

HPLC 波长切换法同时测定牡丹皮中6个成分的含量

谢剑琳, 张振秋*, 杨超, 侯学智, 暴凤伟, 王美
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**建立高效液相色谱波长切换法对牡丹皮中6个成分(没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷)进行分析。**方法:**采用 Phenomsil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 267 nm(0~20 min 没食子酸)、258 nm(20~30 min 氧化芍药苷)、230 nm(30~50 min, 芍药苷)、274 nm(50~80 min 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚)、230 nm(80~90 min 苯甲酰芍药苷), 柱温 30 °C。**结果:**牡丹皮中6个成分没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷进样量分别在 0.109 4~1.094 μg($r=0.999 5$), 0.034 86~0.348 6 μg($r=0.999 5$), 0.212 4~2.124 μg($r=0.999 1$), 0.214 5~2.145 μg($r=0.999 6$), 0.323 5~3.235 μg($r=0.999 4$), 0.075 84~0.758 4 μg($r=0.999 3$)与峰面积呈良好线性关系; 平均回收率($n=6$)分别为 98.7%, 98.8%, 99.7%, 98.3%, 98.9%, 99.2%。**结论:**该方法准确可靠、重复性好, 可用于牡丹皮的质量控制。

[关键词] 牡丹皮; 波长切换; 没食子酸; 氧化芍药苷; 芍药苷; 1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖; 丹皮酚; 苯甲酰芍药苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0085-05

HPLC with UV Switch Determination of 6 Indicative Components in Moutan Cortex

XIE Jian-lin, ZHANG Zhen-qiu*, YANG Chao, HOU Xue-zhi, BAO Feng-wei, WANG Mei
(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of 6 indicative components (gallic acid, hydroxyl-paeoniflorin, paeoniflorin, 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose, paeonol, benzoyl-paeoniflorin) in Moutan Cortex. **Method:** Phenomsil (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted; the mobile phase was acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid solution (B) with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 267 nm (0-20 min, gallic acid), 258 nm (20-30 min, hydroxyl-paeoniflorin), 230 nm (30-50 min, paeoniflorin) 274 nm (50-80 min, 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose, paeonol), 230 nm (80-90 min, benzoyl-paeoniflorin). **Result:** The content of 6 indicative components in Moutan Cortex was stable. The method had a good linearity in the ranges of 0.109 4-1.094 μg ($r=0.999 5$) for gallic acid, 0.034 86-0.348 6 μg ($r=0.999 5$) for hydroxyl-paeoniflorin, 0.212 4-2.124 μg ($r=0.999 1$) for paeoniflorin, 0.214 5-2.145 μg ($r=0.999 6$) for 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose, 0.323 5-3.235 μg ($r=0.999 4$) for paeonol, 0.075 84-0.758 4 μg ($r=0.999 3$) for benzoyl-paeoniflorin. The average recoveris ($n=6$) were 98.7%, 98.8%, 99.7%, 98.3%, 98.9%, 99.2%, respectively. **Conclusion:** This method is dependable, simple and practical, and may be use to control quality of Moutan Cortex.

[Key words] Moutan Cortex; UV switch; gallic acid; hydroxyl-paeoniflorin; paeoniflorin; 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose; paeonol; benzoyl-paeoniflorin

[收稿日期] 20120319(017)

[基金项目] 辽宁省教育厅课题中药材品质评价体系研究(2008S145)

[第一作者] 谢剑琳, 在读硕士, 从事药物分析研究, Tel:0411-87586058, E-mail:hkailei@126.com

[通讯作者] * 张振秋, 教授, 博士生导师, 从事中药质量标准研究, Tel:0411-87586058, E-mail:zhangzhenqiu@sina.com

牡丹皮为毛茛科植物牡丹的干燥根皮,性微寒,味苦、辛,具有清热凉血、活血化瘀的功效,用于热入营血,温毒发斑,吐血衄血,夜热早凉,无汗骨蒸,闭经痛经,跌扑伤痛,痈肿疮毒。^[1]

《中国药典》2010 年版(一部)牡丹皮项下只对丹皮酚进行了含量测定,而牡丹皮中除丹皮酚外,还有芍药苷、氧化芍药苷及苯甲酰芍药苷等多种有效成分^[2-3]。目前,牡丹皮中没食子酸、芍药苷、丹皮酚的含量测定已有文献报道^[4-6]、本文在参考相关文献的基础上^[7-10],建立了高效液相波长切换法同时测定没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷 6 个成分的分析方法,为更好地控制牡丹皮的质量提供参考。

1 仪器与试剂

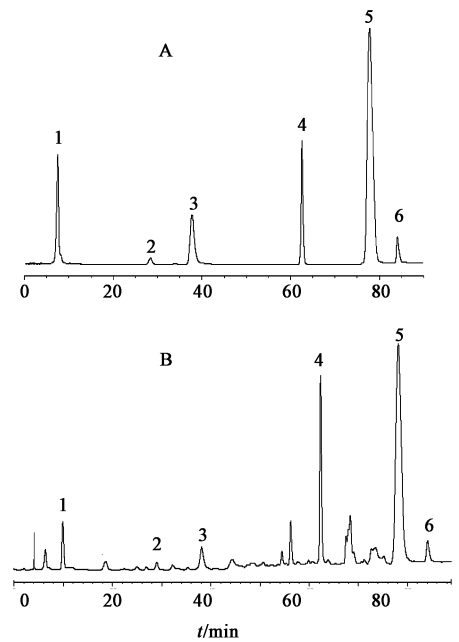
Agilent-1100 型高效液相色谱仪(仪器编号:20041191 DE43607375),配置四元梯度泵、在线脱气机、VWD 检测器,2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司),METTLER AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士),AS3120A 型超声提取器(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),U-3010 型紫外-可见双光束扫描分光光度计(日本日立公司)。

对照品丹皮酚(批号 0708-9704)由中国食品药品检定研究院提供,纯度 98%;氧化芍药苷(批号 110127)由鼎瑞化工有限公司提供,纯度 95%;1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖(批号 110406)由深圳美荷生物科技有限公司提供,纯度 98%;芍药苷(批号 110713)由上海融禾生物制品有限公司提供,纯度 98%;苯甲酰芍药苷(批号 110815)由天津一方科技有限公司提供,纯度 98%。甲醇、乙腈均为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。收集 10 个商品地药材,10 批(山东、云南、内蒙、福建、江苏、浙江、吉林、上海、北京、河北)牡丹皮饮片均经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Phenomsil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)为流动相,梯度洗脱(0~12 min, 3% A~5% A; 12~20 min, 5% A~10% A; 20~40 min, 10% A~15% A; 40~50 min, 15% A~20% A; 50~65 min, 20% A~25% A; 65~77 min, 25% A~28% A; 77~90 min, 28% A~35% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 267 nm(0~20 min, 没食子酸)、258 nm(20~30 min, 氧化芍药苷)、230 nm(30~50 min, 芍药苷)、

274 nm(50~80 min, 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚)、230 nm(80~90 min, 苯甲酰芍药苷)。在上述色谱条件下,理论塔板数以丹皮酚计不低于 1 万,分离度 > 1.5。混合对照品溶液、供试品溶液色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品

1. 没食子酸; 2. 氧化芍药苷; 3. 芍药苷;

4. 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖; 5. 丹皮酚; 6. 苯甲酰芍药苷

图 1 牡丹皮高效液相色谱图

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 分别精密称取对照品没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷适量,分别加甲醇配成各单一对照品储备溶液。没食子酸 0.911 6 g·L⁻¹,氧化芍药苷 0.581 0 g·L⁻¹,芍药苷 1.062 g·L⁻¹,1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 1.072 g·L⁻¹,丹皮酚 1.618 g·L⁻¹,苯甲酰芍药苷 0.632 0 g·L⁻¹,即得。

2.2.2 混合对照品制备 精密吸取 2.2.1 项下的没食子酸、苯甲酰芍药苷的对照品储备液各 0.6 mL,氧化芍药苷对照品储备液 0.3 mL,芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚对照品储备液各 1.0 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取牡丹皮粗粉 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加 75% 乙醇 10 mL,回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,置 50 mL 量瓶中,加 75% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 线性范围考察 分别精密吸取混合对照品溶

液 2,5,10,15,20 μL ,在上述色谱条件下分别进样进行测定。以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标,峰面积(Y)

为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
没食子酸	$Y = 2.79 \times 10^3 X - 69.26$	0.999 5	0.109 4 ~ 1.094
氧化芍药苷	$Y = 1.46 \times 10^3 X - 17.12$	0.999 5	0.034 86 ~ 0.348 6
芍药苷	$Y = 1.13 \times 10^3 X + 38.18$	0.999 1	0.212 4 ~ 2.124
1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	$Y = 2.66 \times 10^3 X - 1.83 \times 10^2$	0.999 6	0.214 5 ~ 2.145
丹皮酚	$Y = 4.44 \times 10^3 X + 3.58 \times 10^2$	0.999 4	0.323 5 ~ 3.235
苯甲酰芍药苷	$Y = 1.94 \times 10^3 X - 35.41$	0.999 3	0.075 84 ~ 0.758 4

2.4 精密度考察 精密吸取 10 号样品的供试品溶液 20 μL ,连续进样 6 次,测得没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷的峰面积的 RSD 分别为 2.3%, 2.0%, 1.8%, 1.1%, 2.6%, 2.1%。结果表明,仪器精密度良好。

2.5 稳定性考察 精密吸取 10 号样品供试品溶液 20 μL ,分别在 0,2,4,6,8,12 h 进样,测得没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 1.9%, 1.9%, 1.7%, 2.4%, 1.6%。结果表明供试品溶液中上述 6 个成分在 12 h 内稳定性良好。

2.6 重复性考察 精密称取 10 号样品粉末 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,按 2.2.3 项下方法平行制备成供试品溶液,分别进样 20 μL 进行测定。结果没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷含量平均值($n = 6$)分别为 1.641, 0.793 5, 4.740, 5.504, 14.38, 0.956 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.9%, 2.1%, 1.8%, 2.0%, 1.3%, 1.6%。结果表明该法重复性良好。

2.7 加样回收率考察 取已知含量(没食子酸 1.641 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、氧化芍药苷 0.793 5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、芍药苷 4.740 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 5.504 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、丹皮酚 14.38 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、苯甲酰芍药苷 0.956 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的 10 号样品粉末,6 份,每份约 0.25g,精密称定,分别置圆底烧瓶中,精密加入没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷对照品储备液各 0.45, 0.35, 1.1, 1.3, 2.2, 0.4 mL,按 2.2.3 项下的方法操作,制备供试溶液,在上述色谱条件下分别进样 20 μL 进行测定,计算回收率。结果没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚、苯甲酰芍药苷平均回收率($n = 6$)分别为 98.7%,

98.8%, 99.7%, 98.3%, 98.9%, 99.2%; RSD 分别为 1.8%, 1.5%, 2.1%, 1.3%, 1.5%, 1.4%。

2.8 样品测定 取所收集的各产地的牡丹皮粗粉约 0.5 g,精密称定,按 2.2.3 项下的方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样 20 μL 进行测定,外标法计算样品中 6 种单体指标性成分的含量。结果见表 3。

3 讨论

比较了超声提取法和回流提取法,结果表明回流提取法比较好。比较了乙醇、甲醇、水等溶剂,结果表明乙醇比较好。在此基础上,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,选择乙醇体积分数、溶剂倍量、提取次数、提取时间 4 个因素,最终确定最佳提取工艺为 75% 乙醇,20 倍量,回流提取 2 次,每次 2 h。

本文建立了 HPLC 波长切换方法测定了牡丹皮中 6 个成分的含量,以保证各成分在最大吸收波长处检测。6 个成分的具体检测波长如下:没食子酸:267 nm、氧化芍药苷:258 nm、芍药苷:230 nm、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、丹皮酚:274 nm、苯甲酰芍药苷:230 nm,均为最大吸收波长。

本文测定了 10 个不同商品地的牡丹皮饮片,各产地之间有一定的差异,没食子酸的含量为 1.264 ~ 3.207 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,氧化芍药苷的含量为 0.793 5 ~ 2.146 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,芍药苷的含量为 4.540 ~ 8.902 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖的含量为 5.043 ~ 9.016 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,丹皮酚的含量为 10.86 ~ 19.28 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,苯甲酰芍药苷的含量为 0.956 ~ 2.363 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。10 个商品地中只有江苏商品地的药材不符合规定(2010 年版《中国药典》规定,丹皮酚含量不得低于 1.2%)。本文采用了加权综合评价和模糊综合评价,以全面评价其质量。

加权评价方法:每个成分的权重系数均为 1/6,10 个商品地的评价结果为:江苏 > 河北 > 山东 > 云南 > 上海 > 内蒙古 > 浙江 > 福建 > 吉林 > 北京。

表 2 牡丹皮加样回收率试验 ($n=6$)

成分	称样量/mg	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
没食子酸	0.253 2	0.415 2	0.410 2	0.809 1	96.0	98.7	1.8
	0.252 5	0.414 1	0.410 2	0.820 6	99.1		
	0.251 1	0.411 8	0.410 2	0.823 4	100.3		
	0.254 8	0.417 9	0.410 2	0.816 2	97.1		
	0.251 9	0.413 1	0.410 2	0.824 6	100.3		
	0.253 7	0.416 1	0.410 2	0.823 9	99.4		
氧化芍药苷	0.253 2	0.200 0	0.203 4	0.400 6	98.6	98.8	1.5
	0.252 5	0.199 5	0.203 4	0.401 4	99.3		
	0.251 1	0.198 4	0.203 4	0.404 2	101.2		
	0.254 8	0.201 3	0.203 4	0.402 5	98.9		
	0.251 9	0.199 0	0.203 4	0.398 2	97.9		
	0.253 7	0.200 4	0.203 4	0.396 9	96.6		
芍药苷	0.253 2	1.200	1.168	2.398	102.6	99.7	2.1
	0.252 5	1.197	1.168	2.332	97.2		
	0.251 1	1.190	1.168	2.349	99.2		
	0.254 8	1.208	1.168	2.353	98.1		
	0.251 9	1.194	1.168	2.357	99.6		
	0.253 7	1.203	1.168	2.392	101.8		
1,2,3,4,6- 五没食子酰葡萄糖	0.253 2	1.393	1.394	2.745	97.0	98.3	1.3
0.252 5	1.389	1.394	2.756	98.1			
0.251 1	1.381	1.394	2.785	100.7			
0.254 8	1.401	1.394	2.761	97.5			
0.251 9	1.385	1.394	2.759	98.5			
0.253 7	1.395	1.394	2.764	98.2			
丹皮酚	0.253 2	3.641	3.56	7.218	100.5	98.9	1.5
	0.252 5	3.631	3.56	7.072	96.7		
	0.251 1	3.611	3.56	7.195	100.7		
	0.254 8	3.664	3.56	7.165	98.3		
	0.251 9	3.622	3.56	7.148	99.0		
	0.253 7	3.648	3.56	7.141	98.1		
苯甲酰芍药苷	0.253 2	0.243 1	0.252 8	0.493 2	98.9	99.2	1.4
	0.252 5	0.242 4	0.252 8	0.496 6	100.6		
	0.251 1	0.241 1	0.252 8	0.492 4	99.4		
	0.254 8	0.244 6	0.252 8	0.491 8	97.8		
	0.251 9	0.241 8	0.252 8	0.497 3	101.1		
	0.253 7	0.243 6	0.252 8	0.490 2	97.6		

表 3 不同商品地牡丹皮含量测定($n=3$)mg·g⁻¹

来源	收集时间	没食子酸	氧化芍药苷	芍药苷	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	丹皮酚	苯甲酰芍药苷
河北	2010-07	3.207	1.829	6.464	8.030	11.57	1.575
山东	2010-08	1.952	0.945	4.540	8.744	16.97	2.066
云南	2010-07	1.627	1.499	6.999	6.729	16.22	1.397
内蒙古	2010-07	1.264	1.031	6.311	6.869	19.28	1.086
福建	2010-07	1.369	1.098	6.457	5.855	12.80	1.236
江苏	2010-08	1.932	2.146	8.902	9.016	10.86	1.444
浙江	2010-08	1.578	0.970	5.019	7.106	14.31	1.151
吉林	2010-03	1.718	0.942	6.039	5.240	12.88	1.132
上海	2010-07	1.666	1.054	6.711	5.043	16.11	2.363
北京	2010-07	1.641	0.793 5	4.740	5.504	14.38	0.956

模糊评价结果为:本实验指标为越大越好,首先

对实际值 X_{ij} 进行归一化变换: $r_{ij} = X_{ij} \div \sqrt{\sum_{i=1}^m X_{ij}^2}$ 得到的归一化矩阵即 X 到 Y 的模糊关系 $R = (r_{ij})_{m \times n}$, 接着以各参评因素相应的最大、最小元, 构成最优向量 R^+ 和最劣向量 R^- : $R^+ = (r_{\max 1}, r_{\max 2}, \dots, r_{\max m})$, $R^- = (r_{\min 1}, r_{\min 2}, \dots, r_{\min m})$ 第 j 个判别对象与最优、最劣向量的距离用 *Euclidean* 分别定义为 $d_j^+ = \sqrt{\sum_{i=1}^m (r_{\max i} - r_{ij})^2}$, $d_j^- = \sqrt{\sum_{i=1}^m (r_{\min i} - r_{ij})^2}$ 第 j 个判别对象与最优向量的贴进度 C_j 用 *Hatming* (海明距离) 定义为 $C_j = d_j^- \div (d_j^- + d_j^+)$ 。根据贴进原则作出的结果为:河北 > 江苏 > 上海 > 山东 > 云南 > 内蒙古 > 浙江 > 福建 > 吉林 > 北京。

综上所述,江苏商品地的药材虽然不符合药典规定,但是以上 2 种方法均显示江苏商品地药材质量良好。本文采用波长切换测定牡丹皮中的 6 种成分,能够更加全面的控制其质量,为其质量评价奠定基础。

[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.

- [2] 王春丽. 牡丹皮化学成份及临床应用[J]. 中国实用医药,2010,25(5):176.
- [3] 王祝举,唐力英,赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用[J]. 国外医药·植物药分册,2006,21(4)155.
- [4] 王玉文,虞科,程翼宇. RP-HPLC 测定牡丹皮饮片中 3 种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(20):1699.
- [5] 温华珍,梁琼麟,罗国安,等. 双波长 HPLC 法同时测定丹皮药材中的 3 个指标成分[J]. 药物分析杂志,2006,26(9):1266.
- [6] 孟宪波,郑晖. HPLC 测定柴芍丸中芍药苷、栀子苷及丹皮酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):72.
- [7] 李伟铭,赵月然,杨艳云,等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(12):2208.
- [8] 冀兰鑫,傅俊曾,黄浩,等. 赤芍中氧化芍药苷和芍药苷的含量测定[J]. 亚太传统医药,2010,6(7):18.
- [9] 李玉恒,张振秋,赖静怡,等. HPLC 波长切换技术同时测定黄连片中 7 中成分含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(2):371.
- [10] 吕士杰,李妍,芦晓晶,等. HPLC 测定芩丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):81.

[责任编辑 顾雪竹]