

中图分类号: R932; R284.2; TQ460.6
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.03.011

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)03-0049-04



牡丹皮提取工艺优化*

周芳, 牛壮伟, 袁继承, 赵鲁亚

(菏泽医学专科学校中医药系, 山东 菏泽 274000)

摘要:目的 优化牡丹皮的提取工艺。方法 以提取时间、提取次数、加水量为考察因素,以芍药苷和丹皮酚的含量、标准煎剂总抗氧化能力、出膏率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法筛选最佳提取工艺,并进行验证试验。结果 牡丹皮最佳提取工艺为加10倍量水,提取3次,每次90 min。在该提取工艺下,出膏率为 $(46.2586 \pm 0.1886)\%$,芍药苷和丹皮酚的含量分别为 $(9.4856 \pm 0.0897)\text{mg/g}$ 、 $(18.2244 \pm 0.4642)\text{mg/g}$,总抗氧化能力为 $(0.5780 \pm 0.0022)\mu\text{mol Trolox/mL}$ 。结论 优化的提取工艺可行性及稳定性良好,为制备更高质量的牡丹皮配方颗粒提供了参考。

关键词:牡丹皮;芍药苷;丹皮酚;总抗氧化能力;提取工艺

Optimization of Extraction Process of Moutan Cortex

ZHOU Fang, NIU Zhuangwei, YUAN Jicheng, ZHAO Luya

(Department of Chinese Medicine, Heze Medical College, Heze, Shandong, China 274000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Moutan Cortex. **Methods** With extraction time, extraction frequency, and water addition as the evaluation factors, and with the content of paeoniflorin and paeonol, the antioxidant capacity of standard decoction, and the extraction rate as the evaluation indexes, the $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to screen the optimal extraction process, and validation test was conducted. **Results** The optimal extraction process of Moutan Cortex was as follows: adding 10 times the amount of water, extracting three times, each time for 90 min. Under this extraction process, the extraction rate was $(46.2586 \pm 0.1886)\%$, and the contents of paeoniflorin and paeonol were $(9.4856 \pm 0.0897)\text{mg/g}$ and $(18.2244 \pm 0.4642)\text{mg/g}$, respectively. The total antioxidant capacity was $(0.5780 \pm 0.0022)\mu\text{mol Trolox/mL}$. **Conclusion** The optimal extraction process has good feasibility and stability, which can provide a reference for the preparation of higher-quality Moutan Cortex Formula Granules.

Key words: Moutan Cortex; paeoniflorin; paeonol; total antioxidant capacity; extraction process

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,味苦、辛,性微寒,具有凉血清热、活血化瘀等功效^[1-4]。临床常用牡丹皮治疗血液热盛、跌打损伤、疮疡红肿等症状。《神农本草经》最早记载:“除征坚,瘀血留舍肠胃,安五脏,治痈疮”。现代药理学研究表明,牡丹皮中主要含有单萜、三萜、苷类、黄酮类、挥发油类等成分,具有抗氧化、保护肝肾和神经系统等功效^[5-10]。有研究表明,牡丹皮中的芍药苷和丹皮酚是其发挥抗炎、抗氧化等功效的主要成分^[11-15]。中药配方颗粒是由以煎煮为主的传统中药饮片转化而来的现代颗粒剂型,因其使用方便、剂量控制精准等优势被广泛应用于临

床,目前发布的标准已达265个^[16-18]。为得到药效成分更高的牡丹皮提取物,本研究中以芍药苷、丹皮酚的含量为主要指标,对牡丹皮的提取工艺进行考察,为制备高品质的牡丹皮配方颗粒提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

JM-B5003型电子天平(诸暨市超泽衡器设备有限公司,精度为0.01 g);XS105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);KQ-500B型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz);R-501型旋转蒸发仪(上海申顺生物

*基金项目:山东省中医药科技项目[2021Q131]。

第一作者:周芳,女,硕士研究生,讲师,研究方向为中药化学成分提取分离及生物活性,(电子信箱)446063367@qq.com。

genic differentiation of mesenchymal stem cells in rat model of osteoporosis through BMP-2/Smads signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(1):434-443.
[18] MAN SM, KARKI R, KANNEGANTI TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. Immunol Rev, 2017,

277(1):61-75.
[19] XU L, ZHANG L, WANG Z, et al. Melatonin suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis and promotes osteoblastogenesis by inactivating the NLRP3 inflammasome [J]. Calcif Tissue Int, 2018, 103(4):400-410.
(收稿日期:2023-10-12;修回日期:2024-08-23)

科技有限公司);Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司,配置四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、Chemstation 色谱工作站);HHS-12-6型数显式恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);800-Y型万能粉碎机(浙江铂欧电器有限公司);DZG6050型真空干燥箱(上海森信实验设备有限公司)

1.2 试药

牡丹皮(山东舜生堂中药饮片有限公司,批号为20080201),经山东省菏泽市牡丹区中心医院副主任中药师郜文起鉴定为正品;丹皮酚对照品(批号为N22HB201956),芍药苷对照品(批号为M28GB143089),纯度均不低于98%,均购自上海源叶生物科技有限公司;抗氧化能力试剂盒(2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸<ABTS>法,江苏艾迪生生物科技有限公司,货号为ADS-W-YHK004-96);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);正丁醇(国药集团化学试剂有限公司,批号为10005228);水为纯化水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 牡丹皮标准煎剂制备

取牡丹皮药材约100 g,加水浸泡30 min,煎煮,趁热滤过,合并滤液,并定容至相同体积,即得牡丹皮标准煎剂,4℃保存备用。

2.2 牡丹皮中丹皮酚与芍药苷含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0 min时30%B,0~35 min时30%B~65%B,35~40 min时65%B~80%B,40~45 min时80%B~30%B);流速:1 mL/min;检测波长:230 nm(0 min),270 nm(15 min);柱温:25℃;进样量:10 μL。

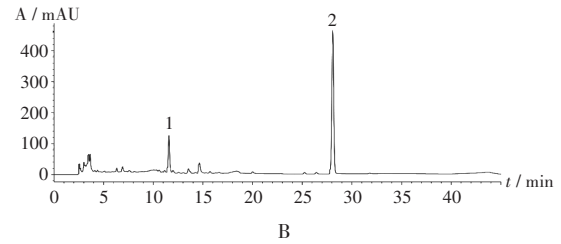
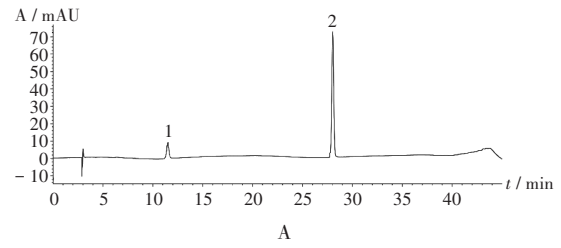
2.2.2 溶液制备

分别取芍药苷对照品1.12 mg、丹皮酚对照品2.48 mg,精密称定,用甲醇溶解并定容至100 mL容量瓶中,制成每1 mL分别含芍药苷11.2 μg、丹皮酚24.8 μg的混合对照品溶液。取2.1项下牡丹皮标准煎剂,经0.45 μm滤膜滤过,取滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2.2项下供试品溶液和混合对照品溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,分离度大于1.5,基线分离良好。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2.2项下混合对照品溶



1. 芍药苷 2. 丹皮酚

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Paeoniflorin 2. Paeonol

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

液0.02,0.05,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL,置1 mL容量瓶中,加甲醇定容,配制成不同质量浓度的对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{芍}} = 6.6547 X_{\text{芍}} - 23.2803$ ($r = 0.9998, n = 7$), $Y_{\text{丹}} = 22.5275 X_{\text{丹}} - 139.9396$ ($r = 0.9998, n = 7$)。结果表明,芍药苷、丹皮酚的质量浓度分别在0.224~8.96 μg/mL、0.496~19.84 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2.2项下混合对照品适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果芍药苷峰面积的RSD为1.22% ($n = 6$),丹皮酚峰面积的RSD为1.80% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液适量,室温放置,每隔1 h(共12 h)按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芍药苷峰面积的RSD为1.97% ($n = 12$),丹皮酚峰面积的RSD为0.45% ($n = 12$),表明供试品溶液室温放置12 h内稳定性良好。

重复性试验:按2.2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果芍药苷含量的RSD为0.36% ($n = 6$),丹皮酚含量的RSD为2.39% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品适量,按100%比例加芍药苷和丹皮酚对照品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果芍药苷和丹皮酚的平均回收率分别为(100.67 ± 1.70)%和

(97.37% ± 2.31)%, RSD分别为1.69%, 2.37% (n = 6), 表明方法准确度良好。

2.2.4 样品含量测定

取2.1项下牡丹皮标准煎剂,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量。

2.3 出膏率测定

精密量取2.1项下牡丹皮标准煎剂100 mL,60 °C减压浓缩至恒定质量,测定干膏质量,根据公式计算出膏率,出膏率(%) = 干膏质量(g) / 牡丹皮取样量(g) × 100%。

2.4 抗氧化能力测定

根据抗氧化能力试剂盒说明书中方法配制工作液,分别设置测定管、对照管和空白管。测定管和对照管中分别加入10 μL 2.1项下牡丹皮标准煎剂,空白管加入10 μL纯化水;测定管和空白管中加入190 μL工作液,对照管中加入190 μL纯化水;摇匀,室温避光放置6 min,于414 nm波长处读取吸光度(A),并计算ΔA。ΔA = A_{空白} - (A_{测定} - A_{对照})。以ΔA(Y)为纵坐标、Trolox摩尔浓度(X)为横坐标进行线性回归,得标准曲线Y = 1.7571 X - 0.0218。根据公式计算总抗氧化能力,总抗氧化能力(μmol Trolox / mL) = 0.57 × (ΔA + 0.0218)。

2.5 提取工艺优化

以加水量(因素A)、提取次数(因素B)、提取时间(因素C)为考察因素,以牡丹皮中丹皮酚和芍药苷的含量、出膏率、总抗氧化能力为评价指标优化提取工艺。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2。按公式(1)对正交试验得到的数据进行标准化处理,按公式(2)根据标准化处理结果(表3)计算综合得分(表2)。

表1 因素与水平

Tab.1 Factors and their levels

水平	因素A(倍)	因素B(次)	因素C(min)	因素D(误差)
1	8	1	30	1
2	10	2	60	2
3	12	3	90	3

标准化数据 = (样品值 - 样品最低值) / (样品最高值 - 样品最低值) (1)

综合得分 = 芍药苷含量 × 30% + 丹皮酚含量 × 30% + 出膏率 × 20% + 总抗氧化能力 × 20% (2)

由方差分析结果(表4)可知,三因素对提取结果均无显著影响。结合直观分析结果(表2)可知,各因素对提取结果的影响从大至小排序为提取次数 > 提取时间 > 加水量,优选工艺为A₃B₃C₃。综合考虑实际生产工艺,最终选择工艺为A₂B₃C₃,即加10倍量水,提取3次,每次90 min。

2.6 验证试验

取牡丹皮药材(批号为20080201)3份,加10倍量水,提取3次,每次90 min,滤过,取滤液,测定芍药苷和丹皮酚含量、出膏率及总抗氧化能力。结果出膏率为(46.2586 ± 0.1886)%,芍药苷和丹皮酚含量分别为(9.4856 ± 0.0897)mg / g、(18.2244 ± 0.4642)mg / g,总抗氧化能力为(0.5780 ± 0.0022)μmol Trolox / mL。

3 讨论

在提取工艺考察中,曾选择芍药苷、丹皮酚的含量,出膏率,总抗氧化能力为考察指标,因芍药苷和丹皮酚为牡丹皮发挥药效的主要成分,故将其得分各定为30%,出膏率和总抗氧化能力各定为20%。但试验中发现不同提取方法得到的标准煎剂的总抗氧化能力无

表2 正交试验设计与结果

Tab.2 Design and results of the orthogonal test

序号	因素A	因素B	因素C	因素D (误差)	芍药苷含量 (mg / g 药材)	丹皮酚含量 (mg / g 药材)	出膏率 (%)	总抗氧化能力 (μmol Trolox / mL)	综合 得分	排名
1	1	1	1	1	4.5649	7.4758	29.5427	0.5748	6.888	9
2	2	1	2	2	5.3687	10.2868	34.2169	0.5744	24.746	8
3	3	1	3	3	6.9448	15.0385	42.4376	0.5830	66.853	4
4	2	2	1	3	7.1464	12.6900	43.1505	0.5773	55.683	6
5	3	2	2	1	6.9813	11.9969	39.5613	0.5822	53.889	7
6	1	2	3	2	8.2065	15.7344	42.8485	0.5866	80.492	2
7	3	3	1	2	7.9039	16.4158	42.8714	0.5760	69.013	3
8	1	3	2	3	8.1854	17.3434	44.2629	0.5686	66.741	5
9	2	3	3	1	9.8762	17.7995	46.2551	0.5722	84.000	1
\bar{X}_1	51.373	32.829	43.862	48.259						
\bar{X}_2	54.810	63.354	48.458	58.083						
\bar{X}_3	63.250	73.251	77.114	63.092						
R	11.877	40.422	33.252	14.833						

表3 正交试验数据标准化处理结果

Tab. 3 Normalized data of the orthogonal test

序号	芍药苷含量 (mg/g)	丹皮酚含量 (mg/g)	出膏率 (%)	总抗氧化能力 ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)
1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.344 4
2	0.151 3	0.272 3	0.279 7	0.322 2
3	0.448 1	0.732 6	0.771 6	0.800 0
4	0.486 0	0.505 1	0.814 2	0.483 3
5	0.455 0	0.437 9	0.599 5	0.755 6
6	0.685 6	0.800 0	0.796 2	1.000 0
7	0.628 7	0.866 0	0.797 5	0.411 1
8	0.681 7	0.955 8	0.880 8	0.000 0
9	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.200 0

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the analysis of variance

因素	Ⅲ类平方和	自由度	F值	P
A	2 663.673	2	7.797	> 0.05
B	1 947.996	2	5.702	> 0.05
C	224.085	2	0.656	> 0.05

显著差异。根据文献[19-21]的研究结果,牡丹皮乙酸乙酯部位体外抗氧化活性较强,而乙酸乙酯部位除丹皮酚、芍药苷等外还有其他抗氧化成分,如没食子醇甲酸、苯甲酸等,但本研究中并未测定,可能是这些成分影响了丹皮酚标准煎剂的总抗氧化能力,后续会对牡丹皮乙酸乙酯部位中抗氧化成分进行深入研究。

前期研究中,根据2020年版《中国药典(一部)》^[22]中丹皮酚和芍药苷含量测定方法对其进行了测定,并计算了转移率,结果丹皮酚的转移率为26.64%~63.44%,芍药苷的转移率为65.92%~142.61%,芍药苷的转移率多数大于100.00%。经分析认为,主要是按该方法测定芍药苷含量时,供试品制备过程中芍药苷未被完全提取,在后续配方颗粒质量标准的建立中,将系统地芍药苷含量的测定方法进行考察。

本研究中采用正交试验优选出的牡丹皮的最佳提取工艺为加10倍量水,提取3次,每次90 min,该工艺稳定,可操作性强,适用于工业化生产。

参考文献

[1] 周永军,魏尊喜. 牡丹皮的研究概况[J]. 中国药业,2012,21(16):111-112.
[2] 王新娣,石晓峰,王斌利,等. 牡丹化学成分的研究进展[J]. 中成药,2018,40(1):171-176.
[3] 王彩虹,邱智东,王永春,等. 牡丹皮的现代研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中药材,2023,46(9):2361-2369.
[4] 张树蓉,赵宏芬,佟沫儒,等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药,2022,53(16):5215-5224.

[5] 朴颖,宋艺兰,李良昌,等. 牡丹皮乙醇提取物对帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元功能障碍的保护作用[J]. 延边大学学报,2021,44(2):89-92.
[6] 赵洪霄,李英,张金颖,等. 芍药苷对糖尿病肾病模型大鼠肾脏的保护作用及作用机制[J]. 中国药业,2022,31(3):31-35.
[7] 于德清. 丹皮中的4种活性物质调控Nrf2/Keap1信号抑制氧化应激和肝损伤研究[D]. 重庆:西南大学,2020.
[8] 车彪,邵凡,王世东,等. 国医大师吕仁和教授治疗糖尿病肾病核心药物组合及作用机制研究[J]. 中国医药导报,2021,18(10):141-146.
[9] 乔文艳,邓克红,张娟,等. 基于TGF- β /Smads通路研究芍药苷对慢性盆腔炎大鼠的抗纤维化和抗炎作用[J]. 中医药信息,2022,39(5):45-50.
[10] 张鹏,程凤琦,金圣奇,等. 丹皮酚的体内抗炎镇痛和体外抗氧化效果评价[J]. 中国兽医杂志,2022,58(6):96-100.
[11] ZHANG M, YANG L, ZHU M, et al. Moutan Cortex polysaccharide ameliorates diabetic kidney disease via modulating gut microbiota dynamically in rats[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 5(1):849-860.
[12] HU S, SHEN G, ZHAO W, et al. Paeonol, the main active principles of Paeonia moutan, ameliorates alcoholic steatohepatitis in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 5(2):100-106.
[13] ZONG SY, PU YQ, XU BL, et al. Study on the physicochemical properties and anti-inflammatory effects of paeonol in rats with TNBS-induced ulcerative colitis[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 6(2):32-38.
[14] GONG X, YANG Y, HUANG L, et al. Antioxidation, anti-inflammation and anti-apoptosis by paeonol in LPS/d-GalN-induced acute liver failure in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 5(6):124-132.
[15] JIAO F, VARGHESE K, WANG S, et al. Recent Insights Into the Protective Mechanisms of Paeoniflorin in Neurological, Cardiovascular, and Renal Diseases[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(6):728-734.
[16] 叶娇燕. 免煎中药配方颗粒在临床应用中的优势与问题[J]. 中医药管理杂志,2023,31(12):88-90.
[17] 路露,施钧瀚,侯富国,等. 中药配方颗粒:历史、现状及“后试点时代”的发展展望[J]. 中国中药杂志,2022,47(8):2008-2014.
[18] 葛少波,刘婕,张杰,等. 中药配方颗粒临床应用方法现状探讨[J]. 中国药业,2017,26(9):1-4.
[19] 李盼盼. 牡丹皮的提取分离及降糖、抗氧化活性研究[D]. 重庆:西南大学,2015.
[20] 丁丽琴. 牡丹皮化学成分及丹皮酚大鼠体内初步药代动力学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2019.
[21] 孟庆焯. 牡丹皮黄酮提取分离与抗氧化及抗疲劳作用研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2013.
[22] 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,2020:179.

(收稿日期:2023-12-08;修回日期:2024-09-10)