

不同炮制方法对牡丹皮中丹皮酚、芍药苷、总黄酮及总多糖含量的影响

熊艳¹, 张杰², 时军^{1*}, 黄嗣航¹

(1. 广东药学院 中药学院, 广州 510006; 2. 安徽归然药业有限公司, 合肥 238072)

[摘要] **目的:**探讨不同炮制方法对牡丹皮中主要成分含量的影响,为全面评价牡丹皮的药效与质量提供参考。**方法:**采用 RP-HPLC 测定丹皮酚和芍药苷含量,流动相分别为甲醇-水(55:45)和乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86),检测波长依次为 274,230 nm。采用 Al(NO₃)₃ 显色法测定总黄酮含量,检测波长 508 nm;硫酸-苯酚比色法测定总多糖含量,检测波长 485 nm。**结果:**丹皮酚、芍药苷、总黄酮及总多糖在不同炮制品中含量排序分别为酒炙品>生品>炒黄品>炒焦品>炒炭品,炒黄品>生品>酒炙品>炒焦品>炒炭品,酒炙品>生品>炒黄品>炒焦品>炒炭品,生品>酒炙品>炒黄品>炒焦品>炒炭品。**结论:**多指标成分测定有利于阐释牡丹皮的炮制机制,并有助于牡丹皮炮制品的检测。

[关键词] 牡丹皮; 炮制方法; 丹皮酚; 芍药苷; 总黄酮; 总多糖

[中图分类号] R282.71;R284.1;R283.1;R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0040-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230040

Effects of Different Processing Methods on Contents of Paeonol, Paeoniflorin, Total Flavonoids and Total Polysaccharides in Moutan Cortex

XIONG Yan¹, ZHANG Jie², SHI Jun^{1*}, HUANG Si-hang¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Anhui Guiran Pharmaceutical Co. Ltd, Hefei 238072, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss effects of different processing methods on contents of main components, in order to provide a reference for comprehensive evaluation of efficacy and quality of Moutan Cortex. **Method:** RP-HPLC was established for determining contents of paeonol and paeoniflorin, mobile phases were methanol-water (55:45) and acetonitrile-0.1% phosphoric acid (14:86), detection wavelengths were 274 nm and 230 nm. Aluminum nitrate chromogenic method was adopted to determine the content of total flavonoids with detection wavelength at 508 nm; sulphuric acid-phenol colorimetric method was used to determine the content of total polysaccharides at 485 nm. **Result:** Contents comparison of paeonol, paeoniflorin, total flavonoids and total polysaccharides were in order of stir-frying products with wine > crude products > fried yellow products > fried coke products > carbonizing products by stir-frying, fried yellow products > crude products > stir-frying products with wine > fried coke products > carbonizing products by stir-frying, stir-frying products with wine > crude products > fried yellow products > fried coke products > carbonizing products by stir-frying, crude products > stir-frying products with wine > fried yellow products > fried coke products > carbonizing products by stir-frying, respectively. **Conclusion:** Determination of multi-index ingredients is benefit to monitor quality of processed products of Moutan Cortex and interpret its processing mechanism.

[Key words] Moutan Cortex; processing methods; paeonol; paeoniflorin; total flavonoids; total polysaccharides

[收稿日期] 20140412(002)

[基金项目] 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(2012LYM_0084)

[第一作者] 熊艳, 硕士, 从事中药新剂型与中药新药研究, Tel:13533148972, E-mail:xionyan19900911@163.com

[通讯作者] * 时军, 博士, 副教授, 从事中药制剂新技术与中药药性理论研究, Tel:020-39352169, E-mail:shijun8008@163.com

牡丹皮性寒,味苦、辛,归心、肝、肾经,具有清热凉血、活血化瘀之功效。牡丹皮的炮制始见于《金匱要略方论》^[1],经历代衍变,现在保留了净制生用、清炒、酒制与炒炭等炮制方法^[2,3]。丁安伟等^[4]研究表明不同炮制条件对丹皮炭中黄酮类成分的含量影响较大,总体变化趋势为长时间高温会导致黄酮类成分含量降低。李娟等^[5]研究显示牡丹皮炒炭后没食子酸和5-羟甲基糠醛含量随温度的升高先增多后减少。丘志春等^[6]证明牡丹皮制炭止血作用好,酒制对抗炎、镇痛作用较好。药理研究表明牡丹皮黄酮类成分具有抗炎及抑制酪氨酸酶的活性^[7];多糖类成分具有较明显的降血糖作用^[8]。芍药苷在牡丹皮中含量较高,2010年版《中国药典》对牡丹皮的质量控制仅限于丹皮酚的含量测定^[9],无法体现中药整体、辨证的特点。目前有关牡丹皮的炮制机制尚不明确,本实验拟采用不同方法测定牡丹皮中丹皮酚、芍药苷、总多糖及总黄酮4种成分的含量,探寻四者在不同炮制品中的含量差异,为该药味的炮制机制分析提供参考。

1 材料

LC-20A型高效液相色谱系统(日本岛津),BS110S型1/1万电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司),UV-1800型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),202-2AB型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

牡丹皮药材广州至信中药饮片有限公司,批号120701,经广东药学院中药学院李书渊教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* 的干燥根皮;丹皮酚、芍药苷、芦丁及D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110708-201106,110736-201136,100080-201107,110833-201103),乙腈、甲醇为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备 将牡丹皮药材迅速洗净,润后切薄片,晒干,得生品。取牡丹皮饮片置锅内,于150℃(文火)微炒,取出放凉,得炒黄品。取牡丹皮饮片放入120℃热锅内,炒至微焦,得炒焦品。取牡丹皮饮片,置锅内用190℃(武火)炒至表面焦黄,边缘带黑色,炒至“存性”,喷淋清水,取出,晒干,得炒炭品。取牡丹皮饮片与黄酒拌匀,焖润至酒尽时,置锅内用150℃(文火)微炒,取出放凉,得酒炙品。

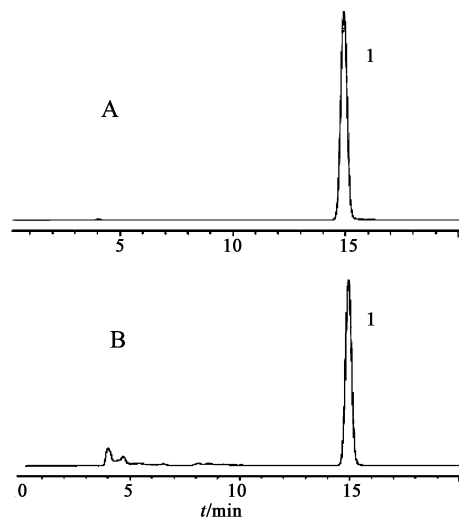
2.2 丹皮酚的含量测定

2.2.1 对照品溶液配制 精密称取丹皮酚对照品

0.0062 g,加甲醇定容至10 mL,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 将牡丹皮炒焦品干燥并粉碎,过40目筛,精密称定粉末0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密量取甲醇50 mL,密塞,摇匀,称定质量,超声处理30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液1 mL至10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 色谱条件 Welch AQ-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(55:45),流速0.8 mL·min⁻¹,柱温35℃,检测波长274 nm,进样量20 μL。理论塔板数以丹皮酚计不低于3 000,见图1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 丹皮酚

图1 牡丹皮炒焦品中丹皮酚 HPLC

2.2.4 标准曲线绘制 精密吸取对照品溶液0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 mL, 分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液,按2.2.3项下色谱条件测定,以丹皮酚对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 11\ 646X + 40\ 982$ ($r = 0.999\ 0$)。方法学考察结果为日内精密度RSD 3.9%,平均加样回收率98.46% (RSD 2.5%)。

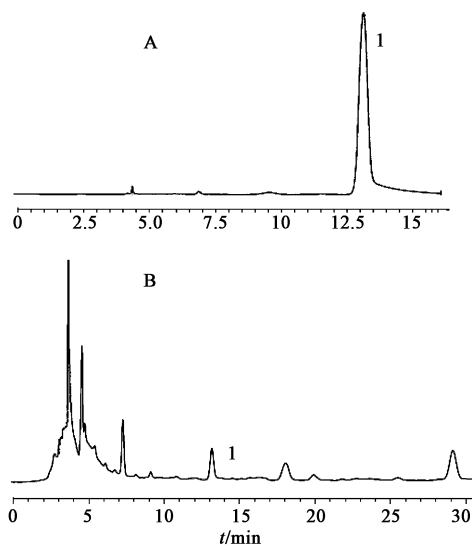
2.3 芍药苷的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品0.0041 g,加甲醇稀释至10 mL,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取牡丹皮炒焦品0.1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇35 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.3.3 色谱条件 Welch AQ-C₁₈色谱柱(4.6 mm ×

250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (14:86), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 230 nm, 进样量 20 μL。理论塔板数以芍药苷计不低于 3 000, 见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芍药苷
图2 牡丹皮炒焦品中芍药苷 HPLC

2.3.4 标准曲线绘制 精密吸取对照品溶液 0.2, 0.5, 1, 2, 2.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液。精密吸取上述各对照品溶液按 2.3.3 项下色谱条件测定峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 26\,450X - 5\,339$ ($r = 0.999\,1$), 线性范围 8.2 ~ 102.5 mg·L⁻¹。方法学考察结果显示日内精密密度 RSD 1.3%, 平均加样回收率 98.35% (RSD 2.5%)。

2.4 总黄酮的含量测定

2.4.1 标准曲线的制备 精密吸取 0.2 g·L⁻¹ 芦丁对照品溶液 0, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 4 mL, 加 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min。以水作空白对照, 于 508 nm 处测定吸光度 (A), 以质量浓度 (C) 为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $A = 9.5C + 0.373$ ($r = 0.999\,2$), 线性范围 0 ~ 80 mg·L⁻¹。

2.4.2 样品测定 精密称取牡丹皮炮制品各 3 份, 每份 5 g, 加入 70% 乙醇 50 mL 回流提取 2 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液, 80 °C 水浴蒸干, 残渣加 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL。精密吸取 2 mL 至 10 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇定容, 摇匀, 精密吸取 1.8 mL

置于 10 mL 量瓶中, 按上述自“各加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL”起开始操作, 于 508 nm 处测定 A, 计算样品中总黄酮含量, 见表 1。

表1 不同牡丹皮炮制品中丹皮酚、芍药苷、

总黄酮及总多糖的含量 mg·g⁻¹

样品	丹皮酚	芍药苷	总黄酮	总多糖
生品	14.126	5.353	8.302	139.197
酒炙品	14.402	5.004	9.744	115.389
炒黄品	11.145	6.012	7.023	104.850
炒焦品	10.191	4.383	6.655	98.569
炒炭品	9.518	2.245	4.157	75.201

2.5 总多糖的含量测定

2.5.1 对照品溶液的制备 精确称取于 105 °C 烘 2 h 的 D-无水葡萄糖对照品 0.019 5 g, 加水溶解并定容至 25 mL, 摇匀, 即得。

2.5.2 供试品溶液的制备 取不同牡丹皮炮制品, 于 60 °C 烘 2 h, 粉碎成中粉 (20 ~ 40 目), 精密称取 1 ~ 2 g 置于圆底烧瓶中, 加入 80% 乙醇 50 mL 回流提取 1 h, 趁热过滤, 残渣用热 80% 乙醇洗涤 3 次, 每次 10 mL, 残渣连同滤纸置烧瓶中, 加 50 mL, 沸水浸提 1 h, 趁热过滤, 残渣用热水洗涤 3 次, 每次 10 mL, 洗液并入滤液中, 放冷, 移置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2.0 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得。

2.5.3 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别加水定容至 10 mL 量瓶中, 吸取上述溶液各 1 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 放置 5 min, 置沸水浴中加热 15 min, 迅速冷却至室温。另取 1 mL 水同法操作作为空白对照, 于 485 nm 处测定 A, 以 C 为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 0.007\,8X + 0.02$ ($r = 0.999\,1$), 线性范围 7.8 ~ 78 mg·L⁻¹。

2.5.4 样品测定 精密吸取供试品溶液 1.0 mL, 按 2.5.3 项下方法显色, 于 485 nm 处测定 A, 按标准曲线方程计算样品中总多糖含量。

3 讨论

2010 年版《中国药典》对牡丹皮药材及其饮片的质量控制仅限于丹皮酚含量的测定, 而牡丹皮中芍药苷、总多糖、总黄酮等成分亦具有明显的药理功效。近年研究发现, 丹皮酚可发挥脑保护和抗疲劳抗焦虑作用, 芍药苷有明显的神经保护作用, 总黄酮有抗炎镇痛作用, 总多糖有增强小鼠免疫功能的作

用^[10]。故应同时测定牡丹皮中芍药苷、丹皮酚、总黄酮及总多糖的含量,以全面考察不同炮制方法制备的牡丹皮药材的质量。

采用 HPLC 测定不同牡丹皮炮制品中丹皮酚的含量,结果表明随着炮制温度的增高,丹皮酚含量逐渐降低。以丹皮炭损失最多,可能是由于丹皮酚易挥发所致;酒炙品中丹皮酚含量最高,原因可能因为文火温度较低,丹皮酚挥发不严重,同时由于丹皮酚易溶于乙醇中,酒炙可增加丹皮酚的溶出。王素娟等^[11]研究发现,牡丹皮中芍药苷在酸催化下可与乙醇发生缩酮反应,产生芍药苷-4-乙基醚,本文中酒炙品中芍药苷含量低于生品,证明这种转化存在可能性。多糖类成分具有抗氧化作用^[12],随着炮制程度的加深,各炮制品中总多糖含量减少明显,可能由于高温产生氧化而使多糖类成分含量明显减少。

[参考文献]

[1] 张仲景. 文棣校. 金匱要略方论[M]. 北京:中国书店出版社,1993:123.
 [2] 赵学龙,丁安伟. 牡丹皮炮制历史沿革的研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(9):1907.
 [3] 张韻慧,柳丰林,张雅慧,等. RP-HPLC 内标法测定牡丹皮饮片丹皮酚的含量[J]. 中国药学杂志,2008,43(1):66.

[4] 丁安伟,张丽,赵学龙,等. 不同炮制工艺丹皮炭中黄酮类成分的动态变化[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):965.
 [5] 李娴,卫向龙,赵学龙,等. 比较牡丹皮炒炭前后的化学成分变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):32.
 [6] 丘志春,孙冬梅,张诚光. 不同炮制方法对牡丹皮中丹皮酚及芍药苷含量的影响[J]. 医学研究杂志,2009,38(4):131.
 [7] 徐金龙,张红梅,徐秀泉. 响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房,2011,22(27):2536.
 [8] 赵根海,沈业寿,卫自,等. 丹皮多糖-2b 对糖尿病大鼠血液流变学影响的实验研究[J]. 中成药,2008,30(9):1270.
 [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160.
 [10] 万京华,李坤珍,陈鹏英. 牡丹皮多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 中国中医药信息杂志,2006,7(13):25.
 [11] 王素娟,杨勇春,李帅,等. 牡丹皮乙醇提取物中的 1 个新芍药苷衍生物[J]. 中国中药杂志,2005,30(10):759.
 [12] 俞慧红,竺巧玲,戴飞,等. 多糖抗氧化作用的研究现状[J]. 食品研究与开发,2008,29(3):172.

[责任编辑 刘德文]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013 年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,242 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfx_2010@188.com,网址:www.syfxzz.com。