

茵陈蒿汤中主要有效成份绿原酸的溶出规律研究

方文忠, 葛尔宁[△], 盛振华

(浙江中医药大学, 浙江杭州 310053)

摘要: 目的 探索茵陈蒿汤中主要有效成分绿原酸的煎出量及随煎药时间的变化规律。方法 UPLC 色谱法。结果 结果表明,绿原酸在 0.452~9.040ng 范围内与峰面积呈良好的线性关系。结论 文火煎煮 25.5min 左右,茵陈蒿汤中绿原酸的总含量达到最高。

关键词: 绿原酸; 茵陈蒿汤; UPLC

中图分类号: R284.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)02-0024-03

茵陈蒿汤为汉代张仲景所著《伤寒论》的经典名方,由茵陈、栀子、大黄组成。具有清热、利湿、退黄的功效,是临床上治疗黄疸的要药^[1]。现代研究表明它具有利胆、保肝、护胰、解热、抗炎、镇痛、抗菌、抗病毒等药理作用^[2-5]。本方茵陈为君药,是消退黄疸的主药。一般用量为 30~60g,《金匱要略汤证论治》提示宜先煎,使其有效成分能够更好的煎出,发挥最大的药效。但茵陈需要先煎多久或者至少需要煎煮多少时间,历代中医书籍都没有准确的说明。

本研究拟对茵陈蒿汤进行最佳煎煮时间评价,通过对茵陈蒿汤中有效成分绿原酸在汤药中的总含量检测来探索主要有效成分绿原酸的溶出规律。采用超高效液相色谱法(UPLC),以传统的煎药法,分时采样,再分别检测每一个时间点的含量^[6-7],不仅可以清楚地了解每一个时间点上汤药中有效成分的具体含量,而且可以动态地观察煎煮过程中绿原酸总量的变化规律。

有关采用高效液相色谱法检测茵陈蒿汤中的绿原酸含量国内外已有许多报道^[8-11],本文采用检测效果更佳,速度更快的超高效液相色谱法来动态检测茵陈蒿汤在煎煮过程中主要有效成分绿原酸的溶出量及变化规律,国内外未见有相关报道。

1 实验仪器与试剂

Waters AcquityTM Ultra performance LC 色谱仪(美国 WATERS 公司),AcquityTM TUV 检测器(美国 WATERS 公司),Empower 工作站(美国 WA-

TERS 公司),AB135-S 型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司),5702 型离心机(德国 EPPON-DORF 公司),Millipore 超纯水仪(美国 Milli-Q Century 公司)。

绿原酸(批号: MUST-12031401)对照品购于国家标准物质中心,供含量测定用。色谱纯乙腈,色谱甲醇,水为超纯水,分析纯磷酸。

实验药材购于浙江中医药大学饮片厂,经浙江中医药大学中药资源教研室宋捷民教授鉴定为茵陈(*Artemisia capillaris* Thumb)、大黄(*Rheum palmatum* L)、栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)。

2 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH RP18(2.1mm×100 mm,1.7μm);以乙腈-0.05%磷酸水溶液(11.5:88.5)作为流动相;检测波长:327nm;流速:0.2mL·min⁻¹;柱温:室温。色谱图见图 1。

3 方法与结果

3.1 对照品溶液制备

精密称取绿原酸对照品 2.26mg,置于 50mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得标准品储备液。取配置好的绿原酸溶液 1mL,置于 10mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得绿原酸标准品溶液,浓度为 4.52μg·mL⁻¹,放置冰箱中待用。

3.2 供试品溶液制备

称取茵陈 18g,栀子 9g,大黄 6g,平行 3 份,分别放入 3 只 1 000mL 的烧杯中,各加入 800mL 水,

收稿日期: 2013-01-11 修回日期: 2013-03-28

作者简介: 方文忠(1988~),男,浙江杭州人,硕士研究生。研究方向:仲景方剂。

[△]通信作者: 葛尔宁, Tel: (0571)86613589

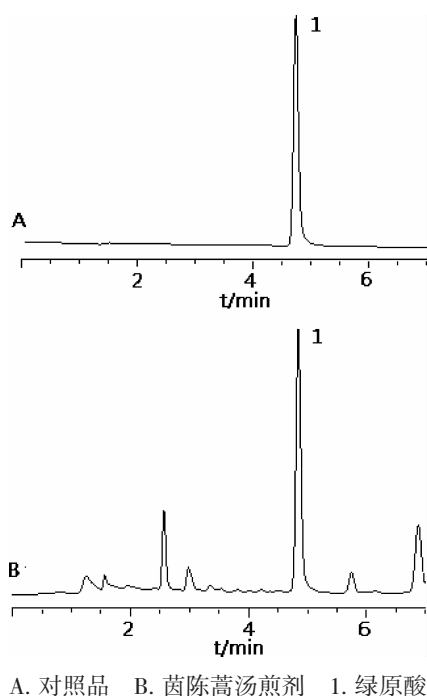


图1 色谱图

调节电压使3只电炉处于高温,置上述3只烧杯于电炉上武火至沸后调低电压改用文火,沸腾时,取第1个样,以后每间隔3.0min取样1次,每次取样1mL,共取样20组,对应混合后将3mL的药液样品平均移取至50mL的容量瓶中,用27mL甲醇稀释,贴上标签,摇匀待用,即得供试品溶液,备用。

3.3 精密度试验

分别取 $4.52\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸对照品溶液,连续进样6次,每次进样体积为 $0.5\mu\text{L}$ 。测定峰面积,考察色谱峰峰面积的一致性,RSD为0.249%,结果表明仪器的精密度良好。

3.4 线性关系考察

取 $4.52\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸对照品溶液,分别以下列方式进行进样,进样体积: $0.1\mu\text{L}$, $0.2\mu\text{L}$, $0.4\mu\text{L}$, $0.8\mu\text{L}$, $1.6\mu\text{L}$, $2.0\mu\text{L}$ 。每针重复进样3次,取平均值,以峰面积(y)对进样量(x)进行线性回归,得回归方程为: $y=16410.0343x+584.5371$, $r=0.9999$ 。结果表明,绿原酸在 $0.452\sim 9.04\text{ng}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

3.5 稳定性试验

取新制备的供试品溶液,在0,2,4,8,12,24h分别进样 $1\mu\text{L}$,测定峰面积,计算RSD,结果RSD为2.337%,表明供试品溶液在24h内稳定,可以满足实验要求。

3.6 重复性试验

精密称取同一批样品各6份,按“3.2”项下方法制备样品后,在“2”项色谱条件下,每个样品连续进样3次,每次进样体积为 $1\mu\text{L}$,测得峰面积取平均值,计算RSD,结果RSD为1.973%,表明该方法的重复性符合要求。

3.7 回收率试验

取绿原酸对照品稀释液适量,加入上述“3.2”项中制备的供试品溶液,同“3.2”项供试品提取处理方法处理后进样检测,结果表明:绿原酸的回收率为100.690%。该实验方法的回收率良好。

3.8 样品含量测定

分别吸取2mL稀释液,过 $0.22\mu\text{m}$ 有机微孔滤膜,取续滤液1mL至进样瓶中,在“2”项色谱条件下,每个样品进3针,每针进样体积为 $0.5\mu\text{L}$,测定绿原酸含量和3次平均值。以煎药时间为横坐标,汤药中绿原酸溶出总量为纵坐标,绘制趋势图(见图2),以趋势图为准,采用多次曲线拟合法求得模拟变化方程 $y=-0.014t^2+0.719t+25.61$,求导数。令 $dy/dt=0$,算得峰值时间为25.5min。由此得知在汤药中,绿原酸的含量在25.5min左右达到高峰,其后,随着煎药时间的延长,绿原酸的含量逐渐下降,至数分钟后趋向稳定。

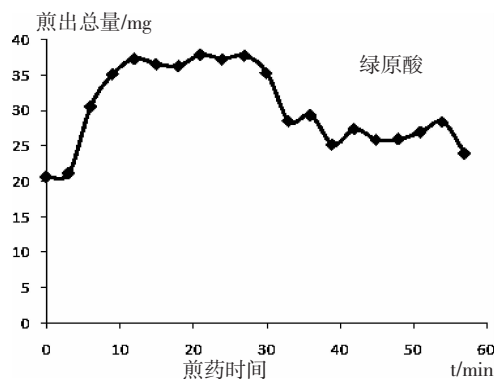


图2 茵陈蒿汤中绿原酸的总含量随煎药时间的变化规律

4 讨论

本实验曾考察了甲醇:0.05%磷酸水溶液,乙腈:0.05%磷酸水溶液等不同比例的流动相。发现当采用流动相乙腈:0.05%磷酸水溶液=11.5:88.5时绿原酸的分离效果良好且绿原酸峰型匀称。

如图2所示,在煎煮茵陈蒿汤时,溶液沸腾后的15min内,绿原酸的总含量随煎煮时间呈上升趋势而在15~30min后趋于稳定。此后,随着煎煮时间

的延长,总含量呈下降趋势,此现象可能与煎煮过程中绿原酸发生分解有关,故随着煎煮时间的延长绿原酸的含量逐渐减少。实验表明,汤药中的绿原酸含量在煎煮 25.5min 左右达到最大。这对于如何把握茵陈蒿汤的煎药时间、提高该汤药效、最大程度地发挥茵陈蒿汤的去黄疸作用,具有一定的临床指导意义。

本文采用超高效液相色谱法来检测茵陈蒿汤中的绿原酸含量,与普通高效液相色谱法相比,具有出峰时间快、峰型好、检测限更低等优势,可有效地作为茵陈及相关组方质量标准检测方法。

由图 2 可见,茵陈蒿汤中的君药茵陈,其主要有效成分绿原酸的总量在药汤煎煮 15~25min 左右即可达到相对高峰,由于本方中的另两味药栀子和大黄中的主要有效成分栀子苷和大黄素、大黄酸等都不是挥发性物质,所以本汤药并不需要让茵陈先煎,只需控制煎药时间在沸后 25min 左右即可。

参考文献

- [1] 闵春艳. 茵陈蒿汤合煎与分煎的成份比较研究[J]. 上海中医药杂志,2004,38(2):53.
- [2] 朱世敏,唐志鹏. 茵陈蒿汤护肝作用研究进展[J]. 上海中医药杂志,2008,42(2):73.

- [3] 王喜军. 茵陈蒿汤的生物药学研究 [J]. 中西医结合肝病杂志,1998,8 增刊(上):10-12.
- [4] 吴卫华,康桢,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发,2006,(18):691-694.
- [5] 朱振家,钱之玉,陆莉华,等. 栀子提取物京尼平苷和西红花苷利胆作用的研究[J]. 中草药,1999,30(11):841-843.
- [6] 葛尔宁,盛振华,朱飞叶,等. 后下中药饮片有效成分的煎出量及变化规律 [J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):42-45.
- [7] 葛尔宁. RP-HPLC 法测定葛根汤中葛根素的含量及变化 [J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(4):12.
- [8] 葛建华,窦志华,罗琳,等. HPLC 法测定茵陈蒿汤中绿原酸和栀子苷的含量[J]. 江苏中医药,2009,41(1):57.
- [9] 赵美瑾,许丽,王瑞红,等. 茵陈蒿汤质量标准中含量的研究[J]. 辽宁中医杂志,2004,34(7):973-974.
- [10] 韩晋,袁海龙,张倩,等. 方药配伍对茵陈蒿汤中绿原酸溶出率的影响[J]. 中国药理学杂志,2005,40(5):339.
- [11] Li K,Zhang Y,Cao Y,Shi Y. Determination of chlorogenic acid and mangiferin in Folium Pyrrosiae from different habitats and species by HPLC[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2010 35(16):2075-8.

(编辑:岳胜难)

To Research the Contents of Chlorogenic Acid in Yinchenhao Decoction and its Dissolve out Regularity

FANG Wen-zhong, GE Er-ning, SHENG Zhen-hua

(Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Hangzhou 310053)

ABSTRACT: **Objective** Exploring the contents of chlorogenic acid in Yinchenhao decoction and its regularity of variety decoction time. **Methods** UPLC method was used. **Results** The results show that in the range of 0.452~9.040ng, the linear was well between the content of chlorogenic acid and peak area. **Conclusion** The total concentrations of chlorogenic acid in Yinchenhao decoct medicinal herbs reach maximum at about 25.5 minutes after decocting medicinal herbs starts.

KEY WORDS: chlorogenic acid; Yinchenhao decoction; UPLC