

牡丹皮药材的HPLC指纹图谱建立和聚类分析^Δ

侯锡鸿*,葛梅,张迎春,曾忠良*(西南大学药学院,重庆 400715)

中图分类号 R931.5;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3354-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.10

摘要 目的:建立牡丹皮药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行聚类分析。方法:采用HPLC法,色谱柱为Ecosil C₁₈,流动相为0.2%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,进样量为10 μL。以丹皮酚为参照,绘制69批(S1~S69)药材样品的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)》进行相似度评价,确定共有峰。采用HPLC-质谱(MS)法鉴定共有峰对应成分[HPLC条件同上;MS条件为电喷雾离子源,正、负离子模式检测,扫描范围为 m/z 100~1 200,干燥气为N₂(纯度:99.999 9%),干燥气流速为15 L/min,干燥气温度为350℃,碰撞低能量为4 V,碰撞高能量为10~40 V]。采用SPSS 20.0软件对69批药材样品进行聚类分析。结果:69批药材样品的HPLC图谱有29个共有峰,除6批药材样品外其余样品相似度均大于0.900。采用HPLC-MS法鉴定出29个共有峰的对应成分。69批药材样品可聚为5类,其中,S19、S22、S26、S29、S30、S33、S34、S38、S43、S46、S49~S51、S53、S56、S57、S64、S65聚为I类,S4~S6、S41聚为II类,S1~S3、S7~S10、S12、S24、S25、S54、S59聚为III类,S15、S23、S35~S37、S39、S40、S47、S48、S52、S58、S66、S67、S69聚为IV类,S11、S13、S14、S16~S18、S20、S21、S27、S28、S31、S32、S42、S44、S45、S55、S60~S63、S68聚为V类。结论:所建HPLC指纹图谱、成分鉴定和聚类分析结果可为牡丹皮药材的真伪鉴别和质量评价提供依据。

关键词 牡丹皮;高效液相色谱法;指纹图谱;丹皮酚;聚类分析

HPLC Fingerprint Study and Cluster Analysis of *Paeonia suffruticosa*

HOU Xihong, GE Mei, ZHANG Yingchun, ZENG Zhongliang (College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Paeonia suffruticosa*, and to conduct cluster analysis. METHODS: HPLC-MS was adopted. The determination was performed on Ecosil C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.2% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 25℃. The sample size was 10 μL. With the reference of paeonol, HPLC chromatograms of 69 batches of samples (S1-S69) were determined. The similarity evaluation was conducted by *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2004 A edition). The common peaks were further identified. Corresponding components of common peaks were identified by HPLC-MS [same HPLC condition as above; MS condition included ESI, positive and negative ion model, mass scanning range of m/z 100-1 200, dry gas of N₂ (99.999 9%), dry gas velocity of 15 L/min, dry gas temperature of 350℃, collision energy of 4 V, and the collision energy of 10-40 V]. Cluster analysis was carried out by using SPSS 20.0 statistical software. RESULTS: There were 29 common peaks in HPLC chromatograms of 69 batches of samples, and the similarity was more than 0.900 except for 6 batches of samples; the corresponding components of 24 peaks were identified totally by using HPLC method. 69 batches of samples were divided into 5

(5):664-666.

- [10] 高文分,袁文娟,王梅. GC法同时测定醒脑静注射液中麝香酮、龙脑的含量及其有关物质[J]. 中国药师,2011,14(11):1607-1608.
- [11] 黎莉,曹芹,曹旭静,等. HS-SPME-GC-MS法测定水中2-甲基异冰片及土臭素[J]. 化学分析计量,2014,23(2):63-65.
- [12] 张新庄,狄留庆,单进军,等. 祖师麻总香豆素缓释微丸

的制备及释放特性[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(11):891-894.

- [13] 石洋,潘博文,王慧娟,等. 天麻微丸的制备及薄膜包衣防潮的考察[J]. 时珍国医国药,2015,26(8):1919-1921.
- [14] 李小娜,郭红霞,时银萍. 薄膜包衣在中药防潮中的应用[J]. 中草药,2008,39(10):1583-1586.
- [15] 付磊,潘五九,王伟明. 中药缓控释微丸包衣材料处方及成型工艺研究进展[J]. 黑龙江中医药,2014,43(1):49-50.
- [16] 曲建博. 中药新药稳定性研究常见问题及案例分析[J]. 中南药学,2013,11(6):477-479.
- [17] 霍秀敏. 稳定性试验与药品的有效期[J]. 药品评价,2007,4(1):56-58.

(收稿日期:2018-05-21 修回日期:2018-10-17)

(编辑:陈宏)

Δ 基金项目:国家级大学生创新创业训练计划资助项目(No.201710635010);重庆市基础与前沿研究计划项目(No.cstc2016jcyjA0359);西南大学基本科研业务费专项资金项目(No.XDJK2016C073)

* 本科生。研究方向:中药学。E-mail: honghouxi169168@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:中药学、中药制剂学。E-mail: zzl998@163.com

categories. S19, S22, S26, S29, S30, S33, S34, S38, S43, S46, S49-S51, S53, S56, S57, S64, S65 could be grouped into category I; S4-S6, S41 could be grouped into category II; S1-S3, S7-S10, S12, S24, S25, S54, S59 could be grouped into category III; S15, S23, S35-S37, S39, S40, S47, S48, S52, S58, S66, S67, S69 could be grouped into category IV; S11, S13, S14, S16-S18, S20, S21, S27, S28, S31, S32, S42, S44, S45, S55, S60-S63, S68 could be grouped into category V. CONCLUSIONS: The established HPLC fingerprint, component identification and cluster analysis can provide reference for identification and quality evaluation of *P. suffruticosa*.

KEYWORDS *Paeonia suffruticosa*; HPLC; Fingerprint; Paeonol; Cluster analysis

牡丹皮为毛茛科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的干燥根皮^[1],其主要活性成分为以丹皮酚为主的酚酸类和以芍药苷为主的苷类^[2]。牡丹皮具有清热凉血、活血化瘀的功效,现代药理学研究表明其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病等作用^[3],含有该药材的六味地黄丸是其临床应用的典范。

牡丹皮以重庆垫江产(习称“川丹”)、安徽铜陵和凤阳产(习称“凤丹”)的质量较优^[4],但因其基源植物牡丹集观赏性和药用于一体,在近年大力发展观光农业、大面积种植观赏牡丹的情况下,市售牡丹皮药材的产地及来源极其复杂、质量良莠不齐,其药用效果和临床用药安全也受到极大影响。2015年版《中国药典》(一部)牡丹皮的质量控制指标项下也仅有丹皮酚含量测定,显然难以全面反映该药材真实的内在质量。

指纹图谱技术能较全面地反映中药的特征化学信息,在样品真伪鉴别评价等方面表现出较大的优势^[5],且该技术与中医药整体观相符,目前已成为国际公认的中药及天然药物质量控制技术^[6]。在目前牡丹皮基源植物育种背景不清楚、药材质量控制及评价体系不完善的大环境下,已有的相关检验鉴别技术专属性差等问题已显露^[7-10]。为此,笔者对重庆垫江、安徽铜陵和亳州等地采集以及市售的共69批牡丹皮药材样品进行高效液相色谱(HPLC)指纹图谱研究,以期为该药材的真伪鉴别和质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD型HPLC仪(包括DGU-20A3R脱气机、LC-20AD溶液输送单元、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、LC-Solution色谱工作站)、LCMS-8030型HPLC-质谱(MS)仪、AUW220D型十万分之一电子分析天平均购自日本Shimadzu公司;KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司);CS-700型高速多功能粉碎机(永康市天祺盛世工贸有限公司)。

1.2 试剂

丹皮酚对照品(批号:150722,纯度:>98%)、芍药苷对照品(批号:150819,纯度:>98%)、没食子酸对照品(批号:150729,纯度:>98%)、没食子酸甲酯对照品(批号:150903,纯度:>98%)均购自上海融禾医药科技

发展有限公司;氧化芍药苷对照品(批号:YY90574-201703,纯度:>98%)、苯甲酰氧化芍药苷对照品(批号:BWB51073-201704,纯度:>98%)均购自中国食品药品检定研究院;丹皮酚原苷对照品(成都普思生物科技有限公司,批号:D-019-150925,纯度:>99%);甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

69批牡丹皮药材样品由笔者自采或购买(来源见表1),经西南大学药学院陈前锋副教授鉴定为真品。

表1 牡丹皮药材来源

Tab 1 Sources of *P. suffruticosa*

| 编号 | 收集时间 | 生长年限,年 | 收集方式 | 编号 | 收集时间 | 生长年限,年 | 收集方式 |
|-----|------------|--------|-----------|-----|------------|--------|------|
| S1 | 2016.10.14 | 2 | 重庆垫江太平镇自采 | S36 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S2 | 2016.10.14 | 2 | 重庆垫江太平镇自采 | S37 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S3 | 2016.10.14 | 2 | 重庆垫江太平镇自采 | S38 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S4 | 2016.10.14 | 20 | 重庆垫江太平镇自采 | S39 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S5 | 2016.10.14 | 20 | 重庆垫江太平镇自采 | S40 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S6 | 2016.10.14 | 17 | 重庆垫江太平镇自采 | S41 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S7 | 2017.11.03 | 4 | 安徽亳州自采 | S42 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S8 | 2017.11.03 | 4 | 安徽亳州自采 | S43 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S9 | 2017.11.03 | 4 | 安徽铜陵自采 | S44 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S10 | 2015.10.15 | 3~5 | 陕西汉中市售 | S45 | 2015.10.15 | 3~5 | 重庆市售 |
| S11 | 2015.10.15 | 3~5 | 陕西汉中市售 | S46 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S12 | 2017.09.05 | 3~5 | 甘肃省售 | S47 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S13 | 2017.09.05 | 3~5 | 甘肃省售 | S48 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S14 | 2017.12.09 | 3~5 | 甘肃省售 | S49 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S15 | 2015.10.15 | 3~5 | 重庆市售 | S50 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S16 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S51 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S17 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S52 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S18 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S53 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S19 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S54 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S20 | 2015.10.15 | 3~5 | 重庆市售 | S55 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S21 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S56 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S22 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S57 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S23 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S58 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S24 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S59 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S25 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S60 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S26 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S61 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S27 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S62 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S28 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S63 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S29 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S64 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S30 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 | S65 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S31 | 2015.10.15 | 3~5 | 安徽省售 | S66 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S32 | 2015.10.15 | 3~5 | 安徽省售 | S67 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S33 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S68 | 2017.09.05 | 3~5 | 重庆市售 |
| S34 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | S69 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 |
| S35 | 2017.12.09 | 3~5 | 重庆市售 | | | | |

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Ecosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表2); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样量: 10 μL。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

| 时间, min | A, % | B, % |
|---------|-----------|-----------|
| 0~3 | 90.0→88.2 | 10.0→11.8 |
| 3~5 | 88.2→88.0 | 11.8→12.0 |
| 5~7 | 87.9→87.8 | 12.1→12.2 |
| 7~9 | 87.8→87.7 | 12.2→12.3 |
| 10~15 | 87.7→87.0 | 12.3→13.0 |
| 15~18 | 87.0→85.0 | 13.0→15.0 |
| 18~21 | 85.0→84.2 | 15.0→15.8 |
| 21~26 | 84.2→26.0 | 15.8→74.0 |
| 26~30 | 26.0→10.0 | 74.0→90.0 |
| 30~35 | 10.0 | 90.0 |
| 35~36 | 10.0→90.0 | 90.0→10.0 |

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式检测; 扫描范围: m/z 100~1 200; 干燥气: N₂ (纯度: 99.999 9%); 干燥气流速: 15 L/min; 干燥气温度: 350 ℃; 碰撞低能量: 4 V; 碰撞高能量: 10~40 V。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取丹皮酚、芍药苷、没食子酸、氧化芍药苷、没食子酸甲酯、丹皮酚原苷、苯甲酰氧化芍药苷对照品各适量, 加甲醇分别制成单一对照品贮备液; 分别精密量取上述单一对照品贮备液各 0.8 mL, 置于同一 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇定容摇匀, 制成每 1 mL 含 0.266 mg 丹皮酚、0.798 mg 芍药苷、0.884 mg 没食子酸、1.393 mg 氧化芍药苷、0.143 mg 没食子酸甲酯、0.096 mg 丹皮酚原苷、0.090 mg 苯甲酰氧化芍药苷的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品适量, 粉碎后过 80 目筛; 取粉末 0.5 g, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 精密加 70% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声(功率: 700 W, 频率: 40 kHz) 提取 30 min; 取出, 放冷, 再次称定质量, 用 70% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀; 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号: S19)适量, 按“2.1”项下试验条件连续进样测定 6 次, 以丹皮酚峰的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 29 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.37% ($n=6$), 相对峰面积的 RSD 为 0.54%~3.53% ($n=6$), 表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号: S19)适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、16、24 h 时按“2.1”项下试验条件进样测定, 以丹皮酚峰的保留时间和

峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 29 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.32% ($n=6$), 相对峰面积的 RSD 为 0.47%~4.65% ($n=6$), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取药材样品(编号: S19)适量, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下试验条件进样测定, 以丹皮酚峰的保留时间和峰面积为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 29 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0~0.62% ($n=6$), 相对峰面积的 RSD 为 1.47%~4.97% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC-MS 指纹图谱分析

2.4.1 HPLC-MS 指纹图谱的生成 取 69 批药材样品粉末各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下试验条件进样测定, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)》对 69 批药材样品的 HPLC 图谱进行分析, 得 HPLC 指纹图谱, 详见图 1、图 2。

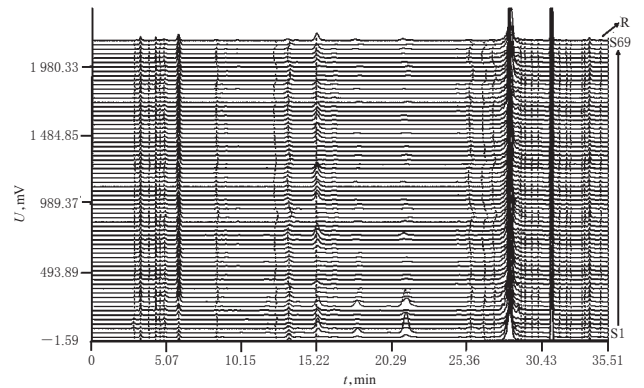


图1 69批药材样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposed fingerprint of 69 batches of samples

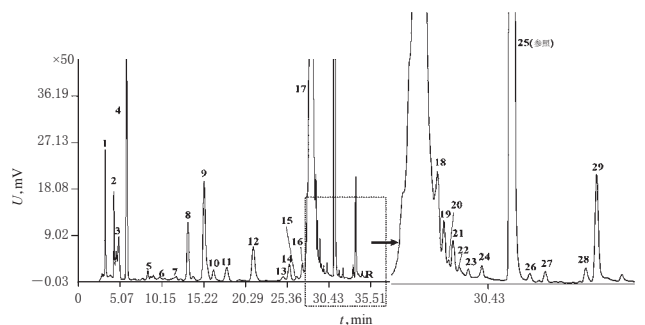


图2 药材样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC reference fingerprint of samples

2.4.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)》, 以生成的 HPLC 对照指纹图谱为对照, 进行整体相似度评价。结果显示, 69 批药材样品中, 除 6 批的相似度小于 0.900 外, 其余 63 批的相似度均大于 0.900, 表明大部分药材样品间差异较小、质量稳定性较好, 详见表 3。

表3 69批药材样品相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation of 69 batches of samples

| 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 |
|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 0.993 | S24 | 0.994 | S47 | 0.998 |
| S2 | 0.938 | S25 | 0.971 | S48 | 0.999 |
| S3 | 0.842 | S26 | 0.994 | S49 | 0.996 |
| S4 | 0.691 | S27 | 0.946 | S50 | 0.995 |
| S5 | 0.787 | S28 | 0.929 | S51 | 0.993 |
| S6 | 0.717 | S29 | 0.956 | S52 | 0.984 |
| S7 | 0.988 | S30 | 0.952 | S53 | 0.998 |
| S8 | 0.992 | S31 | 0.903 | S54 | 0.998 |
| S9 | 0.945 | S32 | 0.917 | S55 | 0.868 |
| S10 | 0.902 | S33 | 0.994 | S56 | 0.982 |
| S11 | 0.942 | S34 | 0.987 | S57 | 0.985 |
| S12 | 0.939 | S35 | 0.997 | S58 | 0.988 |
| S13 | 0.933 | S36 | 0.996 | S59 | 0.999 |
| S14 | 0.997 | S37 | 0.998 | S60 | 0.913 |
| S15 | 0.930 | S38 | 0.998 | S61 | 0.954 |
| S16 | 0.999 | S39 | 0.995 | S62 | 0.973 |
| S17 | 0.932 | S40 | 0.996 | S63 | 0.922 |
| S18 | 0.951 | S41 | 0.986 | S64 | 0.994 |
| S19 | 0.979 | S42 | 0.919 | S65 | 0.997 |
| S20 | 0.948 | S43 | 0.980 | S66 | 0.997 |
| S21 | 0.896 | S44 | 0.954 | S67 | 0.990 |
| S22 | 0.994 | S45 | 0.918 | S68 | 0.930 |
| S23 | 0.998 | S46 | 0.981 | S69 | 0.980 |

表4 药材样品 HPLC 对照指纹图谱中各共有峰对应成分的推测鉴定结果

Tab 4 Speculativeness and identification of corresponding components of the peaks in HPLC reference fingerprint of samples

| 峰号 | 化合物 | 类型 | 分子式 | [M-H] ⁻ (m/z) | | 其他碎片(m/z) |
|----|----------------------------------|-----------------------|---|--------------------------|--------|---------------------------------|
| | | | | 实测值 | 理论值 | |
| 3 | 没食子酰葡萄糖 ^[13] | 没食子酰葡萄糖类 | C ₁₈ H ₁₆ O ₁₀ | 331.15 | 331.26 | 191,169,137 |
| 4 | 没食子酸 ^[11] | 酚类 | C ₇ H ₆ O ₃ | 169.10 | 169.01 | 137,125 |
| 5 | 芍药苷 ^[13] | 黄酮类 | C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂ | 445.20 | 445.40 | 281,174,159,137 |
| 6 | 芍药苷亚硫酸酯 ^[13] | 芍药苷类 | C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃ S | 543.13 | 未提及 | 505,465,384,312,261,137 |
| 7 | 原花青素 B ^[11] | 原花青素类 ^[14] | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577.15 | 577.13 | 483,425,407,330,289,159,125 |
| 8 | 氧化芍药苷 ^[11] | 芍药苷类 | C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂ | 495.15 | 495.15 | 505,465,165,137 |
| 9 | 没食子酸甲酯 ^[11] | 酚类 | C ₈ H ₈ O ₃ | 183.10 | 183.02 | 137,124 |
| 11 | 丹皮酚原苷 ^[13] | 丹皮酚类 | C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂ | 459.15 | 459.15 | 293,197,165,159,137 |
| 12 | 丹皮酚原苷异构体 ^[13] | 丹皮酚类 | C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂ | 459.15 | 459.15 | 293,197,165,159,137 |
| 13 | 槲皮素-3-二葡萄糖苷 ^[11] | 黄酮类 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇ | 625.15 | 625.14 | 300 |
| 14 | 芍药苷 ^[11] | 芍药苷类 | C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁ | 479.10 | 479.16 | 449,435,335,301,165 |
| 15 | 菊苷 A/B/C/D ^[11,13] | 丹皮酚类 | C ₂₇ H ₂₂ O ₁₆ | 611.20 | 611.16 | 577,555,445,393,343,169 |
| 16 | 没食子酰芍药苷 ^[11] | 芍药苷类 | C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅ | 631.20 | 631.17 | 545,509,469,399,335,199,169 |
| 17 | 四氢叶酸葡萄糖 ^[11] | 丹宁类 | C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂ | 787.10 | 787.10 | 763,611,525,469,393,165 |
| 18 | 槲皮素-3-O-没食子酰葡萄糖苷 ^[11] | 黄酮类 | C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆ | 615.25 | 615.10 | 463,300 |
| 19 | 山柰酚-3-O-没食子酰葡萄糖苷 ^[11] | 黄酮类 | C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅ | 599.20 | 599.10 | 528,447,335,314,165,137 |
| 20 | 双没食子酸甲酯 ^[11] | 酚类 | C ₁₆ H ₁₂ O ₉ | 335.05 | 335.04 | 183,165 |
| 21 | 没食子酰氧化芍药苷 ^[11] | 芍药苷类 | C ₃₀ H ₃₂ O ₁₆ | 647.25 | 647.16 | 525,399,327,313,290,271,165,137 |
| 22 | 丹皮苷 B ^[11,13] | 芍药苷类 | C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄ | 629.25 | 629.19 | 599,399,165,137 |
| 23 | 丹皮苷 C ^[11,13] | 芍药苷类 | C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃ | 599.25 | 599.18 | 505,477,447,419,314,165,137 |
| 24 | 苯甲酰氧化芍药苷 ^[11] | 芍药苷类 | C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂ | 583.10 | 583.18 | 629,553,535,197,165,137 |
| 25 | 丹皮酚 ^[11] | 丹皮酚类 | C ₉ H ₁₀ O ₃ | 165.15 | 165.06 | 147,137,123 |
| 27 | 菊苷 A/B/C/D ^[11,13] | 丹皮酚类 | C ₂₇ H ₂₂ O ₁₆ | 611.20 | 611.16 | 577,555,445,393,343,169 |
| 29 | 菊苷 A/B/C/D ^[11,13] | 丹皮酚类 | C ₂₇ H ₂₂ O ₁₆ | 611.20 | 611.16 | 577,555,445,393,343,169 |

(60%、70%、80%、90%)作为提取溶剂时的提取效率。结果,采用70%甲醇作为提取溶剂时,色谱峰数量较多,峰面积响应好,故选择70%甲醇作为提取溶剂。因丹皮酚为易挥发性物质,故提取方法选择超声提取。笔者考

察了不同超声提取时间(15、30、45、60 min)对提取效率的影响,结果30 min的提取效率优于15 min,而再延长提取时间后提取效率无明显差别,因此选择30 min作为提取时间。

2.5 聚类分析

以各共有峰相对峰面积为变量,采用SPSS 20.0软件,以欧氏距离分层聚类法中的Ward法对69批药材样品进行系统聚类分析,详见图3。由图3可知,取欧氏距离为10时,69批药材样品可聚为5类:S4~S6为重庆垫江太平镇生长年限在17年及以上的药材样品,与其他药材样品有显著差异,相似度均小于0.800,和S41聚为第Ⅱ类;采自重庆垫江太平镇的S1~S3栽培品和采自安徽的S7~S9栽培品除S3外其他相似度均大于0.900,同S10、S12、S24、S25、S54、S59聚为第Ⅲ类;市售药材样品主要聚为第Ⅰ、Ⅳ、Ⅴ类。

3 讨论

在预试验中,笔者比较了不同体积分数的甲醇

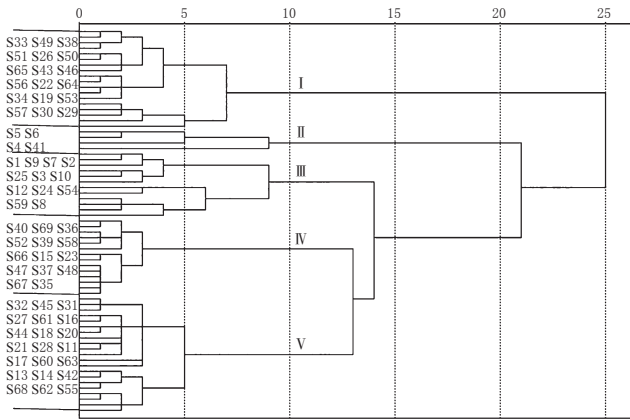


图3 聚类分析树状图

Fig 3 Hierarchical cluster dendritic diagram

本试验通过对69批牡丹皮药材样品进行分析,并推测鉴定出29个共有峰的对成分,主要是单萜苷类、酚酸类及黄酮类成分,这些共有成分可作为对牡丹皮药材进行质量控制的重要指标。

69批药材样品中有3批(S1~S3)为重庆垫江产的2年生的自采样品,3批(S4~S6)为重庆垫江产的17年以上的自采样品,3批(S7~S9)为安徽产的4年生的自采样品。相似度评价结果显示,生长年限在17年及以上的药材样品(S4~S6)的相似度均小于0.900,而其余市售或自采样品(除S21、S55外)相似度大部分均大于0.900,反映了生长年限在3~5年的药材样品质量更稳定。聚类分析中生长年限在17年及以上的药材样品(S4~S6)和S41聚为一类,显示出与其他药材样品有明显差异。重庆垫江另外3个自采样品(S1~S3)和安徽的自采样品(S7~S9)能聚为一类,显示两个产地品种质量的相似性。而市售其他药材样品主要聚为另外3类,且相似度大多大于0.900,提示市售药材样品化学成分整体上较为稳定,但也会受到产地、生长年限、加工方式、贮藏条件和时间等多种因素影响而产生一定波动^[15-20]。

综上所述,本研究所建HPLC指纹图谱、成分鉴定和聚类分析结果可为牡丹皮药材的真伪鉴别和质量评价提供依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:172.
 [2] 吴少华,马云保,罗晓东,等. 丹皮的化学成分研究[J]. 中草药,2002,33(8):9-10.
 [3] WANG Z, HE C, 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):946-973.
 [4] 邓爱平,方文韬,谢冬梅,等. 牡丹皮历代产地变迁及品质评价[J]. 中国现代中药,2017,19(6):880-885,890.

[5] 姚令文,刘燕,郑笑为,等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用[J]. 中国新药杂志,2018,27(8):934-939.
 [6] 付京. 中药指纹图谱研究进展[C]//2013年中国药学会暨第十三届中国药师周论文集. 北京:中国药学会,2013:3.
 [7] 邓小虎,王权,刘劲松,等. 凤丹皮总苷高效液相色谱特征指纹图谱研究[J]. 安徽中医药大学学报,2017,36(3):78-82.
 [8] 邓才富,谭秋生,李玲,等. 垫江牡丹皮HPLC特征图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(12):69-72.
 [9] 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.
 [10] 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.
 [11] LI SS, WU Q, YIN DD, et al. Phytochemical variation among the traditional Chinese medicine Mudanpi from *Paeonia suffruticosa* (tree peony)[J]. *Phytochemistry*, 2018, 146(1):16-24.
 [12] 韩聪敏,朱靖博,丁燕,等. 超高压液相色谱-飞行时间质谱法分析牡丹皮化学成分[J]. 大连工业大学学报,2014,33(3):166-170.
 [13] 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.
 [14] WATANABE G, OHMORI K, SUZUKI K. First regiocontrolled synthesis of procyanidin B6, a catechin dimer with rare connectivity: a halo-capping strategy for formation of 4,6-interflavan bonds[J]. *Chem Commun: Camb*, 2013, 49(45):5210-5212.
 [15] 屈云萍,王娇,高会芹,等. 不同产地牡丹皮质量及丹皮酚提取工艺研究[J]. 中国药物警戒,2015,12(11):656-659.
 [16] 武嫚,肖超妮,张欢,等. 不同生长时期丹皮的品质评价[J]. 中草药,2014,45(20):2987-2992.
 [17] 江国荣,刘少文,陈卫民,等. 不同炮制方法对牡丹皮中有效成分含量的影响[J]. 临床合理用药杂志,2017,10(28):15-16.
 [18] 孔昭琰,成苑榕. HPLC法研究不同贮藏方法牡丹皮药材中3种药效成分的含量变化[J]. 海峡药学,2015,27(1):40-42.
 [19] 吕建洪,巢建国,谷巍,等. HPLC法研究贮藏期牡丹皮中三种药效成分的含量变化[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(6):28-31.
 [20] 胡云飞,徐倩,徐国兵,等. 牡丹皮炒制前后UPLC特征指纹图谱比较[J]. 中国药房,2015,26(6):800-802.

(收稿日期:2018-04-15 修回日期:2018-07-19)

(编辑:张 静)