

## HPLC 法同时测定不同产地牡丹皮中 13 种化学成分的含量

夏成凯<sup>1,2</sup>, 詹云武<sup>3</sup>, 胡云飞<sup>4</sup>, 方成武<sup>3\*</sup>

1. 安徽省中医药科学院亳州中医药研究所, 安徽 亳州 236800

2. 亳州职业技术学院, 安徽 亳州 236800

3. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031

4. 合肥市食品药品检验所, 安徽 合肥 230031

**摘要:** 目的 建立同时测定不同产地牡丹皮中没食子酸、5-羟甲基糠醛、没食子酸甲酯、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、苯甲酸、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、牡丹皮苷 C、苯甲酰氧化芍药苷、丹皮酚 13 种化学成分的含量 HPLC 方法。方法 采用 50% 甲醇回流提取, 色谱条件采用 C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.5% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。结果 所测 13 种化学成分在测定的质量浓度范围内线性关系良好, *r* 均大于 0.999 5, 有良好的精密度、稳定性、重复性和回收率。结论 所建立的 HPLC 方法可用于同时测定牡丹皮中 13 种化学成分的含量, 该方法高效、准确、重复性好, 可用于牡丹皮药材的质量控制。

**关键词:** 牡丹皮; 高效液相色谱法; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 没食子酸甲酯; 氧化芍药苷; 儿茶素; 芍药苷; 1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖; 1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖; 苯甲酸; 1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖; 牡丹皮苷 C; 苯甲酰氧化芍药苷; 丹皮酚

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0970-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.027

## Simultaneous determination of thirteen components of *Moutan Cortex* in different regions by HPLC

XIA Cheng-kai<sup>1,2</sup>, ZHAN Yun-wu<sup>3</sup>, HU Yun-fei<sup>4</sup>, FANG Cheng-wu<sup>3</sup>

1. Bozhou Institute of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Bozhou 236800, China

2. Bozhou Vocational and Technical College, Bozhou 236800, China

3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

4. Hefei Food and Drug Inspection Institute, Hefei 230031, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for the analysis of thirteen main chemical constituents (gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, methylgallate, oxypaeoniflora, catechins, paeoniflorin, 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-*D*-glucose, 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-*D*-glucose, benzoic acid, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-*D*-glucose, mudanpioside C, benzoyloxypaeoniflorin, and paeonal) in *Moutan Cortex* from different origins. **Methods** The methanol (50%) reflux extraction was adopted to *Moutan Cortex*. Separation was carried out on C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was eluted with acetonitrile-0.5% phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 30 °C. **Results** The linear relation of thirteen main active components measured in the range of mass concentration was good with perfect precision, repeatability, and stability, the value of which was all more than 0.999 5. **Conclusion** The HPLC method established for simultaneous determination of thirteen main chemical compositions in *Moutan Cortex* is effective, accurate, and reproducible, which can be used for the quality control of *Moutan Cortex*.

**Key words:** *Moutan Cortex*; HPLC; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; methylgallate; oxypaeoniflora; catechins; paeoniflorin; 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-*D*-glucose; 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-*D*-glucose; benzoic acid; 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-*D*-glucose; mudanpioside C; benzoyloxypaeoniflorin; paeonal

收稿日期: 2018-10-19

基金项目: 安徽省科技重大专项 (1603081113); 安徽省教育厅自然科学重点项目 (KJ2015A388); 国家中医药管理局中药标准化项目 (国中医药办科技函 [2016] 号); 亳州市创新创业领军人才行动计划 (亳组 2016 [32] 号); 安徽省农业科技创新资金项目 (科农秘 2017 [344] 号)

作者简介: 夏成凯 (1982—), 男, 副教授, 研究方向为中药质量控制与评价。E-mail: 65005441@qq.com

\*通信作者 方成武 (1961—), 男, 教授, 研究方向为中药质量标准。E-mail: cwfang1961@sina.com

牡丹皮来源于毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 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、无汗骨蒸、经闭痛经、跌打损伤、痈肿疮毒等<sup>[1]</sup>。牡丹皮主产于安徽、四川、陕西、湖北、山东等地, 气候、温度、土壤与雨水等环境因素可能造成牡丹皮质量有所差异, 有效成分有所差异<sup>[2]</sup>。

牡丹皮作为临床常用中药, 其质量标准受到国内外的广泛关注。目前, 丹皮酚常作为牡丹皮质量控制的主要指标成分, 仅用这一种或几种指标成分进行质量控制与评价牡丹皮药材质量往往不能够被全面的考察。因此多指标成分测定方法越来越多地用于牡丹皮质量标准的研究中<sup>[3]</sup>。牡丹皮的化学成分较为复杂, 主要包括丹皮酚、芍药苷、没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、牡丹皮苷 C、苯甲酰基氧化芍药苷等<sup>[4-5]</sup>。

本研究选取不同产地(山东、山西、湖北、河南、安徽铜陵、安徽亳州华佗镇、安徽亳州谯东镇、安徽亳州五马镇、安徽亳州十八里镇)牡丹皮, 采用 HPLC 法同时测定所收集凤丹皮、亳丹皮和其他地区丹皮中 13 个化学成分(没食子酸、5-羟甲基糠醛、没食子酸甲酯、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、苯甲酸、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、牡丹皮苷 C、苯甲酰氧化芍药苷、丹皮酚)含量。建立快捷、方便、可靠的同时测定牡丹皮多种化学成分的检测方法, 为牡丹皮药材质量标准评价体系提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱(美国 Waters 公司); CAV214C 电子天平 [奥豪斯仪器(上海)有限公司]; XP205 百万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司); Milli-Q 超纯水机(默克化工技术上海有限公司)。

### 1.2 试剂与试药

没食子酸(批号 16071804)、5-羟甲基糠醛(批号 16012601)、没食子酸甲酯(批号 15103003)、氧化芍药苷(批号 1602401)、儿茶素(批号 15101302)、1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖(批号 16082201)、1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖(批号 16082109)、苯甲酸(批号 15091401)、1,2,3,4,6-*O*-

五没食子酰葡萄糖(批号 16080601)、牡丹皮苷 C(批号 16110201)、苯甲酰氧化芍药苷(批号 16031601)质量分数均 $\geq 98\%$ , 购于成都普菲德生物技术有限公司; 芍药苷(批号 161106-201609, 质量分数 96.4%)、丹皮酚(批号 110708-201606, 质量分数 100.0%)购于中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇为色谱纯; 超纯水(自制), 美国 Millipore 公司 Milli-Q 超纯水系统制备; 其他试剂均为分析纯。

9 批牡丹皮药材样品分别采自山东、山西、湖北、河南、安徽铜陵、安徽亳州华佗镇、安徽亳州谯东镇、安徽亳州五马镇、安徽亳州十八里镇, 以上样品均经安徽中医药大学方成武教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。样品信息见表 1。

表 1 牡丹皮样品信息

Table 1 Samples information of *Mortan Cortex*

编号	品种	生长年限	产地
M1	牡丹皮	4	山东
M2	牡丹皮	4	山西
M3	牡丹皮	4	湖北
M4	牡丹皮	4	河南
M5	凤丹皮	4	安徽铜陵
M6	亳丹皮	4	安徽亳州华佗镇
M7	亳丹皮	4	安徽亳州谯东镇
M8	亳丹皮	4	安徽亳州五马镇
M9	亳丹皮	4	安徽亳州十八里镇

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

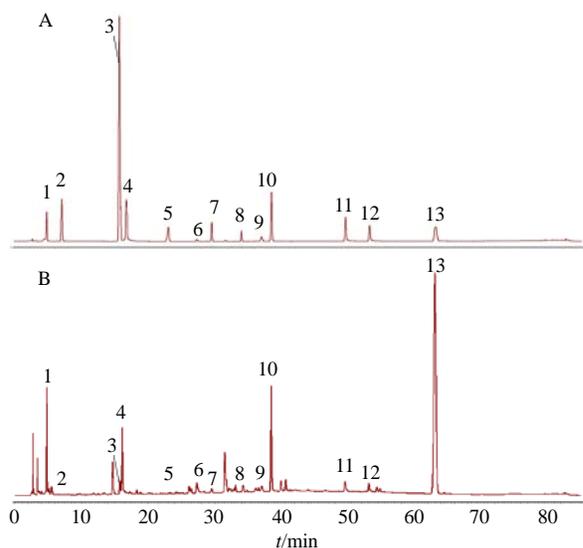
**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、没食子酸甲酯、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、苯甲酸、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、牡丹皮苷 C、苯甲酰氧化芍药苷、丹皮酚适量置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成质量浓度为 37.30、47.60、301.90、96.20、70.50、69.00、124.80、110.60、58.20、105.00、53.80、37.10、42.50  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取牡丹皮药材粉末(过 3 号筛)约 1 g, 精密称定, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 50% 甲醇 20 mL 浸泡 30 min, 水浴回流 3 次(依次为 20、20、10 mL), 每次 30 min, 滤过,

合并滤液于 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 取滤液过 0.22 μm 的微孔滤膜, 即得。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge<sup>®</sup>C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); 流动相为乙腈 (A)-0.5% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 5% A; 2~30 min, 5%~16% A; 30~70 min, 16%~33% A; 70~80 min, 33%~80% A; 80~85 min, 80%~5% A; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。



1-没食子酸 2-5-羟甲基糠醛 3-没食子酸甲酯 4-氧化芍药苷 5-儿茶素 6-芍药苷 7-1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖 8-1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖 9-苯甲酸 10-1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖 11-牡丹皮苷 C 12-苯甲酰氧化芍药苷 13-丹皮酚  
1-gallicacid 2-5-hydroxymethylfurfural 3-methylgallate 4-oxypaeoniflora 5-catechins 6-paeoniflorin 7-1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-*D*-glucose 8-1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-*D*-glucose 9-benzoicacid 10-1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-*D*-glucose 11-mudanpiosideC 12-benzoyloxypaeoniflorin 13-paeonal

图 1 混合对照品 (A) 及牡丹皮样品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and samples (B)

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系考察** 精密移取混合对照品溶液适量, 按比例稀释, 获得 6 个不同质量浓度的对照品溶液, 注入高效液相色谱仪, 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线并进行回归计算, 得各成分的标准曲线回归方程见表 2。

**2.3.2 精密度试验** 取混合对照品溶液适量, 按“2.2”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积, 结果 RSD 分别为 0.86%、1.01%、0.69%、0.85%、1.12%、0.52%、0.38%、0.68%、0.36%、0.98%、0.72%、0.55%、0.62%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取同一批牡丹皮供试品 (M5) 溶液适量, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果其质量分数的 RSD 分别为 1.86%、1.11%、1.59%、0.95%、1.02%、0.83%、1.48%、1.06%、1.16%、0.96%、1.22%、0.59%、0.92%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批样品 (M5) 粉末 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果 RSD 分别为 1.21%、0.91%、1.33%、0.99%、1.44%、0.69%、1.02%、1.22%、1.01%、0.88%、1.31%、0.98%、0.79%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 精密称取已测定 M7 号样品粉末 6 份, 约 0.5 g, 分别精密加入没食子酸、5-羟甲基糠醛、没食子酸甲酯、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、1,2,3,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、1,2,4,6-*O*-四没食子酰葡萄糖、苯甲酸、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、牡丹皮苷 C、苯甲酰氧化芍药苷、丹皮酚对照品 0.70、0.025、0.60、1.05、0.08、5.05、0.26、0.25、0.55、2.00、0.09、0.18、3.80 mg, 按“2.1.2”

表 2 13 个化合物回归方程和线性范围

Table 2 Regression equation and liner range of thirteen constituents

化合物	回归方程	r <sup>2</sup>	线性范围/μg
没食子酸	Y=376 931 X-11 058	0.999 8	0.037~3.73
5-羟甲基糠醛	Y=9 370 X+2 871	0.999 9	0.047~4.76
没食子酸甲酯	Y=12 980 X+98 230	0.999 5	0.031~3.02
氧化芍药苷	Y=5 514 X+8 964	0.999 7	0.096~9.62
儿茶素	Y=29 355 X-59 605	0.999 8	0.071~7.05
芍药苷	Y=25 535 X-10 235	0.999 9	0.069~6.90
1,2,3,6- <i>O</i> -四没食子酰葡萄糖	Y=29 355 X-5 9605	0.999 5	0.120~12.48
1,2,4,6- <i>O</i> -四没食子酰葡萄糖	Y=28 995 X+10 306	0.999 6	0.110~11.06
苯甲酸	Y=20 603 X+2 875	0.999 8	0.058~5.82
1,2,3,4,6- <i>O</i> -五没食子酰葡萄糖	Y=179 390 X-96 304	0.999 9	0.110~10.50
牡丹皮苷 C	Y=8 760 X+13 244	0.999 7	0.054~5.38
苯甲酰氧化芍药苷	Y=40 250 X+712.5	0.999 8	0.037~3.71
丹皮酚	Y=252 413 X-29 367	0.999 9	0.085~8.50

项方法制备供试品溶液,按“2.2”项色谱条件进行测定,结果显示,加样回收率分别为 98.90%、99.48%、99.60%、98.31%、99.14%、98.80%、99.34%、98.36%、99.74%、100.16%、99.14%、98.91%、99.23%,RSD 分别为 0.69%、1.12%、1.11%、0.71%、0.81%、1.65%、1.04%、0.88%、0.91%、0.92%、1.62%、0.91%、1.02%。

### 2.4 测定结果

对 9 批不同产地的牡丹皮 13 个化学成分含量进行测定,结果见表 3;结果表明,河南产地样品(M4)中没食子酸甲酯、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、1,2,3,6 四没食子酰基葡萄糖、1,2,4,6-*O*-四没

食子酰基葡萄糖、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、牡丹皮苷 C、丹皮酚等 9 个化学成分含量相对较低。《中国药典》2015 年版规定丹皮酚的质量分数不低于 1.2%,此次 9 批样品中山西、河南产地牡丹皮丹皮酚含量均不符合《中国药典》2015 年版规定。从地理位置看,山西与河南地理位置相对偏西北,安徽铜陵、亳州、湖北与山东相对偏东南,从没食子酸含量看,西北到东南含量呈递减变化。从丹皮酚含量看,东南到西北呈递减变化。凤丹皮与其他产地牡丹皮相比,其有效成分含量均不是最高。亳州皮与其他产地牡丹皮相比,苯甲酸含量与丹皮酚含量为最高。

表 3 9 批牡丹皮样品中 13 种成分含量测定结果

Table 3 Determination of thirteen components in nine batches of samples

编号	产地	质量分数(mg·g <sup>-1</sup> )												
		没食子酸	5-羟甲基糠醛	没食子酸甲酯	氧化芍药苷	儿茶素	芍药苷	1,2,3,6- <i>O</i> -四没食子酰葡萄糖	1,2,4,6- <i>O</i> -四没食子酰葡萄糖	苯甲酸	1,2,3,4,6- <i>O</i> -五没食子酰葡萄糖	牡丹皮苷 C	苯甲酰氧化芍药苷	丹皮酚
M1	山东	1.986 3	0.008 9	0.323 3	2.402 6	0.059 9	11.281 2	0.856 9	0.886 3	1.493 4	4.896 4	0.504 9	0.449 9	12.375 1
M2	山西	5.781 9	0.143 3	0.971 6	3.817 1	0.415 4	26.088 2	1.069 1	1.051 2	2.300 4	16.085 6	0.587 1	0.756 6	11.716 4
M3	湖北	1.373 9	0.019 2	2.090 2	3.642 0	0.080 0	20.880 6	1.374 0	1.331 1	1.685 7	10.169 0	0.617 3	0.858 6	21.001 6
M4	河南	4.611 3	0.041 4	0.090 9	1.162 1	0.009 0	9.408 0	0.709 5	0.695 6	2.290 0	3.575 0	0.236 4	0.438 0	5.785 5
M5	铜陵	2.093 5	0.009 4	0.344 4	2.515 0	0.065 9	12.105 2	0.874 6	0.890 1	1.604 6	4.810 5	0.584 5	0.453 9	12.960 8
M6	亳州华佗镇	1.285 4	0.052 2	1.646 0	3.074 8	0.315 8	25.109 4	1.275 5	1.263 7	3.335 4	13.682 7	0.770 4	0.676 9	21.733 5
M7	亳州谯东镇	1.372 0	0.050 1	2.460 0	4.200 5	0.331 7	20.250 3	1.076 0	1.101 3	2.265 2	8.020 7	0.373 4	0.683 8	15.075 3
M8	亳州五马镇	1.411 4	0.006 1	1.446 8	2.757 7	0.101 5	15.015 5	0.933 2	0.944 6	2.245 3	10.987 4	0.329 7	0.333 3	16.505 9
M9	亳州十八里	0.692 4	0.036 2	1.776 0	4.787 6	0.181 0	19.791 9	1.193 2	1.210 6	2.621 3	9.880 0	0.324 7	0.891 5	17.969 4

## 3 讨论

### 3.1 提取方法与溶剂选择

本实验对不同溶剂进行比较,70%乙醇、50%乙醇、无水乙醇、70%甲醇、50%甲醇、甲醇作为本次实验所用的提取溶剂<sup>[6-8]</sup>,结果发现 50%甲醇所提取出牡丹皮峰型较好,容易区分。选取不同的提取方式,超声、回流与索式提取,将索式提取方式优化改为 50%甲醇回流,后发现 50%甲醇反复回流 3 次能够将牡丹皮主要成分峰分离出,图谱重现性良好。

### 3.2 色谱条件的选择与优化

在实验中根据文献资料<sup>[9-10]</sup>,分别比较甲醇-水、甲醇-0.5%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.5%磷酸水溶液等多种组合的流动相进行洗脱,结果乙腈-0.5%磷酸水溶液作为流动相洗脱,分离度较好。为了更好地、更快地检测出 13 种化学成分,选择检测波长

为 254 nm 可以一次性完成检测,但部分化学成分的最大吸收波长并不在 254 nm,但方法学考察结果显示具有良好的线性关系,可以用来分析。

本课题建立牡丹皮中 13 种化学成分 HPLC 方法,该法高效、准确、重复性好,能客观准确反映出不同产地牡丹皮化学成分含量的差异,对于评价牡丹皮质量优劣具有一定的参考价值。样品中多成分含量测定有利于更加全面地考察牡丹皮的药效物质基础,有利于更加全面、客观评价牡丹皮药材的质量。

### 参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 吴美珍,赫炎,唐力英,等.牡丹皮饮片指纹图谱的聚类分析[J].中国中药杂志,2007,32(11):1054-1056.
- [3] 刘小蔓.牡丹皮、泽泻和山药的质量标准研究[D].北

- 京: 北京中医药大学, 2015.
- [4] 王祝举, 唐力英, 赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2006, 21(4): 155-159.
- [5] 阳勇, 彭福, 莫宗成, 等. HPLC 测定不同产地牡丹皮中 5 个化学成分的含量 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 416-422.
- [6] 胡云飞, 裴月梅, 吴虹, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术研究不同产地牡丹皮药材化学成分的差异 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 2984-2992.
- [7] 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.
- [8] 方前波, 王彬, 秦昆明. 安徽道地药材凤丹不同采收期的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(6): 31-34.
- [9] 张伟, 刘信秋, 吴德玲, 等. HPLC 波长切换法测定主产区与道地产区牡丹皮中的 4 种成分 [J]. 中成药, 2015, 37(10): 2225-2228.
- [10] 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.