

HPLC 测定不同产地滇牡丹中没食子酸和丹皮酚含量

张德全¹, 马阿丽¹, 杨永寿¹, 黄传会¹, 周浓^{2*}

(1. 大理学院 药化学院, 云南 大理 671000; 2. 重庆三峡学院 生命科学与工程学院, 重庆 404000)

[摘要] 目的: 建立滇牡丹中没食子酸和丹皮酚含量测定方法, 并比较滇牡丹不同产地及其不同部位中没食子酸和丹皮酚的含量。方法: 采用 ZORBOX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 275 nm, 柱温 30 °C。结果: 没食子酸和丹皮酚在 0.204 0 ~ 2.040 μg 和 0.204 0 ~ 2.040 μg 呈良好的线性关系, 平均加样回收率 (n = 6) 为 101.81%, 97.80%。结论: 该方法可用于滇牡丹药材的质量控制; 不同产地滇牡丹中没食子酸和丹皮酚的含量差异较大。

[关键词] 滇牡丹; 没食子酸; 丹皮酚; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0057-04

[doi] 10.11653/syfyj2014050057

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1419.018.html>

[网络出版时间] 2013-12-18 14:19

Content Determination of Trihydroxybenzoic Acid and Paeonol in *Paeonia delavayi* from Different Producing Area by HPLC

ZHANG De-quan¹, MA A-li¹, YANG Yong-shou¹, HUANG Chuan-hui¹, ZHOU Nong^{2*}

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;

2. College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish determined method of the content of trihydroxybenzoic acid and paeonol in *Paeonia delavayi*, and compare the content in samples from different areas and samples from different parts. **Method:** The samples were separated by a ZORBOX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile-0.1% methane acid with water gradient system as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength for fingerprinting was 275 nm with 30 °C for column temperature. **Result:** There were well linear relationships for trihydroxybenzoic acid and paeonol in range of 0.204 0-2.040 μg and 0.204 0-2.040 μg. And average recovery rates for them (n = 6) were 101.81% and 97.80%. **Conclusion:** The method could be used for quality control to medicinal materials of *P. delavayi*. Contents of trihydroxybenzoic acid and paeonol were significantly different for medicinal materials collected from different areas.

[Key words] *Paeonia delavayi*; trihydroxybenzoic acid; paeonol; HPLC; content determination

滇牡丹是芍药科芍药属植物^[1], 为国家三级保护植物, 主要分布于云南中部至西北部^[2-3]。其干燥根在云南省常作为云白芍使用, 具有平肝止痛、养血调经、敛阴止汗之功效^[4]。滇牡丹含芍药苷、丹

皮酚、挥发油及植物甾醇等多种化学成分^[5-6], 其主要有效成分丹皮酚具有抗心律失常、抗缺血再灌注性损伤、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、增强免疫功能、抗

[收稿日期] 20130927(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31200180)

[第一作者] 张德全, 讲师, 博士, 从事药用植物学研究, E-mail: zhangdeq2008@126.com

[通讯作者] * 周浓, 副教授, 硕士, 从事药用植物栽培与质量控制, E-mail: erhaizn@126.com

菌、镇痛等作用^[7],没食子酸具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗氧化、抗肝损伤、抗病毒等作用^[8]。但不同产地的滇牡丹药材中活性成分的含量存在一定的差异,同剂量药材由于活性成分含量的差异可能导致临床疗效的不确定性,从而影响临床用药。本研究采用 HPLC 对不同产地野生滇牡丹药材及其不同部位中有效成分含量进行了比较分析与评价,建立以没食子酸和丹皮酚作为定量指标的测定方法,以期对滇牡丹的内在质量评价及其开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 1100 LC 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),SB2S-12D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),RE-2000 型旋转蒸发仪

(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-III 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),AL104 型天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),FZ102 型微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 试药 没食子酸对照品(110831-200803)、丹皮酚对照品(110708-200506)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,美国费希尔试剂公司),甲酸(分析醇,天津市化学试剂三厂),甲醇(分析醇,天津市瑞金特化学品有限公司),水为 UP 级水。

7 批滇牡丹样品于 2011 年采集于云南省迪庆州中甸县格咱乡等地(表 1),并经大理学院药学院生药学教研室张德全博士鉴定为芍药科植物滇牡丹 *Paeonia delavayi* 的干燥根。

表 1 牡丹皮样品来源

| 编号 | 采集地名 | 经纬度 | 海拔/m | 采集日期 |
|-------|--------------|-------------------------|-------|------------|
| ZD | 迪庆州中甸县格咱乡 | 99°43.878'/27°53.077' | 3 306 | 2011-10-04 |
| KM | 昆明市西山小石林 | 102°37.511'/24°57.495' | 2 295 | 2011-10-20 |
| DL | 大理市苍山花甸坝 | 100°00.751'/25°53.115' | 3 020 | 2012-05-27 |
| CJ | 澄江县梁王山保护区 | 102°51.955'/24°44.920' | 2 239 | 2011-10-22 |
| LJMNP | 丽江市玉龙雪山牦牛坪 | 100°14.250'/27°05.691' | 3 210 | 2011-06-14 |
| LJYH | 丽江市玉龙县白沙乡玉湖村 | 100°11.890'/27°00.451' | 2 898 | 2011-09-11 |
| LJGMG | 丽江市玉龙县太安乡高美古 | 100°02.510'/26°433.925' | 3 120 | 2011-09-02 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液,梯度洗脱(0 ~ 2 ~ 30 ~ 50 ~ 75 min,乙腈 5% ~ 5% ~ 16% ~ 20% ~ 60%),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 275 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,对照品及样品的 HPLC 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定没食子酸、丹皮酚各 10.2 mg,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取滇牡丹药材粉末(过 65 目筛)约 0.5 g,置于 150 mL 圆底烧瓶中,加 60% 甲醇 25 mL,称定质量,冷浸 0.5 h,超声处理 1.5 h,放冷,再称定质量,用 60% 甲醇补足质量,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 2,5,10,15,20,30 μL,注入液相色谱仪,得进样量 $X(\mu\text{g})$ 与峰面积 Y 的线性方程。结果表明,没食子酸和丹皮酚进样量分别在 0.204 ~ 2.040, 0.204 ~ 2.04 μg 与峰面积成良好的线性关系,回归

方程分别为 $A = 972.11 C + 857.48, r = 0.999 2 (n = 6)$; $A = 2 724.6 C + 27.328, r = 0.999 9 (n = 6)$ 。

2.5 精密度试验 取滇牡丹样品(类群编号 ZD,木质部)约 0.5 g,按 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定,连续进样 6 次,得没食子酸、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.50%, 0.70%,表明本法精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(类群编号 ZD,木质部),室温密闭放置,分别在制备后 0,2,4,8,14,26 h 进样,测定没食子酸、丹皮酚峰面积,RSD 分别为 1.10%,0.60%,表明样品在 26 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一份样品(类群编号 ZD,木质部)粉末 6 份,按 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定,测得没食子酸、丹皮酚的峰面积 RSD 分别为 1.20%,1.90%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收试验 精密称取已知含量的滇牡丹药材约 0.25 g(类群编号 ZD,木质部),共 6 份,分别精密加入一定量的没食子酸、丹皮酚对照品,按 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条

表3 不同部位滇牡丹中没食子酸和丹皮酚的含量(n=3) %

| 编号 | 没食子酸 | | 丹皮酚 | |
|-------|------|------|------|------|
| | 韧皮部 | 木质部 | 韧皮部 | 木质部 |
| ZD | 0.33 | 0.14 | 1.14 | 0.60 |
| KM | 0.48 | 0.42 | 0.36 | 0.20 |
| DL | 0.35 | 0.38 | 0.23 | 0.19 |
| CJ | 0.26 | 0.06 | 0.14 | 0.21 |
| LJMNP | 0.40 | 0.48 | 0.09 | 0.03 |
| LJYH | 0.25 | 0.16 | 0.07 | 0.05 |
| LJGMG | 0.45 | 0.57 | 1.08 | 0.57 |

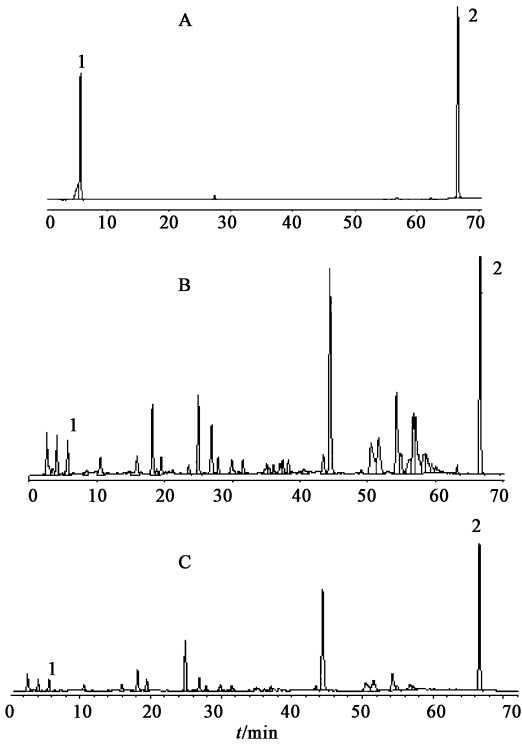
3 讨论

分别考察了加热回流、超声提取、索氏提取等方法的提取效果,以超声提取法的提取效率最高^[9-10]。而超声提取法中,又分别比较了不同的溶剂(重蒸水、甲醇、乙醇)、不同的浸泡时间、不同的提取时间等的提取效果,试验表明以60%甲醇为提取溶剂,冷浸0.5 h,超声提取1.5 h可将滇牡丹中的没食子酸、丹皮酚基本提取完全。

比较了甲醇-水、乙腈-水等流动相系统^[10],从分离情况和出峰时间等综合分析选择乙腈-0.1%甲酸溶液梯度洗脱为佳,峰形对称且分离度较好,保留值适宜,柱后处理简便、省时。

用二极管阵列检测器在本试验溶剂体系条件下,分析了没食子酸、丹皮酚对照品色谱峰和14个样品中目标组分相应色谱峰的紫外光谱,结果保留值相同处紫外光谱基本一致,没食子酸、丹皮酚两成分在275 nm处有最大吸收。待测组分与杂质峰基本能基线分离,检测灵敏度高,因此,确定没食子酸、丹皮酚检测波长为275 nm。

本研究以没食子酸、丹皮酚为考察指标,对不同产地、不同部位滇牡丹中没食子酸、丹皮酚含量的比较。没食子酸、丹皮酚在各部位的平均含量总体上为韧皮部>木质部,支持传统产区以赤丹皮入药的合理性^[11]。结果表明,不同产地的样品中没食子酸和丹皮酚的含量差别较大,丽江市玉龙县太安乡高美古(LJGMG)所产滇牡丹木质部中没食子酸含量最高,澄江县梁王山保护区(CJ)所产滇牡丹木质部中没食子酸含量最低,相差近10倍;迪庆州中甸县格咱乡(ZD)所产滇牡丹韧皮部中丹皮酚含量最高,而丽江市玉龙县白沙乡玉湖村(LJYH)所产滇牡丹木质部中丹皮酚含量最低,相差40倍,说明不同生长区域的没食子酸、丹皮酚含量有所不同。可能与其生态环境、采收时间等原因有关^[9]。因此,有必



A. 对照品;B. 韧皮部;C. 木质部;1 没食子酸;2. 丹皮酚

图1 牡丹皮 HPLC 色谱

件测定,结果见表2。

表2 滇牡丹中加样回收率试验

| 成分 | 样品中 | | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | 称样量 /g | 含量 /mg | | | | | |
| 没食子酸 | 0.250 6 | 0.348 3 | 0.357 0 | 0.707 5 | 100.61 | 101.81 | 1.49 |
| | 0.250 1 | 0.347 6 | 0.357 0 | 0.719 9 | 104.28 | | |
| | 0.250 1 | 0.347 6 | 0.357 0 | 0.712 8 | 102.30 | | |
| | 0.252 4 | 0.350 8 | 0.357 0 | 0.715 7 | 102.22 | | |
| | 0.251 3 | 0.349 3 | 0.357 0 | 0.711 4 | 101.44 | | |
| | 0.252 0 | 0.350 3 | 0.357 0 | 0.707 2 | 99.98 | | |
| 丹皮酚 | 0.250 6 | 1.496 1 | 1.530 0 | 3.008 0 | 98.82 | 97.80 | 0.87 |
| | 0.250 1 | 1.493 1 | 1.530 0 | 2.986 9 | 97.64 | | |
| | 0.250 1 | 1.493 1 | 1.530 0 | 2.995 9 | 98.22 | | |
| | 0.252 4 | 1.506 8 | 1.530 0 | 2.992 6 | 97.11 | | |
| | 0.251 3 | 1.500 3 | 1.530 0 | 3.006 1 | 98.42 | | |
| | 0.252 0 | 1.504 4 | 1.530 0 | 2.982 1 | 96.58 | | |

2.9 样品含量测定 取不同产地、不同部位滇牡丹药材样品各3份,分别按2.3项下供试品溶液制备方法制备,按2.1项下色谱条件测定,按外标法计算不同产地滇牡丹中没食子酸和丹皮酚的含量,测定结果见表3。

中药鬼箭羽质控标准的建立

李明江, 张玉玲, 潘扬*, 张弦
(南京中医药大学药学院, 南京 210029)

[摘要] 目的: 建立中药鬼箭羽形态、组织学的特征体系及其指标性成分的定性和定量方法, 为鬼箭羽的药材质量评估提供科学依据。方法: 以 10 批不同来源的鬼箭羽样本作为研究对象, 生药学制片技术观察组织构造特征; 参照 2010 年版《中国药典》方法测定水分、浸出物和灰分; 以柚皮素为对照品进行硅胶 TLC 法定性鉴别; 分别采用紫外分光光度法和 HPLC 测定鬼箭羽中总黄酮和柚皮素的含量。结果: 10 批鬼箭羽药材的显微特征基本一致, 不同产地药材并不存在显著的差异。各药材水分为 $13.8\% \pm 0.9\%$; 水浸出物 $5.9\% \pm 0.5\%$, 醇浸出物 $4.7\% \pm 0.5\%$; 总灰分 $8.4\% \pm 1.8\%$, 酸不溶性灰分 $2.9\% \pm 1.0\%$ 。供试品 TLC 色谱中, 在与柚皮素对照品色谱相对应的位置上均显相同的红色斑点。总黄酮含量为 $2.7\% \pm 0.7\%$, 柚皮素 $0.006\% \pm 0.005\%$ 。结论: 实验结果可以作为评判中药鬼箭羽质量好坏的参考标准。

[关键词] 鬼箭羽; 质量控制; 总黄酮; 柚皮素; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0060-07

[doi] 10.11653/syjf2014050060

[收稿日期] 20130726(013)

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程项目(ysxk-2010)

[第一作者] 李明江, 硕士研究生, 从事中药化学与生物技术研究, Tel: 025-86798185, E-mail: 215668094@qq.com

[通讯作者] * 潘扬, 博士, 教授, 从事中药化学与生物技术研究, Tel: 025-86798185, E-mail: y.pan2006@163.com

要采集更多的、更具有代表性的滇牡丹样品进行深入的研究。

滇牡丹的根皮为 1996 年版《云南省药品标准》收录的滇产赤丹皮^[11], 但丹皮酚的含量远低于正品牡丹皮的含量限度($\geq 12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)^[12], 所得的结论与文献报道^[13]的基本一致, 这些滇产赤丹皮品种是否能作为“正品”牡丹皮运用, 需结合药理、药效和临床应用来对其进行进一步的研究。

本试验采用高效液相色谱法测定滇牡丹中没食子酸、丹皮酚的含量方法, 具有用量少、快速、准确的特点, 为黄牡丹的深入研究与开发提供了参考, 也为滇牡丹在质量控制的研究上提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志. 第 11 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 291.
[2] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志. 第 27 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 37.
[3] 张盈, 徐迎春, 张秀新, 等. 滇牡丹种群与生态环境现状的调查研究 [J]. 江苏农业科学, 2009(6): 415.
[4] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药饮片标准. 第 1 册 [S]. 昆明: 云南美术出版社, 2006: 18.

[5] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 1127.
[6] 冯源, 王胤, 周浓, 等. HPLC 测定黄牡丹不同部位中芍药苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 139.
[7] 刘本臣. 丹皮酚的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 附 4.
[8] 贾淑平, 曾睿, 但卫华, 等. 植物多酚药理作用的研究及应用 [J]. 中国药房, 2009, 20(12): 953.
[9] 简在友, 俞敬波, 王文全. 芍药不同部位和不同采收期 6 个化学活性成分含量的比较 [J]. 药学学报, 2010, 45(4): 489.
[10] 阳勇, 彭福, 莫宗成, 等. HPLC 测定不同产地牡丹皮中 5 个化学成分的含量 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 416.
[11] 云南省卫生厅. 云南省药品标准 [S]. 1996 年版. 昆明: 云南大学出版社, 1998: 55.
[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 160.
[13] 许舜军, 李鹏, 杨柳, 等. 牡丹皮高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1677.

[责任编辑 顾雪竹]