

牡丹皮炮制前后 HPLC 指纹图谱比较

钟永翠, 别甜甜, 翟文泽, 孟江, 王淑美, 梁生旺*
(广东药科大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立牡丹皮、酒牡丹皮 HPLC 指纹图谱,并进行比较研究。方法:采用高效液相色谱法,Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸水梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 230 nm,进样量 10 μL。结果:牡丹皮、酒牡丹皮 HPLC 指纹图谱均含有相同的 12 个共有峰,与其相应的对照图谱的相似度均 > 0.90。炮制前后牡丹皮指纹图谱差异不大,但酒牡丹皮 3 号和 6 号峰的峰面积明显增加。结论:该方法准确可靠,为酒牡丹皮进一步研究提供试验依据。

[关键词] 牡丹皮; 炮制; 酒炙; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0071-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100071

HPLC Fingerprint of Moutan Cortex Before and After Processing

ZHONG Yong-cui, BIE Tian-tian, ZHAI Wen-ze, MENG Jiang, WANG Shu-mei, LIANG Sheng-wang*
(School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish and compare the fingerprint of Moutan Cortex and wine Moutan Cortex by HPLC. **Method:** HPLC method was adopted on Luna C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the column temperature was maintained at 25 °C. The detection wavelength was 230 nm, and the injection volume was 10 μL. **Result:** There were 12 common peaks in HPLC fingerprint of Moutan Cortex and wine Moutan Cortex. The similarity between various samples and the automatically generated reference fingerprints reached above 0.90. There were little differences in fingerprint of Moutan Cortex before and after processing, but the peak areas of No. 3 peak and No. 6 peak were increased significantly in wine Moutan Cortex. **Conclusion:** The established method is accurate and reliable, and can provide experimental basis for further study on wine Moutan Cortex.

[Key words] Moutan Cortex; processing; alcoholic prepared; fingerprint; HPLC

牡丹皮为清热凉血药,味苦辛,生用有清热凉血的功效,酒炒活血化瘀,炒炭止血。牡丹皮化学成分主要为酚类、单萜、三萜和甾醇及其苷类^[2]。近代药理研究表明,牡丹皮有抗凝血、降压、抗炎、抑制中枢神经系统等功能^[3]。牡丹皮历来炮制方法较多:汉代有去心、刘宋有清酒拌蒸、宋代有炒、元代有烧灰存性、清代还有面裹煨等方法^[4]。现在牡丹皮应

用较多的炮制方法主要有酒炙和炒炭等。临床上,当归、白芍酒炙可增强活血化瘀功效,地龙、蕲蛇酒炙可增强祛风通络作用,地黄、肉苁蓉酒炙可增强温经补肾作用,此外还可矫味矫臭。研究发现,酒炙牡丹皮在河南、福建、广东等省炮制规范均有收载,且均为酒炒制^[5]。但目前各地方对牡丹皮酒炙工艺的具体量化参数和指标没有统一标准,本试验酒炙

[收稿日期] 20150929(012)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201207004-7)

[第一作者] 钟永翠,在读硕士,从事中药质量控制研究,Tel:15918744025,E-mail:mxiaoxi2720@163.com

[通讯作者] *梁生旺,教授,博士生导师,从事中药质量控制研究,Tel:020-39352172,E-mail:swliang371@163.com

工艺依据别甜甜等^[6]以加酒量、闷润时间及炒制温度为考察因素,正交试验得出的最佳工艺,即每 100 g 药材加 15 g 黄酒,闷润 30 min,80 ℃ 炒至颜色加深近干。

目前已有牡丹皮指纹图谱方面的研究报道^[7-9],但尚未见牡丹皮酒炙品的指纹图谱研究。本试验以丹皮酚为对照,分别建立牡丹皮和酒牡丹皮 HPLC 指纹图谱,进行相似度评价和对比研究,为酒牡丹皮的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A 型高效液相色谱仪(DAD 检测器,日本岛津公司),Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),KQ-500E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),Smart Sensor-AR550 型红外测温仪(香港希玛公司),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(Sartorius)。

1.2 试药 丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110708-200505),黄酒(成都巨龙生物科技有限公司,生产日期 2013-01-14);11 批牡丹皮购于广州市清平药材市场、致信药业有限公司、采芝林药业有限公司,经广东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。水为超纯水,乙腈、甲醇色谱纯,甲醇、乙醇、磷酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸水梯度洗脱(0 ~ 15 min,5% ~ 14% 乙腈;15 ~ 40 min,14% ~ 20% 乙腈;40 ~ 50 min,20% ~ 27% 乙腈;50 ~ 75 min,27% 乙腈;75 ~ 100 min,27% ~ 50% 乙腈),检测波长 230 nm,进样量 10 μL,柱温 25 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹。

2.2 样品的制备

2.2.1 牡丹皮样品的制备 取各批牡丹皮净选,去除杂质,备用。

2.2.2 酒牡丹皮样品的制备^[6] 取各批净选后牡丹皮,每 100 g 药材加黄酒 15 g,搅匀闷润 30 min,置于 80 ℃ 炒制容器内炒制,炒至颜色加深近干时,取出放凉,备用。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,再精密量取 1 mL 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 0.214 8 g·L⁻¹ 的丹皮酚对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 样品粉碎,过 2 号筛,精密称取 0.2 g,精密加入稀乙醇溶液 20 mL,称定质量,超声提取 30 min,静置放冷,补足质量,摇匀过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件测定,连续进样 6 次,记录所得色谱图。结果表明,各色谱峰相对保留时间的 RSD < 2%,相对峰面积的 RSD < 3%,表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一供试品粉末 6 份,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行检测,结果表明,各色谱峰相对保留时间的 RSD < 2%,相对峰面积的 RSD < 3%,表明方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0,4,10,12,18 和 24 h 进样,按 2.1 项下色谱条件进行检测,记录所得色谱图。结果表明,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的采集 按 2.1 项下的色谱条件,分别采集 11 批牡丹皮、酒牡丹皮样品的指纹图谱,均标出相同的 12 个共有峰。以 12 号峰(丹皮酚)为参考峰,计算其共有峰的相对峰面积,见表 1,2。

2.5.2 共有模式的建立 将 11 批牡丹皮、酒牡丹皮样品的指纹图谱,导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版),采用中位数法和多点校正法,时间窗宽度 0.10,生成相应的对照谱图 R,结果见图 1,2。

2.5.3 牡丹皮、酒丹皮相似度评价 分别对牡丹皮、酒丹皮指纹图谱进行相似度计算,结果见表 3,4。从表可知,牡丹皮药材指纹图谱共有峰的相似度均 > 0.90,酒牡丹皮指纹图谱共有峰的相似度均 > 0.95,表明其各批次样品之间相似度高。

2.5.4 生、酒牡丹皮 HPLC 指纹图谱比较 采用 2.5.2 项下方法,将生成的生、酒牡丹皮共有模式导入软件,并计算相似度,见图 3、表 5。对比发现,酒炙后牡丹皮 HPLC 指纹图谱与生品的差异不大,但酒炙后含量发生改变,3 号和 6 号峰的峰面积增加。牡丹皮和酒牡丹皮指纹图谱相似度均 > 0.95,表明生品和酒炙品相似度较高。

2.6 系统聚类分析 将 11 批牡丹皮和酒牡丹皮作为研究对象,12 号峰(丹皮酚)设为参照峰,把 12 个

表 1 11 批牡丹皮的共有峰的相对峰面积

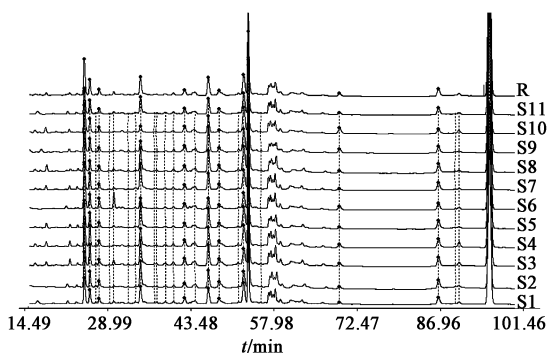
Table 1 Similarities of 11 batches of Moutan Cortex

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	0.004 7	0.009 1	0.004 5	0.004 8	0.003 1	0.007 9	0.002 7	0.008 5	0.006 6	0.002 9	0.002 4
S2	0.077 4	0.162 0	0.082 9	0.098 2	0.075 3	0.066 9	0.136 8	0.068 5	0.089 9	0.099 1	0.129 7
S3	0.043 6	0.069 6	0.040 1	0.042 7	0.017 6	0.041 3	0.040 3	0.043 2	0.024 6	0.028 2	0.041 1
S4	0.053 1	0.144 6	0.072 0	0.048 2	0.049 3	0.087 3	0.033 0	0.097 6	0.063 1	0.025 8	0.020 6
S5	0.006 7	0.010 8	0.008 0	0.009 2	0.007 1	0.006 9	0.007 5	0.007 4	0.007 7	0.006 4	0.007 7
S6	0.059 2	0.109 2	0.052 2	0.051 8	0.073 6	0.070 2	0.038 4	0.057 5	0.068 3	0.071 9	0.066 9
S7	0.027 3	0.061 7	0.017 5	0.016 0	0.026 3	0.019 8	0.015 6	0.021 3	0.030 7	0.015 9	0.022 3
S8	0.086 9	0.110 2	0.051 7	0.065 8	0.016 4	0.088 4	0.068 2	0.082 8	0.089 4	0.074 2	0.118 4
S9	0.220 7	0.427 9	0.218 1	0.200 4	0.455 7	0.213 5	0.249 6	0.234 8	0.236 4	0.184 3	0.215 0
S10	0.009 7	0.013 1	0.010 3	0.012 2	0.013 1	0.006 9	0.016 4	0.006 3	0.009 6	0.015 1	0.029 7
S11	0.034 1	0.061 6	0.031 1	0.030 7	0.047 2	0.037 3	0.029 7	0.037 0	0.033 7	0.022 0	0.023 3
S12	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0

表 2 11 批酒牡丹皮的共有峰的相对峰面积

Table 2 Similarities of 11 batches of wine Moutan Cortex

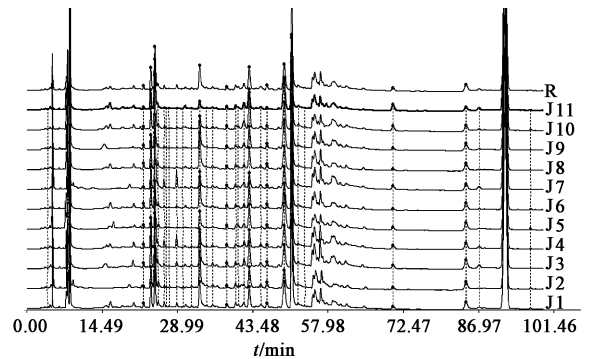
编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
J1	0.009 1	0.004 3	0.008 0	0.007 8	0.007 6	0.011 5	0.002 5	0.012 3	0.010 6	0.004 6	0.005 8
J2	0.044 4	0.059 5	0.046 5	0.046 9	0.028 9	0.048 7	0.043 3	0.050 7	0.034 9	0.034 2	0.043 8
J3	0.078 8	0.133 5	0.097 8	0.129 5	0.087 7	0.063 3	0.125 7	0.069 6	0.096 4	0.102 9	0.130 8
J4	0.072 8	0.169 2	0.079 4	0.053 8	0.065 3	0.097 1	0.045 9	0.106 5	0.097 3	0.031 6	0.023 2
J5	0.008 5	0.009 3	0.008 9	0.008 7	0.010 9	0.008 8	0.008 4	0.008 1	0.009 7	0.008 0	0.009 4
J6	0.064 9	0.093 2	0.063 9	0.058 1	0.103 8	0.072 4	0.047 2	0.055 1	0.089 3	0.095 1	0.077 8
J7	0.013 0	0.025 4	0.012 5	0.009 5	0.014 2	0.013 6	0.008 1	0.014 9	0.016 4	0.007 0	0.004 9
J8	0.094 6	0.097 3	0.067 3	0.085 8	0.160 3	0.102 4	0.077 0	0.088 3	0.133 0	0.088 7	0.135 1
J9	0.238 8	0.395 2	0.238 9	0.232 8	0.272 6	0.219 5	0.243 0	0.234 5	0.270 4	0.197 0	0.217 4
J10	0.009 5	0.010 8	0.011 1	0.013 5	0.015 0	0.005 6	0.013 8	0.006 1	0.009 4	0.016 2	0.031 1
J11	0.031 1	0.048 0	0.033 0	0.028 6	0.045 9	0.035 9	0.025 3	0.035 1	0.038 7	0.023 7	0.020 1
J12	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0



S1 ~ S11. 1 ~ 11 号样品; R. 对照指纹图谱

图 1 11 批牡丹皮样品 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 11 batches of Moutan Cortex



J1 ~ J11. 1 ~ 11 号样品; R. 对照指纹图谱

图 2 11 批酒牡丹皮样品 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 11 batches of wine Moutan Cortex

表 3 11 批牡丹皮的相似度计算

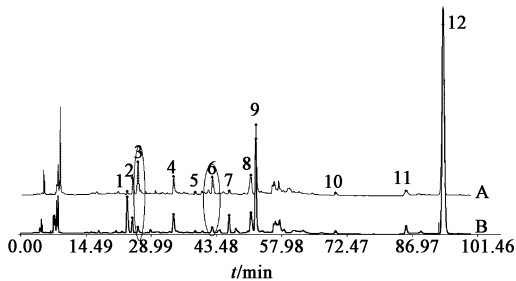
Table 3 Similarities of 11 batches of Moutan Cortex

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	R
S1	1.000	0.965	0.990	0.989	0.984	0.995	0.988	0.982	0.984	0.985	1.000	0.992
S2	0.965	1.000	0.950	0.946	0.955	0.964	0.951	0.958	0.946	0.946	0.965	0.960
S3	0.990	0.950	1.000	0.999	0.995	0.990	0.992	0.993	0.988	0.994	0.990	0.997
S4	0.989	0.946	0.999	1.000	0.994	0.990	0.991	0.993	0.989	0.996	0.989	0.996
S5	0.984	0.955	0.995	0.994	1.000	0.980	0.986	0.997	0.985	0.991	0.984	0.990
S6	0.995	0.964	0.990	0.990	0.980	1.000	0.985	0.981	0.985	0.987	0.995	0.993
S7	0.988	0.951	0.992	0.991	0.986	0.985	1.000	0.983	0.989	0.985	0.988	0.993
S8	0.982	0.958	0.993	0.993	0.997	0.981	0.983	1.000	0.986	0.992	0.982	0.990
S9	0.984	0.946	0.988	0.989	0.985	0.985	0.989	0.986	1.000	0.984	0.984	0.989
S10	0.985	0.946	0.994	0.996	0.991	0.987	0.985	0.992	0.984	1.000	0.985	0.993
S11	1.000	0.965	0.990	0.989	0.984	0.995	0.988	0.982	0.984	0.985	1.000	0.992
R	0.992	0.960	0.997	0.996	0.990	0.993	0.993	0.990	0.989	0.993	0.992	1.000

表 4 11 批酒牡丹皮的相似度计算

Table 4 Similarities of 11 batches of wine Moutan Cortex

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	R
J1	1.000	0.973	0.997	0.997	0.992	0.999	0.996	0.999	0.994	0.996	0.995	0.999
J2	0.973	1.000	0.972	0.969	0.975	0.973	0.971	0.975	0.978	0.964	0.966	0.978
J3	0.997	0.972	1.000	0.998	0.987	0.996	0.996	0.997	0.991	0.992	0.993	0.998
J4	0.997	0.969	0.998	1.000	0.988	0.995	0.997	0.995	0.991	0.993	0.996	0.998
J5	0.992	0.975	0.987	0.988	1.000	0.992	0.988	0.991	0.996	0.990	0.992	0.994
J6	0.999	0.973	0.996	0.995	0.992	1.000	0.993	0.999	0.995	0.994	0.993	0.998
J7	0.996	0.971	0.996	0.997	0.988	0.993	1.000	0.994	0.990	0.993	0.994	0.997
J8	0.999	0.975	0.997	0.995	0.991	0.999	0.994	1.000	0.995	0.994	0.993	0.998
J9	0.994	0.978	0.991	0.991	0.996	0.995	0.990	0.995	1.000	0.991	0.992	0.996
J10	0.996	0.964	0.992	0.993	0.990	0.994	0.993	0.994	0.991	1.000	0.995	0.996
J11	0.995	0.966	0.993	0.996	0.992	0.993	0.994	0.993	0.992	0.995	1.000	0.997
R	0.999	0.978	0.998	0.998	0.994	0.998	0.997	0.998	0.996	0.996	0.997	1.000



A. 酒牡丹皮; B. 牡丹皮

图 3 生、酒牡丹皮 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 3 Fingerprint common model HPLC of Moutan Cortex and wine Moutan Cortex

表 5 生、酒牡丹皮对照谱相似度

Table 5 Similarities of HPLC fingerprint of Moutan Cortex and wine Moutan Cortex

图谱名称	牡丹皮	酒牡丹皮	对照指纹图谱
牡丹皮	1.000	0.979	0.995
酒牡丹皮	0.979	1.000	0.994
对照指纹图谱	0.995	0.994	1.000

件,采用离差平方和法(Ward's Method),选用进行聚类分析,结果见图 4。除了第二批牡丹皮外,可以区别其生品和酒炙品。

3 讨论

选用稀乙醇,甲醇,50% 甲醇,95 乙醇^[10-12]作为

共有色谱峰的相对峰面积导入 SPSS 19.0 统计软

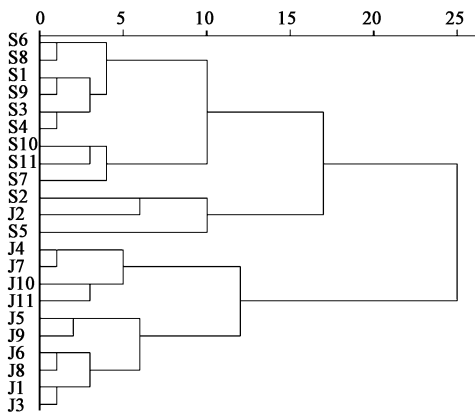


图 4 牡丹皮和酒牡丹皮的聚类分析树状分析
Fig. 4 Cluster analysis of Moutan Cortex and wine Moutan Cortex

提取溶剂进行考察,结果发现,稀乙醇提取的色谱峰数较多,且色谱峰分离度较高,因此确定提取溶剂为稀乙醇。

采用二极管阵列检测器在 190 ~ 400 nm 对供试品溶液进行三维图谱的扫描,结果在 230 nm 条件下,色谱峰响应度较高,峰形对称,峰数较多,分离度较好,基线较为平稳,选择 230 nm 为检测波长。

以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.5% 冰乙酸、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.2% 磷酸水作为流动相分别进行考察,并优化洗脱程序,结果用乙腈-0.2% 磷酸水进行洗脱时,基线平稳,色谱峰分离度较好,出峰时间较为适中。故确定流动相为乙腈-0.2% 磷酸水。

目前文献记载牡丹皮的指纹图谱^[7-12],存在所得图谱共有峰数目少或提取方法复杂,重复性差等不足之处。本试验优化牡丹皮的高效液相指纹图谱测定条件,探索酒牡丹皮的指纹图谱。建立牡丹皮、酒牡丹皮的指纹图谱,比较发现,酒炙后牡丹皮的 HPLC 指纹图谱与生品差异不大,均含有相同的 12

个共有峰,但 3 号和 6 号峰的峰面积明显增加。酒有活血化瘀的功效,酒炙后牡丹皮该 2 个成分的溶出度增加,可能与其增强活血化瘀作用有关,为进一步研究酒牡丹皮提供试验依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160-161.
[2] 王春丽. 牡丹皮化学成分及临床应用[J]. 中国实用医药,2010,5(25):176-177.
[3] 张健萍,李连珍,赵红江,等. 牡丹皮的化学成分、药理作用及临床应用研究概况[J]. 中华中医药杂志,2006,21(5):295-297.
[4] 赵学龙,丁安伟,张丽,等. 牡丹皮炮制历史沿革的研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(9):1907-1910.
[5] 福建省卫生厅. 福建省中药炮制规范[M]. 福建:福建科学技术出版社,1998:244.
[6] 别甜甜,孟江,王淑美,等. 正交试验优选牡丹皮酒炙工艺[J]. 广东药学院学报,2014,30(5):569-573.
[7] 高新彪,孙磊,乔善义,等. 牡丹皮 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2013,44(7):900-904.
[8] 周刚,吕庆红. 牡丹皮不同部位有效成分含量测定及指纹图谱化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(18):2070-2073.
[9] 范旭航,王振中,李清,等. 牡丹皮药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):715-717.
[10] 邓祖磊,黄丽丹,程世云,等. 牡丹皮 HPLC 特征图谱研究[J]. 安徽医药,2011,15(7):825-827.
[11] 姜潇,张君仁. 牡丹皮 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 齐鲁药事,2005,24(4):209-210.
[12] 许舜军,李鹏,杨柳,等. 牡丹皮高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(20):1677-1680.

[责任编辑 顾雪竹]