

# 牡丹皮炒制前后 UPLC 特征指纹图谱比较<sup>Δ</sup>

胡云飞<sup>1\*</sup>, 徐倩<sup>1</sup>, 徐国兵<sup>1,2#</sup>, 蒋磊<sup>1,3</sup>, 吴虹<sup>1</sup>(1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230031; 2.安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051; 3.亳州市食品药品检验所, 安徽亳州 236800)

中图分类号 R283.6; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0800-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.27

**摘要** 目的:建立牡丹皮炒制前后的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并进行比较。方法:采用UPLC法。色谱柱为Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>,流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为0.4 ml/min,检测波长为254 nm,进样量为2 μl。以丹皮酚为参照峰分别测定10批牡丹皮、丹皮炭的特征指纹图谱,并采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对所建立的指纹图谱进行评价。结果:牡丹皮炒制前后特征指纹图谱有明显差异,其中以5-羟甲基糠醛和芍药苷的变化最为显著。结论:该方法能快速、有效地反映出牡丹皮炒制前后的成分变化。本研究所建立的指纹图谱可为牡丹皮饮片的炒制工艺与质量评价提供科学依据。**关键词** 牡丹皮;炒制;超高效液相色谱法;指纹图谱

## Comparison of UPLC Fingerprint of Cortex Moutan before and after Stir-frying

HU Yun-fei<sup>1</sup>, XU Qian<sup>1</sup>, XU Guo-bing<sup>1,2</sup>, JIANG Lei<sup>1,3</sup>, WU Hong<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Anhui University of TCM, Hefei 230031, China; 2.Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 3.Anhui Bozhou Institute for Food and Drug Control, Anhui Bozhou 236800, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish and compare UPLC fingerprint of Cortex Moutan before and after stir-frying. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The column temperature was 30 °C, and detection wavelength was 254 nm. The sample size was 2 μl. The fingerprints of Cortex Moutan and charred Cortex Moutan were determined. Established fingerprints were evaluated with TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System. RESULTS: There were significant differences before and after stir-frying, in which the contents of 5-hydroxymethyl furfural and paeoniflorin changed most significantly. CONCLUSIONS: The method can reflect the differences of component before and after stir-frying quickly and effectively, and provides the scientific basis for processing technology and quality evaluation of Cortex Moutan.

**KEYWORDS** Cortex Moutan; Stir-frying; UPLC; Fingerprint

牡丹皮 Cortex Moutan 为毛茛科植物牡丹 *Paeonol saffur-ticosa* 的干燥根皮,是安徽省地道药材之一,始载于《神农本草经》,具有较好的清热凉血、活血散瘀之功。其中,丹皮炭为牡丹皮的重要炮制品之一,主入血分,凉血止血效果显著<sup>[1]</sup>。目前,有关牡丹皮及丹皮炭的研究报道较多,对于牡丹皮与丹皮炭的指纹图谱均有报道<sup>[2-3]</sup>,但牡丹皮炒制前后超高效液相色谱(UPLC)特征指纹图谱的比较研究却尚未见报道。本研究对牡丹皮及其炒制品丹皮炭的特征指纹图谱进行了比较,旨在为全面评价牡丹皮与丹皮炭的质量提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪,包括 HPG-3400RS 型双二元梯度泵、PDA-3000 型紫外检测器和 Chromeleon 7 数据处

<sup>Δ</sup> 基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(No.1308085MH171);安徽省研究生“千人计划”项目

\* 硕士研究生。研究方向:中药活性成分与质量控制。E-mail: yunfeihu07@163.com

# 通信作者:主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:中药活性成分与质量控制。电话:0551-63358053。E-mail: xgb119@163.com

理软件(美国 Dionex 公司);S30H-D78224 型超声清洗器(德国 Elma Sonic 公司);XP26 型分析天平(瑞士 Mettler-toledo 公司,精度:0.001 mg);AL204 型分析天平(瑞士 Mettler-toledo 公司,精度:0.001 g)。

### 1.2 试剂

没食子酸(批号:110831-200302)、苯甲酸(批号:100419-200301)、丹皮酚(批号:110708-200506)、芍药苷(批号:110736-200630)、5-羟甲基糠醛(5-HMF)对照品(批号:111626-201007)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯;水为纯净水(使用前均经 0.22 μm 滤膜滤过)。

### 1.3 药材

牡丹皮药材采于安徽、浙江、重庆、陕西、湖北、山东等地,经安徽省食品药品检验研究院黄丽丹主任药师鉴定为毛茛科植物牡丹 *P. saffur-ticosa* 的根皮,密封存放于阴凉干燥处。10 批牡丹皮样品来源见表 1(注:牡丹皮饮片与丹皮炭的样品批号相同,同批平行炮制<sup>[4]</sup>)。

## 2 方法与结果

### 2.1 饮片炮制

表1 10批牡丹皮样品来源

Tab 1 Source of 10 batches of Cortex Moutan

编号	产地	采收年月	编号	产地	采收年月
S1	安徽铜陵凤凰山	2013.4	S6	重庆南川	2013.6
S2	安徽铜陵凤凰山	2013.4	S7	重庆垫江	2012.4
S3	安徽铜陵凤凰山	2013.4	S8	陕西	2013.4
S4	安徽亳州	2013.5	S9	湖北	2013.6
S5	浙江	2013.5	S10	山东	2013.8

2.1.1 牡丹皮<sup>[2]</sup> 取鲜牡丹根皮适量,去除杂质,洗净,晾至外表面无水分,再去除木心部,于50℃烘干,即得。

2.1.2 丹皮炭<sup>[5]</sup> 取牡丹皮生品200g,置于锅内,以武火炒至外部焦黑色,内部黄褐色,喷淋少许清水,取出,凉透,即得。

## 2.2 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,1.7 μm), van Guard BEH C<sub>18</sub>(1.7 μm 预柱);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10.0 min,5%→30%B;11.0~12.0 min,30%→50%B;12.1~15.0 min,30%B;15.1~15.8 min,5%B);流速:0.4 ml/min;检测波长:254 nm;进样量:2 μl;柱温:30℃。

## 2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取没食子酸、苯甲酸、丹皮酚、芍药苷、5-羟甲基糠醛对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,分别配制成质量浓度为0.883、0.569、4.137、3.585 mg/ml的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 精密称取牡丹皮粉末0.5 g,置于圆底烧瓶中,加70%甲醇50 ml,称定质量,于80℃水浴中回流提取2 h,放冷,密塞,再次精密称定,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 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=1.14%(n=6),表明仪器精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批牡丹皮供试品(S1)溶液适量,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.73%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品(S1)粉末适量,按“2.3.2”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,重复5次,记录峰面积。结果,RSD=1.70%(n=5),表明该方法重复性良好。

## 2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 指纹图谱的测定 取10批牡丹皮及丹皮炭样品各适量,按“2.3.2”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,得特征指纹图谱,详见图1。

2.5.2 牡丹皮及丹皮炭对照图谱的生成 采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对牡

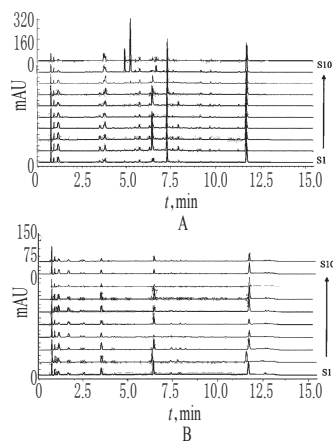


图1 特征指纹图谱

A.牡丹皮;B.丹皮炭

Fig 1 Characteristic fingerprint chromatogram

A. Cortex Moutan; B. charred Cortex Moutan

丹皮饮片与丹皮炭饮片进行对照图谱拟合。结果发现,10批牡丹皮所共有的特征峰有14个,丹皮炭的共有峰有17个,其中14号峰经对照为丹皮酚,因其为牡丹皮的主要有效成分,故选其为参照峰。牡丹皮和丹皮炭的共有峰图谱见图2。

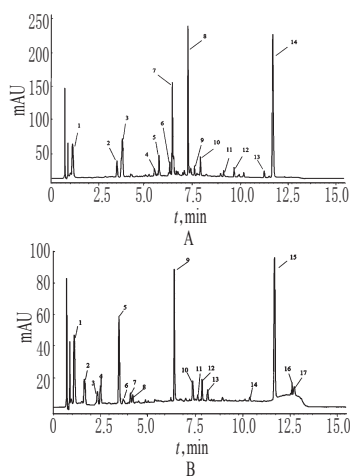


图2 共有峰图谱

A.牡丹皮;B.丹皮炭

Fig 2 The chromatogram of common peak

A. Cortex Moutan; B. charred Cortex Moutan

2.5.3 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对牡丹皮炒制前后的色谱峰进行比较分析。结果,10批牡丹皮药材的相似度均≥0.762,丹皮炭的相似度均≥0.914,结果见表2。

牡丹皮药材炒制前后的特征指纹图谱变化见图3。由图3可见,牡丹皮炒制前后的共有峰2~4、6、11、14号峰发生了显著的量变化;4、5、8、13号峰消失,而新增了a~h等色谱峰,即发生了“质”的变化,其中5号峰(芍药苷)的消失与a峰(5-HMF)的新增最为显著。

## 3 讨论

牡丹皮炒制前后UPLC特征指纹图谱的比较显示,炒制后的牡丹皮饮片其化学成分及色谱峰的比例均发生了显著变

表2 10批牡丹皮炒制前后的指纹图谱相似度分析结果

Tab 2 Analysis results of the similarity of 10 batches of Cortex Moutan before and after stir-frying

牡丹皮	相似度	丹皮炭	相似度
S1	0.902	S1	0.936
S2	0.891	S2	0.989
S3	0.907	S3	0.973
S4	0.922	S4	0.974
S5	0.870	S5	0.916
S6	0.904	S6	0.935
S7	0.875	S7	0.924
S8	0.886	S8	0.978
S9	0.774	S9	0.914
S10	0.762	S10	0.924

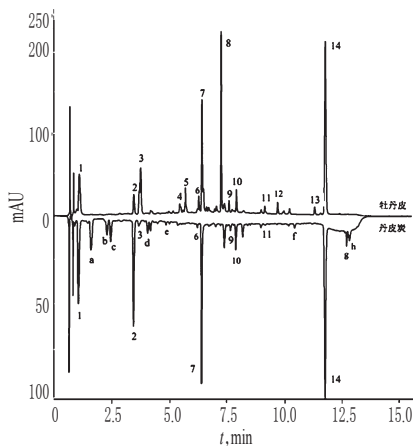


图3 牡丹皮炒制前后UPLC特征指纹图谱镜像比较

Fig 3 Comparison of UPLC fingerprint mirror image of Cortex Moutan before and after stir-frying

化,其中以芍药苷(5号峰)、5-HMF(a峰)等的含量变化最为显著。据研究报道,牡丹皮中含有大量没食子酰类、萜类、黄酮类以及多糖类化合物,武火炒制过程中温度急剧升高,会导致酰键断裂,游离出的没食子酸会导致炒制后含量增加<sup>[6-8]</sup>;芍药苷等萜类化合物在加热过程中由于结构变化导致了炒制后含量明显下降;没食子酰葡萄糖等丹皮多糖成分由于高温裂解成葡萄糖、果糖等单糖化合物,单糖化合物又会随着温度升高脱水成5-HMF,因此丹皮炭特征指纹图谱中有较强的5-HMF峰,牡丹皮饮片却无。由于5-HMF的药效作用一直颇受争议<sup>[9]</sup>,目前国内的炮制工艺也没有严格的质量控制标准<sup>[10-11]</sup>,因此是否选用5-HMF作为牡丹皮炒制工艺参数有待于进一步探讨研究,但作为丹皮炭与牡丹皮的鉴别是切实可行的。

采用UPLC特征指纹图谱技术可以对牡丹皮和丹皮炭进

行快速鉴别<sup>[12-13]</sup>,增加了样品各组分分离度。本研究中采用70%乙醇提取效果较佳,样品在254 nm波长处下检测图谱信息量较大、峰形较好、基线平稳,以0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱分离度较好、基线平稳,有利于特征指纹图谱的分析。

综上所述,本方法能快速、有效地反映出牡丹皮炒制前后的成分变化;本研究所建立的指纹图谱可为牡丹皮饮片的炒制工艺与质量评价提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 胡云飞,徐国兵.牡丹皮及其有效成分丹皮酚的药理作用研究进展[J].安徽医药,2014,18(4):589.
- [2] 范旭航,王振中,李清,等.牡丹皮药材UPLC特征指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2011,36(6):715.
- [3] 李鹏,赵学龙,张丽,等.丹皮炭HPLC指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2009,34(19):2463.
- [4] 韩燕全,洪燕,高家荣,等.基于UPLC特征指纹图谱和指标成分定量测定研究炮姜的炮制工艺[J].中草药,2013,44(1):42.
- [5] 赵学龙,丁安伟,张丽,等.丹皮炭炮制工艺的研究[J].中成药,2009,31(4):570.
- [6] 许舜军,杨柳,张勉,等.牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J].药学学报,2006,41(9):852.
- [7] 李娴,卫向龙,赵学龙,等.比较牡丹皮炒炭前后的化学成分变化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):32.
- [8] 丁安伟,张丽,赵学龙,等.不同炮制工艺丹皮炭中黄酮类成分的动态变化[J].中国中药杂志,2011,34(8):965.
- [9] 朱明贵,李丽,肖永庆,等.五味子醋制前后指纹图谱的分析比较[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(20):100.
- [10] 刘华亮,袁珂,陈年者,等.山茱萸炮制前后的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2012,23(3):234.
- [11] 黄艳萍,袁萍.白术不同炒制品HPLC指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):74.
- [12] 刘芷,贾英,赵旭,等.五味子的UPLC指纹图谱研究[J].中草药,2014,45(11):1631.
- [13] 张虹,王麟,陈相涛,等.元胡炮制前后UPLC指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(7):1093.

(收稿日期:2014-08-25 修回日期:2014-11-10)

(编辑:孙冰)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅