

牡丹皮中3种活性成分提取方法优化及含量测定

赵亮¹, 吴豪², 张海¹, 吕磊¹, 朱臻宇², 张国庆¹, 柴逸峰² (1. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 优化牡丹皮提取条件, 建立同时测定牡丹皮中没食子酸、芍药苷和丹皮酚3种有效成分含量的反相高效液相色谱分析方法。方法 采用 Agilent Plus C₁₈ 柱, 以乙腈-0.6% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μl。结果 回归方程分别为: 没食子酸 $Y = 16.5980X + 4.9502$, $r = 0.9999$; 芍药苷 $Y = 1.6131X + 0.9951$, $r = 0.9999$; 丹皮酚 $Y = 5.9817X + 54.1030$, $r = 0.9997$ 。线性范围分别为 4.0~100.1; 20.6~515.0; 33.3~832.0 μg/ml。平均回收率分别为 100.7%、99.2%、97.8%; RSD($n=9$) 分别为 1.6%、3.0%、1.1%。结论 考察了牡丹皮的提取条件, 提取效果好, 分析方法准确可靠, 重复性好, 回收率高, 适用于牡丹皮的含量测定。

[关键词] 牡丹皮; 丹皮酚; 芍药苷; 没食子酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.2, R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)06-0432-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.06.009

Extraction optimization and content determination of three effective ingredients in Moutan Coretex

ZHAO Liang¹, WU Hao², ZHANG Hai¹, LV Lei¹, ZHU Zhen-yu², ZHANG Guo-qing¹, CHAI Yi-feng² (1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction methods and develop a HPLC-DAD assay for the determination of three effective ingredients in Moutan Coretex. **Methods** The analysis was performed on an Agilent ZORBAX Eclipse Plus (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with acetonitrile and water (0.6% formic acid) as mobile phase at a rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 254 nm, the injection volume was 10 μl. **Results** The regress equation of gallic acid, paeoniflorin and paeonol were $Y = 16.5980X + 4.9502$, $r = 0.9999$; $Y = 1.6131X + 0.9951$, $r = 0.9999$; $Y = 5.9817X + 54.1030$, $r = 0.9997$, respectively. The average recoveries were 100.7%, 99.2%, 97.8% and RSD($n=9$) were 1.6%, 3.0%, 1.1%. **Conclusion** The extraction effect was good and the determination assay was reliable and accurate.

[Key words] Moutan Coretex; gallic acid; paeoniflorin; paeonol; HPLC

牡丹皮系毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的根皮, 归心、肝、肾经, 用途广泛, 具有清热凉血, 活血化瘀之功效, 用于温毒发斑, 吐血衄血, 夜热早凉, 经闭痛经, 痈肿疮毒, 跌扑伤痛^[1]。近代药理学研究表明, 牡丹皮具有抗炎、抗菌, 调节心血管系统, 还具有中枢抑制、调节免疫、保肝护肝等作用^[2]。

中药质量控制是中药现代化的瓶颈之一, 单一成分含量控制无法体现中药整体、辩证的特点, 也无法满足日益严格的中药质控要求, 对药材中的多种活性成分进行含量测定则能更全面地控制其质量。虽然已有报道对牡丹皮中的多种成分进行含量测

定^[3-6], 但并未对提取方法进行系统优化, 也未见对不同产地牡丹皮中3个成分含量的比较研究。本研究对其主要活性成分丹皮酚、芍药苷、没食子酸的提取方法进行优化并测定其含量, 随后应用到不同产地牡丹皮的质量评价。结果表明, 该方法提取效果好, 测定结果准确可靠, 重复性好。

1 仪器和材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 配有低压四元泵, 二极管阵列检测器, 自动进样器, 柱温箱, ChemStation 色谱工作站。DJ-04 药材粉碎机(上海淀久, 中国); SB3200-T 超声发生器(上海科导, 中国)。笔者收集了5个产地共14个批次的牡丹皮, 对照品丹皮酚、芍药苷、没食子酸(纯度均 > 98%) 以及牡丹皮对照药材(供鉴别用)均购自

[作者简介] 赵亮(1980-), 男, 主管药师。Tel: (021)81875584, E-mail: zhaoliangphar@yahoo.com.cn.

[通讯作者] 柴逸峰。Tel: (021)81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯(Fisher公司),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验 Agilent ZORB-AX Eclipse Plus (4.6 mm × 150mm, 5 μm), 流动相:0.6% 甲酸水溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱程序:0~3 min, 4%~7% B; 3~22 min, 7%~20% B;

22~38 min, 20%~27% B; 38~50 min, 27%~46% B; 50~55 min, 46%~95% B, 流速1.0 ml/min, 检测波长254 nm, 进样量10 μl, 柱温为室温。在此色谱条件下, 分别取空白液、对照品溶液和牡丹皮样品溶液10 μl, 注入色谱仪, 记录色谱图, 结果见图1。理论塔板数均不低于5000, 没食子酸、芍药苷和丹皮酚的保留时间分别为6.6、21.4、50.1 min, 与相邻峰的分度均>1.5。

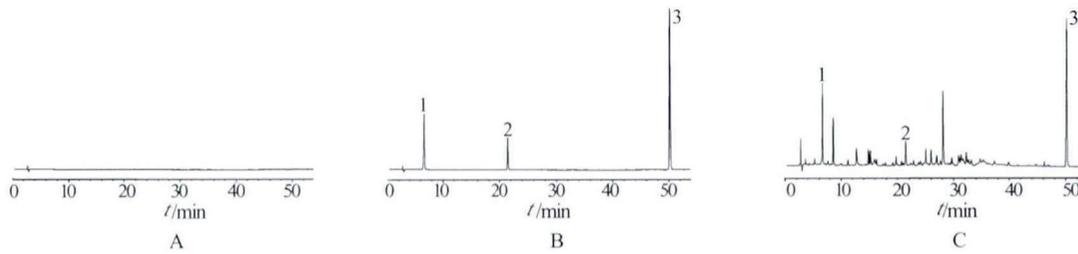


图1 牡丹皮中3种成分的HPLC图谱

A-空白溶液; B-对照品溶液; C-样品溶液; 1-没食子酸; 2-芍药苷; 3-丹皮酚

2.2 对照品储备液的配制 精密称定没食子酸10.01、芍药苷10.30、丹皮酚20.80 mg, 分别置10 ml量瓶, 甲醇定容。配成没食子酸1 001、芍药苷1 030、丹皮酚2 080 μg/ml的储备液。

2.3 样品提取条件优化

2.3.1 提取溶剂考察 因丹皮酚为易挥发性物质, 所以选择超声提取法, 精密称取牡丹皮粉末0.5 g, 共5份, 置50 ml容量瓶中, 分别加入100%、80%、50%、20% 甲醇及水溶液, 超声(50 kHz, 120 W) 30 min, 放冷, 定容。设同一条件下没食子酸、芍药苷和丹皮酚的提取量分别为 A_i 、 B_i 、 C_i ($i=1\sim5$), 5种条件下最大提取量分别为 A_{max} 、 B_{max} 、 C_{max} , 并设 $X_i = A_i/A_{max} + B_i/B_{max} + C_i/C_{max}$, 以 X_i 最大为最优条件, 5种条件下 X_i 分别为2.69、2.83、2.81、2.57

和2.43, $X_{max} = 2.83$, 故选择80%的甲醇为提取溶剂。结果见图2-A。

2.3.2 提取时间考察 精密称取牡丹皮粉末0.5 g, 共3份, 置50 ml容量瓶中, 加入80%的甲醇, 分别提取20、30、40 min, 放冷、定容。同“2.3.1”项下选择标准, X_i 分别为2.99、2.91、2.91, $X_{max} = 2.99$, 故选择超声时间20 min。在提取时间增加的过程中, 丹皮酚的含量甚至减少, 可能是由于其挥发性较大的缘故, 结果见图2-B。

2.3.3 提取次数考察 精密称取牡丹皮粉末0.5 g, 共3份, 置50 ml容量瓶中, 加入80%的甲醇, 分别提取了1次、2次、3次。结果表明, 1次提取可以达到3次提取量的98%以上, 考虑到时间和溶剂的节约, 故采用超声提取1次。结果见图2-C。

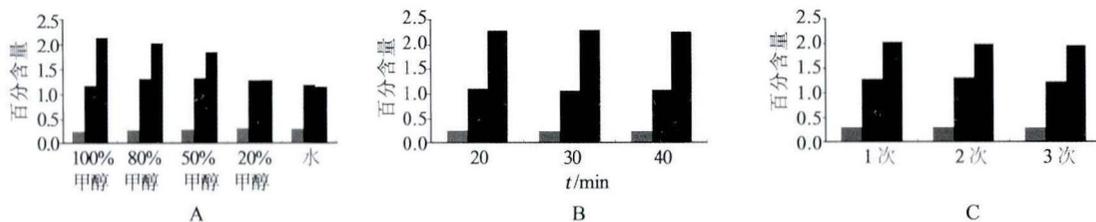


图2 不同因素对没食子酸、芍药苷及丹皮酚提取结果的影响

■ 没食子酸; ■ 芍药苷; ■ 丹皮酚; A 提取溶剂; B 提取时间; C 提出次数

2.3.4 供试品溶液的制备 综合以上提取考察条件, 确定供试品溶液的制备过程: 精密称定牡丹皮药材粉末0.5 g, 置50 ml量瓶中, 加80%甲醇约50 ml,

超声(50 kHz, 120 W)提取20 min, 放至室温, 定容, 摇匀, 经0.22 μm微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 标准曲线及线性关系 精密量取储备液没食子酸 1 ml、芍药苷 5 ml、丹皮酚 4 ml 置 10 ml 量瓶中, 甲醇定容, 配成浓度分别为 100.1、515.0、832.0 g/ml 混合对照品溶液, 逐级稀释制成 6 个浓度梯度的混合对照品溶液, 浓度范围分别为: 没食子酸 4.0 ~ 100.1 μg/ml; 芍药苷 20.6 ~ 515.0 μg/ml; 丹皮酚 33.3 ~ 832.0 μg/ml。取混合对照品溶液 10 μl 进样, 每个浓度重复 3 次, 以色谱峰面积平均值 Y 为纵坐标, 浓度 X (μg/ml) 为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程分别为: 没食子酸 $Y = 16.598X + 4.9502$, $r = 0.9999$; 芍药苷 $Y = 1.6131X + 0.9951$, $r = 0.9999$; 丹皮酚 $Y = 5.9817X + 54.103$, $r = 0.9997$ 。

2.5 稳定性 按“2.1”项下色谱条件, 同一供试品分别在 0、6、12、18、24 h 进样 10 μl, 测定没食子酸、芍药苷和丹皮酚的峰面积, 其 RSD 分别为 1.32%、0.59%、0.54%, 供试品在常温下稳定。

2.6 精密度 按“2.1”项下色谱条件, 取没食子

酸、芍药苷和丹皮酚浓度分别为 20.02、103.0、166.4 μg/ml 的对照品溶液 10 μl, 重复进样 6 次, 计算三者峰面积 RSD, 分别为 0.30%、0.33%、0.11%, 结果显示日间精密度良好。上述对照品溶液连续分析 5 d, 峰面积 RSD 分别为 3.9%、1.1%、1.0%, 显示日间精密度良好。

2.7 重复性 按“2.3”项下供试品制备方法制备 5 份样品, 取 10 μl 进样, 测定没食子酸、芍药苷和丹皮酚峰面积 RSD, 分别为 1.3%、0.5%、0.13%。

2.8 加样回收率 取牡丹皮约 0.25 g, 共 9 份, 精密称定, 置 50 ml 容量瓶中, 分别加入高、中、低浓度的混合对照品溶液, 每个浓度 3 份, 按“2.3.4”项下制备供试品溶液, 进样分析, 测定回收率, 结果见表 1。

2.9 样品测定 共收集 14 个批次的牡丹皮样品, 按“2.3.4”项下制备供试品溶液, 每份重复 3 次, 按“2.1”项下色谱条件进样 10 μl, 结果见表 2。

表 1 没食子酸、芍药苷和丹皮酚的加样回收率 ($n = 9$)

化合物	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
没食子酸	0.436 4	0.200 2	0.639 4	100.7	1.6
	0.434 4	0.400 4	0.830 2		
	0.401 1	0.600 6	1.014 0		
芍药苷	1.326	0.600	1.934	99.2	3.0
	1.320	1.200	2.531		
	1.238	1.825	2.979		
丹皮酚	4.657	2.236	6.845	97.8	1.1
	4.637	4.446	8.943		
	4.281	6.656	10.85		

表 2 牡丹皮中没食子酸、芍药苷和丹皮酚的含量 (% , $n = 3$)

编号	样品来源	没食子酸	RSD	芍药苷	RSD	丹皮酚	RSD
1	对照药材	0.29	1.2	1.62	0.5	2.34	0.9
2	四川滇江	0.15	0.5	1.56	1.2	1.71	0.8
3	安徽(购于浙江)	0.26	0.7	0.66	1.1	1.07	0.5
4	安徽(购于深圳)	0.24	1.1	0.51	0.7	2.03	0.4
5	云南(购于广东茂名)	0.20	1.0	0.74	0.8	1.32	0.9
6	山东临沂(购于河北保定)	0.29	1.3	1.12	1.0	2.59	1.0
7	安徽(购于浙江, 炒制)	0.27	0.9	0.59	0.5	1.11	0.6
8	安徽(购于上海)	0.32	1.2	1.72	1.3	2.56	0.8
9	山东临沂(购于河北保定, 炒制)	0.26	1.2	0.66	0.5	1.05	1.0
10	安徽亳州(购于亳州)	0.16	1.3	0.32	1.1	1.94	0.5
11	安徽铜陵(购于安徽六安)	0.16	0.6	0.48	0.8	1.71	0.5
12	安徽亳州(2008 年)	0.16	1.4	0.97	0.8	2.42	1.0
13	安徽亳州(2007 年)	0.28	1.0	1.61	1.2	2.50	0.7
14	安徽亳州(2006 年)	0.23	0.6	1.89	0.9	2.76	1.0

3 讨论

3.1 色谱条件考察 在流动相优化过程中, 由于没食子酸的出峰时间过短, 溶剂效应明显, 故在流动相中加

入了 0.6% 甲酸, 使其保留时间延长, 色谱峰形良好。

3.2 检测波长的选择 没食子酸、芍药苷和丹皮酚的最大吸收波长各异, 没食子酸为 220 ~ 270 nm, 芍药苷 230 nm, 丹皮酚 274 nm, 综合考虑选取通用的

254 nm 作为检测波长。

3.3 含量测定结果 结果显示,不同产地间成分含量差别较大,没食子酸、芍药苷和丹皮酚含量的波动范围分别为 0.15% ~ 0.32%, 0.32% ~ 1.89% 和 1.05% ~ 2.76%, 芍药苷的含量波动最大。即使是相同产地不同年份间的含量差异也较大。目前《中华人民共和国药典》对牡丹皮的质量控制指标主要是其中丹皮酚的含量,不同产地的牡丹皮药材由于生长环境不同,会导致其所含的有效成分含量存在一定差异^[7]。有文献研究报道^[8],牡丹皮在产地加工时多为采挖后不清洗直接抽出木心晒干,干燥过程易受天气因素的影响,干燥时间越长,丹皮酚损失越多,加工后的牡丹皮在常温贮存过程中会有丹皮酚析出,在牡丹皮入药清洗泥沙时会随水流失,影响牡丹皮质量,所以加工过程和贮藏时间也是影响牡丹皮药材质量的重要因素。因此,牡丹皮药材的质量稳定性亟待提高,植物种植、加工和贮藏的标准化很有必要,需要进一步规范操作,以保证牡丹皮药材的质量均一性。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160.
- [2] 王祝举,唐力英,林炎. 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.
- [3] 杨洁,贾国强,刘萍. HPLC 法测定不同产地牡丹皮中丹皮酚的含量[J]. 科学技术与工程 2006,6(3):299.
- [4] 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.
- [5] 杨晨,方成武,韩燕全,等. HPLC 测定不同产地不同采收期牡丹皮中丹皮酚的含量[J]. 中国当代医药,2010,17(5):5.
- [6] 范旭航,马天成,沈旭,等. UPLC 法测定不同产地不同部位牡丹皮中 6 种活性成分[J]. 中成药,2012,34(2):317.
- [7] 许玲,金传山,吴德玲. 不同产地牡丹皮饮片质量评价. 安徽中医学院学报,2012,31(2):64.
- [8] 马豪,唐声伟,张吉,等. 加工方法及贮存期对牡丹皮质量因素影响的研究[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(4):16.

[收稿日期]2012-09-17

[修回日期]2013-02-21

(上接第 411 页)

表 10 3 批盐酸普萘洛尔乳膏样品含量测定结果

批号	取样量(g)	含量(%)	标示量(%)	RSD(%)
20120323	1.010	1.95	97.5	2.19
	0.998	1.92	96.0	
	1.014	2.05	102.5	
20120330	1.017	1.97	98.5	
	1.009	2.01	100.5	
	1.012	1.98	99.0	
20120406	1.001	1.93	96.5	
	1.013	1.96	98.0	
	0.995	2.04	102.0	

3 讨论

本实验通过正交试验,以乳化温度、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯及吐温-80 用量为考察因素,优选了最佳基质配方和工艺条件。在处方中,单硬脂酸甘油酯和吐温-80 为 O/W 型乳膏的乳化剂,使乳膏稳定;硬脂酸作为油相分散后,使成品带珠光,涂布皮肤后,在表皮形成酸罩,具有一定的抑菌作用和保护作用。

本实验采用 HPLC 法测定盐酸普萘洛尔的含量,并对其进行质量控制。关于盐酸普萘洛尔的含量测定方法,《中华人民共和国药典》2010 年版中只收录了紫外分光光度法,而 HPLC 法作为现代最常

用的含量测定方法,具有分析速度快、分离效率高、选择性好、检测灵敏度高、操作自动化、应用范围广等优点,因此选用 HPLC 法进行质量控制。

近年来,国内外有大量关于普萘洛尔治疗血管瘤的报道,笔者也观察了普萘洛尔对血管瘤患者的临床疗效,结果发现口服效果虽显著,但个别有血压及心率下降、血糖改变、溢奶、腹泻、精神症状等不良反应,临床应用受到一定限制。因此,笔者针对普萘洛尔内服用药的不足,而研制了外用乳膏剂。本研究通过正交试验确定了盐酸普萘洛尔乳膏剂的最佳基质组成和工艺条件,并对其进行质量检查,建立了可控的质量标准,旨在为血管瘤患者提供安全有效的药物。

【参考文献】

- [1] Léauté-Labrèze C, Dumas dela Roque E, Hubiche T, et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy[J]. N Engl J Med, 2008, 358(24):2649.
- [2] 金英妮,金哲虎,崔笑怡,等. 普萘洛尔口服治疗婴幼儿血管瘤的临床观察[J]. 中国皮肤性病杂志,2011,9(25):688.
- [3] 李真. 普萘洛尔口服治疗婴幼儿血管瘤的效果观察[J]. 山东医药,2011,51(34):103.
- [4] 张健. 普萘洛尔在婴幼儿增生期血管瘤治疗中的临床应用[D]. 山东大学,2010:9.
- [5] 毕殿洲. 药剂学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2000:369.

[收稿日期]2013-03-29

[修回日期]2013-09-23