

基于 UPLC-MS 的牡丹皮药材质量评价研究*

陈菲菲^{1,2}, 钱大玮^{2,3**}, 郭盛^{2,3}, 严辉³, 欧阳臻¹, 卞晓坤², 赵秋龙², 段金廛^{2,3}

(1. 江苏大学药学院, 镇江 212013; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023;

3. 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱-三重四极杆质谱串联法(UPLC-TQ-MS法)同时测定牡丹皮中18个化学成分, 并比较其差异。**方法:** 采用Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速0.4 mL · min⁻¹, 柱温35 °C, 采用多反应监测(MRM)方法进行质谱扫描。**结果:** 18个待测成分的浓度与峰面积线性关系良好(0.992 3 < r² < 0.999 9)。利用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)绘制OPLS-DA得分图及VIP图, 发现了芍药苷亚硫酸酯、槲皮素、儿茶素、氧化芍药苷、没食子酸、没食子酸甲酯为硫熏与未硫熏样品之间的差异性成分。**结论:** 建立一种全面、准确的牡丹皮药材质量评价方法, 同时为鉴别牡丹皮药材是否经硫熏以及质量控制提供参考。

关键词: 牡丹皮; 硫熏; 差异性成分; 芍药苷亚硫酸酯; 槲皮素; 儿茶素; 氧化芍药苷; 没食子酸; 没食子酸甲酯; 超高效液相色谱-三重四极杆质谱串联技术; 正交偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)04-0609-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.04.07

Study on quality evaluation of Cortex Moutan based on UPLC-MS*

CHEN Fei-fei^{1,2}, QIAN Da-wei^{2,3**}, GUO Sheng^{2,3}, YAN Hui³, OUYANG Zhen¹,
BIAN Xiao-kun², ZHAO Qiu-long², DUAN Jin-ao^{2,3}

(1. Jiangsu University School of Pharmacy, Zhenjiang 212013, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal

Resources Industrialization, Nanjing 210023, China; 3. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal

Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To establish a method for simultaneous determination of 18 chemical constituents in Cortex Moutan by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-TQ-MS) and to compare the differences between sulfur-smoked and sulfur-free samples. **Methods:** The determination was performed on a Waters UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), with gradient elution of water (0.1% acetic acid) and acetonitrile at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. The column temperature was 35 °C. The target compounds were analyzed by multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results:** The linearities between the concentrations

* 国家中药标准化项目—桂枝茯苓方系列产品标准化研究(ZYBZH-C-JS-28)

** 通信作者 Tel: 18951671057; E-mail: qiandwnj@126.com

第一作者 Tel: 18631599168; E-mail: chenff0501@163.com

of the tested components and the peak areas were good ($0.9923 < r^2 < 0.9999$). The orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) score and VIP picture were drawn by OPLS-DA, which indicated that paeoniflorin sulfite, quercetin, catechin, oxypaeoniflora, gallic acid and methyl gallate were the discriminating components between the sulfur smoked and non-sulfur smoked samples of Cortex Moutan. **Conclusion:** A comprehensive and accurate method for evaluating the quality of Cortex Moutan was established, which could provide reference for the identification of Cortex Moutan with or without sulfur and its quality control.

Keywords: Cortex Moutan; sulfur-smoked; different ingredients; paeoniflorin sulfite; quercetin; catechin; oxypaeoniflora; gallic acid; methyl gallate; ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry; orthogonal partial least squares discriminant analysis

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 的干燥根皮, 性苦、辛, 微寒, 有清热凉血及活血化瘀之效^[1]。目前已从牡丹皮中鉴定出的化学成分有 50 多个^[2], Xu 等^[3] 曾采用 HPLC-DAD/ESI-MS² 技术鉴定出了 17 个单萜苷类成分、14 个没食子酸糖苷类成分、5 个酚酸类成分、3 个黄酮类成分、1 个三萜类成分, He 等^[4] 采用 HPLC-DAD-ESI/MS² 技术对牡丹皮进行质量评价, 共指认出了 19 个共有峰成分, 并对 5 个成分进行了定量测定。关于牡丹皮的质控方法大多选择丹皮酚、芍药苷及没食子酸等少数几个指标性成分^[5-8], 中药材的药效是内部所有化学成分综合作用的结果, 因此单一或少数几个指标性成分无法代表中药材的总体质量。近年来, 超高效液相色谱 (UPLC) 串联三重四极杆质谱 (TQ-MS) 因具有分离速度快, 灵敏度高, 准确性强的特点, 被广泛应用于中药材的分析中^[9-10], 故本文建立了基于 UPLC-TQ-MS 方法的多指标综合评价牡丹皮药材质量的方法, 以期对牡丹皮药材及其成药的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 公司 ACQUITY UPLC 系统 (二元高压泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器); Waters 公司 Xevo TQ/MS 质谱系统; Waters 公司 MassLynxTM 质谱工作站; 梅特勒-托尼多仪器有限公司 ML204 电子分析天平 (1/10 万), MS105 电子分析天平 (1/1 万); Millipore 公司 Millipore Q 纯水系统; 昆山禾创超声仪器有限公司 KQ-250E 型超声波清洗器; 上海安亭科学仪器厂 Anke GL-16G II 型离心机。

对照品丹皮酚 (批号 DPF20160828)、没食子酸 (批号 MSZS20140901)、芍药苷 (批号 SYG20160108)、五没食子酰葡萄糖 (批号 QMTT20160811)、没食子酸甲酯 (批

号 MSJZ20161013)、苯甲酰芍药苷 (批号 BJYG20161011)、三没食子酰葡萄糖 (批号 SMTT20161213)、没食子酰芍药苷 (批号 MSYG20160601)、氧化芍药苷 (批号 YHYG20151121)、芍药苷元 (批号 SYGY20160313)、香草乙酮 (批号 XCYT20161102)、儿茶素 (批号 ECS20160315)、对羟基苯甲酸 (批号 DQJS20141212)、6-羟基香豆素 (批号 QJDS20160921)、牡丹皮苷 C (批号 MDGC20151211)、丹皮酚原苷 (批号 DPYG20161220)、槲皮素 (批号 HPS20160618)、芍药苷亚硫酸酯 (批号 160703) 均购自南京春秋生物工程有限公司, 纯度均 $\geq 98\%$; 甲醇 (南京化学试剂有限公司) 为分析纯, 乙腈 (Merck 公司) 及甲酸 (ACS 公司) 均为色谱纯, 超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。

牡丹皮药材购于安徽亳州康美中药城, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为毛茛科植物牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 的干燥根皮, 共采集了 20 批样品, 编号 S1~S20; 其中 S1~S10 为硫熏样品, S11~S20 为未硫熏样品, 凭证标本存放于江苏省中药资源产业化过程协同创新中心。

2 方法与结果

2.1 混合对照品工作液的制备

分别精密称取丹皮酚、没食子酸、芍药苷、五没食子酰葡萄糖、没食子酸甲酯、苯甲酰芍药苷、三没食子酰葡萄糖、没食子酰芍药苷、氧化芍药苷、芍药苷元、香草乙酮、儿茶素、对羟基苯甲酸、6-羟基香豆素、牡丹皮苷 C、丹皮酚原苷、槲皮素、芍药苷亚硫酸酯的对照品适量, 以甲醇溶解并定容制成各对照品储备液。精密量取各成分对照品储备液适量, 置于同一量瓶中, 制成混合对照品溶液, 其中上述各成分的质量浓度分别为 129.4、122.2、121.4、99.4、179.4、110.6、100.6、100.7、95.6、111.1、100.0、109.1、125.7、120.3、

63.6、72.4、91.6 和 123.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。并将上述混合对照品溶液用甲醇稀释成 6 份不同浓度(稀释 2、10、20、100、200、1 000 倍)的混合对照品工作液。

2.2 供试品溶液的制备

取牡丹皮药材粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)45 min,放至室温,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 色谱及质谱条件

色谱分析条件:采用 Waters Acquity UPLC HSS BEH

C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),以 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~5 min, 95%A \rightarrow 90%A; 5~7 min, 90%A \rightarrow 75%A; 7~10 min, 75%A \rightarrow 50%A; 10~15 min, 50%A \rightarrow 5%A),流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 3 μL 。进样前以流动相梯度初始条件平衡 5 min。

质谱检测条件:ESI 源;扫描方式为 ESI⁺、ESI⁻ 模式;多反应监测(MRM);毛细管电压 3 kV,锥孔电压 20 V,萃取电压 3 V,离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气流量 50 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,脱溶剂气流量 1 000 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,辅助气流 0.15 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;各待测成分的质谱参数见表 1,色谱图见图 1。

表 1 待测成分 MRM 参数

Tab. 1 MRM parameters of the component to be tested

成分名称 (ingredient name)	t_R/min	相对分子质量 (relative molecular mass)	离子化方式 (ionization equation)	多反应监测扫描 (multiple reaction monitoring scan) m/z	锥孔电压 (cone voltage)/V	碰撞能量 (collision energy)/eV
没食子酸(gallic acid)	2.09	170	ESI ⁻	169.031 9>124.958 2	36	14
芍药苷亚硫酸酯(paeoniflorin sulfite)	3.12	544	ESI ⁺	544.404 3>161.165 7	22	22
对羟基苯甲酸(<i>p</i> -hydroxybenzoic acid)	5.06	138	ESI ⁺	136.968 1>93.006 6	26	12
没食子酸甲酯(methyl gallate)	6.37	184	ESI ⁻	183.031 9>123.991 0	40	20
氧化芍药苷(oxypaeoniflora)	6.67	496	ESI ⁺	495.301 4>137.018 9	52	28
儿茶素(catechin)	6.73	308	ESI ⁻	309.159 6>202.938 0	32	20
三没食子酰葡萄糖(1,3,6- <i>tri-O</i> -galloyl- β -D-glucose)	7.17	636	ESI ⁻	635.309 4>465.209 3	66	30
6-羟基香豆素(6-hydroxycoumarin)	7.27	162	ESI ⁻	163.031 9>107.055 6	36	18
丹皮酚原苷(paeonolide)	7.32	460	ESI ⁻	459.287 3>165.054 4	38	32
芍药苷(paeoniflorin)	7.57	480	ESI ⁻	479.287 3>120.962 7	36	28
香草乙酮(acetovanillone)	7.84	166	ESI ⁻	167.095 8>125.097 2	24	8
五没食子酰葡萄糖(1,2,3,4,6-pentagalloylglucose)	8.01	941	ESI ⁻	939.414 9>769.187 5	66	32
没食子酰芍药苷(galloyl-paeoniflorin)	8.10	632	ESI ⁻	631.346 6>613.267 8	58	24
苯甲酰芍药苷(benzoyl paeoniflorin)	8.72	584	ESI ⁺	583.344 6>553.247 41	40	10
牡丹皮苷 C(cortexidin C)	8.92	600	ESI ⁻	599.414 9>136.959 9	48	42
槲皮素(quercetin)	9.28	302	ESI ⁻	301.159 6>151.015 6	42	24
芍药苷元(paeoniflorigenone)	10.15	318	ESI ⁺	319.223 5>105.088 3	20	30
丹皮酚(paeonol)	10.64	166	ESI ⁺	167.095 8>121.127 4	30	20

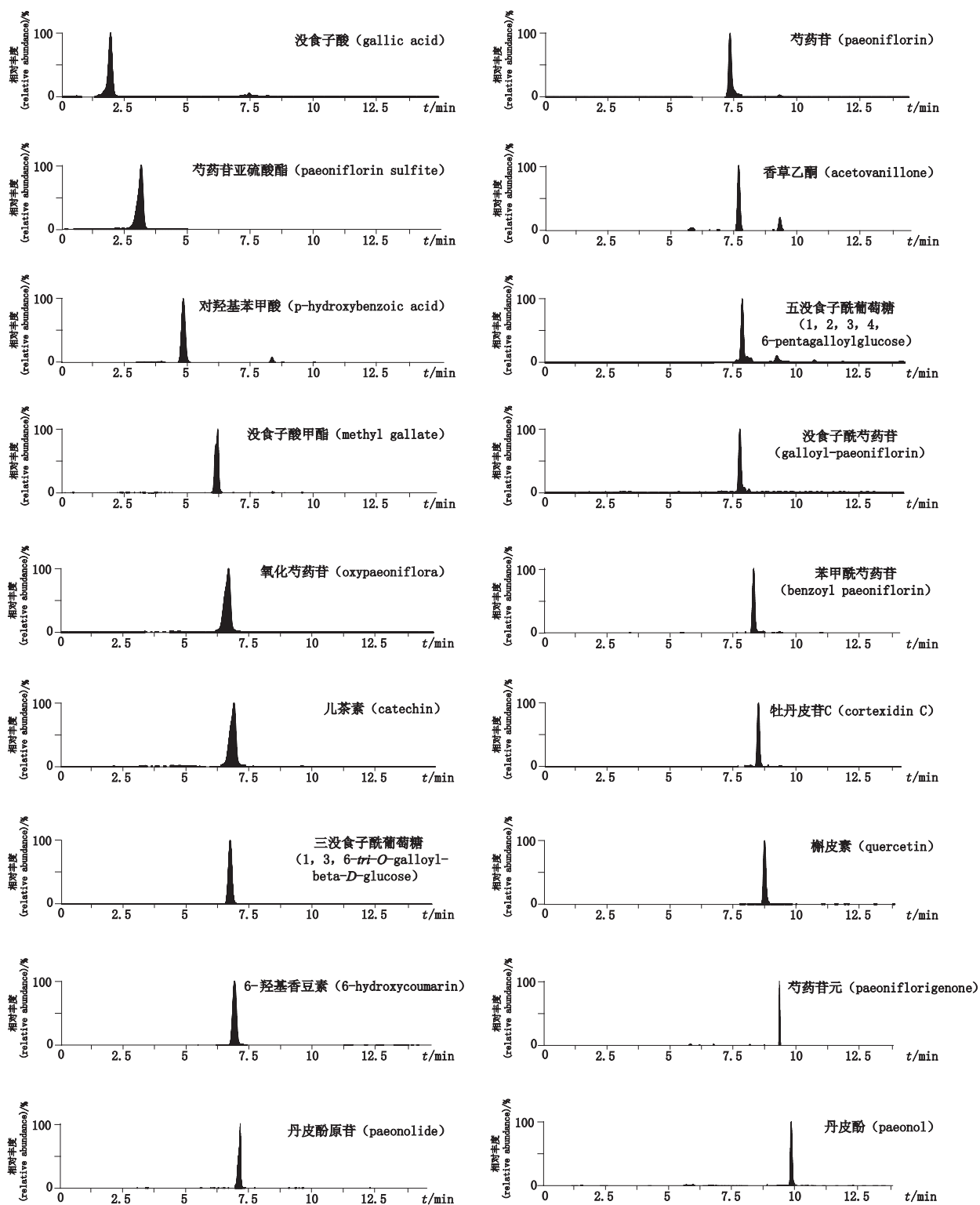


图1 样品中各待测成分 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of each analyte in the sample

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察与检测下限、定量下限测定 精密量取“2.1”项下系列混合对照品工作液 3 μL , 按“2.3”项下的分析条件进行测定。以被测化合物质量

浓度 X 为横坐标, 相应峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归, 并按信噪比 (S/N) 为 10 和 3 分别计算被测成分的定量下限 (LOQ) 和检测下限 (LOD)。结果见表 2, 各成分线性良好, r^2 值均在 0.992 3 以上。

表 2 回归方程、线性范围、检测下限与定量下限
Tab. 2 Regression equation, linear range, LOD and LOQ

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	r^2	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
丹皮酚 (paeonol)	$Y=1.138X+0.146$	0.996 9	0.129 4~129.4	0.011 8	0.039 5
没食子酸 (gallic acid)	$Y=9.238X+1.151$	0.996 2	0.122 2~61.08	0.049 7	0.165 8
芍药苷 (paeoniflorin)	$Y=6.869X+0.558$	0.995 0	0.121 4~60.72	0.029 6	0.098 7
五没食子酰葡萄糖 (1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose)	$Y=2.475X-0.054 7$	0.999 9	0.994 4~49.72	0.153 4	0.511 3
没食子酸甲酯 (methyl gallate)	$Y=65.444X+0.392$	0.999 3	0.119 4~56.69	0.174 8	0.582 8
苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin)	$Y=0.098X+0.008$	0.992 5	0.110 6~55.28	0.091 5	0.305 1
三没食子酰葡萄糖 (1, 3, 6-tri-O-galloyl-beta-D-glucose)	$Y=0.491X-0.014 1$	0.999 9	0.100 6~50.28	0.075 0	0.249 9
没食子酰芍药苷 (galloyl-paeoniflorin)	$Y=9.375X+0.689$	0.994 0	0.100 7~50.36	0.058 0	0.193 3
氧化芍药苷 (oxypaeoniflora)	$Y=0.264X-0.000 5$	0.999 8	0.955 6~47.78	0.005 3	0.017 5
芍药苷元 (paeoniflorigenone)	$Y=2.522X+0.002$	0.995 2	1.111~55.56	0.017 0	0.056 5
香草乙酮 (acetovanillone)	$Y=8.305X-0.616$	0.994 8	0.010 0~50.00	0.001 2	0.004 0
儿茶素 (catechin)	$Y=4.438X+0.138$	0.999 2	0.109 1~54.53	0.033 6	0.112 0
对羟基苯甲酸 (<i>p</i> -hydroxybenzoic acid)	$Y=0.497X+0.036$	0.992 3	0.125 7~62.86	0.037 8	0.125 9
6-羟基香豆素 (6-hydroxycoumarin)	$Y=89.82X+8.548$	0.995 8	0.120 3~60.17	0.058 6	0.195 2
牡丹皮苷 C (cortexidin C)	$Y=5.015X+0.194$	0.996 4	0.063 6~63.56	0.045 9	0.152 9
丹皮酚原苷 (paeonolide)	$Y=3.265X+0.043 6$	0.999 4	0.072 4~72.39	0.074 4	0.248 0
槲皮素 (quercetin)	$Y=38.634X+0.522$	0.997 6	0.091 6~91.56	0.074 7	0.249 0
芍药苷亚硫酸酯 (paeoniflorin sulfite)	$Y=0.019 4X-0.000 07$	0.999 4	0.123 9~61.94	0.071 0	0.236 6

2.4.2 精密度试验 取中浓度(稀释20倍)混合对照品工作液,在上述色谱条件下连续进行6次以测定待测成分的峰面积,以各指标成分峰面积的RSD评价精密度。结果见表3。

表3 方法学考察

Tab. 3 Methodological study

化合物 (compound)	RSD% (n=6)			加样回收率 (recovery) (n=9)	
	精密度 (precision)	稳定性 (stability)	重复性 (repeatability)	均值 (mean)	RSD%
丹皮酚 (paeonol)	0.56	1.5	1.9	101.6	2.0
没食子酸 (gallic acid)	1.8	1.0	1.4	98.8	2.4
芍药苷 (paeoniflorin)	1.2	0.48	1.4	99.9	3.0
五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose)	0.62	0.84	1.7	97.2	2.2
没食子酸甲酯 (methyl gallate)	1.4	1.5	2.1	98.6	1.7
苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin)	1.5	1.1	1.6	100.3	3.5
三没食子酰葡萄糖 (1,3,6-tri-O-galloyl-beta-D-glucose)	1.2	0.44	0.24	97.2	4.0
没食子酰芍药苷 (galloyl-paeoniflorin)	2.0	1.9	1.9	96.7	3.7
氧化芍药苷 (oxypaeoniflora)	1.5	0.070	1.7	97.7	1.1
芍药苷元 (paeoniflorigenone)	0.83	2.5	1.6	102.1	3.2
香草乙酮 (acetovanillone)	1.4	0.15	1.2	98.9	1.9
儿茶素 (catechin)	1.6	0.081	1.5	99.0	1.3
对羟基苯甲酸 (p-hydroxybenzoic acid)	1.5	0.18	1.6	99.3	3.6
6-羟基香豆素 (6-hydroxycoumarin)	0.74	1.8	0.76	98.6	4.4
牡丹皮苷 C (cortexidin C)	1.1	0.54	2.0	99.7	4.2
丹皮酚原苷 (paeonolide)	1.2	0.17	1.8	95.2	3.6
槲皮素 (quercetin)	0.63	1.4	2.4	95.5	2.8
芍药苷亚硫酸酯 (paeoniflorin sulfite)	1.4	1.2	2.2	100.6	1.6

2.4.3 重复性试验 取S1号样品6份,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样分析,计算各成分的含量,以含量的RSD评价重复性,结果见表3。

2.4.4 稳定性试验 取S1号样品,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h进样测定,以样品中各指标成分峰面积计算RSD,结果见表3。

2.4.5 加样回收率试验 取0.5 g已知含量的S1号

样品6份,每份精密称定,加入与样品中各成分含量相近的各对照品,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液并按上述条件测定,计算平均回收率和RSD。结果见表3。

3 结果与分析

3.1 测定结果

各样品按照“2.2”项下的方法制得供试品溶液,并按“2.3”项条件下进行测定,结果见表4。

表 4 不同批次牡丹皮样品中待测成分的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 4 The content of the substance in different batches of Cortex Moutan

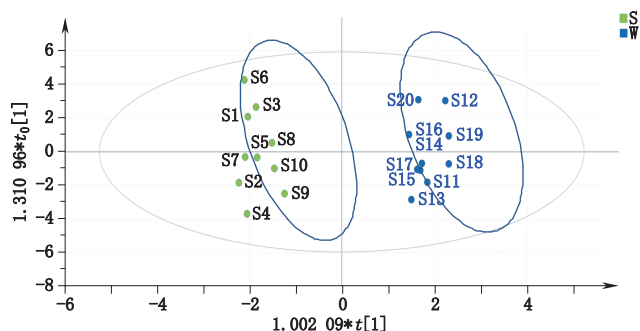
样品号 (sample)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
S1	35.18	1.90	5.43	8.76	0.03	2.94	0.23	1.09	0.18	0.82	0.07	0.61	0.36	0.87	3.54	0.22	0.07	0.91
S2	30.56	1.37	4.75	6.54	0.03	2.06	0.17	0.65	0.16	0.37	0.11	0.63	0.12	1.35	2.25	1.29	0.05	0.74
S3	33.18	2.49	5.89	10.76	0.02	2.77	0.34	1.37	0.27	0.69	0.12	0.44	0.44	0.20	3.40	1.86	0.07	0.61
S4	31.87	1.52	3.79	5.54	0.02	1.91	0.12	0.75	0.14	0.32	0.11	0.41	0.25	0.31	1.81	0.04	0.05	0.92
S5	32.57	1.98	6.69	6.83	0.02	2.62	0.11	0.75	0.20	0.82	0.10	0.53	0.25	0.18	2.45	1.15	0.04	1.09
S6	33.91	2.38	5.40	10.82	0.04	3.06	0.25	1.48	0.20	1.04	0.12	0.75	0.26	1.21	2.44	1.91	0.06	0.61
S7	31.85	1.41	6.22	9.67	0.04	2.40	0.28	1.23	0.24	0.60	0.11	0.80	0.15	0.23	2.62	1.79	0.06	0.60
S8	32.27	1.40	5.37	9.98	0.03	2.79	0.25	1.00	0.22	0.80	0.11	0.60	0.18	0.63	2.87	1.57	0.05	0.54
S9	29.16	1.13	4.42	6.87	0.01	2.41	0.11	0.87	0.16	0.68	0.11	0.43	0.19	0.14	2.25	0.65	0.05	0.49
S10	28.62	1.38	4.76	7.89	0.02	2.51	0.15	0.98	0.18	0.77	0.06	0.52	0.23	0.20	2.62	1.11	0.05	0.45
S11	32.39	1.21	6.27	7.79	0.04	2.80	0.31	0.98	0.29	0.46	3.06	0.24	0.26	0.49	3.01	0.01	0.02	0.01
S12	29.47	1.48	6.26	8.73	0.04	3.20	0.01	1.00	0.27	1.33	0.12	0.33	0.38	0.26	2.76	0.21	0.04	0.01
S13	28.34	1.06	4.27	5.81	0.06	1.97	0.12	0.76	0.19	0.37	0.10	0.25	0.25	0.19	1.98	0.03	0.02	—
S14	37.67	1.29	5.43	8.17	0.05	2.48	0.23	1.03	0.25	0.47	0.13	0.20	0.25	0.17	2.47	0.63	0.02	0.07
S15	37.34	0.98	5.28	8.14	0.06	2.43	0.15	1.05	0.25	0.46	0.11	0.29	0.19	0.19	2.54	0.62	0.03	0.01
S16	26.84	1.27	6.48	7.68	0.09	3.09	0.27	0.96	0.23	1.05	0.10	0.24	0.28	0.30	2.66	0.71	0.02	0.07
S17	31.77	1.06	5.26	8.09	0.10	2.13	0.20	1.23	0.26	0.36	0.13	0.41	0.17	0.19	2.18	1.02	0.03	0.00
S18	33.50	0.84	5.38	8.06	0.07	2.64	0.19	1.02	0.26	0.62	0.07	0.20	0.16	0.22	2.62	0.88	0.02	0.02
S19	30.89	1.31	5.69	8.72	0.04	2.78	0.19	1.03	0.25	0.70	0.11	0.24	0.26	0.55	2.83	0.85	0.00	0.06
S20	32.78	1.44	7.65	12.18	0.14	2.39	0.35	1.52	0.32	0.47	0.12	0.60	0.10	0.83	3.48	1.73	0.05	—

注 (note): — 低于检测下限 ($-\text{below LOD}$); 1. 丹皮酚 (paeonol) 2. 没食子酸 (gallic acid) 3. 芍药苷 (paeoniflorin) 4. 五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose) 5. 没食子酸甲酯 (methyl gallate) 6. 苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin) 7. 三没食子酰葡萄糖 (1,3,6-tri-*O*-galloyl-beta-D-glucose) 8. 没食子酰芍药苷 (galloyl-paeoniflorin) 9. 氧化芍药苷 (oxypaeoniflorin) 10. 芍药苷元 (paeoniflorigenone) 11. 香草乙酮 (acetovanillone) 12. 儿茶素 (catechin) 13. 对羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid) 14. 6-羟基香豆素 (6-hydroxycoumarin) 15. 牡丹皮苷 C (cortexidin C) 16. 丹皮酚原苷 (paeonolide) 17. 槲皮素 (quercetin) 18. 芍药苷亚硫酸酯 (paeoniflorin sulfate)

3.2 结果分析

将 20 批次牡丹皮样品中 18 个化学成分含量数据生成二维数据矩阵,经 UV 标准化处理后导入 SIMCA-P+13.0 (Umetrics AB, Umea, 瑞典) 软件,利用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 建立分析模型。

绘制 OPLS-DA 得分图,如图 2,该图表明 20 批牡丹皮样品被 $t[2]$ 轴明显区分为 22 个区域,且恰好分为硫熏 (S) 与未硫熏 (W) 2 组,初步显示硫熏加工会导致牡丹皮内在化学成分发生较大的变化。



W. 未硫熏 (not sulfur smoked) S. 硫熏 (sulfur smoked)

图 2 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 Score plot of OPLS-DA

VIP 值是 OPLS-DA 中评价变量对分类的贡献所常用的方法,一般认为 $VIP > 1$ 的变量为组间的特征性成分,具有统计学意义^[11]。以 7 倍交叉验证 (7-fold cross validation) 得到的评价模型的参数解释率 (R^2Y) 为 97.2%,模型预测率 (Q^2) 为 93.2%,并以此为标准,结合 VIP 图 (图 3),筛选出对硫熏样品与未硫熏样品分组贡献较大的差异性成分。图 3 显示,芍药苷亚硫酸酯、槲皮素、儿茶素、氧化芍药苷、没食子酸、没食子酸甲酯的 VIP 值 > 1 ,说明牡丹皮药材经硫后上述几个化学成分的含量存在显著差异。

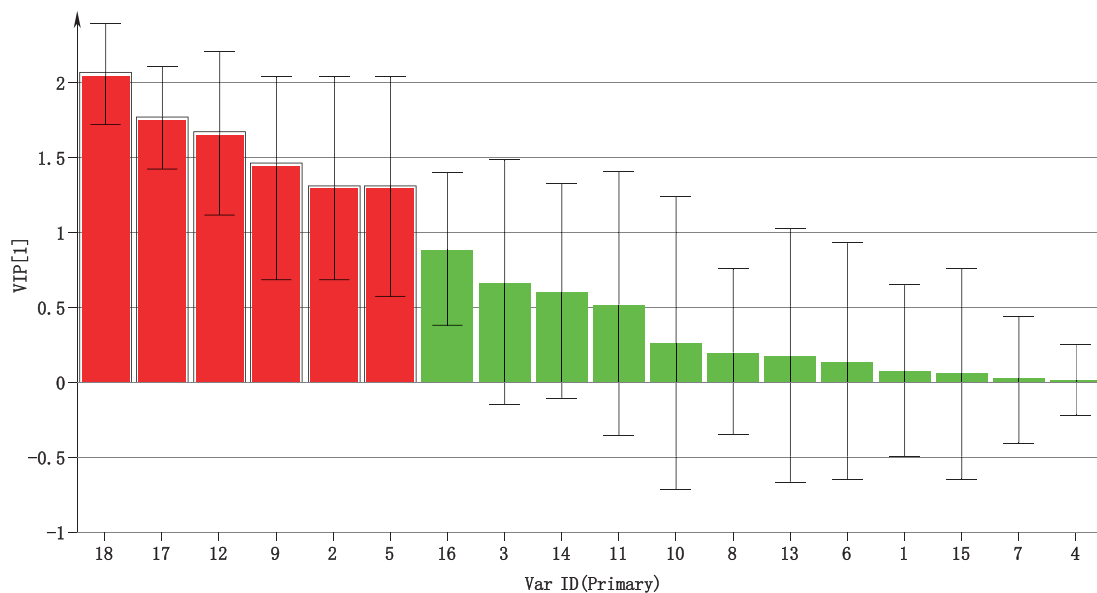
4 讨论与小结

4.1 供试品溶液的优化

本研究曾尝试采用水蒸气蒸馏提取法和超声提取法 2 种方法制备供试品溶液,并分别考察了不同提取时间对测定结果的影响。结果表明用超声提取法,提取有效成分更加完全,且杂质含量较少。

4.2 讨论

近年来,大量文献报道称,硫熏会导致药材内部化学成分发生改变^[12-15],并残留一定量的二氧化硫以及含硫衍生物,存在安全隐患,李秀杨等采用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术推测牡丹皮硫熏后产生特



1. 丹皮酚 (paeonol) 2. 没食子酸 (gallic acid) 3. 芍药苷 (paeoniflorin) 4. 五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose) 5. 没食子酸甲酯 (methyl gallate) 6. 苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin) 7. 三没食子酰葡萄糖 (1,3,6-tri-O-galloyl-beta-D-glucose) 8. 没食子酰芍药苷 (galloyl-paeoniflorin) 9. 氧化芍药苷 (oxypaeoniflora) 10. 芍药苷元 (paeoniflorigenone) 11. 香草乙酮 (acetovanillone) 12. 儿茶素 (catechin) 13. 对羟基苯甲酸 (p-hydroxybenzoic acid) 14. 6-羟基香豆素 (6-hydroxycoumarin) 15. 牡丹皮苷 C (cortexidin C) 16. 丹皮酚原苷 (paeonolide) 17. 槲皮素 (quercetin) 18. 芍药苷亚硫酸酯 (paeoniflorin sulfite)

图 3 牡丹皮中 18 个化学成分 VIP 图

Fig. 3 VIP values of 18 constituents in Cortex Moutan

征性含硫成分芍药苷亚硫酸酯^[16]。结合本研究测定结果,芍药苷亚硫酸酯在硫熏前后含量变化最为显著,因此本研究建议将芍药苷亚硫酸酯列为牡丹皮药材硫熏质控指标。

除此之外,牡丹皮经硫熏后,槲皮素、儿茶素、没食子酸含量显著升高,氧化芍药苷、没食子酸甲酯的含量显著降低;其中,槲皮素、儿茶素为黄酮类成分,在牡丹皮中含量较低,不是主要活性成分;没食子酸为有机酸,具有抗氧化、抗炎等药理活性,是牡丹皮中研究较广泛的化学成分之一;氧化芍药苷与没食子酸甲酯的含量也相对较低,且少见其药理活性的报道。

4.3 小结

本研究利用 UPLC-TQ-MS 串联技术对牡丹皮药材中 18 个化学成分的含量进行测定分析,建立了一种全面、科学的测定方法,为综合评价牡丹皮药材质量提供切实可行的参考;经 OPLS-DA 变量统计分析,指出牡丹皮硫熏前后含量差异显著的 6 个指标性成分(芍药苷亚硫酸酯、槲皮素、儿茶素、氧化芍药苷、没食子酸、没食子酸甲酯),为牡丹皮药材质量控制提供依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典 2015 年版.一部[S]. 2015: 172
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 172

[2] 王祝举,唐力英,赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用[J]. 现代药物与临床, 2006, 21(4): 155
WANG ZJ, TANG LY, HE Y. Chemical constituents and pharmacological actions of Cortex Moutan [J]. *Drugs Clin*, 2006, 21(4): 155

[3] XU SJ, YANG L, ZENG X, *et al.* Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commum Mass Spectrom*, 2006, 20(22): 3275

[4] HE Q, GE ZW, SONG Y, *et al.* Quality evaluation of Cortex Moutan by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(9): 1271

[5] 范旭航,马天成,沈旭,等. UPLC 法测定不同产地不同部位牡丹皮中 6 种活性成分[J]. 中成药, 2012, 34(2): 317
FAN XH, MA TC, SHEN X, *et al.* UPLC determination of six active components in different parts of Moutan Cortex from different habitats [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2012, 34(2): 317

[6] 杨名宇,邓桂明,张志国,等. 牡丹皮药材及饮片中丹皮酚的动态变化[J]. 医药导报, 2011, 30(10): 1355
YANG MY, DENG GM, ZHANG ZG, *et al.* Dynamic changes of paeonol in Cortex Moutan and herbal medicine pieces [J]. *Her*

Med, 2011, 30(10): 1355

[7] 杨晨,方成武,韩燕全,等. HPLC 测定不同产地不同采收期牡丹皮中丹皮酚的含量[J]. 中国当代医药, 2010, 17(5): 5
YANG C, FANG CW, HAN YQ, *et al.* HPLC determination of paeonol in Cortex Moutan at different harvesting stages [J]. *China Mod Med*, 2010, 17(5): 5

[8] 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
HU YF, PEI YM, WU H, *et al.* Difference analysis of chemical constituents in Moutan Cortex from different origins by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(17): 2984

[9] 刘杰,许文,李煌,等. UPLC-MS/MS 法同时测定白芍饮片中 10 种成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 635
LIU J, XU W, LI H, *et al.* Simultaneous determination of ten components in Radix Paeoniae Alba pieces by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(4): 635

[10] 董乙文,李天雪,褚朝森,等. UPLC-MS/MS 法同时定量测定补中益气丸中的 15 种化合物[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7): 1228
DONG YW, LI TX, CHU CS, *et al.* UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of 15 components in Buzhong Yiqi pills [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(7): 1228

[11] 严辉,段金殿,钱大玮,等. 我国不同产地的当归药材质量的分析与评价[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1988
YAN H, DUAN JA, QIAN DW, *et al.* Analysis and evaluation on the quality of *Angelica sinensis* from different areas [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2009, 40(12): 1988

[12] 李友连,王珊,朱晶晶,等. 硫磺熏蒸对亳菊化学成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2624
LI YL, WANG S, ZHU JJ, *et al.* Study on effects of sulfur fumigation on chemical constituents of *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(13): 2624

[13] 黄山君,王瑞,石燕红,等. 硫磺熏制白芍的安全性评价初步研究[J]. 药学学报, 2012, 47(4): 486
HUANG SJ, WANG R, SHI YH, *et al.* Primary safety evaluation of sulfated Paeoniae Radix Alba [J]. *Acta Pharm Sin*, 2012, 47(4): 486

[14] WANG Q, LIU RX, GUO HZ, *et al.* Study on influence of processing methods on chemical constituents in Radix Paeoniae Alba [J]. *China J Chin Mater Med*, 2006, 31(17): 1418

[15] 孟祥松,刘文革,李军,等. 硫磺熏蒸时间对白芍中芍药苷含量影响[J]. 安徽医药, 2012, 14(11): 1278
MENG XS, LIU WP, LI J, *et al.* Effects on paeoniflorin concentration of Radix Paeoniae Alba with different sulfuring time [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2012, 14(11): 1278

[16] 李秀杨,段素敏,刘欢欢,等. 特征含硫衍生物对硫熏牡丹皮检控的意义[J]. 药学学报, 2016, 51(6): 972
LI XY, DUAN SM, LIU HH, *et al.* Sulfur-containing derivatives as characteristic chemical markers in control of sulfur-fumigated Moutan Cortex [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(6): 972

(本文于 2017 年 11 月 6 日收到)