

• 药物检验与分析 •

HPLC 法同时测定白芍中芍药苷、芍药苷亚硫酸酯成分含量

于定荣¹,谷 巍²,邓志灏^{3*},李 丽¹,刘 颖¹,翁小刚¹,陈 畅¹,杜茂波¹,王海林¹,王丽芳¹(1. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;2. 山东宝来利来生物工程股份有限公司,山东泰安 27100;3. 北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

摘要:目的 建立能同时测定芍药苷以及芍药苷亚硫酸酯成分含量的 HPLC 法,为白芍中的芍药苷以及芍药苷亚硫酸酯成分含量测定提供一种新的方法。方法 以 Inertsil®(4.6 mm × 250 mm 5 μm) ODS-2 色谱柱为固定相;以乙腈-0.1% 磷酸水溶液(14:86)为流动相;检测波长为 235 nm;流速为 1.0 mL · min⁻¹;进样量为 10 μL;柱温 35 °C。结果 芍药苷、芍药苷亚硫酸酯分别在(0.0282 ~ 1.128 μg, 0.0196 ~ 0.784 μg) 的范围内与其峰面积呈现良好的线性关系,平均加样回收率分别为 96.64%、96.78%;RSD 分别为 2.64%、2.49%。结论 所建立的 HPLC 法能同时测定白芍及其饮片中的芍药苷以及芍药苷亚硫酸酯成分的含量,方法简单、准确,可考虑作为白芍药材及其饮片的质量控制方法。

关键词:白芍;硫磺熏蒸;芍药苷;芍药苷亚硫酸酯;含量测定

中图分类号:R927 文献标识码:A 文章编号:1006-3765(2021)-05-0049-04

Investigation on the Residue of Sulphur Dioxide and Establishing the Method of Simultaneous Determining the Contents of Paeoniflorin and Paeoniflorin Sulfite in *Paeoniae Radix Alba* by HPLC

YU Ding-rong¹, GU Wei², DENG Zhi-hao^{3*}, LI Li¹, LIU Ying¹, WENG Xiao-gang¹, CHEN Chang¹, DU Mao-bo¹, WANG Hai-lin¹, WANG Li-fang¹(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Shandong Baolai-Leelai Bioengineering Co., Ltd, Tai'an, 271000, China; 3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method that can simultaneously determine the content of paeoniflorin and paeoniflorin sulfite, and provide a new method for the determination of paeoniflorin and paeoniflorin sulfite in *Paeoniae Radix Alba*. **METHODS** Using Inertsil®(4.6 mm × 250 mm 5 μm) ODS-2 column was the stationary phase; using acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (14:86) as the mobile phase; detection wavelength was 235 nm; flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; the injection volume was 10 μL and column temperature was 35 °C.

RESULTS The content of paeoniflorin and paeoniflorin sulfite showed a good linear relationship with its peak area in the range of (0.0282~1.128 μg, 0.0196~0.784 μg), respectively. The average sample recovery rates were 96.64% and 96.78%; RSD were 2.64% and 2.49% respectively. **CONCLUSION** The established HPLC method can simultaneously determine the content of paeoniflorin and paeoniflorin sulfite in *Paeoniae Radix Alba* and its decoctions. The method was simple, accurate, it can be considered as the quality control method of *Paeonia lactiflora* and its decoction pieces.

KEY WORDS: *Paeonia lactiflora*; Sulfur fumigation; Paeoniflorin; Paeoniflorin sulfite; Content determination

硫磺熏蒸会导致中药的化学成分及其药理作用发生改

变,且在熏蒸中药的过程中会产生大量的二氧化硫,可能引起慢性支气管炎、哮喘和心血管病等多种疾病,故其残留的二氧化硫被认为是主要的有害物质⁽¹⁾。有研究报道⁽²⁾表明,白芍经硫磺熏制后产生的新成分芍药苷亚硫酸酯不具有芍药苷的抗血小板凝聚和松弛平滑肌的作用。而目前在诸多的硫磺熏蒸白芍的相关研究以及报道中,多以硫磺熏蒸导致白芍中有效成分芍药苷含量显著下降以及产生新的化学成分芍药苷亚硫酸酯作为其影响白芍药材及其饮片质量的评判依据,甚至

作者简介:于定荣,男(1975-)。学历:博士。职称:副研究员。从事中药炮制、中药化学研究。

通讯作者:邓志灏,男(1985-)。学历:博士。职称:主治医师。从事中医药防治肛肠疾病。

基金项目:中国中医科学院自主选题项目(L2017068);国家自然科学基金(81704077)

有人提出以芍药苷亚硫酸酯的色谱峰作为判断白芍在加工过程中是否使用硫磺熏蒸，并以芍药苷亚硫酸酯的含量作为硫磺熏蒸白芍质量控制的程度⁽³⁾。

目前 2020 版《中国药典》在白芍中保留了其硫磺熏蒸加工方法，并规定了其二氧化硫残留量的标准，不得超过 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，但是没有收载白芍因硫磺熏蒸而生成的芍药苷亚硫酸酯的含量测定方法及其限度标准。笔者在前期研究中探讨了硫磺熏蒸对白芍中芍药苷含量的影响，以及白芍硫磺熏制品在储藏过程中其芍药苷、二氧化硫残留量的变化规律⁽⁴⁾。在此基础上，拟建立一种能同时测定硫磺熏蒸白芍中的芍药苷、芍药苷亚硫酸酯成分含量的 HPLC 法；为白芍中的芍药苷以及芍药苷亚硫酸酯成分含量测定提供一种新的方法；为白芍的质量控制提供实验依据。这是目前没有报道的。

1 仪器与材料

1.1 仪器 20A-VP 型高效液相色谱仪、SPD-M20A 型二极管阵列检测器和 SIL-20A 型自动进样器（日本岛津）；800A 型多功能粉碎机；ME155DU 型十万分之一天平（瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司）。

1.2 药材 白芍药材，生长期为 3 年，分别采挖于安徽亳州市谯城区谯东镇余集、安徽亳州市颍上县十八里铺镇。经中国中医科学院中药研究所主管药师何希荣老师鉴定为毛茛科植物白芍 *Paeonia lactiflora* 的根，按当地药农传统产地加工方法制得白芍硫磺熏蒸药材；按 2020 年版《中国药典》项下方法制备得硫磺熏蒸白芍饮片。此外，分别从中药饮片公司购买了 4 批白芍饮片（北京盛世龙药业有限公司购买了白芍饮片、炒白芍饮片；北京本草方源药业有限公司购买了白芍饮片、酒白芍饮片）；实验所用的白芍以及饮片样品供试品（见表 1）。

表 1 实验所用的样品来源

样品编号	批号	来源	产地
S1 白芍饮片	1906015	北京盛世龙药业有限公司	安徽亳州
S2 炒白芍饮片	1912185	北京盛世龙药业有限公司	安徽亳州
S3 白芍饮片	20191029	北京本草方源药业有限公司	安徽亳州
S4 酒白芍饮片	20200401	北京本草方源药业有限公司	安徽亳州
S5 硫磺熏蒸不去皮药材	-	谯城区谯东镇余集	安徽亳州
S6 硫磺熏蒸去皮药材	-	谯城区谯东镇余集	安徽亳州
S7 硫磺熏蒸不去皮饮片	-	谯城区谯东镇余集	安徽亳州
S8 硫磺熏蒸去皮饮片	-	谯城区谯东镇余集	安徽亳州
S9 硫磺熏蒸不去皮药材	-	颍上县十八里铺镇	安徽亳州
S10 硫磺熏蒸去皮药材	-	颍上县十八里铺镇	安徽亳州
S11 硫磺熏蒸不去皮饮片	-	颍上县十八里铺镇	安徽亳州
S12 硫磺熏蒸去皮饮片	-	颍上县十八里铺镇	安徽亳州

1.3 对照品 芍药苷（批号：23180-57-9，HPLC $\geq 98\%$ ，购于北京北纳创联生物技术研究院）；芍药苷亚硫酸酯（批号：MUST-49102911，纯度 99.15%，购于成都曼思特生物科技有限公司），供含量测定用。

1.4 试剂 水为重蒸馏水，乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

• 50 •

2.1 白芍药材供试品制备 笔者于秋季亲往安徽亳州谯城区、十八里铺分别采挖白芍的根，将其洗去泥土，除去头尾两端和细根，只保留其药用部位。将其投入沸水中煮至透心，快速取出，分别制备得去皮、不去皮白芍药材供试品。

2.2 硫磺熏蒸白芍药材供试品制备 将 2.1 项下晒干至一定程度的去皮、不去皮白芍药材供试品，在当地药农的指导下，按照产地加工方法用硫磺熏蒸后，晒干，制备得硫磺熏蒸去皮、不去皮白芍药材供试品。

2.3 白芍饮片供试品制备 将 2.1 与 2.2 项下的硫磺熏蒸去皮、不去皮白芍药材供试品，各分别取一部分，按照 2020 年版《中国药典》白芍项下规定方法，分别制备得硫磺熏蒸去皮、不去皮白芍饮片。

2.4 水分测定⁽⁵⁾ 按 2020 年版《中国药典》附录水分测定法（通则 0832 第二法）项下“烘干法”对实验中所制备的白芍药材及其饮片，以及购买的 4 批白芍饮片分别进行水分测定，结果（见表 4）。

2.5 二氧化硫残留测定⁽⁵⁾ 按 2020 年版《中国药典》（四部通则 2331 第一法），分别取本实验中的白芍、以及白芍饮片各约 10 g，精密称定，置于 500 mL 圆底烧瓶中，进行蒸馏，将所收集的各样品馏出液用氢氧化钠滴定液滴定，分别以干燥品计算其煎煮液中二氧化硫残留量，结果（见表 4）。

2.6 芍药苷、芍药苷亚硫酸酯含量测定⁽⁶⁾

2.6.1 色谱条件： Inertsil[®] ODS-2 色谱柱（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）；流动相：乙腈-0.1% 磷酸水溶液（14:86）；流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；检测波长为 235 nm；进样量为 10 μL ；柱温 35 °C。按上述色谱条件进样，结果：对照品、供试品溶液中芍药苷和芍药苷亚硫酸酯两个峰不仅能够完全分离，而且峰型良好（见图 1~6）。

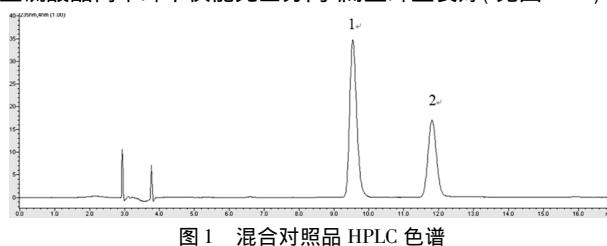


图 1 混合对照品 HPLC 色谱

1. 芍药苷亚硫酸酯；2. 芍药苷

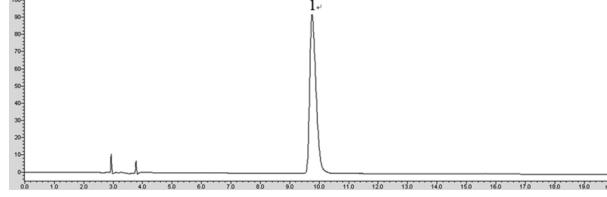


图 2 芍药苷亚硫酸酯对照品 HPLC 色谱

1. 芍药苷亚硫酸酯

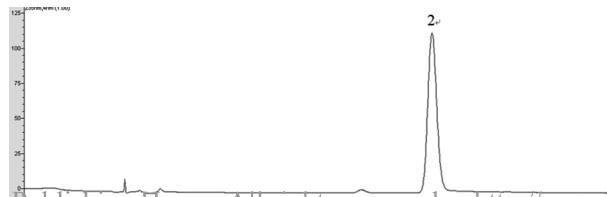


图 3 芍药苷对照品 HPLC 色谱

2. 芍药苷

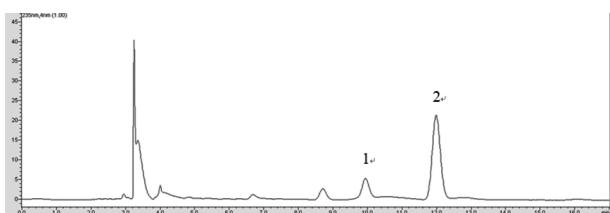


图4 硫磺熏蒸白芍药材供试品HPLC色谱
1. 芍药苷亚硫酸酯; 2. 芍药苷

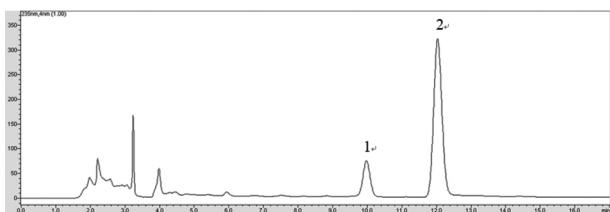


图5 硫磺熏蒸白芍饮片供试品HPLC色谱
1. 芍药苷亚硫酸酯; 2. 芍药苷

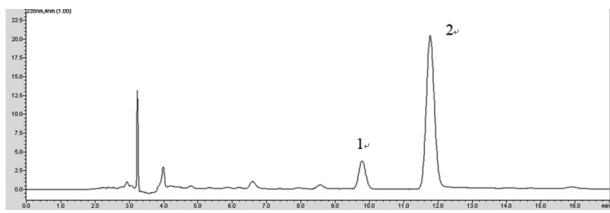


图6 白芍饮片供试品HPLC色谱
1. 芍药苷亚硫酸酯; 2. 芍药苷

2.6.2 供试品溶液制备: 分别精密称定 1.2 项下表 1 中的样品中粉各 0.1 g 置于 100 mL 锥形瓶中 加稀乙醇 50 mL ,于天平上称量总重量 超声处理 30 min(功率 240 W 频率 45 kHz) 后放冷 再一次在天平上称重 ,以稀乙醇补足损失的重量 放冷 摆匀之后滤过 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜 即得供试品溶液。

2.6.3 对照品溶液的制备: 分别精密称取芍药苷对照品 14.1 mg 、芍药苷亚硫酸酯对照品 9.8 mg 置同一量瓶中加甲醇溶解 ,定容至 10 mL 制备得芍药苷、芍药苷亚硫酸酯混合对照品储备液(每 1 mL 含芍药苷 1410 μg 、含芍药苷亚硫酸酯 980 μg)。精密吸取适量 置 50 mL 量瓶中以甲醇定容至刻度 配制成每 1 mL 含芍药苷 28.2 μg 、芍药苷亚硫酸酯 19.6 μg 的混合对照品溶液。

2.6.4 线性关系考察: 分别精密吸取 2.6.3 项下混合对照品溶液 1 μL 、 2 μL 、 5 μL 、 10 μL 、 40 μL 注入高效液相色谱仪 按 2.6.1 项下色谱条件分别测定芍药苷、芍药苷亚硫酸酯含量。以芍药苷、芍药苷亚硫酸酯进样量 (μg) 为横坐标 , 峰面积为纵坐标 绘制标准曲线 结果(见表 2)。

表2 芍药苷、芍药苷亚硫酸酯成分线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围(μg)	r
芍药苷	$Y = 302.07X + 18578$	0.0282 ~ 1.9128	0.9999
芍药苷亚硫酸酯	$Y = 790596X + 1898$	0.0196 ~ 0.784	0.9999

2.6.5 精密度试验: 分别精密吸取 S12(硫磺熏蒸去皮饮片) 供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次 , 按 2.6.1 项下色谱条件进样 测定计算得芍药苷、芍药苷亚硫酸酯面积的 RSD 分别为 0.31% 、 0.47% , 表明该方法精密度良好。

2.6.6 稳定性实验: 精密吸取 S12(硫磺熏蒸去皮饮片) 供试品溶液 10 μL , 分别在 0 h 、 2 h 、 4 h 、 8 h 、 12 h 以及 24 h , 按 2.6.1 项下色谱条件测定计算得芍药苷、芍药苷亚硫酸酯峰面积的 RSD 分别为 1.12% 、 1.34% , 表明供试品溶液在测定的 24 h 内稳定。

2.6.7 重复性试验: 精密称取 S12(硫磺熏蒸去皮饮片) 供试品中粉 0.1 g , 按 2.6.2 项下方法制备得供试品溶液 , 按 2.6.1 项下色谱条件进样 测得芍药苷、芍药苷亚硫酸酯平均含量的 RSD 分别为 1.41% 、 1.27% , 表明该方法重复性良好。

2.6.8 加样回收率实验: 取 2.2 项下相同量的 S12(硫磺熏蒸去皮饮片) 供试品粉末 9 份 , 每份 0.1 g , 精密称定 , 置 50 mL 带塞锥形瓶中 , 分别按(低、中、高) 3 个剂量精密加入 0.7 mL 0.9 mL 、 1.0 mL 混合对照品储备溶液各 3 份 , 按 2.6.2 项下方法制备供试品溶液 , 分别测定得芍药苷含量平均回收率为 96.64% , RSD 为 2.64% ; 芍药苷亚硫酸酯含量平均回收率为 98.38% , RSD 为 1.54% 表明此方法准确度良好 结果(见表 3)。

表3 芍药苷、芍药苷亚硫酸酯加样回收率测定结果(n = 3)

成分	取样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回收率 /%	平均加样回收率 /%	RSD /%
芍药苷	0.1000	1.2222	0.9870	2.2038	99.45	96.64	2.64
	0.1000	1.2222	0.9870	2.2120	100.28		
	0.1000	1.2222	0.9870	2.2016	99.23		
	0.1000	1.2222	1.2690	2.3920	92.18		
	0.1000	1.2222	1.2690	2.4456	96.41		
	0.1000	1.2222	1.2690	2.4199	94.38		
	0.1000	1.2222	1.4100	2.5599	94.87		
	0.1000	1.2222	1.4100	2.5671	95.38		
	0.1000	1.2222	1.4100	2.5975	97.54		
	0.1000	0.8502	0.6860	1.5051	95.46	96.78	2.49
芍药苷亚硫酸酯	0.1000	0.8502	0.6860	1.5353	99.87		
	0.1000	0.8502	0.6860	1.5340	99.68		
	0.1000	0.8502	0.8820	1.7000	96.35		
	0.1000	0.8502	0.8820	1.6779	93.84		
	0.1000	0.8502	0.8820	1.6900	95.21		
	0.1000	0.8502	0.9800	1.7775	94.62		
	0.1000	0.8502	0.9800	1.7849	95.38		
	0.1000	0.8502	0.9800	1.7970	100.61		

2.6.9 供试品溶液测定: 分别精密吸取 1.2 项下表 1 中的白芍及其饮片供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪 进行含量测定。测定其芍药苷、芍药苷亚硫酸酯成分的含量 结果(见表 4)。

3 讨论

3.1 提取溶剂、提取方法的考察⁽⁷⁾ 实验中分别以稀乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇以及甲醇作为溶剂 , 以超声提取、回流提

取 2 种方法进行了比较。结果表明 , 以 50% 乙醇超声提取中色谱的基线较平稳 , 所测指标成分芍药苷、芍药苷亚硫酸酯的

峰面积较大 , 杂质峰较少 , 且分离度较好 , 故选择 50% 乙醇为提取溶剂进行超声提取。

表 4 各供试品中水分、芍药苷、芍药苷亚硫酸酯含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品编号	水分(%)	芍药苷(%)	芍药苷亚硫酸酯(%)	二氧化硫残留($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
S1 白芍饮片	7.3027 ± 0.0318	1.7614 ± 0.2627	0.6652 ± 0.7745	11.1825 ± 0.7668
S2 炒白芍饮片	7.1931 ± 0.0398	1.5808 ± 0.2123	0.5448 ± 1.1640	10.6875 ± 0.8229
S3 白芍饮片	7.2164 ± 0.0448	1.9018 ± 0.1719	0.5128 ± 1.2218	10.4307 ± 0.7781
S4 酒白芍饮片	7.1647 ± 0.0567	1.4627 ± 0.1807	0.4387 ± 1.0045	9.4258 ± 0.8148
S5 硫磺熏蒸不去皮药材	8.2132 ± 0.0463	2.2283 ± 0.1048	1.2868 ± 0.8967	152.1905 ± 1.2158
S6 硫磺熏蒸去皮药材	8.1123 ± 0.0272	1.8038 ± 0.0328	0.9953 ± 0.9121	134.2027 ± 0.8867
S7 硫磺熏蒸不去皮饮片	7.9362 ± 0.0581	1.4713 ± 0.2025	0.9487 ± 0.9924	111.0061 ± 1.0867
S8 硫磺熏蒸去皮饮片	7.8492 ± 0.0162	1.4089 ± 0.0674	0.8882 ± 0.8438	96.6684 ± 0.8172
S9 硫磺熏蒸不去皮药材	8.1014 ± 0.0651	1.9017 ± 0.2927	1.1687 ± 0.6621	148.2832 ± 0.9121
S10 硫磺熏蒸去皮药材	8.0123 ± 0.0627	1.7928 ± 0.3015	0.9867 ± 0.4158	131.6824 ± 0.9683
S11 硫磺熏蒸不去皮饮片	7.9263 ± 0.0468	1.4163 ± 0.2146	0.9398 ± 0.7008	100.0243 ± 0.8827
S12 硫磺熏蒸去皮饮片	7.9048 ± 0.0513	1.3271 ± 0.5932	0.9232 ± 0.5568	96.8579 ± 1.0125

3.2 色谱条件的选定 对甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.025% (0.05%、0.1%) 磷酸溶液等不同流动相系统进行了筛选 , 考察了不同柱温 (25 °C、30 °C、35 °C、40 °C) 对色谱峰的影响 , 同时以 SPD-M20A 检测器比较了 190 nm、235 nm、254 nm、265 nm、274 nm 处的色谱图 , 发现以乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (14:86) 为流动相进行等梯度洗脱 , 在波长为 235 nm 时基线最平稳 , 而芍药苷、芍药苷亚硫酸酯两主峰峰面积较大 , 干扰少 , 分离度最好。由于 35 °C、45 °C 的柱温对各色谱峰影响不明显 , 故选择柱温为 35 °C。

综上 , 本实验通过等梯度洗脱 , 以 HPLC 法同时测定白芍中芍药苷、芍药苷亚硫酸酯成分含量 , 不仅避免了梯度洗脱的繁琐以及对芍药苷、芍药苷亚硫酸酯分别进行方法学考察 , 而且为实验节省了时间和成本。该方法操作起来不仅简单、稳定性、重复性良好 , 而且能使芍药苷和芍药苷亚硫酸酯完全分离 , 达到同时测定硫磺熏蒸白芍中药及其饮片中的芍药苷和芍药苷亚硫酸酯成分的目的 , 可为白芍及其饮片的质量控制

提供新的方法 , 是有意义的。

参考文献

- (1) 邓爱平 , 康传志 , 张锐 , 等 . 熏硫对中药化学成分及药理作用的影响 (J). 药物分析杂志 2019, 39(9): 1542-1559.
- (2) 朱涛 , 张云 , 丛晓东 , 等 . 硫熏对中药饮片质量的影响及应对思考 (C). 武汉 : 中药炮制分会 2009 年学术研讨会论文集 2009, 48.
- (3) 王赵 , 陈玉武 , 王琼 , 等 . 硫熏白芍的质量评价 (J). 中国中药杂志 2014, 39(16): 3074-3077.
- (4) 于定荣 , 肖永庆 , 麻印莲 , 等 . 白芍储藏一年芍药苷及二氧化硫残留变化 (J). 中国实验方剂学杂志 2016, 22(21): 63-65.
- (5) 国家药典委员会编 . 中国药典 (一部) [S]. 北京 : 中国医药科技出版社 2020.
- (6) 黄山君 , 王瑞 , 石燕红 , 等 . 硫磺熏制白芍的安全性评价初步研究 (J). 药学学报 2012, 47(4): 486-491.
- (7) 金传山 , 蔡一杰 , 吴德玲 . 硫磺熏制对白芍中芍药苷含量的影响 (J). 南京中医药大学学报 2011, 27(2): 161-164.

山七降脂通脉胶囊中三七、石菖蒲的显微鉴别及质量评价

李旭桂¹ 林晓春¹ 刘萌² 郑锦坤¹ 李庆德¹ (1. 粤北人民医院 , 广东韶关 512025; 2. 韶关市食品药品检验所 , 广东韶关 512025)

摘要: 目的 建立山七降脂通脉胶囊处方中三七、石菖蒲的显微鉴别规范并对制剂进行质量评价。方法 采用 60 目药筛过筛山七降脂通脉胶囊内容物 , 混匀过筛后的粉末、水合氯醛透化 , 并用稀甘油封藏 , 放置在显微镜下观察、鉴别 ; 按药典胶囊剂检查项 , 测定山七降脂通脉胶囊的水分、装量差异、崩解时限。结果 显微镜下 , 可见树脂道碎片含黄色分泌物、梯纹导管、网纹导管及螺旋导管直径 15~55 μm 、草酸钙簇晶等三七显微特征 ; 显微镜下 , 见纤维束周围细胞中含草酸钙方晶 , 形成晶纤维。分泌细胞呈圆形或长圆形 , 胞内充满黄绿色、橙红色或红色分泌物等

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作者简介: 李旭桂。学历: 研究生。职称: 副主任药师。主要从事医院药学研究。

基金项目: 2019 年广东省中医药局面上科研项目(20191325)