量都和“鸡爪”相当。因此,

结合市场需求,5年生“线条”和4年生“蒲棒”为最佳品种。

5 结论

本研究首次用 LC-MS 方法对亳白芍3个栽培品种的化学成分进行了分析,并指出它们的特征峰,得出3个品种间化学成分的异同,为亳白芍栽培品种生产种植的规范化和亳白芍的质量控制提供了理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:68.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海:上海科技出版社,1977:706-709.
- [3] 张丽萍(Zhang LP),杨春清(Yang CQ),赵永华(Zhao YH),等. 安徽白芍规范化种植加工技术研究及SOD的制定[J]. 世界科学技术—中医药现代化(World Sci Technol Mod Tradit Chin Med),2004,6(3):63-72.
- [4] Tanaka T, Kataoka M, Tsuboi N, et al. New monoterpene glycoside esters and phenolic constituents of *Paeoniae Radix*, and increase of water solubility of proanthocyanidins in the presence of paeoniflorin[J]. *Chem Pharm Bull*,2000,48(2):201-207.
- [5] Hong JD, Zhi QL, Feng RS, et al. Structural analysis of monoterpene glycosides extracted from *Paeonia lactiflora* Pall. using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*,2007,21(19):3193-3199.
- [6] Ding HY, Wu YC, Lin HC, et al. Glycosides from *Paeonia suffruticosa*[J]. *Chem Pharm Bull*,1999,47(2):652-655.
- [7] Li R, Wang XL, Zhou Y, et al. Analysis of sodium adduct paeoniflorin, albiflorin and their derivatives by (+)ESI-MSⁿ, DFT calculations and computer-aided mass spectrometry analysis program[J]. *J Mass Spectrom*,2007,42(3):335-345.
- [8] 许舜军(Xu SJ),杨柳(Yang L),张勉(Zhang M),等. 牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. 药学报(Acta Pharm Sin),2006,41(9):852-856.
- [9] 梁琼麟(Liang QL),温华珍(Wen HZ),王玉莉(Wang YL),等. 丹皮药材的高效液相色谱-质谱/质谱研究[J]. 分析化学(Chin J Anal Chem),2005,33(11):1555-1559.