

不同产地牡丹皮规格等级内涵研究

袁宝金^{1,2}, 高贯彪¹, 张洪坤^{1,2*}, 吴韶辉³, 路丽², 黄玉瑶², 潘林燕²

(1. 亳州市沪谯药业有限公司, 安徽亳州 236800; 2. 广州市中芝源中药有限公司, 广东广州 510925; 3. 韶关市食品药品检验所, 广东韶关 512026)

摘要 [目的] 建立同时测定牡丹皮中7种指标性成分含量的方法, 综合多成分指标含量分析不同产地牡丹皮等级的内在质量关系, 探讨牡丹皮规格等级内涵。[方法] 采用高效液相色谱(HPLC)法测定不同产地不同规格等级牡丹皮样品中7种指标性成分的含量, 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(5 μm, 250 mm×4.6 mm), 检测波长为230 nm; 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1 mL/min, 进样量为10 μL, 柱温为30 ℃。[结果] 建立的HPLC方法中的没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚分别在0.004~0.055、0.013~0.189、0.003~0.045、0.019~0.291、0.002~0.030、0.005~0.076、0.050~0.752 μg线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%; 加样回收率分别为102.93%、96.12%、99.19%、92.69%、97.49%、103.96%、99.71%。[结论] 建立的HPLC法操作简单、精确, 可用于同时测定不同规格等级牡丹皮中7种指标性成分的含量。不同产地不同规格等级牡丹皮与有效成分含量之间规律不尽相同, 其中铜陵、芜湖和亳州产地牡丹皮等级与有效成分含量之间呈现弱的负相关, 即随着等级升高含量降低, 其他产地牡丹皮等级与含量之间无统一趋势的相关性。

关键词 牡丹皮; 规格等级; 高效液相色谱法; 含量测定; 指标性成分

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)21-0179-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.21.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Connotation of Specification Grade of Cortex Moutan in Different Producing Areas

YUAN Bao-jin^{1,2}, GAO Guan-biao¹, ZHANG Hong-kun^{1,2} et al (1. Bozhou Huqiao Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou, Anhui 236800; 2. Guangzhou Zhongzhiyuan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510925)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a method for simultaneously determining the content of seven index components in cortex moutan. The content of multi-component indicators was used to analyze the intrinsic quality relationship of cortex moutan grades from different producing areas, and the connotation of specification grade of cortex moutan was discussed. [Method] High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of seven kinds of index components in different grades of cortex moutan samples from different areas. The column was Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm) with a detection wavelength of 230 nm; the phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1 mL/min, an injection volume of 10 μL, and a column temperature of 30 ℃. [Result] The linear relationships of gallic acid, oxypaeoniflorin, catechin, paeoniflorin, benzoic acid, benzoyl paeoniflorin and paeonol were good in the range of 0.004-0.055, 0.013-0.189, 0.003-0.045, 0.019-0.291, 0.002-0.030, 0.005-0.076, 0.050-0.752 μg. The RSD of precision, stability and repeatability tests were less than 3%. The recovery rates of the samples were 102.93%, 96.12%, 99.19%, 92.69%, 97.49%, 103.96% and 99.71%, respectively. [Conclusion] The established HPLC method is simple and accurate, and can be used to simultaneously determine the content of seven index components in different specifications of cortex moutan. There are different rules for the content of cortex moutan and active ingredients in different grades of different producing areas. There is a weak negative correlation between the level of cortex moutan and the content of active ingredients in Tongling, Wuhu and Bozhou, that is, the content decreases with the increase of grade, there is no correlation between the grade and content of the moutan cortex in other producing areas.

Key words Cortex moutan; Specification grade; HPLC; Content determination; Index components

牡丹的药用价值自先秦开始体现, 明确记载“牡丹”始见于《神农本草经》, 列为中品^[1], 之后更多古书典籍^[2-6]中提及牡丹的药用, 入药部位为牡丹的根皮。《中国药典》(2015版)一部记载, 牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 秋季采挖根部, 除去细根和泥沙, 剥取根皮, 晒干或刮去粗皮, 除去木心, 晒干。前者习称连丹皮, 后者习称刮丹皮。苦、辛, 微寒, 归心、肝、肾经, 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、经闭痛经、跌扑伤痛、痈肿疮毒^[7]。

中药材商品规格等级标准是传统药效、检验、纯度、美观的统一, 中药材功效主要是药效, 因此传统药效应是中药材商品规格等级标准优先指标^[8]。以产地、性状指标划分的规格实质上是药效强弱与功效的差异, 因此应积极开展药效与

成分的相关性研究。张雨凤等^[9]对牡丹皮药材规格等级进行初探, 研究发现在不同等级中, 四等牡丹皮中芍药苷含量最高, 一等牡丹皮中丹皮酚含量最高, 芍药苷含量在主根中最少, 在支根中最多, 芍药苷和丹皮酚积累量的趋势相反。李静^[10]采用聚类分析法和主成分分析法分析, 综合评价牡丹皮药材和饮片的规格等级、价格与被测指标的相关性; 通过相关性分析, 市售亳州牡丹皮的价格与5种指标的含量基本不呈正相关; 大小、性状、颜色等外在因素决定了牡丹皮市场价位及规格等级。笔者通过建立同时测定牡丹皮中7种指标性成分含量的方法, 综合多成分指标含量分析不同产地牡丹皮等级的内在质量关系, 探讨牡丹皮规格等级内涵, 为牡丹皮药材规格等级的划分提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试材。牡丹皮分别为产地收集的连丹皮和刮丹皮以及产自安徽亳州十河镇牡丹皮基地的刮丹皮。收集5个产地连丹皮, 分别产自安徽省铜陵市铜陵县顺安镇、安徽芜湖市南陵县何湾镇、四川省达州市通川区、山西省运城市绛县、

基金项目 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-Y-AH-03)。
作者简介 袁宝金(1989—), 女, 湖南永州人, 药师, 从事中药研发及其质量评价研究。*通信作者, 主管药师, 硕士, 从事中药研发及其质量评价研究。
收稿日期 2019-06-10

湖南邵阳邵东县;收集4个产地刮丹皮,分别产自安徽亳州十河镇牡丹皮基地、安徽亳州时谯城区华佗镇、湖北恩施利川市、重庆市垫江县。根据现行标准及前期研究结果,将牡丹皮划分为4个等级,分别为一等(编号1),长度 ≥ 5.0 cm,中部直径 ≥ 1.0 cm;二等(编号2),长度 ≥ 5.0 cm,中部直径 1.0 cm $>D$ ≥ 0.8 cm;三等(编号3),长度 ≥ 5.0 cm,中部直径 0.8 cm $>D$ ≥ 0.5 cm;统货(编号4),不分大小。

1.1.2 仪器。高速多功能粉碎机(浙江永康市荣浩工贸有限公司);MX5电子天平(百万分之一,Mettler Toledo);XS204电子天平(万分之一,Mettler Toledo);HWS-28型电热恒温水浴锅(上海市一恒科学仪器有限公司);DIONEX Ultimate 3000高效液相色谱仪(DAD检测器);ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(美国Agilent公司)。

1.1.3 试剂。没食子酸(110831-201605,中国食品药品检定研究院,纯度90.8%);儿茶素(110877-201604,中国食品药品检定研究院,纯度99.2%);氧化芍药苷(MUST-16021505,成都曼斯特有限公司,纯度99.93%);芍药苷(110736-201539,中国食品药品检定研究院,纯度96.4%);苯甲酸(100419-200301,中国食品药品检定研究院);丹皮酚(110708-201407,中国食品药品检定研究院,纯度99.9%);苯甲酰芍药苷(MUST-16061803,成都曼斯特有限公司,纯度99.28%);甲醇为色谱纯(Merck);磷酸为色谱纯(阿拉丁);甲醇分析纯(广州化学试剂厂);超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件与系统适用性试验。色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(5 μ m,250 mm \times 4.6 mm);以乙腈为流动相A,以0.1%磷酸溶液为流动相B,按表1中的规定进行梯度洗脱;柱温为30 $^{\circ}$ C;检测波长为230 nm。理论板数按丹皮酚峰计算应不低于10 000。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

| 时间 Time min | 流动相 A Mobile phase A//% | 流动相 B Mobile phase B//% |
|----------------|----------------------------|----------------------------|
| 0~5 | 5→15 | 95→85 |
| 5~15 | 15→18 | 85→82 |
| 15~25 | 18→30 | 82→70 |
| 25~40 | 30→60 | 70→40 |

1.2.2 对照品溶液的制备。分别取没食子酸、儿茶素、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酸、丹皮酚和苯甲酰芍药苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,得质量浓度分别为0.5、0.5、0.3、1.0、0.5、1.0、0.5 mg/mL的单个对照品溶液。分别精密移取上述各对照品溶液适量,加50%甲醇稀释,得质量浓度分别为0.003 6、0.003 0、0.012 6、0.019 4、0.002 0、0.050 1、0.005 1 mg/mL的混合对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备。取本品粉末(过3号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定重量,回流提取1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液1 mL,置10 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.4 线性关系考察。分别精密吸取“1.2.2”项下混合对照品溶液1、3、5、7、10、15 μ L,在“1.2.1”色谱条件下进样检测分析,记录峰面积,以各待测物进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归。

1.2.5 精密度试验。精密吸取牡丹皮同一混合对照品溶液,按“1.2.1”色谱条件,重复进样6次,分别记录各成分峰面积,计算各成分含量的RSD。

1.2.6 稳定性试验。按“1.2.3”方法制备供试品溶液,分别于0、3、6、9、12、15、18、24 h进样检测,分别记录各成分峰面积,计算各成分含量的RSD。

1.2.7 重复性试验。取同一批药材,按“1.2.3”方法平行制备供试品溶液6份,按“1.2.1”色谱条件进样分析,分别记录各成分峰面积,计算各成分含量的RSD。

1.2.8 加样回收试验。精密称取本品粉末6份,每份0.25 g,分别精密添加没食子酸0.304 8 mg、氧化芍药苷1.133 0 mg、儿茶素0.145 4 mg、芍药苷1.998 0 mg、苯甲酸0.140 0 mg、苯甲酰芍药苷0.471 1 mg、丹皮酚5.594 0 mg,按照“1.2.3”方法制备供试品溶液,按照“1.2.1”色谱条件进行测定,计算加样回收率。

1.2.9 含量测定。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,测定,即得。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品与样品的高效液相色谱峰图。从图1可以看出,在相同的色谱条件下,样品在对照品相同出峰时间中均有相应的峰出现,且该条件下样品中的目标峰与相邻峰的分度较大,说明此条件适合测定牡丹皮各成分的含量。

2.1.2 线性关系的考察。以各待测物进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,具体结果见表2,结果表明,各成分在相应的范围内线性关系良好。

表2 回归方程与线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges

| 成分 Element | 线性方程 Linear equation | R^2 | 线性范围 Linear range μ g |
|--------------------------------|-------------------------|--------|---------------------------------|
| 没食子酸 Gallic acid | $Y=34.944X-0.0021$ | 0.9999 | 0.004~0.055 |
| 氧化芍药苷 Oxy-paeoniflorin | $Y=17.776X-0.0206$ | 0.9998 | 0.013~0.189 |
| 儿茶素 Catechin | $Y=29.457X+0.0028$ | 1.0000 | 0.003~0.045 |
| 芍药苷 Paeoniflorin | $Y=19.052X-0.0461$ | 0.9999 | 0.019~0.291 |
| 苯甲酸 Benzoic acid | $Y=53.882X-0.0019$ | 1.0000 | 0.002~0.030 |
| 苯甲酰芍药苷 Benzoyl paeoniflorin | $Y=23.572X-0.0162$ | 0.9998 | 0.005~0.076 |
| 丹皮酚 Paeonol | $Y=34.755X-0.0104$ | 1.0000 | 0.050~0.752 |

2.1.3 精密度试验。按照“1.2.5”方法操作,结果得出牡丹皮中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷和丹皮酚峰面积的RSD分别为0.50%、0.23%、0.79%、0.37%、0.36%、0.47%和0.18%,表明仪器精密度高。

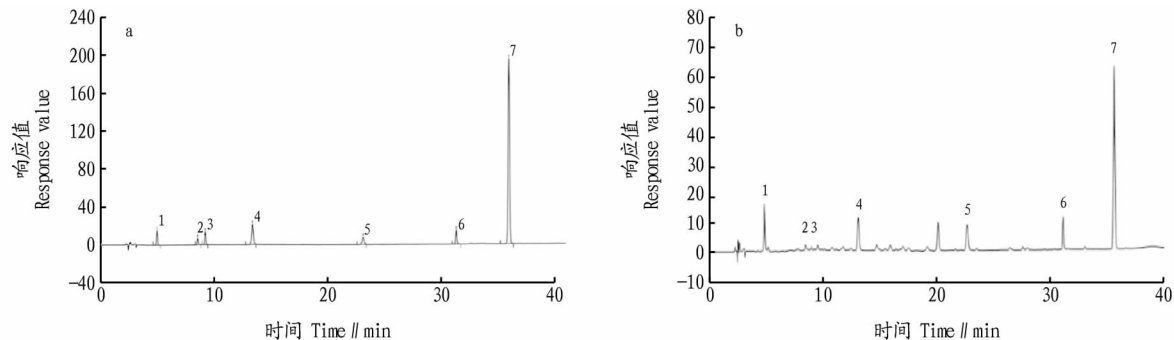
2.1.4 稳定性试验。按照“1.2.6”方法操作,结果得出牡丹皮中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药

苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.66%、1.66%、1.34%、0.68%、1.57%、0.86% 和 0.42%，表明样品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.5 重复性试验。按照“1.2.7”方法操作，结果得出牡丹皮中没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷和丹皮酚的含量分别为 0.138%、0.065%、0.511%、0.901%、0.062%、0.212% 和 2.523%，RSD 分别为 1.20%、2.23%、2.89%、0.96%、2.22%、0.50% 和 1.83%，表明该方法

重复性良好。

2.1.6 加样回收率试验。按照“1.2.8”方法操作，计算加样回收率，结果没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷、丹皮酚的平均加样回收率分别为 102.93%、96.12%、99.19%、92.69%、97.49%、103.96%、99.71%，RSD 分别为 1.69%、2.15%、3.34%、0.78%、1.45%、2.44%、0.69%，表明该方法回收率较好，方法可行。



注:1. 没食子酸;2. 氧化芍药苷;3. 儿茶素;4. 芍药苷;5. 苯甲酸;6. 苯甲酰芍药苷;7. 丹皮酚

Note: 1. Gallic acid; 2. Oxypaeoniflorin; 3. Catechin; 4. Paeoniflorin; 5. Benzoic acid; 6. Benzoyl paeoniflorin; 7. Paeonol

图 1 对照品 (a) 和供试品 (b) 多成分测定 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC comparison of multi-component determination of reference (a) and test article (b)

2.2 各指标成分含量测定结果 各成分的方法确定并验证后，取不同产地不同规格等级的牡丹皮样品，进行各指标含

量测定，结果见图 2~8。结果表明，7 种成分中，没食子酸、氧化芍药苷的含量与等级无明显相关性；安徽芜湖和四川达州

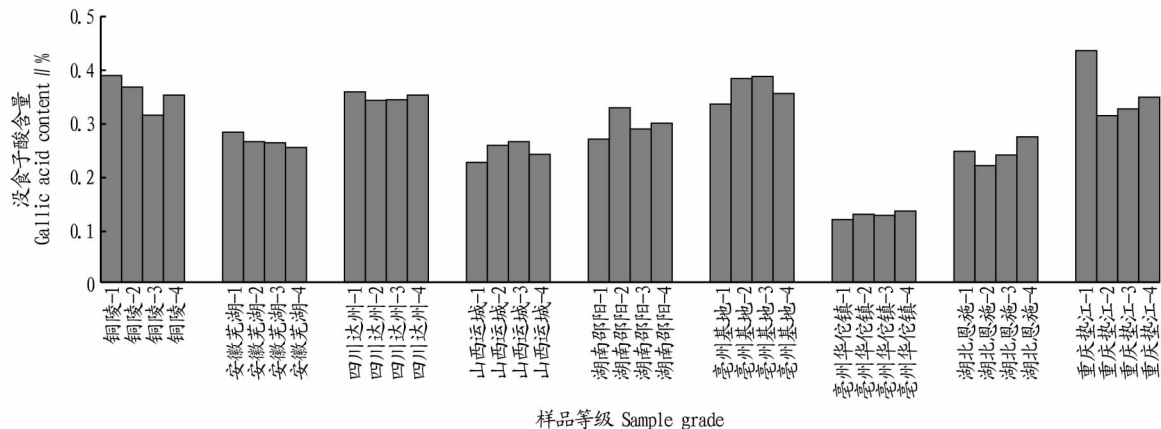


图 2 牡丹皮不同等级没食子酸含量

Fig. 2 Gallic acid content of different levels cortex moutan

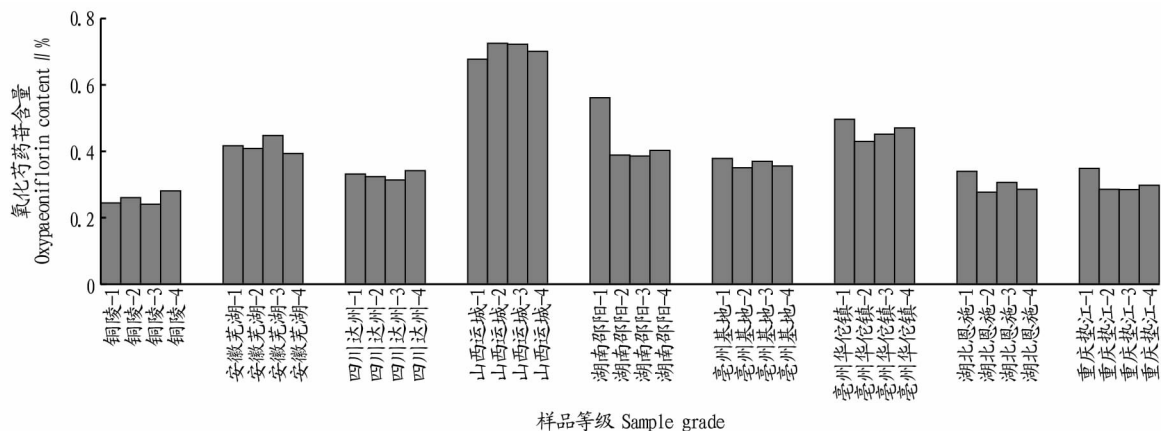


图 3 牡丹皮不同等级氧化芍药苷含量

Fig. 3 Oxypaeoniflorin content of different levels cortex moutan

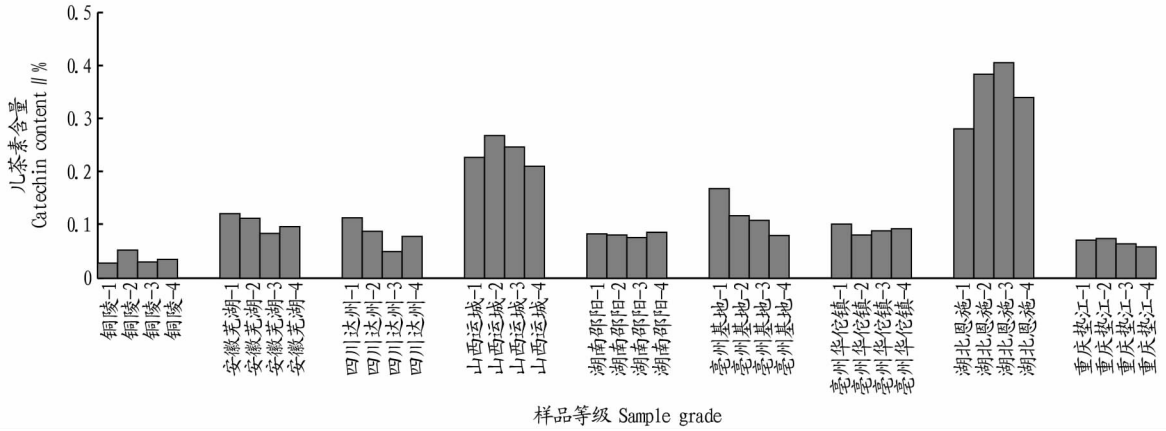


图4 牡丹皮不同等级儿茶素含量

Fig. 4 Catechin content of different levels cortex moutan

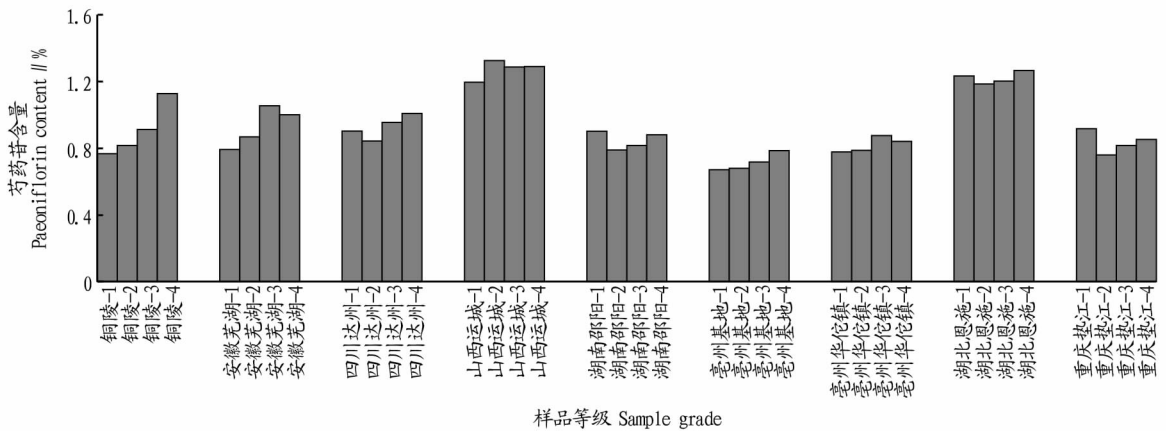


图5 牡丹皮不同等级芍药苷含量

Fig. 5 Paeoniflorin content of different levels cortex moutan

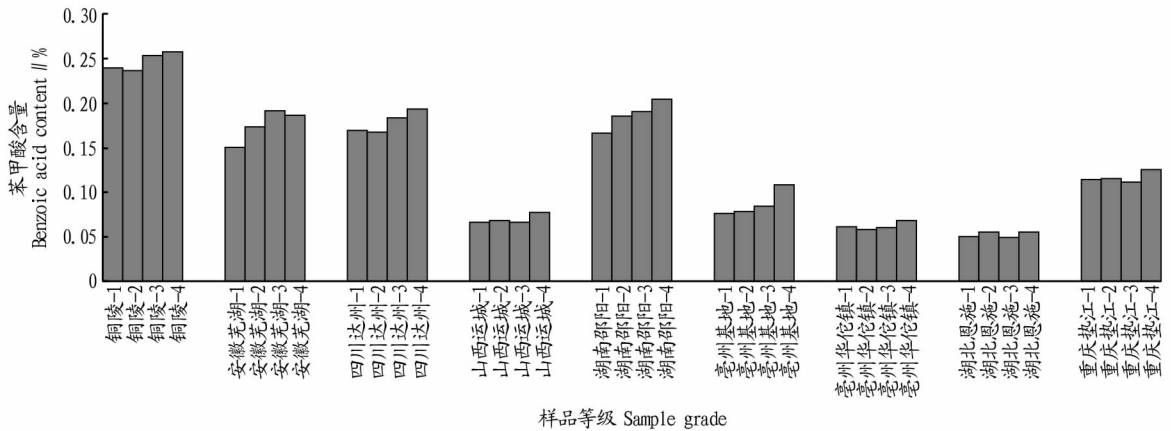


图6 牡丹皮不同等级苯甲酸含量

Fig. 6 Benzoic acid content of different levels cortex moutan

的儿茶素含量与等级呈弱的正相关性,湖北恩施的儿茶素含量与等级呈弱的负相关性,其他产地的儿茶素含量与等级无明显相关性;安徽铜陵和安徽芜湖的芍药苷含量与等级呈弱的负相关性,其他产地的芍药苷含量与等级无明显相关性;湖南邵阳的苯甲酸含量与等级呈弱的负相关性,其他产地的苯甲酸含量与等级无明显相关性;安徽芜湖的苯甲酰芍药苷含量与等级呈弱的负相关性,其他产地的苯甲酰芍药苷含量与等级无明显相关性;安徽芜湖和安徽基地的丹皮酚含量与

等级呈弱的负相关性,山西运城的丹皮酚含量与等级呈弱的正相关性,其他产地的丹皮酚含量与等级无明显相关性。

3 结论与讨论

比较不同产地不同等级的牡丹皮7种成分的含量,整体上看不同产地不同规格等级牡丹皮与有效成分含量之间规律不尽相同,大部分成分的含量随等级变化趋势并不明显,其中铜陵、芜湖和亳州产地牡丹皮等级与有效成分含量之间呈现弱的负相关,即随着等级升高含量降低,其他产地牡丹

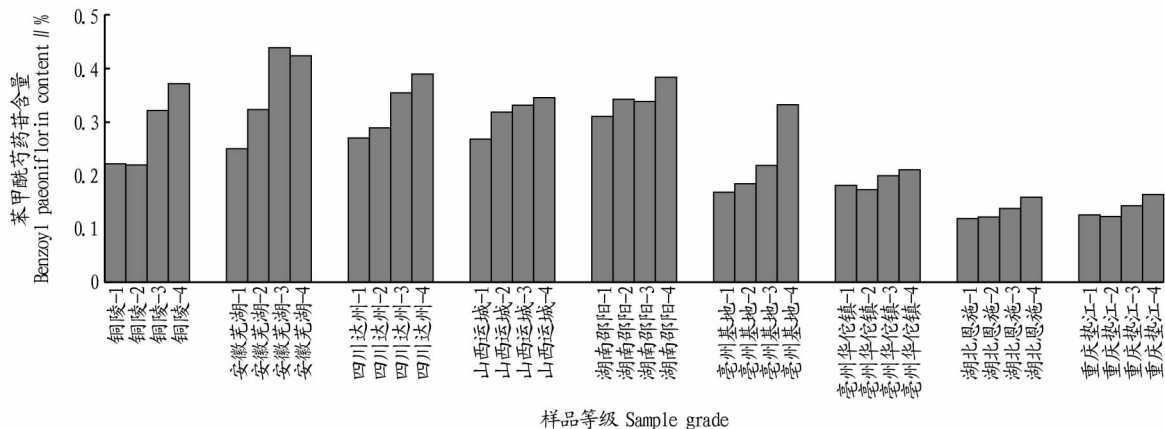


图7 牡丹皮不同等级苯甲酰芍药苷含量

Fig. 7 Benzoyl paeoniflorin content of different levels cortex moutan

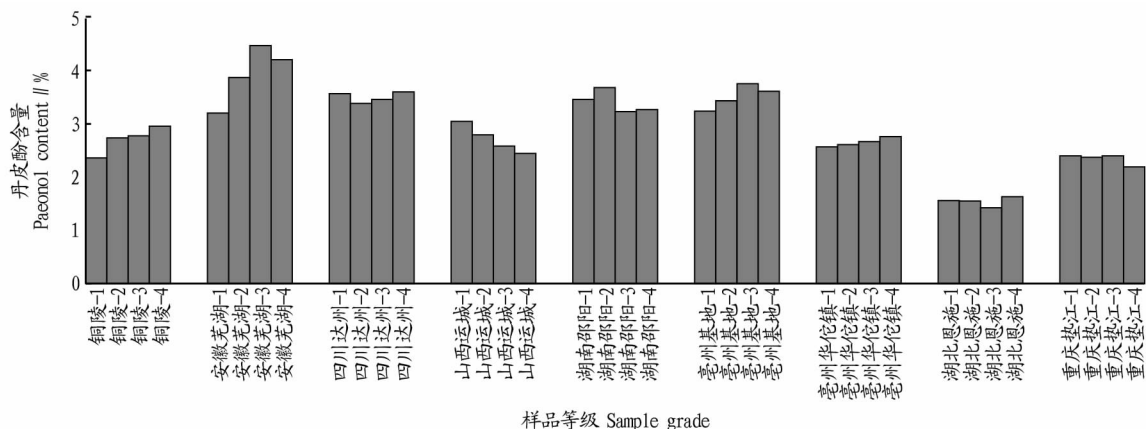


图8 牡丹皮不同等级丹皮酚含量

Fig. 8 Paeonol content of different levels cortex moutan

皮等级与含量之间无统一趋势的相关性。目前药材市场对牡丹皮药材的等级划分主要是依据粗细和长短,普遍认为药材越粗的等级越高,质量越好。从此次研究结果来看,不同商品规格牡丹皮中均出现了传统商品形态与有效成分含量不一致的情况,如铜陵、芜湖和亳州的牡丹皮药材越细,芍药苷和丹皮酚成分含量越高,因此,综合考虑,牡丹皮药材划分等级时应考虑加入含量进行限量区分。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目:第2册[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:852-854.
- [2] 苏敬等撰,尚志钧辑校. 唐·新修本草[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1981:227-228.
- [3] 马子密,傅延龄. 历代本草药性汇解[M]. 北京:中国医药科技出版社,

2001:214-219.

- [4] 谢宗万,郝近大. 常用中药名与别名手册[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2008:198-199.
- [5] 严西亭,施澹宁,洪缉庵. 得配本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:54-55.
- [6] 兰州军区后勤部卫生部. 陕甘宁青中草药选[M]. 北京:人民卫生出版社,1971:12-258.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:172.
- [8] 杨光,王诺,詹志来,等. 中药材市场商品规格等级划分依据现状调查[J]. 中国中药杂志,2016,41(5):761-763.
- [9] 张雨凤,王军,方成武,等. 牡丹皮药材规格等级初探[J]. 安徽中医药大学学报,2015,34(5):80-83.
- [10] 李静. 亳州牡丹皮产地加工、储藏方法及不同商品规格等级综合评价研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2016.