・中药工业・

茵陈饮片与茵陈标准汤剂的质量比较研究△

田芳^{1,2}, 阮群 珈³, 石星⁴, 吴孟华^{1,2}, 张英^{1,2}, 曹晖^{1,2}, 马志国^{1,2}*

- 1. 暨南大学岭南传统中药研究中心,广东 广州 510632;
- 2. 国家中药现代化工程技术研究中心 岭南资源分中心, 广东 广州 510632:
 - 3. 暨南大学 药学院, 广东 广州 510632;
 - 4. 乌鲁木齐质量计量检测研究院,新疆 乌鲁木齐 830000

[摘要] 目的:比较茵陈饮片与茵陈标准汤剂的质量。方法:按照标准汤剂制备要求,制备 12 批茵陈饮片标准汤剂,测定绿原酸含量,计算其转移率,测定汤剂的出膏率,并建立茵陈饮片与标准汤剂的 HPLC 指纹图谱,以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,柱温为 30 ℃,流速为 1 mL·min⁻¹,检测波长为 330 nm。结果:12 批茵陈饮片标准汤剂的绿原酸转移率为 31.0% ~62.4%,出膏率 21.2% ~30.1%,茵陈饮片与标准汤剂指纹图谱相似度均 > 0.96,指认了 7 个共有峰,分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸。结论:该研究中茵陈饮片标准汤剂制备方法规范,指纹图谱相似度高,其方法精密度、稳定性和重复性良好,可为茵陈饮片标准汤剂质量控制提供参考。

[关键词] 茵陈;标准汤剂;绿原酸;指纹图谱;质量评价

[中图分类号] R283; R944.1 [文献标识码] A [文章编号] 1673-4890(2020)01-0098-05 **doi**;10.13313/j. issn. 1673-4890. 20190315006

Comparative Study on the Quality of Artemisia capillaris and Its Standard Decoction

TIAN Fang^{1,2}, RUAN Qun-jia³, SHI Xing⁴, WU Meng-hua^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, CAO Hui^{1,2}, MA Zhi-guo^{1,2}

- 1. Research Center for TCM of Lingnan (Southern China), Jinan University, Guangzhou 510632, China;
- 2. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine Linguan Resources Branch,
 Guangzhou 510632, China;
 - 3. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
 - 4. Urumqi Academy of Quality and Metrology Inspection, Urumqi, 830000, China

[Abstract] Objective: Compare the quality of Artemisia capillaris and standard decoction. Methods: 12 batches of Artemisia capillaris standard decoctions were prepared following the preparation conditions of the TCM standard decoction. The transfer rate of chlorogenic acid and extract rate were calculated. HPLC fingerprints of Artemisia capillaris and its standard decoction were established under a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and eluted with a mobile phase of acetonitrile (B)-0.1% formic acid acid solution (A) in a gradient mode. The column temperature was set at 30 °C and the detection wavelength was 330 nm. Results: the chlorogenic acid transfer rate of standard decoctions was at a range of 31.0% to 62.4%, the extract rate was from 21.2% to 30.1%. The fingerprint similarities of Artemisia capillaris and its standard decoction were all greater than 0.96, and seven were identified, namely, neochlorogenic acid and chlorogenic acid. cryptochlorogenic acid, caffeic acid, 1, 3-dicaffeoylquinic acid, 3, 4-dicaffeoylquinic acid and 4, 5-dicaffeoylquinic acid. Conclusion: In this study, the preparation method for Artemisia capillaris decoction was standard, with high similarity in fingerprint, and showing high precision, stability and repeatability in fingerprint analysis. Thus, this study can provide a reference for the quality control of Artemisia capillaris standard decoction.

[Keywords] Artemisia capillaris; standard decoction; chlorogenic acid; fingerprint; quality evaluation

^{△ [}基金项目] 国家重点研发计划(2019YFC1711500)

^{* 「}**通信作者**] 马志国,副教授,研究方向:中药饮片质量研究;Tel:(020)85223784,E-mail:mzg79@ hotmail. com

茵陈为菊科植物滨蒿 Artemisia scoparza Waldst. et Kit. 或茵陈蒿 Artemisia capillaris Thunb. 的干燥地上部分,春季采收的习称"绵茵陈",秋季采割的称"花茵陈"。味苦、辛,性微寒,具有清利湿热、利胆退黄的功能,临床用于黄疸尿少、湿温暑湿、湿疮瘙痒^[1]。"绵茵陈"为临床常用的饮片规格,其主要含有绿原酸、咖啡酸为代表的有机酸类成分^[23],《中华人民共和国药典》2015 年版一部茵陈项下规定"绵茵陈"中含绿原酸不得少于 0.5%。茵陈在中医临床上多以复方入药,关于茵陈饮片标准汤剂研究尚未见文献报道。本实验以茵陈饮片为对象,按照《中药饮片标准汤剂研究策略》的相关要求^[4],进行茵陈饮片标准汤剂研究,以期为茵陈饮片标准汤剂研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪 (G7115A型DAD 检测器、G7129A型自动进样器和柱温箱、G7111A型在线真空脱气机); FA 2204B型万分之一电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司); EX225DZH十万分之一天平(美国奥豪斯仪器有限公司); KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为: PRF7051143、PRF7041803、15020603、PRF7061112、15042210、15062011,纯度均>98%);对照品咖啡酸(中国食品药品检定研究院,批号:110885-200102,纯度 \geq 98%);色谱纯乙腈(上海麦克林生化科技有限公司);实验用水为纯净水 [华润怡宝饮料(中国)有限公司];其他试剂均为分析纯。

本研究共收集市售 15 批茵陈饮片,所有饮片样品经暨南大学药学院马志国副教授鉴定为菊科植物茵陈 Artemisia capillaris Thunb. 的干燥地上部分,均为"绵茵陈"。15 批茵陈样品信息见表 1。

表 1 茵陈样品信息

	W- MINITERIA		
编号	生产厂家	批号	产地
YC-01	汕头市粤东药业有限公司	180810	陕西
YC-02	广州南北行中药饮片有限公司	180421	山东
YC-03	湖北聚瑞中药饮片有限公司	180301	山东
YC-04	广东时珍制药有限公司	181001	甘肃
YC-05	佛山市御嘉中药饮片有限公司	18Z0601	山东
YC-06	汕头市粤东药业有限公司	180809	陕西
YC-07	广东和翔制药有限公司	HX18H01	陕西
YC-08	佛山星联中药饮片有限公司	180401	河南
YC-09	广东汇群中药饮片股份有限公司	20180601	山东
YC-10	广州市华宇药业有限公司	171201	陕西
YC-11	安徽盛海堂中药饮片有限公司	2017120731	山西
YC-12	安国市聚药堂药业有限公司	1809003	山东
YC-13	安国市聚药堂药业有限公司	1808002	山东
YC-14	广州市诚济药业有限公司	181001	山西
YC-15	广州市华宇药业有限公司	180501	陕西

2 方法与结果

2.1 茵陈饮片中绿原酸的含量测定

依照《中华人民共和国药典》2015 年版一部茵 陈项下含量测定方法^[1],采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m),流动相乙腈-0.05%磷酸溶液 (10:90),柱温 30 $^{\circ}$ C,体积流量 1.0 mL·min ⁻¹;检测波长 327 nm 为色谱条件测定绿原酸的含量。结果有 12 批样品的绿原酸含量符合《中华人民共和国药典》限量标准要求,见表 2。另存在 3 批不合格样品。

2.2 茵陈饮片标准汤剂的制备

参考文献 [4],将 12 批茵陈样品制备成标准汤剂。取茵陈饮片 100 g,加 12 倍量水,浸泡 30 min,回流提取 30 min,趁热过滤,药渣再加 10 倍量水回流提取 20 min,趁热过滤,合并 2 次滤液,浓缩至500 mL,摇匀,得生药质量浓度为 0.2 g·mL⁻¹的茵陈饮片标准汤剂。

2.3 茵陈饮片标准汤剂中绿原酸含量测定

供试品溶液的制备:取茵陈饮片标准汤剂,摇匀,精密量取1 mL 置10 mL 量瓶中,加10% 甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

色谱条件、对照品溶液的制备及测定方法,参考《中华人民共和国药典》2015 年版一部茵陈项下含量测定方法^[1],测定 12 批茵陈饮片标准汤剂中绿原酸的含量,结果见表 2。

2.4 转移率、出膏率计算

以绿原酸为指标成分,按公式(1)计算转移率;取茵陈饮片标准汤剂适量,摇匀,精密吸取 50 mL置已恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,105 ℃烘 3 h,取出,置干燥器中冷却 30 min,称定质量,按公式(2)得出膏率。见表 2。

转移率 = 茵陈饮片标准汤剂中指标成分质量/ 饮片中指标成分质量×100% (1)

出膏率=干膏质量/(取样量×

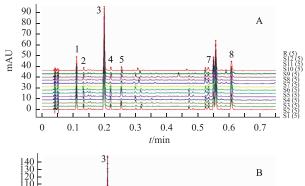
标准汤剂生药质量浓度)×100% (2)

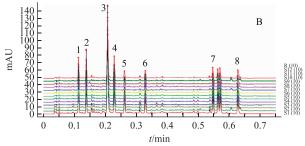
表 2 茵陈饮片及其标准汤剂的评价指标测定

				%
编号	饮片绿原酸质量分数	汤剂绿原酸质量分数	转移率	出膏率
YC-01	0. 72	0. 34	47. 6	26. 8
YC-02	0. 56	0.30	53. 2	22. 0
YC-03	1.04	0. 32	31.0	27. 9
YC-04	0. 90	0. 42	47. 2	31.5
YC-05	1. 04	0.43	41.4	30.0
YC-06	1. 02	0.38	37. 7	26. 9
YC-07	0.73	0. 28	38. 9	27. 4
YC-08	0. 74	0.46	62. 4	25. 2
YC-09	0. 67	0. 21	31.4	29. 4
YC-10	0. 75	0.40	53. 1	25. 6
YC-11	0. 57	0. 20	35. 1	25. 4
YC-12	0. 58	0. 33	55. 4	21.5

- 2.5 茵陈饮片及其标准汤剂指纹图谱的建立
- **2.5.1** 色谱条件 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈(B) 梯度洗脱(0 ~ 20 min, 7% ~ 15% B; 20 ~ 30 min, 15% ~ 20% B; 30 ~ 35 min, 20% B; 35 ~ 45 min, 20% ~ 25% B), 柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 330 nm,进样量 10 μL。
- 2.5.2 供试品溶液制备 茵陈饮片和标准汤剂的供试品溶液分别按《中华人民共和国药典》2015 年版一部茵陈项下和2.3 项下方法制备。
- 2.5.3 精密度试验 取同一批茵陈饮片标准汤剂 (YC-06)的供试品溶液,按 2.5.1 项下条件连续进样 6 次,以绿原酸(3 号峰) 为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 < 0.20%、<1.3%,表明仪器精密度良好。
- 2.5.4 稳定性试验 取同一茵陈饮片标准汤剂(YC-06)的供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、16 h 按 2.5.1 项下条件进样测定,以绿原酸为参照

- 峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 < 1.9%、 < 3.5%, 表明茵陈饮片标准 汤剂的供试品溶液在 16 h 内稳定性良好。
- 2.5.5 重复性试验 平行制备 6 份茵陈饮片标准汤剂(YC-06)的供试品溶液,按 2.5.1 项下条件进样分析,以绿原酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别 < 1.7%、 < 3.7%,表明该方法的重复性较好。
- 2.5.6 样品检测与分析 分别取 12 批茵陈饮片和饮片标准汤剂供试品溶液,按 2.5.1 项下色谱条件测定,记录 HPLC 图谱。将 12 批饮片和标准汤剂的供试品溶液的色谱图分别导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统"(2012A版)软件,采用中位数法,时间窗宽度 0.1,分别生成饮片和标准汤剂的指纹图谱(见图 1),并生成各自的对照指纹图谱(见图 2),并以对照指纹图谱为参照进行相似度评价。结果茵陈饮片指纹图谱中有 7 个共有峰,茵陈标准汤剂指纹图谱中有 8 个共有峰。12 批茵陈饮片及其标准汤剂与共有模式对照指纹图谱的相似度均高于 0.96(见表 3)。

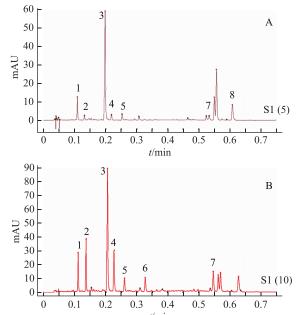




注: A. 茵陈饮片; B. 标准汤剂; 2. 新绿原酸; 3. 绿原酸; 4. 隐绿原酸; 5. 咖啡酸; 6.1, 3-二咖啡酰奎宁酸; 7.3, 4-二咖啡酰奎宁酸; 8.4, 5-二咖啡酰奎宁酸。

图 1 12 批茵陈饮片及其标准汤剂指纹图谱

分别按 2.5.1 项下色谱条件测定,通过保留时间结合紫外光谱图对供试品溶液各色谱峰进行指认,见图 2。结果茵陈饮片和标准汤剂的指纹图谱中共指认了7个共有峰,依次为新绿原酸(2号峰)、绿原酸(3号峰)、隐绿原酸(4号峰)、咖啡酸(5号峰)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(6号峰)、3,4-二咖啡酰奎宁酸(7号峰)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(8号峰)。1号峰未指认,通过查阅文献^[5-6],可能为1-咖啡酰奎宁酸,有待于进一步进行确认。



注: A. 茵陈饮片; B. 标准汤剂; 2. 新绿原酸; 3. 绿原酸; 4. 隐绿原酸; 5. 咖啡酸; 6.1, 3-二咖啡酰奎宁酸; 7.3, 4-二咖啡酰奎宁酸; 8.4, 5-二咖啡酰奎宁酸。

图 2 茵陈饮片和标准汤剂对照指纹图谱

表 3 12 批茵陈饮片及其标准汤剂相似度

	- 100 Ed 10: 0(1) 1 / 2/ 10:	· [199 71 2 [1977]
Aè 口	相似度	
编号	饮片	汤剂
YC-01	0. 996	0. 995
YC-02	0. 988	0. 986
YC-03	0. 992	0. 986
YC-04	0. 989	0. 995
YC-05	0. 995	0. 997
YC-06	0. 997	0. 993
YC-07	0. 985	0. 992
YC-08	0. 998	0. 998
YC-09	0. 990	0. 989
YC-10	0. 993	0. 993
YC-11	0. 977	0. 973
YC-12	0. 965	0. 986

2.5.8 饮片与标准汤剂共有峰的比较 通过比较 12 批茵陈饮片和标准汤剂的各共有峰的平均相对峰面积(见表 4),发现饮片与标准汤剂共有峰中,除了 8 号峰,其他共有峰的相对峰面积差别较大。以 3 号峰(绿原酸)为参比峰,进一步对比两者的对照指纹图谱发现,除了 8 号峰,其他共有峰在标准汤剂中的相对峰高均高于饮片。

表 4 12 批茵陈饮片及其标准汤剂共有峰的平均相对峰面积

峰号	饮片峰面积	标准汤剂峰面积
1	0. 153	0. 211
2(新绿原酸)	0. 029	0. 297
3(绿原酸)	1.000	1.000
4(隐绿原酸)	0.040	0.319
5(咖啡酸)	0. 055	0. 104
6(1, 3-二咖啡酰奎宁酸)	0. 041	0. 132
7(3, 4-二咖啡酰奎宁酸)	0.054	0. 186
8(4, 5-二咖啡酰奎宁酸)	0. 186	0. 196

3 讨论

3.1 样品来源

本实验共收集了来自 12 个厂家的茵陈饮片 15 批,分别产于陕西、山东、甘肃、河南、山西 5 个产地。其中 12 批样品中的绿原酸符合《中华人民共和国药典》限量标准要求,另存在 3 批不合格样品,编号为 YC-13、YC-14、YC-15。因此,选取合格的12 批茵陈饮片为研究对象进行茵陈饮片标准汤剂的研究。

3.2 供试品前处理及色谱条件优选

在茵陈饮片标准汤剂指纹图谱供试品溶液制备方法的优选过程中,以色谱峰峰形、分离度、分析时间等为指标,对标准汤剂稀释用溶剂的种类和稀释倍数进行了考察。结果,稀释用溶剂 10% 甲醇优于无水乙醇;稀释 10 倍为最佳稀释倍数。故选取10% 甲醇稀释倍数 10 倍为茵陈饮片标准汤剂的供试品溶液制备方法。

本实验对色谱条件进行了优选,采用乙腈-0.1%甲酸、甲醇-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液分别对流动相系统进行液相色谱分离效果的考察,结果使用乙腈-0.1%甲酸可以使色谱峰达到更好的分离效果。同时考察了不同波长(240、283、330 nm)下各活性成分的吸收情况,发现波长

330 nm 能兼顾大部分色谱峰的检测,最终确定 2.5.1 项下的色谱条件。

3.3 饮片与标准汤剂指纹图谱的比较

茵陈标准汤剂指纹图谱中含有8个共有峰,其 中7个共有峰亦为茵陈饮片指纹图谱的共有峰。通 过指认,这些共有峰均为有机酸类成分,且它们之 间多为同分异构体。文献报道[7],目前从植物中发 现的绿原酸类异构体主要是单咖啡酰奎宁酸类(绿原 酸、隐绿原酸和新绿原酸)和二咖啡酰奎宁酸类(1, 3-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二 咖啡酰奎宁酸);绿原酸是由咖啡酸与奎宁酸形成的 酯,其分子结构中有酯键、不饱和键及多元酚3个 不稳定部分,前者易发生水解,后两者易被氧化, 绿原酸可通过水解和分子内酯基迁移而发生异构化; 若从酯键处断裂,可产生奎宁酸和咖啡酰基的水解 产物,咖啡酰基断裂后在奎宁酸上的取代位置发生 重排,可产生绿原酸的同分异构体。针对茵陈饮片 和汤剂两者的指纹图谱的共有峰的相对峰高差异较 大这一现象,结合相关文献[89],推测在煎煮过程中 茵陈中的主要成分绿原酸(3号峰)和3,4-二咖啡酰 奎宁酸(7号峰)可能发生了水解和异构化反应而含 量降低, 使得相应的异构体: 新绿原酸(2 号峰)、 隐绿原酸(4号峰)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(6号峰)、 4,5-二咖啡酰奎宁酸(8号峰)含量增加,从而造成 两者的指纹图谱出现了差异。同时, 绿原酸的转移 率为31.0%~62.4%, 差异较大, 平均转移率仅为 44.5%, 也可能与煎煮过程中绿原酸的水解和转化 有关。因此,今后可对茵陈中有机酸类成分煎煮过程中的分解转化规律进行研究,指导其标准汤剂制备过程中工艺参数的优选。在茵陈标准汤剂质控指标方面也可增加新绿原酸、隐绿原酸等指标成分,可更好地控制质量。

参考文献

- [1] 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, 2015: 239-240.
- [2] 孙远南,冯健. 茵陈蒿的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国现代医生,2011,49(21):12-14.
- [3] 曹锦花. 茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J]. 沈阳 药科大学学报,2013,30(6):489-494.
- [4] 陈士林,刘安,李琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.
- [5] 罗芮,喻芳君,孙洁,等. HPLC 结合化学计量学的菌陈提取物指纹图谱研究[J]. 中药材,2017,40(12):2874-2878.
- [6] 欧阳文竹,尚展鹏,王文建,等. 茵陈提取物中化学成分的 UHPLC-LTQ-Orbitrap 快速鉴定[J]. 中国中药杂志, 2017,42(3);523-530.
- [7] 罗奇志,王有至,罗佳波. 绿原酸水解产物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. 药物分析杂志,2011,31(7):1345-1349.
- [8] 张倩,张加余,隋丞琳,等. HPLC-DAD-ESI-MS/MS 研究 金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律[J]. 中国 中药杂志,2012,37(23):3564-3568.
- [9] 陈芳平,李玉贤,孙德梅. β-环糊精对绿原酸稳定作用的研究[J]. 河南科学,1999,17(2):166-167.

(收稿日期: 2019-03-15 编辑: 王笑辉)

(上接第79页)

- [6] 马俊彦,杨汝德,敖利刚.植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展[J].现代食品科技,2007,23(7):71.
- [7] 王曼玲, 胡中立, 周明全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学报, 2005, 22(2): 215.
- [8] 宋涛,吴亚军,赵越. 减压干燥和冷冻干燥对六味地黄生物制剂中丹皮酚和没食子酸含量的影响[J]. 中成药,2009,31(12):1948.
- [9] 吴忠旺,吴一超,王丽,等.不同干燥方法对白芍中6种化学成分的影响与评价[J].天然产物研究与开发,2016,28(11):82.
- [10] 张天文,白娜仁,席图门.高效液相色谱法(HPLC)研究 不同干燥温度下阿拉坦五味丸中没食子酸含量[J].内 蒙古民族大学学报(自然科学版),2008,23(6);671.
- [11] 陈立军,张琼光,黄文芳,等. 地榆鞣质类成分提取物干燥方式的筛选与优化[J]. 中药材,2014,37(12):2297.
- [12] 王梦月,贾敏如,马逾英,等.不同入药部分及不同加工方法对白芷香豆素类成分含量的影响[J]. 中药材, 2004,27(11):826.
- [13] 王彦龙. 禹白芷的干燥及其总香豆素的提取纯化[D]. 洛阳:河南科技大学,2012.

(收稿日期: 2019-03-07 编辑: 戴玮)