

图 2 中压制备系统富集朝藿定 A、B、C 的色谱图

## 2.3 自动纯化系统分离朝藿定 A、B、C

### 2.3.1 自动纯化系统色谱条件的优化

自动纯化系统色谱条件的优化步骤同中压制备系统色谱条件的优化。经优化后,样品用甲醇溶解,浓度为 62.5 mg/mL;流动相为乙腈-水;在浓度为 62.5 mg/mL 的前提下,朝藿定 A、B、C 混合物的最佳进样体积为 2 mL。

### 2.3.2 流分收集区间的确定

朝藿定 A、B、C 的纯度除了受到色谱分离条件的影响外,还受到流分收集区间的影响。实验中结合具体流分的 HPLC 分析结果,确定适宜的收集区间,以保证制备效果。

### 2.3.3 分离朝藿定 A、B、C

制备色谱条件: Lichrospher C<sub>18</sub> 制备柱(30 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(29 : 71, v/v);流速: 25 mL/min;检测波长: 270 nm;进样量: 2 mL。

多次进样,分别收集朝藿定 A、B、C 所在流分,图谱见图 3,减压浓缩后,置于烘箱内干燥,可获得目标化合物,即朝藿定 A 2.4 g、朝藿定 B 14.8 g 和朝藿定 C 1.7 g。

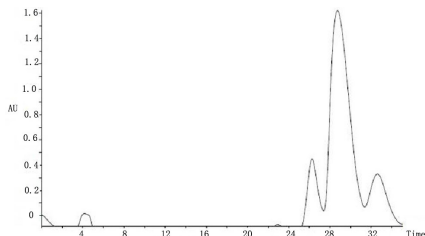


图 3 自动纯化系统分离制备朝藿定 A、B、C 的色谱图

## 2.4 产品的纯度检测

### 2.4.1 分析型 HPLC 条件

色谱柱为 Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.60 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(25 : 75),流速 1.0

mL/min,柱温 30 °C,检测波长 270 nm。

### 2.4.2 纯度分析

精密称取本方法制备的 3 种产品和本实验室之前自制的朝藿定 A、B、C 对照品各 10.0 mg,用少量流动相分别溶解并定容至 10 mL,按照“2.4.1”的条件进行分析,朝藿定 A、B、C 采用面积归一化法测定,测得朝藿定 A、B、C 的纯度分别为 99.02%、98.57% 和 98.63%。

## 3 讨论

本实验室建立了一种从淫羊藿原药材规模制备朝藿定 A、B、C 对照品的方法。以药材为原料可以保证样品的来源,且容易获得、价格适当。对淫羊藿中黄酮类成分,尤其是多糖苷类成分的分离制备起到了示范指导作用,具有一定的实际应用价值。

本实验室采用中压制备系统联合自动纯化系统进行了淫羊藿中朝藿定 A、B、C 的生产。通过优化中压制备系统和自动纯化系统的色谱分离条件,从 4.5 kg 淫羊藿原药材中获得朝藿定 A 2.4 g、朝藿定 B 14.8 g 和朝藿定 C 1.7 g,且产品纯度均达到 98% 以上。本方法具有高分辨、高通量的特点,且由于中压制备系统和自动纯化系统中的色谱填料能重复利用,这在很大程度上降低了中药化学对照品的分离成本。所建立的方法通过放大技术可以用于更大规模对照品的制备。

### 参考文献:

- [1] Ma H, He X, Yang Y, et al. The genus Epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 519-541.
- [2] Shen P, Guo BL, Gong Y, et al. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of Epimedium species[J]. Phytochemistry, 2007, 68(10): 1448-1458.
- [3] 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, 2010: 306-308.  
Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [M]. Beijing: China medical science press, 2010: 306-308.
- [4] 高明哲, 袁晓艳, 肖红斌. 制备型高效液相色谱法从积雪草提取物中分离纯化积雪草甙和羟基积雪草甙对照品[J]. 色谱, 2008, 26(3): 362-365.  
Gao MZ, Yuan XY, Xiao HB. Preparation of asiaticoside and madecassoside from the extract of *Centella asiatica* (L.) Urb using preparative high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatograph, 2008, 26(3): 362-365.

(编辑:董宇)

# 不同生长年限及采收期牡丹皮中药效成分 HPCE 分析

胡煜雯, 巢建国\*, 谷巍, 刘训红, 孔昭琰 (南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

**摘要:**目的 确立牡丹皮的最佳采收年限和最佳采收时期, 为牡丹皮 GAP 生产提供依据。方法 采用 HPCE 测定不同采收期牡丹皮中丹皮酚和没食子酸 2 种药效成分的含量。结果 风丹皮中药效成分的含量不同时期存在差异, 不同年限中以 5、6 年生所含的丹皮酚和没食子酸含量相对较高; 同一年份中各成分含量均在 9、10 月份达到相对高值且比较稳定。结论 综合考虑各因素, 牡丹皮以生长 5 年, 在 9、10 月份为最佳采收时期。

**关键词:**牡丹皮; 采收期; 药效成分; HPCE

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2013)01-0063-03

**Research on the Content of Pharmacodynamic Components of *Moutan Cortex* by HPCE in Different Ages and Picking Periods**

HU Yu-wen, CHAO Jian-guo\*, GU Wei, LIU Xun-hong, KONG Zhao-yan

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To determine the best harvesting time for *Moutan Cortex* and provide basis of GAP production. **METHODS** HPCE was employed to determine the content of 2 pharmacodynamic components ( paeonol and gallic acid) of *Moutan Cortex* at different ages and picking periods. **RESULTS** The contents of paeonol and gallic acid in *Moutan Cortex* were different in various harvesting time, and relatively higher in 5 or 6-year-old *Moutan Cortex*; all components contents were higher and more stable in September or October at the same harvesting year. **CONCLUSION** Concluding various factors, September or October is the best harvesting time for 5-year-old *Moutan Cortex*.

**KEY WORDS:** *Moutan Cortex*; harvesting time; pharmacodynamic components; HPCE

牡丹皮 *Moutan Cortex* 来源于毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。其味苦、辛, 微寒, 具有清热凉血、活血化瘀的功效<sup>[1]</sup>。安徽为牡丹皮的主产区, 尤以铜陵、南陵产的风丹皮奉为道地药材, 在海内外享有盛誉<sup>[2]</sup>。植物各生长发育阶段所含的化学成分种类、含量均有差异, 因此药材采收期不同, 直接影响药材品质和产量<sup>[3]</sup>。丹皮酚具有抗动脉粥样硬化、降血压、镇痛、抗炎、解热等作用, 是丹皮中最主要的有效成分, 没食子酸也具有抗肿瘤、抗炎、抑菌等生理活性<sup>[4-5]</sup>。本实验首次采用 HPCE 法同时测定不同采收期风丹皮中丹皮酚、没食子酸 2 种药效成分的含量, 确立风丹皮的最佳采收期, 为丹皮的 GAP 生产提供参考。

## 1 材料

Agilent 型高效毛细管电泳仪 (型号: G1600 AX), 包括惠普化学工作站, DAD 检测器, 自动进样

器; BUCHI 旋转蒸发仪 (型号: Rotavapor R-3); AG285 电子天平; PHS-3C 型 PH 计 (上海康仪仪器有限公司)。

丹皮酚对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110708-200506); 没食子酸对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110831-200805)。

硼砂 (南京化学试剂一厂, 分析纯), 氢氧化钠 (上海化学试剂有限公司, 分析纯), 甲醇 (上海化学试剂有限公司, 分析纯), 配制缓冲溶液和供试品溶液所用的水均为纯净水。

样品采自安徽南陵县丫山风丹皮 GAP 生产基地, 于 2010 年 5~11 月份采收 5 年生丹皮, 编号依次分别为: S1~S7; 2010 年 9 月 19 日采集 2、3、4、6、7 年生牡丹皮, 编号依次分别为: S8~S12。样品采集后去木心, 晒干, 打粉, 过 60 目筛, 装于棕色瓶中备用。所有样品均经由南京中医药大学药学院中药

收稿日期: 2012-09-22; 修稿日期: 2012-12-11

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010); 江苏省中药炮制重点实验室开放课题 (ZYPZ007); 常州市科技支撑计划 (农业) (CE20112019)

作者简介: 胡煜雯 (1989—), 女, 江苏南京人, 英国伦敦国王学院硕士研究生。\* 通信作者: jgchao1016@yahoo.com.cn

资源学教研室巢建国教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。

## 2 方法与结果

### 2.1 电泳条件

未涂渍标准熔融石英毛细管  $75\ \mu\text{m} \times 64.5\ \text{cm}$ , 有效长度  $56\ \text{cm}$  (Agilent 科技有限公司); 检测波长:  $212\ \text{nm}$ ; 压力进样:  $50\ \text{mbar}$ ,  $5\ \text{s}$ ; 分离电压:  $20\ \text{kV}$ ; 毛细管温度:  $25\ ^\circ\text{C}$ ; 运行缓冲液  $30\ \text{mmol/L}$  硼砂 ( $5\%$  甲醇,  $\text{pH}\ 9.4$ )。毛细管使用前以  $0.1\ \text{mol/L}$  氢氧化钠溶液, 重蒸馏水和运行缓冲液依次通过压力冲洗  $2, 5, 5\ \text{min}$ 。上述试剂使用前均经  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜滤过, 并超声脱气。

### 2.2 对照品溶液制备

精密称取丹皮酚对照品  $14.89\ \text{mg}$ 、没食子酸对照品  $4.83\ \text{mg}$  分别置于  $10\ \text{mL}$  量瓶中, 用  $70\%$  甲醇溶解并定容。制得浓度分别为丹皮酚  $1.489\ \text{mg/}$

$\text{mL}$ 、没食子酸  $0.483\ \text{mg/mL}$  的对照品储备液。

### 2.3 供试品溶液制备

精密称取样品粉末  $0.5\ \text{g}$  (过  $60$  目筛), 置  $50\ \text{mL}$  具塞三角锥形瓶中, 加入  $70\%$  甲醇溶液  $25\ \text{mL}$ , 称质量, 超声提取  $30\ \text{min}$ , 放冷, 补足质量, 滤过, 浓缩至干, 再用  $70\%$  甲醇定容至  $10\ \text{mL}$  量瓶中, 过  $0.22\ \mu\text{m}$  微孔滤膜, 作为供试品溶液。

### 2.4 标准曲线、检测限与定量限

精密吸取混合对照品溶液  $0.5, 1, 1.5, 2, 2.5\ \text{mL}$ , 用  $70\%$  甲醇定容于  $10\ \text{mL}$  容量瓶中, 分别进样测定, 以对照品的峰面积 ( $Y$ ) 对相应的浓度 ( $X$ ) 进行线性回归, 得回归方程、相关系数及线性范围; 以各化合物的信噪比等于  $3$  ( $S/N=3$ ) 时的相应浓度确定最低检测限 (LOD); 以各化合物的信噪比等于  $10$  ( $S/N=10$ ) 时的相应浓度确定最低定量限 (LOQ)。结果见表 1。

表 1 标准曲线、检测限与定量限

成分	标准曲线	$r$	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
丹皮酚	$Y=2.1339X-81.105$	0.9979	74.45~744.5	17.80	59.34
没食子酸	$Y=3.6987X-14.711$	0.9981	14.49~144.9	2.74	9.12

### 2.5 系统适用性试验

色谱柱理论板数: 在选定的条件下注入混合对照品液, 按  $n=5.54(t_R/W_{h/2})^2$  分别计算色谱柱理论板数  $n$ 。  $t_R$  为保留时间,  $W_{h/2}$  为半峰高宽。

分离度: 在选定的条件下, 注入混合对照品液, 按  $R=2(t_{R2}-t_{R1})/(W_1+W_2)$  分别计算分离度  $R$ 。  $t_{R2}$  为相邻的两个峰中后一个峰的保留时间,  $t_{R1}$  为相邻的两个峰中前一个峰的保留时间;  $W_1, W_2$  为相邻的两个峰的峰宽。

结果表明, 理论板数、分离度均达到相关要求。结果见表 2, 图 1~2。

表 2 系统适用性试验

成分	迁移时间/ $\text{min}$	理论板数	分离度
丹皮酚	2.76	34271	3.48
没食子酸	9.87	20136	27.67

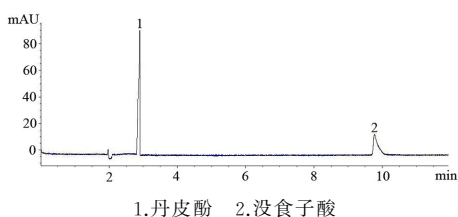


图 1 混合对照品 HPCE-DAD 色谱图

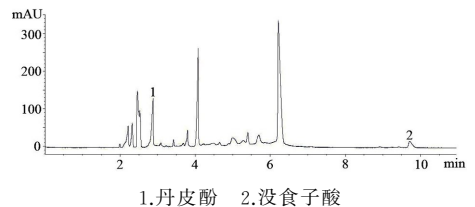


图 2 牡丹皮样品 HPCE-DAD 色谱图

### 2.6 方法学考察

精密度试验: 取一定浓度的混合对照品液, 重复进样 5 次, 各标准品平均迁移时间、峰面积的  $RSD$  见表 3。

稳定性试验: 取牡丹皮 (S6) 样品供试液, 分别在  $1, 2, 4, 8, 16, 24\ \text{h}$  进样 6 次, 2 种有效成分平均迁移时间、峰面积的  $RSD$  见表 3。

重复性试验: 精密称取牡丹皮 (S6) 样品 6 份, 每份  $0.5\ \text{g}$ , 分别按供试品液制备方法制成供试液, 进样测定, 2 种有效成分平均迁移时间、峰面积的  $RSD$  见表 3。