

不同炮制工艺山绿茶药材特征图谱的比较

谢臻¹, 张龙², 陈勇^{1*}, 郑锡任¹, 李耀华¹, 农莉¹, 刘鼎¹, 李怡萱¹

(1. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530001; 2. 柳州市人民医院, 广西 柳州 545006)

[摘要] 目的:采用 HPLC 研究不同炮制工艺山绿茶药材特征图谱的变化,为科学评价和控制其质量提供有效的方法。方法:以 70% 乙醇为提取溶剂,采用加热回流的方法提取制备供试样品。以 Phenomenon C₁₈ 色谱柱为固定相,流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱,检测波长 330 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,进行 HPLC 特征图谱检测。以芦丁为对照品,检测不同炮制工艺山绿茶药材中芦丁含量变化。结果:不同炮制工艺药材中共确定 9 个主要共有特征峰。研究发现特征图谱中主要色谱峰发生了显著改变,与炮制前相比峰面积显著降低。表明山绿茶药材经炮制处理后,主要化学成分含量明显减少。结论:该 HPLC 特征图谱检测方法重复性、精密度良好,可用于山绿茶药材及其炮制品的质量控制。

[关键词] 山绿茶; 炮制工艺; 芦丁; 特征图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0056-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230056

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1521.003.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:21

[收稿日期] 20140609(008)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81060344);广西自然科学基金创新研究团队项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 谢臻,博士,副教授,硕士生导师,从事中药质量控制、复方配伍研究,E-mail:xie_zhen@126.com

[通讯作者] *陈勇,教授,硕士生导师,从事中药质量分析教学与科研工作,Tel:18978947922,E-mail:cy6381@163.com

- Fuzi-Gancao herb-pair decoction for its potential interaction mechanism investigation [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(1):128.
- [6] Thomas Y K Chan. Aconite poisoning following the percutaneous absorption of *Aconitum alkaloids* [J]. Forensic Sci Int, 2012, 223(1/3):25.
- [7] 王勇, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 草乌花及其煎煮液中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究[J]. 药学学报, 2003, 38(4):290.
- [8] Dezső C, Eva M W, István Z, et al. Qualitative and quantitative analysis of aconitine-type and lipo-alkaloids of *Aconitum carmichaelii* roots [J]. J Chromatogra A, 2009, 1216(11):2079.
- [9] Bisset N G. Arrow poisons in China part ii *Aconitum*-botany, chemistry, and pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 1981, 4(3):247.
- [10] 阳小勇, 唐荣平. 诃子化学成分的研究[J]. 西昌学院学报:自然科学版, 2012, 26(2):65.
- [11] Beate P, Samy K E D, William E H, et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities [J]. Phytochemistry, 2010, 71(10):1132.
- [12] 杨红霞, 杜玉枝, 肖远灿, 等. 诃子制草乌的炮制工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(6):572.
- [13] 满都拉, 富玉兰. 蒙药那如三味丸离子透入治疗三叉神经痛 17 例临床观察[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002, 5(5):287.
- [14] 越皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 附子不同配伍药对中生生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. 药学学报, 2007, 42(2):201.
- [15] Yue H, Pi Z F, Song F R, et al. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaelii* Debx. by HPLC/ESIMS/MSn [J]. Talanta, 2009, 77(3):1800.
- [16] 刘文龙, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 乌头类双酯型生物碱组分转化为单酯水解型及脂型生物碱组分的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(3):717.

[责任编辑 顾雪竹]

Comparative on Characteristic Chromatogram of Different Processing Methods of *Ilex hainanensis*

XIE Zhen¹, ZHANG Long², CHEN Yong^{1*}, ZHENG Xi-ren¹, LI Yao-hua¹, NONG Li¹, LIU Ding¹, LI Yi-xuan¹

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. The People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545006, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish a sensitive and specific HPLC method for quality control of *Ilex hainanensis*. **Method:** HPLC method was applied for quality assessment of *I. hainanensis*. HPLC analysis was performed on a phenomenon C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile (solvent B) and watercontaining 0.1% phosphoric acid (solvent A) at a constant flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. An increasing linear gradient of solvent B was used. The injection volume was 10 μL. The column temperature was set at 25 °C. The chromatograms were monitored at 330 nm. **Result:** In *I. hainanensis* obtained from different processing methods, there were 9 characteristic peaks identified. It was established from its prepared samples of *I. hainanensis*. **Conclusion:** The characteristic chromatogram of *I. hainanensis* with high specificity can be used to control its quality as well as the uniformity of processing products.

[Key words] *Ilex hainanensis*; processed products; rutin; characteristic chromatogram

山绿茶为冬青科植物海南冬青的干燥叶,主要分布于海南、广西、广东等地,为广西少数民族民间中草药,使用历史悠久,已收载于《广西中药材标准》(1990年版),具有清热解毒、平肝潜阳、活血化瘀的功效^[1-2],主要用于防治高血压症,降血脂、降胆固醇、冠心病、脑血管意外所致的偏瘫,风热感冒、口腔炎、慢性喉炎、妇科炎症等^[3-4]。

目前对山绿茶的研究主要集中在化学成分的提取分离与鉴定,药理作用研究等方面。有文献报道,山绿茶降压片能明显减少小鼠自发活动,有协同阈下剂量戊巴比妥钠诱发小鼠睡眠的趋势,并有明显的降压及降血脂作用。山绿茶醇提物对四氧嘧啶所致的糖尿病小鼠具有较好的降血糖作用^[5]。本文作者前期研究表明,山绿茶对实验性鹌鹑高脂血症有降血脂作用^[6],对麻醉猫正常血压有降压作用^[7];同时测定了山绿茶茎和叶中挥发油成分及不同炮制品中芦丁、绿原酸、总黄酮的含量^[8-9]。本实验对不同炮制品山绿茶药材特征图谱进行研究,为充分利用山绿茶药材资源、制定山绿茶的规范化炮制品和提高药材质量提供了理论依据。

1 材料

1.1 药材 山绿茶药材采自广西上林县,经广西中医药大学陈勇教授鉴定,符合《广西中药材标准》1990年版山绿茶项下药材品种,确定为冬青科植物

海南冬青 *Ilex hainanensis* 的鲜叶。炮制工艺包括清炒炮制(a)、传统炮制(b)、阴干(c)、烘烤炮制、微波炮制;传统炮制方法为将采摘的山绿茶药材鲜叶尽快用热锅(260~280 °C)翻炒,杀青,接着在揉搓台上用手揉搓,然后复炒2~3次,至叶色呈暗绿色,带有银灰绿色,略有光泽为度,取出,放置烘房中烘干,取出,放凉,即得山绿茶药材传统炮制品。烘烤炮制方法包括180 °C烘烤30 min(d),200 °C烘烤30 min(e),200 °C烘烤40 min(f),220 °C烘烤20 min(g),220 °C烘烤30 min(h),220 °C烘烤40 min(i);微波炮制方法包括60 g药材微波11 min(j),100 g药材微波11 min(k),80 g药材微波9 min(l),80 g药材微波11 min(m),80 g药材微波13 min(n)。

山绿茶对照药材由中国食品药品检定研究院提供(批号1247-0301),芦丁对照品(批号111231,供含量测定用,纯度大于98%,上海融禾医药科技发展有限公司提供)。

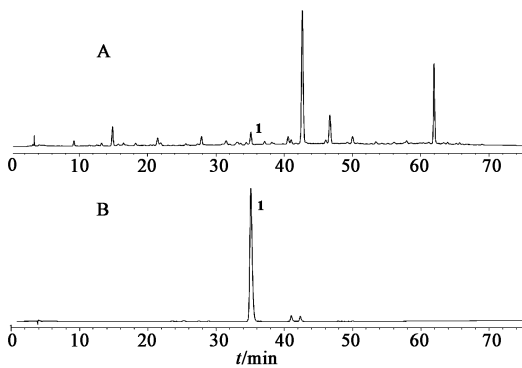
1.2 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯(Fisher公司),其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 仪器 1260系列高效液相色谱仪及1260型色谱工作站(美国安捷伦科技公司),BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯),AE100S型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),LG16-WA型高速微量离心机(北京京立离心机有限公

司), Millipore Simplicity-185 型超纯水器(美国密理博公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenon C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B), 洗脱程序(0 ~ 20 min, 9% ~ 15% A; 20 ~ 50 min, 15% ~ 25% A; 50 ~ 75 min, 25% ~ 40% A), 检测波长 330 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。理论塔板数以芦丁峰计不低于 10 000。样品及对照品色谱图见图 1。



A. 对照药材; B. 对照品; 1. 芦丁

图 1 山绿茶对照药材 HPLC

2.2 供试品溶液的制备 精密称取山绿茶对照药材干燥粉末(过 40 目筛) 2.0 g, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 40 mL, 称定质量, 水浴加热, 回流提取 30 min, 放冷, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液约 2 mL, 离心 10 min (1 万 r · min⁻¹), 取上清液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 取芦丁对照品 5.0 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 得浓对照品溶液。精密吸取浓对照品溶液 5.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇至刻度, 摇匀, 得 0.250 0 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

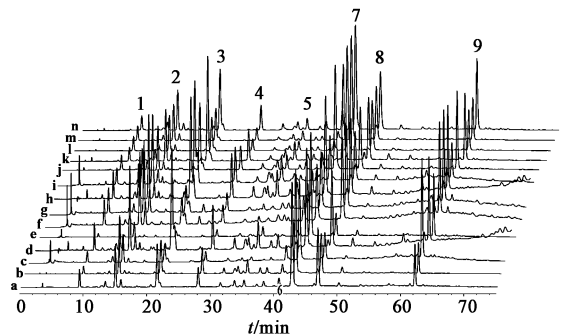
2.4 精密度试验 取阴干炮制山绿茶药材, 按供试品溶液制备方法制备, 在上述色谱条件下记录特征图谱。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间 RSD 在 0.04% ~ 1%, 各峰相对峰面积 RSD 在 0.2% ~ 2%, 表明仪器的精密度良好。

2.5 重复性试验 精密称取阴干炮制山绿茶药材 6 份, 按供试品溶液制备方法制备, 在上述色谱条件下测定。结果表明 6 份样品的 HPLC 特征图谱中各色谱峰的相对保留时间 RSD 在 0.05% ~ 0.4%, 各峰相对峰面积 RSD 在 0.2% ~ 4%。

2.6 稳定性试验 取阴干炮制山绿茶药材, 按供试

品溶液制备方法制备, 在上述色谱条件下, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 检测特征图谱, 结果表明, 各色谱峰的相对保留时间 RSD 在 0.09% ~ 0.9%, 各峰相对峰面积 RSD 在 0.4% ~ 2%。

2.7 不同炮制品种山绿茶药材特征图谱的采集 取不同炮制工艺所得山绿茶药材粉末适量(已扣除药材水分, 相当于新鲜药材 5.0 g) 各 1 份, 精密称定, 共 14 份, 按 2.2 项下供试品制备方法制备山绿茶药材供试品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件下依次进行测定, 记录 14 批次山绿茶 HPLC 色谱图, 确定了 11 个共有特征色谱峰, 其中 5 号峰为对照品峰。各样品色谱图见图 2。



a ~ n. 炮制品

图 2 山绿茶不同炮制品种的 HPLC 叠加特征图谱

2.8 山绿茶药材不同炮制品中芦丁含量测定 精密吸取经稀释后不同浓度的芦丁对照品溶液 10 μL, 共 6 份, 分别注入高效液相色谱仪测定, 以对照品进样量(μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。芦丁标准曲线 $Y = 1\,258X - 1.406$ ($r = 1.000\,0$)。不同炮制品山绿茶药材芦丁含量(已扣除药材水分) 结果见表 1。

3 讨论

3.1 提取方法的考察 考察了超声、回流、浸渍 3 种提取方法, 料液比以及提取时间, 通过比较各项数据以及信号峰的多少, 选定回流提取方法, 得到的图谱最佳。

3.2 提取溶剂的选择 分别采用了甲醇、乙醇对山绿茶药材进行提取制备并进行 HPLC 分析, 结果表明以甲醇和乙醇为提取溶剂, 对山绿茶药材主要成分的提取效果相似, 分离效果均比较理想, 但是乙醇比甲醇安全、经济, 故选择乙醇为提取溶剂。考察了不同体积分数乙醇的提取效果, 结果表明, 以 50% 乙醇为提取溶剂, 得到的图谱最佳。

3.3 不同炮制方法山绿茶药材 HPLC 特征图谱比较 考察不同炮制方法山绿茶药材 HPLC 特征图

表1 不同炮制方法山绿茶药材芦丁含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

炮制方法	芦丁
200 ℃烘烤 30 min	0.92
80 g 药材微波 11 min	1.36
清炒	0.96
传统	4.49
阴干	1.53
180 ℃烘烤 30 min	0.40
200 ℃烘烤 30 min	0.92
220 ℃烘烤 20 min	1.38
220 ℃烘烤 30 min	0.87
220 ℃烘烤 40 min	0.26
60 g 药材微波 11 min	1.93
80 g 药材微波 11 min	1.66
100 g 药材微波 11 min	2.17
80 g 药材微波 9 min	2.08
80 g 药材微波 11 min	1.65
80 g 药材微波 13 min	1.78

谱,共确定了9个共有特征峰。通过比较,发现各组间,特征图谱差异较大,各组间主要成分含量也存在较大差异。烘烤炮制药材和微波炮制药材中色谱峰数目较多;清炒炮制药材、传统炮制药材和阴干炮制药材色谱峰数目较少。说明药材经烘烤和微波炮制之后化学成分发生了变化。

3.4 不同烘烤工艺山绿茶药材 HPLC 特征图谱比较 考察不同烘烤工艺山绿茶药材 HPLC 特征图谱,共确定了9个共有特征峰。通过比较,发现各组间,特征图谱差异很小,基本无变化,但各组间主要成分含量存在较大差异。不同烘烤温度药材中,芦丁含量随温度变化呈抛物线变化;不同烘烤时间药材中,芦丁含量随时间增加而减少。所以表明,不同烘烤温度及时间对山绿茶药材主要成分影响较大。

3.5 不同微波工艺山绿茶药材 HPLC 特征图谱比较 考察不同微波工艺山绿茶药材 HPLC 特征图

谱,共确定了9个共有特征峰。通过比较,发现各组间,特征图谱差异很小,基本无变化,但各组间主要成分含量存在较大差异。同一微波时间(11 min)不同质量药材中,芦丁含量随温度变化呈现先减后增的趋势;同一质量(80 g)药材不同微波时间,芦丁含量随时间增加先减少后趋于平稳。所以表明,不同微波时间及不同药材质量对山绿茶药材主要成分影响较大。

4 结论

通过本实验研究,结果显示山绿茶药材经过不同炮制方法处理后,特征图谱发生了明显的变化,表明不同炮制工艺使山绿茶主要化学成分发生了显著改变,这些化学成分的变化可能就是山绿茶及其炮制品种发挥不同临床功效的物质基础和机制所在,此结果为山绿茶的炮制及其临床应用提供了一定的实验依据。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:137.
- [2] 季宇彬. 中草药有效成分药理与应用[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995:60.
- [3] 郑学忠. 山绿茶的原植物调查及生物鉴定[J]. 中草药,1984,15(4):27.
- [4] 赵宾. 山绿茶降压片在治疗高血压良性肾动脉硬化症中的应用[J]. 中国现代药物应用,2008(7):26.
- [5] 李春英. 绿茶提取物的降血糖研究[D]. 杭州:浙江大学,2014.
- [6] 李萍,谢金鲜,陈勇. 山绿茶不同炮制品对实验性高脂血症鹌鹑血脂的影响[J]. 中药材,2008,31(11):1627.
- [7] 李萍,谢金鲜,陈勇. 山绿茶不同炮制品降压作用的实验研究[J]. 中药材,2008,31(9):1309.
- [8] 陈勇,谢臻,刘婧. HPLC法测定山绿茶不同炮制品中绿原酸和芦丁的含量[J]. 广西中医药,2007,30(5):58.
- [9] 陈勇,谢臻,李立,等. 山绿茶药材质量标准的研究. 中华中医药杂志,2011,26(7):1606.

[责任编辑 顾雪竹]