

# 牡丹皮药材 UPLC 特征指纹图谱研究

范旭航<sup>1</sup>, 王振中<sup>2</sup>, 李清<sup>3</sup>, 马天成<sup>1</sup>, 毕开顺<sup>3</sup>, 贾英<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016;

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

3. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 建立牡丹皮药材的超高效液相色谱特征指纹图谱分析方法。方法: 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长 254 nm。结果: 建立了牡丹皮 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 20 个共有峰, 并指认了 10 个主要色谱峰, 15 批牡丹皮药材的相似度为 0.973 ~ 0.998。结论: 本方法快速、高效, 可用于牡丹皮药材的质量评价。

**[关键词]** 牡丹皮; 特征指纹图谱; UPLC

牡丹皮系毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 是我国传统中药材, 应用历史悠久, 为国内外药材市场的重要商品。牡丹皮始载于《神农本草经》, 列为中品, 性微寒, 味苦、辛。归心、肝、肾经, 具有清热凉血, 活血化瘀之功效。用于治疗温毒发斑, 吐血衄血, 夜热早凉, 无汗骨蒸, 经闭痛经, 痈肿疮毒, 跌扑伤痛等<sup>[1]</sup>。化学研究发现牡丹皮中主要含有单萜类、酚及酚苷类、三萜类、有机酸类等成分。目前牡丹皮的质量评价主要以丹皮酚为考察指标, 中药特征指纹图谱研究对药材的全面控制具有重要作用。本实验建立了 8 min 内快速鉴别牡丹皮药材的 UPLC 特征指纹图谱方法, 为有效控制和科学评价牡丹皮药材的质量提供依据。

## 1 材料

ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower2 色谱工作站), BP210S 电子天平(德国 Sartorius 公司), AB135-S 1/10 万天平(METTLER TOLEDO 仪器有限公司)。

药材样品来源于安徽亳州、铜陵、山西运城, 经沈阳药科大学生药教研室贾英副教授鉴定, 均为正

品, 密封存放于阴凉干燥处, 样品来源见表 1。对照品没食子酸、没食子酸甲酯、芍药苷、香草乙酮、苯甲酰芍药苷、牡丹苷 C、苯甲酰氧芍药苷、丹皮酚均为自制(经核磁和质谱鉴定, 采用峰面积归一化法计算, 纯度均大于 98%), 苯甲酸购自天津市大茂化学试剂厂。1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖来自于江苏康缘公司; 乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司), 磷酸为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司), 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

表 1 牡丹皮药材收集情况

NO.	产地	采集日期	特征指纹图谱编号
1	安徽亳州	2010-08	S1
2	安徽亳州	2010-08	S2
3	安徽亳州	2010-08	S3
4	安徽亳州	2010-08	S4
5	安徽亳州	2010-08	S5
6	山西运城	2010-08	S6
7	山西运城	2010-08	S7
8	安徽铜陵	2010-03	S8
9	安徽铜陵	2010-07	S9
10	安徽铜陵	2010-07	S10
11	安徽铜陵	2010-07	S11
12	安徽铜陵	2010-07	S12
13	安徽铜陵	2010-11	S13
14	安徽铜陵	2010-11	S14
15	安徽铜陵	2010-11	S15

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm × 100

[稿件编号] 20110211006

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-003, 2009ZX09504-004)

[通信作者] \* 贾英, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础与质量控制研究, E-mail: jiayingyphu@yahoo.com.cn

mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ), 流动相 0.05% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 2 min, 6% ~ 20% B; 2 ~ 5 min, 20% ~ 24% B; 5 ~ 6.5 min, 24% ~ 55% B; 6.5 ~ 8 min, 55% ~ 65% B。流速 0.5 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长 254 nm; 进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

## 2.2 供试品溶液的制备

取牡丹皮药材约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定, 超声处理 (250 W, 33 kHz) 30 min, 放冷至室温, 称定, 用 70% 甲醇补足失量, 摇匀, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

## 2.3 对照品溶液的制备

取 1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、没食子酸、没食子酸甲酯、芍药苷、香草乙酮、苯甲酰芍药苷、牡丹苷 C、苯甲酰氧芍药苷、丹皮酚对照品适量, 甲醇溶解, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取牡丹皮药材样品约 0.5 g, 精密称定, 2.2 项下操作, 按 2.1 项下方法连续进样 6 次, 检测特征指纹图谱。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 5.0%, 符合要求<sup>[2-3]</sup>。

**2.4.2 重复性试验** 取同一批牡丹皮药材样品 6 份, 按 2.1 项下方法进样, 检测特征指纹图谱。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均小于 5.0%, 符合要求。

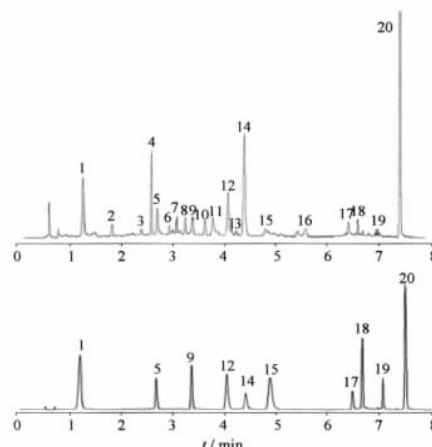
**2.4.3 稳定性试验** 取牡丹皮药材样品, 按 2.2 项下操作, 在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 检测特征指纹图谱。结果表明, 各色谱峰相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 5.0%, 表明样品在实验过程中稳定。

## 2.5 样品测定

取 15 批牡丹皮药材样品, 按 2.2 项下操作, 2.1 项下方法依次进样检测, 记录色谱图, 共获得 20 个共有峰, 指认其中 10 个共有峰, 分别为没食子酸 (1 号峰)、没食子酸甲酯 (5 号峰)、芍药苷 (9 号峰)、香草乙酮 (12 号峰)、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖 (14 号峰)、苯甲酸 (15 号峰)、牡丹苷 C (17 号峰)、苯甲酰氧芍药苷 (18 号峰)、苯甲酰芍药苷 (19 号峰)、丹皮酚 (20 号峰)。结果见图 1。

## 2.6 特征指纹图谱的建立

**2.6.1 参比峰的选择** 在各批次样品图谱中, 1, 2,



1. 没食子酸; 5. 没食子酸甲酯; 9. 芍药苷; 12. 香草乙酮; 14. 1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖; 15. 苯甲酸; 17. 牡丹苷 C; 18. 苯甲酰氧芍药苷; 19. 苯甲酰芍药苷; 20. 丹皮酚。

图 1 对照品和牡丹皮药材的 UPLC 图

3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖的色谱峰 (14 号峰) 分离良好, 峰位居中, 峰面积较大且为所有样品共有, 所以确定 1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖为参照峰。

**2.6.2 特征指纹图谱的建立及相似度评价** 将所得的 15 批牡丹皮药材 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版》软件, 以第 S10 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配, 确定了 20 个共有峰, 建立了牡丹皮药材特征指纹图谱的共有模式, 并进行了相似度计算, 15 批药材的相似度分别为 0.973, 0.973, 0.988, 0.977, 0.997, 0.992, 0.988, 0.993, 0.992, 0.998, 0.997, 0.990, 0.976, 0.986, 0.991, 各批药材相似度较好, 见图 2。

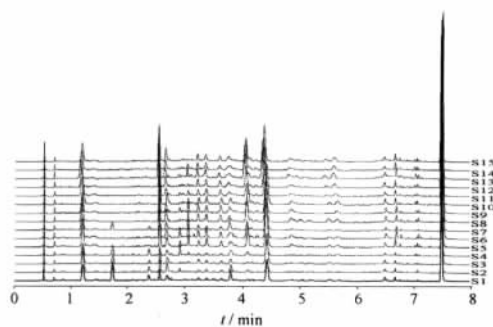


图 2 15 批牡丹皮药材 UPLC 特征指纹图谱

## 3 讨论

### 3.1 提取溶剂和方法的选择

本实验对提取溶剂进行考察,比较了乙醇、水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇和甲醇,结果表明,70%甲醇提取的样品,色谱峰个数较多,峰面积较大,故提取溶剂选择70%甲醇。对超声、回流2种不同提取方法的考察结果表明,2种提取方法提取效率相当,考虑到超声操作较简便,故提取方法选择超声。对不同的提取时间进行考察,分别超声15,30,45,60 min,结果表明30 min后各时间点的提取效率基本一致,故选择超声时间为30 min。最终确定用70%甲醇超声提取30 min。

### 3.2 色谱条件的选择

本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水、乙腈-甲酸水5个流动相系统。由于高浓度甲醇会导致UPLC色谱柱柱压升高,故选择乙腈。乙腈-磷酸水作为流动相系统时,各峰的分度度较好,且基线平稳,有利于特征指纹的分析,因此最终采用乙腈-磷酸水作为流动相系统。

### 3.3 检测波长的选择

本实验使用Waters的PDA检测器进行紫外区全波长扫描,以230 nm为检测波长时,芍药苷类成分色谱峰响应较大,但色谱峰数目较少,色谱峰有基

线漂移。以丹皮酚的最大吸收波长270 nm为检测波长时,色谱峰的数目较少。在254 nm波长下,色谱图基线噪音较低,特征峰信息较完全且分离度好,综合考虑了牡丹皮药材中丹皮酚类和芍药苷类2类主要成分,选择254 nm作为检测波长。

### 3.4 色谱柱的考察和优化

本实验考察了ACQUITY UPLC HSS T3和HSS C<sub>18</sub>色谱柱,结果表明ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱,各色谱峰分布均匀,分离度较好,柱效高,故选用此色谱柱。

### 3.5 牡丹皮药材UPLC特征指纹的建立

本实验建立了8 min内快速鉴定牡丹皮药材的UPLC特征指纹图谱方法,对牡丹皮药材进行了评价。各批次药材的相似度均较高,说明牡丹皮品质较为稳定。该方法快速,操作性强,为控制和评价牡丹皮药材的整体质量提供依据。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 160.
- [2] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 131.
- [3] 洪筱坤. 中药数字化色谱指纹图谱[M]. 上海: 科学技术出版社, 2003: 69.

## UPLC characteristic chromatographic profile of Moutan Cortex

FAN Xuhang<sup>1</sup>, WANG Zhenzhong<sup>2</sup>, LI Qing<sup>3</sup>, MA Tiancheng<sup>1</sup>, BI Kaishun<sup>3</sup>, JIA Ying<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;

3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an UPLC method of determining the characteristic chromatographic profiles of Moutan Cortex for quality control of the medicine. **Method:** The UPLC characteristic chromatographic profiles of fifteen batches of Moutan Cortex were determined on an HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) eluted with the mobile phase consisted of water containing 0.05% phosphoric acid and acetonitrile in gradient mode and the detection wavelength was set at 254 nm. **Result:** The common mode of the UPLC characteristic chromatographic profile was set up under the established condition. There were 20 common peaks in the characteristic chromatographic profile of fifteen samples, ten of which were identified, and the similar degrees of the fifteen batches to the common mode were between 0.973-0.998. **Conclusion:** The method was fast and accurate. The characteristic chromatographic profile of Moutan Cortex with high specificity can be used to control the quality of Moutan Cortex.

**[Key words]** Moutan Cortex; characteristic chromatographic profile; UPLC

doi: 10.4268/cjcm20110614

[责任编辑 马超一]