·方药研究·

牡丹皮药材关键质量标准的优化研究

宋芊芊[1],周慧银[1],赵宏苏[1,2,3],翟宏焱[4],王 瑞[1],孙慧娟[1],方成武[1,2,3]

(1.安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;2.中药饮片制造新技术安徽省重点实验室,安徽 合肥 230012;3.安徽道地中药材品质提升协同创新中心,安徽 合肥 230012;4.安徽省食品药品检验研究院,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 优化牡丹皮药材的关键质量标准。**方法** 采用薄层色谱法对牡丹皮药材进行研究;采用高效液相色谱法建立牡丹皮药材的特征图谱,对芍药苷和丹皮酚含量进行测定。**结果** 牡丹皮药材的薄层色谱中与对照品丹皮酚及对照药材色谱相应位置上,显现相同颜色的斑点;建立了高效液相色谱法特征图谱共有模式,检出5个共有峰,生成牡丹皮药材特征图谱;18批药材中芍药苷含量为0.90%~1.70%,丹皮酚含量均符合2015版《中华人民共和国药典》的限量要求。**结论** 该方法对薄层色谱鉴别法进行优化,建立牡丹皮特征图谱,新增含量限量指标,专属性强,重复性好,简便高效,可更为有效地控制牡丹皮药材的质量。

[关键词]牡丹皮;质量标准;薄层色谱鉴别;特征图谱;含量测定

[中图分类号]R927.2 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2020.05.019

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.的干燥根皮,性微寒,味苦、辛,归心、肝、肾经,具有清热凉血、活血化瘀之功效[1]。本品中主要含单萜及其苷类、酚及酚苷类、三萜及其苷类和挥发油类等成分[2-6]。其中以丹皮酚、芍药苷等成分含量较高,为主要活性成分。牡丹皮具有抗菌、免疫调节、降血糖、抗血栓、抗动脉粥样硬化等多种药理作用[7-10]。作为大宗药材,其质量标准受到广泛关注。2015年版《中华人民共和国药典》中牡丹皮质量标准存在一定局限性,如薄层色谱鉴定未加入对照药材,未引入指纹图谱(特征图谱)作为牡丹皮质量整体性评价标准,含量测定的指标较为单一。因此,本研究从薄层色谱鉴别、高效液相特征图谱、芍药苷和丹皮酚的含量测定3个方面对牡丹皮进行质量标准研究,为牡丹皮药材质量标准的完善提供有效的参考方法及依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 TLC Scanner 4薄层色谱扫描仪、Camag Reprostar 4薄层色谱扫描影像:瑞士卡玛;赛默飞U3000液相系统-变色龙工作站[包括Thermo LPG-3400SD泵,Inertsil HPLC ODS-3色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)]:美国赛默飞公司;Milli-Q Advantage A10一体式超纯水机:美国Milipore公司;EX125DZHW十万分之一天平:奥豪斯仪器(上海)有限公司;WL-100型打粉机:浙江省威力制药机械厂;JY2003万分之一电子天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;HH-S2型电热恒温水浴锅:江苏金坛市环宇科学仪器厂;硅胶GF254板:青岛海洋化工。

1.2 试药与试剂 丹皮酚(批号110708-201407,纯度99.9%)、牡丹皮对照药材(121490-201603):中国食品药品检定研究院;没食子酸(批号GZDD-0128,纯度大于98%)、苯甲酰芍药苷(批号GZDD-0758,纯度大于98%):贵州迪大生物科技有限公司;芍药苷(批号0736-200015,纯度大于98%):北京世纪奥科生物技术有限公司;氧化芍药苷(批号16021505,纯度99.93%):北京恒元启天化工技术研究所;乙醇、乙酸乙酯、环己烷、冰醋酸、硫酸、香草醛等试剂均为分析纯。

收集牡丹皮药材18批,经鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticaosa* Andr.的干燥根皮。样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 取牡丹皮粉末1 g,加乙醇10 mL,密塞,振摇5 min,滤过,滤液挥干,残渣加乙醇2 mL使其溶解,作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 取对照药材粉末1 g,加乙醇10 mL,密塞,振摇5 min,滤过,滤液挥干,残渣加乙醇2 mL使其溶解,作为对照药材溶液。另取丹皮酚对照品,加乙醇制成2 mg/mL的溶液,作为对照品丹皮酚溶液。

基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究专项(2018YFC1707004);国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-Y-AH-05)

作者简介:宋芊芊(1994-),女,硕士研究生

通信作者:方成武(1961-),男,教授,cwfang1961@sina.com

表1 牡丹皮药材的样品信息

编号	产地	规格	等级
S1	安徽铜陵凤凰山村	刮丹	选货
S2	安徽铜陵凤凰山村	刮丹	统货
S3	重庆垫江	刮丹	选货
S4	重庆垫江	刮丹	统货
S5	四川成都	刮丹	选货
S6	四川成都	刮丹	统货
S7	安徽铜陵凤凰山村	连丹	一等
S8	安徽铜陵凤凰山村	连丹	二等
S9	安徽铜陵凤凰山村	连丹	三等
S10	安徽铜陵凤凰山村	连丹	统货
S11	安徽亳州华佗镇	连丹	一等
S12	安徽亳州华佗镇	连丹	二等
S13	安徽亳州华佗镇	连丹	三等
S14	安徽亳州华佗镇	连丹	统货
S15	安徽铜陵金凤村	连丹	一等
S16	安徽铜陵金凤村	连丹	二等
S17	安徽铜陵金凤村	连丹	三等
S18	安徽铜陵金凤村	连丹	统货

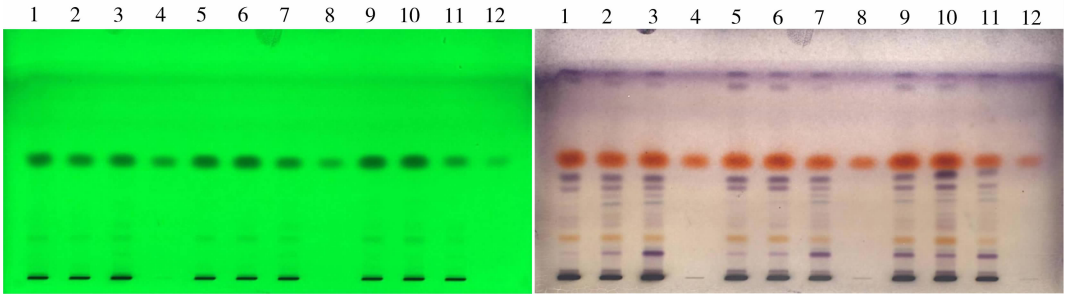
注：秋季采挖根部，除去细根和泥沙，剥取根皮，晒干，称为“连丹”；刮去粗皮，除去木心，晒干，称为“刮丹”；统货：药材不分等级，大小不一；选货：按等级选取，大小均匀

2.1.3 薄层层析 分别吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品丹皮酚溶液各5 μL，点于同一硅胶GF254薄层板上，以环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(4∶1∶0.1)作为展开剂展开，取出，晾干，在254 nm紫外灯下检测，和对照品丹皮酚色谱相应的位置上，显现相同颜色的斑点。喷以2%香草醛硫酸乙醇溶液(1→10)显色，并在105 ℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在和对照品丹皮酚及对照药材色谱相应的位置上，显现相同颜色的斑点。见图1、图2。

2.2 特征图谱

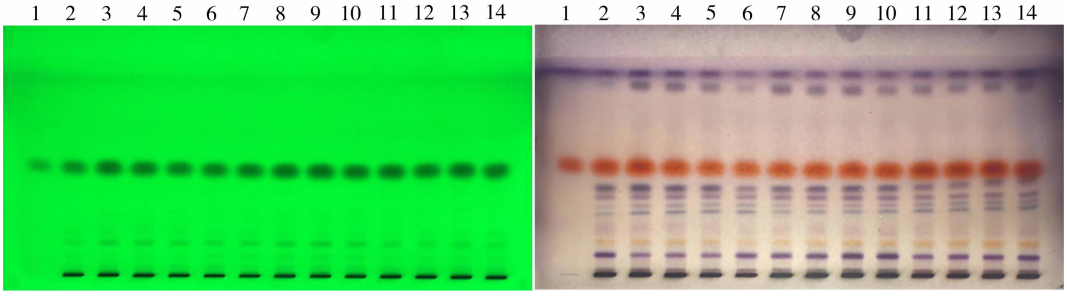
2.2.1 色谱条件 色谱柱：Inertsil HPLC ODS-3(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相：乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)，按表2条件进行梯度洗脱；流速1.0 mL/min；柱温30 ℃；检测波长246 nm；进样量10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚，加70%甲醇溶解，配制成2 mg/mL对照品储备溶液，吸取对照品储备溶液0.1 mL于10 mL量瓶中，加70%甲醇稀释至刻度并摇匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，即得。



注：左图为254 nm紫外灯下检测的薄层色谱图；右图为2%香草醛硫酸乙醇溶液(1→10)显色后的薄层色谱图；4、8、12为丹皮酚对照品；3、7、11为对照药材；1、2、5、6、9、10为牡丹皮药材(依次为样品S1—S6)

图1 不同等级牡丹皮药材(刮丹)的薄层色谱图



注：左图为254 nm紫外灯下检测的薄层色谱图；右图为2%香草醛硫酸乙醇溶液(1→10)显色后的薄层色谱图；1为丹皮酚对照品；2为对照药材；3—14为牡丹皮药材(依次为样品S7—S18)

图2 不同等级牡丹皮药材(连丹)的薄层色谱图

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取牡丹皮粉末约0.5 g，置具塞锥形瓶中，加70%甲醇50 mL，密塞，称定质量，超声处理(功率300 W，频率50 kHz)30 min，放冷再称定质量，用70%甲醇补足质量，摇匀，滤过，取续滤液1 mL于10 mL量瓶中，加70%甲醇稀释至刻度并摇匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，即得。

2.2.4 精密度考察 取牡丹皮供试品溶液，重复进样6次。结果显示，以芍药苷作为内参比峰，计算5个主要色谱峰。没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚的相对峰面积的RSD值为1.21%～1.48%，相对保留时间的RSD值为0～0.46%，表明本方法及仪器精密度良好。

表2 梯度洗脱条件

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	13	87
3	16	84
5	20	80
10	25	75
25	50	50
33	75	25
40	13	87

2.2.5 稳定性考察 取同一供试品溶液，分别在0、2、4、6、8、12、24 h进行色谱分析。结果显示，以芍药苷作为内参比峰，计算5个主要色谱峰。没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚的相对峰面积的RSD值为1.47%～1.79%，相对保留时间的RSD值为0～0.44%，表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同批牡丹皮粉末6份，同法制备供试液并测定。结果显示，以芍药苷作为内参比峰，计算5个主要色谱峰。没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚的相对峰面积的RSD值为1.60%～2.03%，相对保留时间RSD值为0～0.47%，表明方法重复性良好。

2.2.7 特征图谱的建立 取18批牡丹皮药材供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，记录色谱图。将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1版)，设定S1为参照图谱，采用中位数法，时间窗口宽度为0.1 min，将其他样品的色谱图与参照图谱进行自动匹配，建立牡丹皮药材特征图谱及共有模式，最终共标定5个共有峰，18批牡丹皮药材与共有模式的相似度均在0.9以上。牡丹皮药材高效液相特征图谱见图3，各共有峰的相对保留时间和峰面积见表3。

表3 18批牡丹皮药材共有峰的相对保留时间及相对峰面积($\bar{x}\pm s$)

峰号	相对保留时间/min	相对峰面积
1	0.333±0.001	0.565±0.112
2	0.647±0.002	0.498±0.061
3	1.000±0.000	1.000±0.000
4	1.869±0.005	0.233±0.056
5	2.322±0.003	2.591±0.645

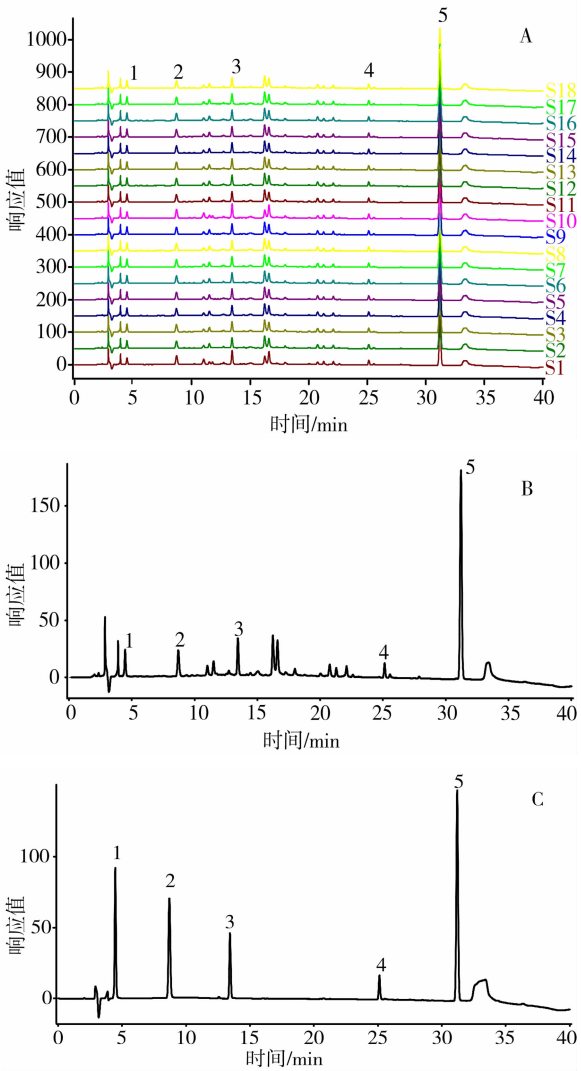
2.3 丹皮酚和芍药苷的含量

2.3.1 色谱条件 同“2.2.1”项。色谱图见图3。

2.3.2 供试品溶液的制备 同“2.2.3”项。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、丹皮酚对照品适量，置于10 mL容量瓶中，加70%甲醇溶解，制成芍药苷、丹皮酚的质量浓度分别为70.9、116.3 μg/mL的对照品储备液，4 ℃保存备用。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取芍药苷、丹皮酚对照品储备液，分别按2、4、10、20、100倍稀释，得系列



注：A.18批牡丹药材指纹图谱共有模式；B.牡丹皮药材对照特征图谱；C.混合对照色谱图；1.没食子酸；2.氧化芍药苷；3.芍药苷；4.苯甲酰芍药苷；5.丹皮酚

图3 牡丹皮药材高效液相特征图谱

混合对照品溶液。以其峰面积(Y)为纵坐标，对照品浓度(X)为横坐标，绘制标准曲线。见表4。

表4 芍药苷和丹皮酚的回归方程及线性范围

化合物	回归方程	R^2	线性范围/(μg/mL)
芍药苷	Y=6.820 1X+0.0797	1.000	0.709～70.900
丹皮酚	Y=4.717 6X−1.782	0.999	1.163～116.300

2.3.5 精密度考察 取牡丹皮供试品溶液，重复进样6次。结果显示，芍药苷和丹皮酚峰面积的RSD值分别为0.96%、1.03%，表明本方法及仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取同一供试品溶液，分别在0、2、4、6、8、12、24 h进行色谱分析。结果显示，芍药苷和丹皮酚峰面积的RSD值分别为1.07%、1.02%，表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 重复性试验 取同批牡丹皮粉末6份，同法制备供试液并测定。结果显示，芍药苷和丹皮酚含

量的RSD值分别为1.89%、1.12%，表明方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品粉末(S6)6份，每份约0.25 g，另取芍药苷和丹皮酚，用70%甲醇制成每毫升含芍药苷0.340 3 mg，含丹皮酚0.822 2 mg的混合对照品溶液。分别精密加入混合对照品5 mL，70%甲醇定容至50 mL，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，测得芍药苷和丹皮酚的平均加样回收率分别为99.63%、100.49%，RSD值分别为1.12%、1.67%，表明方法的准确度良好。结果见表5。

表5 加样回收率测定(n=6)

化合物	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芍药苷	0.249 0	2.474 7	1.701 5	4.139 8	97.86	99.63	1.12
	0.249 7	2.481 7	1.701 5	4.167 8	99.10		
	0.245 9	2.443 9	1.701 5	4.135 8	99.44		
	0.257 9	2.563 2	1.701 5	4.272 1	100.43		
	0.264 0	2.623 8	1.701 5	4.343 0	101.04		
	0.248 1	2.465 8	1.701 5	4.165 8	99.91		
丹皮酚	0.249 0	5.546 9	4.111 0	9.724 0	101.61	100.49	1.67
	0.249 7	5.562 5	4.111 0	9.721 0	101.15		
	0.245 9	5.477 9	4.111 0	9.657 2	101.66		
	0.257 9	5.745 2	4.111 0	9.850 3	99.86		
	0.264 0	5.881 1	4.111 0	9.882 8	97.34		
	0.248 1	5.526 9	4.111 0	9.691 9	101.31		

2.3.9 样品测定 按“2.3”项下色谱条件及供试品制备方法，对牡丹皮药材的含量进行测定，结果显示，所有样品中芍药苷含量在0.90%～1.70%之间，丹皮酚含量均符合2015年版《中华人民共和国药典》牡丹皮含量要求。见表6。

表6 牡丹皮药材中芍药苷和丹皮酚的含量测定(n=2)

编号	芍药苷/%	丹皮酚/%	编号	芍药苷/%	丹皮酚/%
S1	0.924 7	1.468 2	S10	1.447 2	2.264 2
S2	1.308 4	1.817 1	S11	1.126 1	1.820 7
S3	1.191 7	2.110 7	S12	1.292 3	2.511 8
S4	1.198 5	2.070 1	S13	1.699 0	2.915 8
S5	0.904 8	2.998 9	S14	1.311 9	2.782 8
S6	0.993 9	2.227 7	S15	1.333 0	2.257 5
S7	0.858 6	1.950 6	S16	1.557 9	2.189 8
S8	1.031 8	2.221 0	S17	1.659 7	2.300 4
S9	1.166 1	2.011 5	S18	1.487 9	2.451 8

3 讨论

在薄层色谱鉴别实验中，对样品的点样量进行了考察，结果表明，点样量为3～5 μL时，斑点清晰，分离度良好，无拖尾现象。采用不同厂家的薄层板对方法的耐用性进行考察，结果表明，该方法对不同厂家薄层板均适用。

在建立牡丹皮特征图谱实验中，比较了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水、甲醇-0.05%甲酸水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.05%甲酸水的洗脱系统，结果表明流动相选用乙腈-0.1%甲酸水时分离度和峰形较好。同时，对200～400 nm的检测波长进行考察，最终选择246 nm作为其测定波长，对0.8、1.0、1.2 mL/min流速进行考察，选择1.0 mL/min作为最终测定速率。牡丹皮中除活性成分丹皮酚含量较高外，单萜苷类成分的含量也占有较大比例，查阅文献[11-15]发现，牡丹皮多指标成分含量测定时往往加入单萜类成分如氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷。因此，本研究选择3种含量较高的单萜苷类成分作为特征图谱的特征峰。没食子酸作为代表性成分在牡丹皮次生代谢产物合成转化途径中起到关键作用，且含量较高，故也将其引入到特征峰，从而更好地衡量牡丹皮的质量，使牡丹皮质量标准更具有整体性、专属性特性。本研究最终共标定没食子酸、氧化芍药苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚5个共有峰，建立牡丹皮药材高效液相特征图谱。

在含量测定实验中，考虑到普适性，合理筛选出芍药苷、丹皮酚作为特征性指标，并优化供试品的提取条件，选用70%甲醇超声提取，使得芍药苷和丹皮酚提取率均有所提高。

与2015年版《中华人民共和国药典》原标准相比，本实验在薄层色谱鉴别法中优化了供试品提取试剂，将提取溶剂乙醚更改为毒性小且易得的乙醇提取，增加了254 nm紫外灯下检视，可辅助显色后斑点信息的确认，将对照药材与供试药材进行比对，建立了一种斑点更为清晰、绿色安全、专属性较高的薄层鉴别方法；建立了牡丹皮药材特征图谱，为科学评价牡丹皮药材和控制其质量提供有效的方法；增加单萜苷类中代表性成分芍药苷作为含量指标限量要求，提升牡丹皮药材整体评价标准。综上，该方法专属性强，重复性好，简便高效，可更好地控制牡丹皮药材的质量，为牡丹皮药材质量标准的完善提供有效的参考方法。

参考文献：

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[M].北京：中国医药科技出版社，2015：172.

[2] 赵文军，林阳，李鹏飞，等.牡丹皮化学成分的HPLC-QT-OFMS分析[J].药学实践杂志，2014，32(4)：261-265.

[3] 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.

[4] 王新娣，石晓峰，王斌利，等.牡丹化学成分的研究进展[J].中成药，2018，40(1)：171-176.

[5] LI X Y，XU J D，ZHOU S S，et al. Time segment scanning-based quasi-multiple reaction monitoring mode by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole/time-of-flight mass spectrometry for quantitative determination of herbal medicines：Moutan Cortex，a case study[J]. J Chromatogr A，2018(1581/1582)：33-42.

[6] 焦梦姣，邓哲，章军，等.含挥发性成分中药饮片标准汤剂的制备和质量标准研究：以牡丹皮为例[J].中国中药杂志，2018，43(5)：891-896.

[7] 翟春梅，孟祥瑛，付敬菊，等.牡丹皮的现代药学研究进展[J].中医药信息，2020，37(1)：109-114.

[8] 杨小龙，张珂，许俊锋，等.牡丹皮药理作用的研究进展[J].河南科技大学学报(医学版)，2012，30(2)：157-158.

[9] 胡云飞，徐国兵.牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J].安徽医药，2014，18(4)：589-592.

[10] WANG Z Q，HE C N，PENG Y，et al. Origins，phytochemistry，pharmacology，analytical methods and safety of cortex moutan (Paeonia suffruticosa Andrew)：a systematic review[J]. Molecules，2017，22(6)：946.

[11] 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.

[12] 夏成凯，詹云武，胡云飞，等.HPLC法同时测定不同产地牡丹皮中13种化学成分的含量[J].中草药，2019，50(4)：970-974.

[13] 陈菲菲，钱大玮，郭盛，等.基于UPLC-MS的牡丹皮药材质量评价研究[J].药物分析杂志，2018，38(4)：609-617.

[14] 王志强，陈勇，刘双双，等.基于形态、显微、多成分测定和指纹图谱的牡丹皮质量评价系统研究[J].中国中药杂志，2018，43(14)：2899-2907.

[15] WANG Z Q，SHEN J，LI P，et al. Research on quality markers of moutan cortex：quality evaluation and quality standards of moutan cortex[J]. Chinese Herbal Medicines，2017，9(4)：307-320.

(收稿日期：2020-03-20；编辑：张倩)

Optimization of Key Quality Standard for the Medicinal Material Cortex Moutan Radicis

SONG Qian-qian[1]，*ZHOU Hui-yin*[1]，*ZHAO Hong-su*[1,2,3]，*ZHAI Hong-yan*[4]，*WANG Rui*[1]，*SUN Hui-juan*[1]，*FANG Cheng-wu*[1,2,3]

(1. *School of Pharmacy*，*Anhui University of Chinese Medicine*，*Anhui Hefei* 230012，*China*；2. *Anhui Provincial Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces*，*Anhui Hefei* 230012，*China*；3. *Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement*，*Anhui Hefei* 230012，*China*；4. *Anhui Institute for Food and Drug Control*，*Anhui Hefei* 230012，*China*)

[**Abstract**] **Objective** To optimize the key quality standard for the medicinal material Cortex Moutan Radicis. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) was used to analyze the medicinal material Cortex Moutan Radicis，and high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to establish the specific chromatogram of Cortex Moutan Radicis and measure the content of paeoniflorin and paeonol. **Results** TLC spots with the same color were observed at the corresponding positions of the TLC chromatogram of Cortex Moutan Radicis and the chromatograms of the reference substance paeonol and the reference herb. The common model of HPLC specific chromatogram was established，5 common peaks were detected，and the specific chromatogram of Cortex Moutan Radicis was established. Among the 18 batches of the medicinal material，the content of paeoniflorin was 0.90%-1.70%，and the content of paeonol met the requirement for limit in Pharmacopoeia of The People's Republic of China (2015 edition). **Conclusion** This method optimizes the TLC identification method，establishes the specific chromatogram of Cortex Moutan Radicis，and adds the index of content limit，with strong specificity and good repeatability. This method is simple and efficient and can effectively control the quality of Cortex Moutan Radicis.

[**Key words**] Cortex Moutan Radicis；Quality standard；Thin-layer chromatography identification；Specific chromatogram；Content determination