

HPLC 法测定不同产地赤芍中芍药苷的含量及重金属和残留农药的分析

陈 述

(中国中医科学院西苑医院药剂科,北京,100091)

摘要 目的:建立一种测定赤芍中芍药苷含量的高效液相色谱法,测定不同产地赤芍中芍药苷的含量并分析赤芍中重金属含量及农药的残留量。方法:色谱柱:Kromasil C₁₈柱(5 μm,4.6 mm×250 mm);流动相:甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(30:70);波长:230 nm;柱温:25 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。采用原子吸收分光光度法对赤芍药材中的重金属铅、砷、铜、镉、汞进行分析,同时采用气相色谱法对有机氯类农药残留量进行测定。结果:芍药苷在0.1~1.0 mg/mL 范围内,浓度与峰面积的线性关系良好(R²=0.9996),样品的平均加样回收率为98.8%,RSD为0.29%。17个不同产地的赤芍药材中芍药苷的含量为2.17%~4.17%;赤芍中检出铅、砷、铜、镉、汞的残留量分别为0.19~0.39、0.19~0.72、0.87~8.17、0.11~0.29和0.08~0.14 mg/kg;部分赤芍药材中有检出有机氯类,DHC、DDT、PCNB的残留量分别为0.021~0.063、0.039~0.121和0.024~0.050 mg/kg。结论:17个产地的赤芍药材中芍药苷的含量均符合中国药典要求;药材存在一定量的重金属和有机氯类农药残留,除1份药材 DDT 含量超标外,其他药材的重金属及农药残留量均符合《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》中的限量规定,赤芍药材总体质量较好。

关键词 不同产地;赤芍;高效液相色谱法;芍药苷;重金属残留;农药残留

Analysis of Paeoniflorin, Residual Pesticide and Heavy Metal Content Determination in Radix Paeoniae Rubra from Different Habitats by HPLC

Chen Shu

(Pharmacy Department of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC method to determine the content of paeoniflorin as well as residual pesticide and heavy metal in Radix Paeoniae Rubra in different areas. **Methods:** Chromatographic column was Kromasil C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm×250 mm); mobile phase was methanol-0.05mol/L potassium dihydrogen phosphate (30:70); wavelength was 230 nm; column temperature was 25 ℃; flow rate was 1 mL/min; sample size was 10 L. Analysis of heavy metal lead, arsenic, copper, cadmium, mercury in Paeonia lactiflora were determined by atomic absorption spectrophotometry, and gas chromatography was used for the determination of organochlorine pesticide residues. **Results:** The content of paeoniflorin was in the range of 0.1 to 1.0 mg/mL, and the linear relationship between concentration and peak area (R²=0.9996) were good. The average recovery was 98.8%, and RSD was 0.29%. The content of paeoniflorin in Radix Paeoniae Rubra from 17 different areas was 2.17~4.17%; residues of arsenic, lead, copper, cadmium, mercury in Radix Paeoniae Rubra were 0.19~0.39, 0.19~0.72, 0.87~8.17, 0.11~0.29 and 0.08~0.14mg/kg; part of Paeonia lactiflora found the detection of organochlorine residues, and DHC, DDT, PCNB were respectively 0.021~0.063, 0.039~0.121 and 0.024~0.050mg/kg. **Conclusion:** The contents of paeoniflorin in Paeonia lactiflora in 17 areas were all in accord with the Chinese pharmacopoeial requirements; there is a certain amount of metal materials and organic chlorine pesticide residues in medicinal materials, and except 1 copy of DDT content exceeding the standard, the quantity are in line with the “medicinal plants and preparations of the green trade standard” in the provisions on limits of heavy metal and pesticide residue in other medicinal herbs. The overall quality of Paeonia lactiflora is good.

Key Words Origin; Radix Paeoniae Rubra; HPLC; Paeoniflorin; Heavy metals; Pesticide residues

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.09.034

赤芍是由毛茛科植物芍药或者川赤芍的干燥根制成,是临床应用历史悠久、用量较大的著名野生中药材^[1],具有清血分实热^[2],散瘀血留滞的功能,主要是用于治疗瘀滞经闭^[3],腹胁疼痛,疝瘕积聚^[4],目赤肿

痛等病症^[5]。近年来,赤芍被广泛应用于治疗心血管类疾病,且具备抗肿瘤^[6]、保肝^[7]、抗内毒素、抑制胃酸分泌等药理作用^[8]。赤芍中含有单萜苷、鞣质、三萜皂苷、儿茶素、芳香酸等多类化学成分^[9]。目前研究多认

为单萜苷类化合物(即赤芍总苷)是赤芍中的主要活性成分,赤芍总苷中主要包含芍药苷、苯甲酰芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷等化合物^[10],其中以芍药苷占赤芍总苷的75%以上^[11],是作为评价赤芍药材的质量优劣的指标性组分,由于土壤、水源、气候、种植施肥方式等环境因素的差异影响,不同产地赤芍药材中芍药苷的含量也因地域影响呈现差异,并且重金属及农药残留也呈现地域性的差异。

本文建立了一种测定赤芍药材中芍药苷含量的高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),测定17个不同产地赤芍药材中芍药苷的含量,并且根据药典方法对赤芍药材中重金属含量及有机氯类农药残留量进行测定分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Waters1525,配备四元泵及双波长紫外检测器);电子天平AL204(梅特勒公司);原子吸收光谱仪(1020MPT,长春吉大小天鹅公司);气相色谱仪(Agilent 7890A);芍药苷标准对照品及赤芍对照药材(中国药品生物制品检定所),其他不同产地药材为市售;重金属铅、砷、铜、镉、汞标准溶液(国家标准物质研究中心);色谱纯乙腈、色谱纯甲醇(Fisher公司);实验用水为二次蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 赤芍中芍药苷含量的测定

1.2.1.1 色谱条件 采用反相高效液相色谱法,Kromasil C₁₈柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相采用甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾(30:70);UV检测器选择波长230 nm;柱温25℃;流速1.0 mL/min;进样量10 μL。理论塔板数以芍药苷峰计,不低于3 000。

1.2.1.2 对照品溶液的制备 先将芍药苷对照品置于含五氧化二磷减压干燥器中干燥36 h,待干燥完成后,准确称取100 mg芍药苷于50 mL容量瓶中,适量甲醇溶解后,继续用甲醇定容至刻度,即得浓度为2 mg/mL的对照品溶液。

1.2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取赤芍粗粉0.5 g置于具塞三角瓶中,加入甲醇35 mL,浸泡4 h后,超声30 min,冷却至室温后,经滤纸过滤于50 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀后经0.45 μm滤膜过滤,按“1.2.1.1”项下色谱条件进样,分析。

1.2.1.4 标准曲线及线性范围 分别精密移取上述芍药苷对照品溶液0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 mL,置于10 mL已标定的容量瓶中,用甲醇定容至刻度线,获得浓度为0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/mL的系列标准溶液,按“1.2.1.1”项下色谱条件进样分析,以浓度(X)为横坐

标,以峰面积(Y)为纵坐标作线性回归,得回归方程为 $Y = 1.4589 \times 10^7 X + 12542$ ($R^2 = 0.9996$)。结果表明,芍药苷在0.1~1.0 mg/mL范围内,浓度与峰面积的线性关系良好。

1.2.1.5 精密性 取上述芍药苷对照品溶液适量,配制成低、中、高(0.1, 0.4, 0.8 mg/mL)浓度的芍药苷对照品溶液,各平行配制5份,按“1.2.1.1”项下色谱条件进样分析,1 d内连续进样5次,连续测定3 d,测定其峰面积,计算峰面积的日内及日间RSD,结果日内RSD值为0.39%,日间RSD为1.02%。

1.2.1.6 重复性 准确称取赤芍粗粉末0.5 g,平行称取6份,按“1.2.1.3”项下方法制备供试品的溶液,并按“1.2.1.1”项下色谱条件进行分析,根据标准曲线计算芍药苷的含量。结果表明,样品中芍药苷的平均含量为4.17%,RSD为0.21%,说明本方法的重复性良好。

1.2.1.7 稳定性 取同一供试品溶液,在室温下放置0, 2, 4, 8, 10 h后,按“1.2.1.1”项下色谱条件进行分析,测定的不同时间点芍药苷的峰面积,并与0小时的峰面积相比较,结果不同时间点间的RSD值为0.89%,表明供试液在10 h内保持稳定。

1.2.1.8 加样回收率 准确称取已知含量的赤芍药材6份,平均分成3份,按照低、中、高3个水平分别准确加入一定量的标准品溶液,按“1.2.1.3”项下方法制备供试品溶液,并按“1.2.1.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积。

1.2.1.9 样品含量测定 选取17个产地的赤芍药材,粉碎后过3号筛,准确称取0.5 g制备好样品各三份。按“1.2.1.3”项下方法制备供试品溶液,制备完成后,按“1.2.1.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积。

1.2.2 重金属铅、砷、铜、镉、汞的测定 参照2010年《中华人民共和国药典》,采用原子吸收分光光度法对来自17个不同产地的赤芍药材中的重金属铅、砷、铜、镉、汞进行了测定。按照《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》中对于重金属元素的限量指标为:铅(Pb) ≤ 5 mg/kg、砷(As) ≤ 2.0 mg/kg、铜(Cu) ≤ 20 mg/kg、镉(Cd) ≤ 0.3 mg/kg、汞(Hg) ≤ 0.2 mg/kg。

1.2.3 气相色谱法测定有机氯农药残留 参照《中华人民共和国药典》2000版一部附录IXQ有机氯农药残留量测定法,对来自17个不同产地的赤芍药材中有机氯类农药:六六六(BHC)、滴滴涕(DDT)、五氯硝基苯(PCNB)的残留量进行测定,测定结果见表4。按照《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》的限量规定:六六六(BHC) ≤ 0.1 mg/kg、滴滴涕(DDT) ≤ 0.1 mg/

kg、五氯硝基苯(PCNB) ≤ 0.1 mg/kg。

2 结果

2.1 根据标准曲线计算样品中芍药苷的含量 测得低、中、高浓度样品的平均回收率为 98.8%, RSD 为 0.29%, 具体结果见表 1。

表 1 HPLC-UV 法测定赤芍中芍药苷含量的回收率(n=6)

编号	芍药苷加入量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率	RSD (%)
1	22.7	21.9	98.7	98.8	0.29
2	22.8	22.2	98.7		
3	40.8	40.0	98.8		
4	40.7	39.7	98.5		
5	60.2	59.8	99.3		
6	59.8	59.2	99.0		

2.2 根据标准曲线计算样品中芍药苷的含量 色谱图如图 1 所示, 测定结果见表 2。

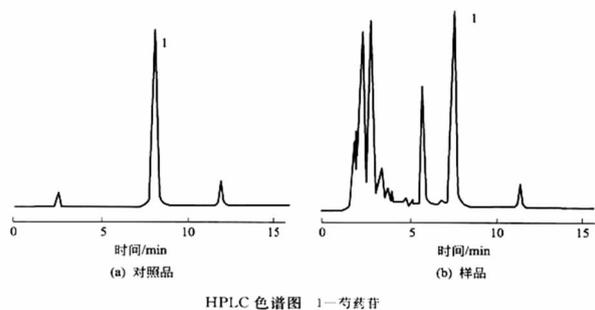


图 1 标准对照品与样品的高效液相色谱图(芍药苷)

表 2 不同产地赤芍中芍药苷含量测定结果

编号	产地	芍药苷含量 (%)	编号	产地	芍药苷含量 (%)
1	内蒙古额尔古右旗	2.85	10	黑龙江宝清	3.24
2	内蒙古扎兰屯	4.17	11	吉林敦化	4.08
3	内蒙古莫力达瓦	3.17	12	吉林汪清	4.12
4	内蒙古多伦	3.42	13	河北赤城	2.17
5	四川理县	3.19	14	河北丰宁	3.84
6	辽宁西丰	3.17	15	山西夏县	3.59
7	辽宁凤城	2.98	16	新疆阿勒泰	3.16
8	辽宁庄河	2.87	17	新疆哈巴河	2.58
9	黑龙江伊春	3.15			

2.3 重金属铅、砷、铜、镉、汞的测定 测定结果见表 3。

2.4 气相色谱法测定有机氯农药残留 具体结果见表 4。

3 结论

笔者建立了测定不同产地赤芍药材中芍药苷含量的 HPLC 方法, 该方法线性良好, 线性范围为 0.1 ~ 1.0 mg/mL, 平均加标回收率为 98.8%, RSD 为 0.29% (n = 6), 方法精密性及稳定性良好, 方法测定 17 个不同产地的赤芍药材中芍药苷的含量为 2.17% ~ 4.17%,

各产地的赤芍药材中含量有所差异, 但均符合 2010 年《中华人民共和国药典》中赤芍药材中含芍药苷不得少于 1.8% 的规定。其中, 以内蒙古扎兰屯所产的赤芍药材的中芍药苷含量最高为 4.17%,

部分产地的赤芍药材检出重金属, 赤芍中检出的铅、砷、铜、镉、汞的残留量分别为 0.19 ~ 0.39 mg/kg、0.19 ~ 0.72 mg/kg、0.87 ~ 8.17 mg/kg、0.11 ~ 0.29 mg/kg、0.08 ~ 0.14 mg/kg; 其中以铜元素检出率最高, 17 个产地中全部有检出, 其他元素部分产地有检出, 呈现地域差异, 药材中重金属含量均符合《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》中的限量要求^[12]。

表 3 不同产地赤芍中重金属的测定结果

编号	产地	含量(mg/kg), n=3				
		铅	砷	铜	镉	汞
1	内蒙古额尔古右旗	0.39	0.59	2.51	0.21	/
2	内蒙古扎兰屯	/	0.72	3.44	0.14	/
3	内蒙古莫力达瓦	/	0.35	1.78	/	0.08
4	内蒙古多伦	0.20	0.29	0.89	0.11	/
5	四川理县	/	0.59	3.59	0.21	/
6	辽宁西丰	/	0.48	4.59	0.23	/
7	辽宁凤城	/	0.51	4.12	0.19	0.09
8	辽宁庄河	/	/	3.88	/	/
9	黑龙江伊春	0.19	0.29	8.17	0.16	/
10	黑龙江宝清	/	0.19	6.12	0.19	0.11
11	吉林敦化	/	0.32	3.25	0.22	/
12	吉林汪清	/	0.39	2.58	0.14	/
13	河北赤城	0.24	0.42	3.39	0.29	0.14
14	河北丰宁	/	0.54	0.87	0.27	/
15	山西夏县	0.38	/	0.91	0.21	/
16	新疆阿勒泰	0.20	0.22	2.15	0.17	0.09
17	新疆哈巴河	/	0.25	2.08	0.19	/

注: “/” 代表未检出。

表 4 不同产地中有机氯类农药的残留量(mg/kg)

编号	产地	含量(mg/kg), n=3		
		BHC	DDT	PCNB
1	内蒙古额尔古右旗	0.058	0.068	/
2	内蒙古扎兰屯	0.021	0.054	/
3	内蒙古莫力达瓦	0.048	0.078	/
4	内蒙古多伦	/	0.058	0.048
5	四川理县	/	0.042	/
6	辽宁西丰	/	0.039	/
7	辽宁凤城	0.063	0.047	/
8	辽宁庄河	0.042	0.051	0.024
9	黑龙江伊春	/	0.049	/
10	黑龙江宝清	0.058	0.121	/
11	吉林敦化	0.029	0.087	/
12	吉林汪清	/	0.058	0.037
13	河北赤城	/	0.059	/
14	河北丰宁	/	0.047	/
15	山西夏县	0.039	0.039	0.050
16	新疆阿勒泰	/	0.041	0.038
17	新疆哈巴河	0.040	0.048	0.032

农药残留是中药药材质量的重要控制方面,多地的赤芍药材检出有机氯类,DHC、DDT、PCNB的残留量分别为0.021~0.063 mg/kg、0.039~0.121 mg/kg、0.024~0.050 mg/kg,其中以DDT的检出率较高,17地中仅有黑龙江宝清所产的赤芍中DDT含量达到0.121 mg/kg,超过《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》中对于DDT \leq 0.1 mg/kg的限量要求,原因可能是主要是由于有机氯农药半衰期长,早期的大量使用导致土壤及水体中残留,导致该地区的中药材出现农药残留量超标现象^[13]。

综上所述,赤芍药材的质量因产地不同而呈现地域性差异,测定芍药苷的含量及重金属、农药残留量,对于赤芍的内在质量的评价及其临床用药安全具有重要价值,本研究将为准确评价赤芍的质量提供参考和依据。

参考文献

- [1]俞敬波,章军,王文全.赤芍野生品与栽培品4种化学成分含量的比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):107.
- [2]张建军,黄银峰,王丽丽.白芍,赤芍及芍药苷,芍药内酯苷对综合放血法致血虚小鼠补血作用的比较研究[J].中国中药杂志,2013,38(19):3358-3362.
- [3]谢艳,朱太咏,秦娜.益气生骨颗粒剂的质量标准研究[J].世界中医

- 药,2012,7(1):331-332.
- [4]冀兰鑫,黄浩,李长志.赤芍药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2010,3(4):431.
- [5]王瑞,鲁岚,李颖伟.赤芍与白芍的药理作用比较[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):112-114.
- [6]许惠玉,陈志伟,周丽.赤芍总苷非受体依赖途径诱导K562肿瘤细胞凋亡及相关基因变化的实验研究[J].中国中药杂志,2010,35(24):3377-3381.
- [7]高雪岩,王文全,孙建宁.赤芍总苷抗氧化活性及对大鼠肝星状细胞增殖的影响[J].现代生物医学进展,2011,11(14):2609-2611.
- [8]杨琪伟,杨莉,熊爱珍.赤芍和白芍抗炎作用的UPLC-MS代谢组学初步研究[J].中国中药杂志,2011,36(6):694-697.
- [9]张伟杰,王鹏,杨明俊.川芍,赤芍多糖活性分析及其比较[J].中药材,2011,34(10):1569-1574.
- [10]王瑞,黄山君,王峰涛.一测多评法测定赤芍中不同类型成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2011,28(8):594-598.
- [11]陈立江,段洪云,张胜.赤芍中芍药苷,芍药内酯苷双指标考察赤芍总苷提纯工艺优化[J].食品科学,2011,32(12):96-100.
- [12]马冰,王晶,刘春明.不同提取方法对赤芍中芍药苷含量影响的高效液相色谱法对比研究[J].时珍国医国药,2013,24(8):1820-1822.
- [13]朱金芳,马生军,包晓玮.RP-HPLC法测定赤芍总苷原料中芍药苷和赤芍总苷的含量[J].中国药房,2011,22(7):623-625.

(2014-02-07 收稿 责任编辑:曹柏)

关于举办“十二五名老中医独特辨证方法、特色治则治法传承”高级研修班的通知

各有关单位:名老中医临床经验、学术思想是在长期的理论积累与临证实践总结基础上形成的专业领域内集体智慧的结晶,代表着中医药学术的最高水平,是中医药学创新发展的源泉。近年来,名医经验传承工作深受政府和中医学界的高度重视,五批师承、传承工作室、名医经验传承研究项目课题等传承工作的开展,取得了较好地传承效果。为了更有效的传承名医经验,从方法学上深入挖掘,从名医言传身教中汲取精华,需要加强对传承人的培养和扶持。

中国中医药国际合作中心拟定于2014年11月中旬在北京举办“十二五名老中医独特辨证方法、特色治则治法传承”高级研修班,特邀国医大师亲身授。

一、培训内容

在“十二五”名医经验传承项目研究的基础上,针对名老中医独特辨证方法、特色治则治法经验传承的核心要素及传承方法学上的常见问题,特邀国医大师传授名医经验传承体会,名医传承人讲授跟师学习体会及定性研究方法学传承,注重临床与科研的经验传授及现场答疑。主要内容如下:

1. 名老中医临床经验、学术思想传承研究战略思考(李振吉教授);
2. 国医大师李士懋“汗法”临证经验与传承体会(李士懋教授);
3. 国医大师孙光荣临证经验与传承体会;(孙光荣教授)
4. 名老中医周平安表里和解法临证经验与传承体会(周平

安教授);

5. 国医大师陈可冀血瘀证独特辨证方法临证经验与传承体会(徐浩主任医师);王永炎院士化痰通腑法治疗中风病临证经验及传承体会(邹忆怀主任医师);名老中医吕仁和肾络微型癥瘕证独特辨证方法临证经验与传承体会(李靖副主任医师);
6. 名老中医经验深传承度访谈方法学研究(王玉光主任医师)。

二、培训时间

2014年11月15日~16日,11月14日(周五)下午报到。

三、培训地点

中国高级公务员培训中心。地址:北京市朝阳区育慧里5号。

四、联系电话:010-58650017; 13522902130

五、有关要求

1. 请各学员于11月1日前网上填报报名信息,报名网址为: <http://210.76.97.27/zyy/reception/learn/zxbm.jsp>;
2. 培训费用:1500元/人(含培训费、教材费、资料费),1800元/人(含培训费、教材费、资料费、餐费),交通、住宿费用自理,会务组可协助安排食宿事宜。

详见附件的会议通知。