

李超,黄显章,张超云,等.不同产地及不同年份艾叶中绿原酸含量差异分析[J].江苏农业科学,2019,47(22):251-254.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.059

不同产地及不同年份艾叶中绿原酸含量差异分析

李超¹,黄显章¹,张超云¹,王广飞²,何玉龙¹,敖亚雯¹

(1. 南阳理工学院/河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室,河南南阳 473000; 2. 安国市康普泰中药材销售有限责任公司,河北安国 071200)

摘要:采用响应面法优化艾叶绿原酸提取工艺,分析河南汤阴、河北保定、河南南阳、浙江宁波、湖北蕲春 5 个不同产地及 2013—2017 年河南汤阴艾叶中绿原酸含量的差异。结果表明,艾叶绿原酸最佳提取工艺为乙醇体积分数 37%、提取时间 60 min、料液比 1 g : 15 mL;河北保定艾叶中绿原酸含量相对最高,为 10.65%,显著高于河南汤阴、河南南阳、浙江宁波等产区($P < 0.05$);2017 年河南汤阴艾叶中的绿原酸含量相对最高,为 10.22%,显著高于 2013—2016 年的。5 个艾叶不同主产区及 2013—2017 年这 5 个不同年份艾叶中的绿原酸含量差异相对较大,在临床使用中应区别对待,以保证用药的安全性和有效性。

关键词:艾叶;响应面法;绿原酸;产地;年份;提取工艺

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)22-0251-04

艾叶为菊科植物艾(*Artemisia argyi* Lévl. et Vant.)的干燥叶,正式作为药物最早记载于我国梁朝陶弘景的《名医别录》,现收载于各版《中国药典》中^[1-2]。艾叶性辛、温,味苦,归肝、脾、肾经,具有温经止血、散寒止痛、理气安胎等功效,距今已有 2 000 余年的使用历史^[3-6]。在临床应用中,艾叶内服温经止血、散寒止痛,外用杀虫止痒、清热除湿,常用于治疗胎漏下血、少腹冷痛、经寒不调等症状,是止血的要药之一,为中医妇科常用药物^[7-8]。随着对艾叶研究的逐渐深入,其制品应用范围不断扩大,艾叶作为灸法的主体材料,是历代医学家们多次临床实践的选择,以艾叶为主开发的艾附暖宫丸、安胎固本膏等复方中成药也在临床中被广泛应用。

近年来,国内外学者对艾叶的研究主要集中在化学成分、药理作用及临床疗效等方面^[9-13],对不同产地、不同年份间的艾叶品质差异鲜见研究报道。本试验在利用响应面法优化艾叶绿原酸最佳提取工艺的基础上,分析湖北蕲春、浙江宁波、河南汤阴、河北保定、河南南阳 5 个不同产地及 2013—2017 年河南汤阴艾叶中的绿原酸含量差异,以期对艾叶的质量评价提供试验依据和有益参考。

收稿日期:2018-07-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:81803661);河南省科技开放合作项目(编号:172106000053)。

作者简介:李超(1987—),男,河南南阳人,博士,讲师,从事中药资源学研究。E-mail:lichaoetm@126.com。

通信作者:黄显章,博士,副教授,从事中药品质评价研究。E-mail:nylgzyx@126.com。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

721-100 型紫外可见光光度计、SHB-DII 型循环真空抽滤系统、粉碎打粉机,上海仪电分析仪器有限公司生产;DKB-507 型恒温干燥烘箱,天津市兰博实验仪器设备有限公司生产;DS-2120QT 型超声波清洗器,上海生析超声仪器有限公司生产;Thermo fisher 移液器,赛默飞世尔科技生产;AR-1106 型电子分析天平,德国赛多利斯集团生产;4 号药典筛,湖南通用药筛厂生产。无水乙醇,批号 170506,南京国硕医药科技有限公司生产;绿原酸标准品,北京振翔科技有限公司生产。

1.2 样品采集

浙江宁波、河北保定、河南汤阴、河南南阳、湖北蕲春 5 个产地艾叶样品,分别于 2017 年端午节前后采集;2013—2017 年 5 个不同仓储年限艾叶样品,分别于当年端午节前后采集于河南省汤阴县伏道镇。艾叶样品采集时按照“Z”形进行,采集样品经南阳理工学院黄显章副教授鉴定为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant.。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制 精确称取干燥至恒质量的绿原酸标准品 5.50 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加乙醇溶液溶解;定容,摇匀,得绿原酸对照品溶液,质量浓度为 0.055 mg/mL;精确吸取绿原酸对照品溶液 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,加入乙醇定容,混合均匀,采用紫外分光光度计测定波长为 327 nm 处的吸光度;以质量浓度为横坐

[23] 孟智勇,张保占,马浩波,等.密集烘烤转火时间对烤烟中性致香物质和评吸质量的影响[J].河南农业科学,2010,39(9):31-34.

[24] 韩富根.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2010.

[25] 宫长荣,王能如,汪耀富,等.烟叶烘烤原理[M].北京:科学出版社,1995.

[26] 宫长荣,赵振山,陈江华,等.烤烟三段式烘烤及配套技术[M].北京:科学技术文献出版社,1996.

[27] 王梅,贺帆,孙永军,等.基于灰色统计的密集烘烤工艺评价模型[J].河南农业大学学报,2012,46(3):247-251.

[28] 孟智勇,张保占,马浩波,等.密集烤房烘烤技术参数的测定与分析[J].河南农业科学,2011,40(4):156-160.

标(X),吸光度为纵坐标(Y),得到标准曲线方程为 $Y=8.225\ 9X+0.005\ 5(r^2=0.998\ 8)$,说明绿原酸质量浓度与吸光度存在良好的线性关系。

1.3.2 艾叶绿原酸提取单因素试验 在相对固定乙醇浓度为40%、超声时间为60 min、料液比为1 g : 15 mL、提取温度60 ℃其中3个因子的条件下,分别考察不同乙醇体积分数、超声时间、料液比、提取温度对艾叶绿原酸提取率的影响。乙醇体积分数设6个梯度,分别为20%、30%、40%、50%、60%、70%;超声时间设5个梯度,分别为30、60、90、120、180 min;料液比设5个梯度,分别为1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 30(g : mL);提取温度设5个梯度,分别为20、40、60、80、99 ℃。

1.3.3 响应面法优化艾叶绿原酸提取工艺 在单因素试验基础上,按照Box - Behnken 中心组合原理,以乙醇体积分数、超声时间、料液比为考察因素,采用3因素3水平响应面分析法(-1,0,1)进行试验设计,详见表1、表2,以测定艾叶中绿原酸含量,优化艾叶绿原酸提取工艺。

表1 响应面分析试验因素水平

水平	因素		
	X_1 :乙醇体积分数 (%)	X_2 :提取时间 (min)	X_3 :料液比 (g : mL)
-1	20	30	1 : 10
0	40	60	1 : 15
1	60	90	1 : 20

1.3.4 不同产地、不同年份艾叶中绿原酸含量的测定 将采集的不同产地、不同年份艾叶样品去杂、清洗,自然干燥,烘干,粉碎过筛,备用;采取响应面法得到的最佳提取工艺(乙

醇体积分数37%、料液比为1 g : 15 mL、提取时间60 min)提取艾叶绿原酸,取适量待测液测定波长为327 nm处的吸光度,计算艾叶中绿原酸含量及其提取率。每个样品重复3次。

1.4 统计分析

采用Excel 2010 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 艾叶绿原酸提取的单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对艾叶绿原酸提取率的影响 由图1可知,随乙醇体积分数的增加,艾叶中绿原酸提取率呈先升后降趋势,乙醇体积分数为40%时对艾叶绿原酸的提取率相对最高,为9.07%,这说明在一定范围内,乙醇体积分数的增加有利于艾叶中绿原酸的提取,但其持续升高可能影响溶剂的介电性能及极性,反而会使绿原酸提取率下降。因此,艾叶绿原酸提取使用的乙醇体积分数以40%为宜。

2.1.2 超声时间对艾叶绿原酸提取率的影响 由图2可知,随超声提取时间的延长,艾叶中绿原酸提取率呈先升后降趋势,提取时间为60 min 时对艾叶绿原酸的提取率相对最高,为8.89%,这说明超声时间过少,会导致对绿原酸的提取不充分,而提取时间过长,则可能会导致水温升高或部分酚酸类成分分解而影响对绿原酸的提取。因此,艾叶绿原酸提取的最佳时间以60 min 为宜。

2.1.3 料液比对艾叶绿原酸提取率的影响 由图3可知,随料液比的下降,艾叶中绿原酸提取率呈先升后降趋势,料液比为1 g : 15 mL 时对艾叶绿原酸的提取率相对最高,为9.25%。因此,艾叶绿原酸提取的料液比以1 g : 15 mL 为宜。

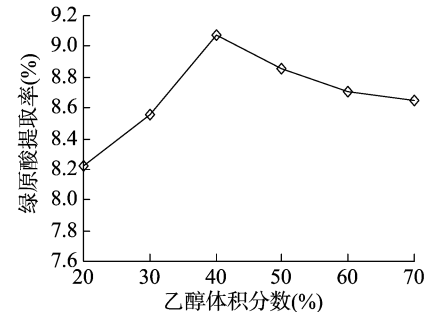


图1 不同乙醇体积分数对艾叶绿原酸提取率的影响

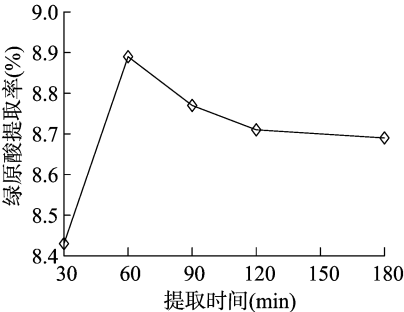


图2 不同提取时间对艾叶绿原酸提取率的影响

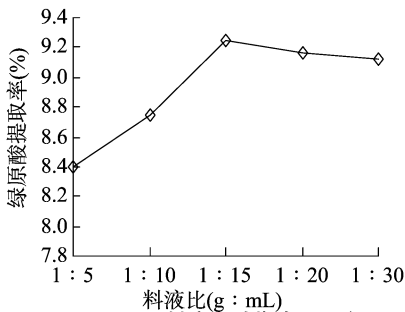


图3 不同料液比对艾叶绿原酸提取率的影响

2.1.4 提取温度对艾叶绿原酸提取率的影响 由图4可知,随提取温度的升高,艾叶绿原酸提取率呈先升后降再升趋势,其中以提取温度为40 ℃时对艾叶绿原酸的提取率相对最高,为9.04%。因此,考虑到实际操作需要和节能减排,艾叶绿原酸的提取温度以40 ℃为宜,响应面分析中也以此温度作为提取温度。

2.2 响应面法优化艾叶绿原酸提取工艺

由表2可见,提取条件为乙醇体积分数40%、料液比1 g : 15 mL、提取时间60 min 时,艾叶中绿原酸提取率相对最高,为9.04%。试验结果(表2、图5)经回归统计,得回归方程为: $Y=3.517\ 5+0.074X_1+0.308\ 33X_2+0.415\ 5X_3-2.666\ 67\times10^{-4}X_1X_2+1.05\times10^{-3}X_1X_3+2.133\ 33\times10^{-3}X_2X_3-10^{-3}X_1^2-4.444\ 44\times10^{-4}X_2^2-0.019\ 2\times X_3^2$,确定

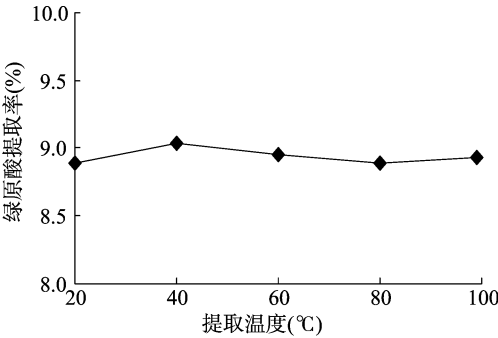


图4 不同提取温度对艾叶绿原酸提取率的影响

系数(R^2)为0.904 7,说明艾叶绿原酸的试验值与预测值间有较好的一致性。由表3可见,试验因素中,一次项 X_1 、二次

表 2 响应面法中不同提取条件对艾叶绿原酸提取率的影响

编号	X_1 :乙醇体积分数(%)	X_2 :提取时间(min)	X_3 :料液比(g:mL)	提取率(%)
1	20	90	1:15	8.40
2	40	60	1:15	8.98
3	40	60	1:15	8.86
4	60	60	1:20	8.10
5	40	30	1:10	8.16
6	60	60	1:10	8.01
7	40	60	1:15	9.04
8	40	90	1:10	7.67
9	60	30	1:15	8.22
10	20	60	1:10	8.25
11	40	60	1:15	8.89
12	20	30	1:15	8.37
13	40	30	1:20	7.83
14	20	60	1:20	7.92
15	40	60	1:15	8.98
16	60	90	1:15	7.61
17	40	90	1:20	8.62

项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、交互项 X_2X_3 对回归模型有极显著影响 ($P < 0.01$),交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 对回归模型有显著影响 ($P < 0.05$),这说明试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系;回归模型 F 值为 78.33,达极显著水平;失拟度 P 值为 0.19,大于 0.05,模型失拟度不显著。通过降维及解析回归模型,得到艾叶绿原酸最佳工艺条件为乙醇体积分数 36.96%、料液比为 1 g : 15.16 mL、提取时间为 59.98 min。考虑到实际操作需要,将艾叶绿原酸最佳提取条件工艺修正为乙醇体积分数 37%、料液比为 1 g : 15 mL、提取时间为 60 min,此条件下实际测得艾叶绿原酸提取率为 10.89%,而回归模型预测提取率理论值为 12.75%,实际测定值比理论预测值低 1.86 百分点,说明该模型有较好的预测能力。

2.3 不同产地及不同年份艾叶样品中绿原酸含量的测定

2.3.1 不同产地艾叶绿原酸含量差异 由表 4 可知,不同产地艾叶中绿原酸含量差异较大,河北保定的艾叶绿原酸含量相对最高,平均含量达到 10.65%,稍高于湖北蕲春,显著高于河南南阳、河南汤阴、浙江宁波等产区的艾叶 ($P < 0.05$);河南汤阴的艾叶绿原酸含量居中,平均含量为 10.22%,显著高于浙江宁波、河南南阳产区的艾叶;浙江宁波、河南南阳的

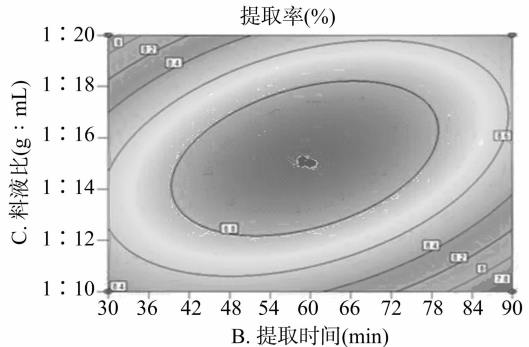
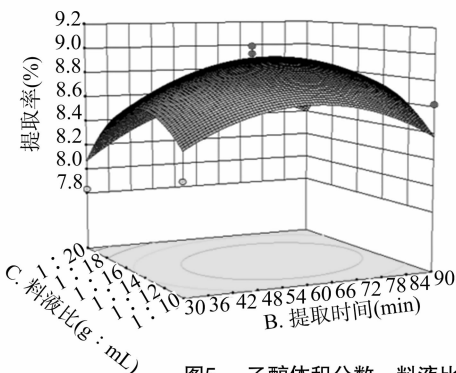
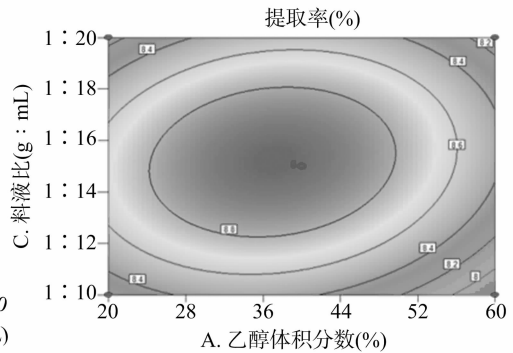
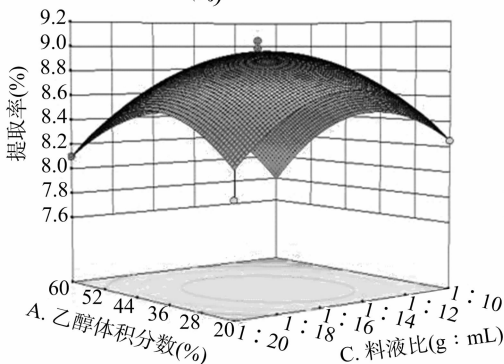
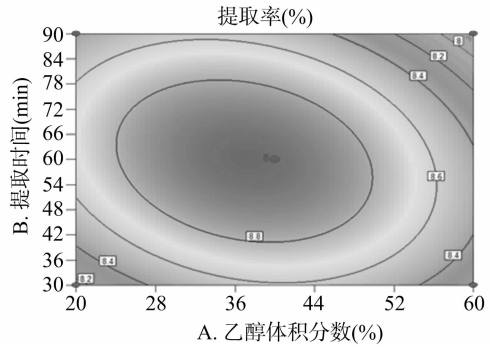
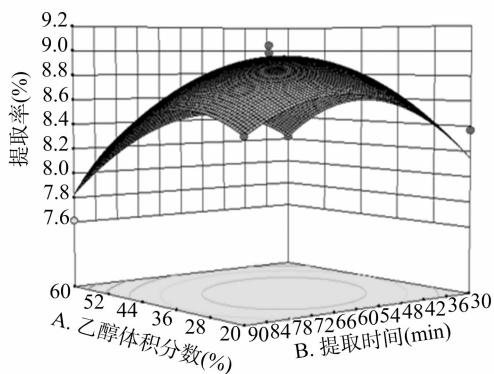


图5 乙醇体积分数、料液比、提取时间三因素交互作用响应面与等值线

表 3 回归模型显著性检验结果

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性检验
X_1	13.31	1	13.31	32.84	**
X_2	0.98	1	0.98	1.02	
X_3	1.82	1	1.82	2.41	
X_1X_2	10.67	1	0.10	22.33	*
X_1X_3	4.47	1	4.47	11.08	*
X_2X_3	41.21	1	41.21	49.32	**
X_1^1	67.64	1	67.64	75.33	**
X_2^2	67.09	1	67.09	75.98	**
X_3^3	97.28	1	97.28	122.07	**
模型	330.16	9	0.37	78.33	**
残差	31.22	7	0.044		
失拟误差	29.73	3	0.095	17.66	0.19

注: **、* 分别表示相关数据项对模型影响极显著 ($P < 0.01$)、显著 ($P < 0.05$)。

表 4 不同产地艾叶绿原酸含量差异

产地	绿原酸含量 (%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值 ± 标准差
河南南阳	8.01	8.50	8.44	8.32 ± 0.27c
河北保定	10.85	10.69	10.42	10.65 ± 0.22a
河南汤阴	10.48	10.29	9.89	10.22 ± 0.30b
浙江宁波	8.81	8.72	8.53	8.69 ± 0.14c
湖北蕲春	10.45	10.60	10.51	10.52 ± 0.08ab

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。表 5 同。

艾叶绿原酸含量相对较低,其含量分别为 8.69%、8.32%。
2.3.2 不同年份艾叶绿原酸含量差异 由表 5 可知,随贮藏年份的延长,艾叶中绿原酸含量整体呈下降趋势;2017 年的河南汤阴艾叶绿原酸含量相对最高,平均含量为 10.22%,显著高于其他年份 ($P < 0.05$);2016、2015 年的艾叶绿原酸平均含量分别为 8.37%、8.00%,相互间差异不显著 ($P > 0.05$),显著高于 2013、2014 年的艾叶;2013、2014 年的艾叶绿原酸含量相对较低,分别为 7.19%、6.97%。

表 5 不同年份河南汤阴艾叶绿原酸含量差异

年份	绿原酸含量 (%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值 ± 标准差
2013	6.88	7.31	7.37	7.19 ± 0.27c
2014	6.88	7.01	7.10	6.97 ± 0.11c
2015	7.83	8.19	7.98	8.00 ± 0.18b
2016	8.07	8.62	8.43	8.37 ± 0.27b
2017	9.67	10.70	10.37	10.22 ± 0.52a

3 结论与讨论

随着艾产业的快速持续发展,艾叶已成为中药和食品领域的研究热点,国内外学者多集中于化学成分、药理作用及临床疗效等方面的研究,但对不同产地艾叶的有效成分含量是否存在差异、不同仓储年限对艾叶品质是否有影响等问题却少有研究。河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室在前期研究的基础上,利用响应面法优化艾叶绿原酸最佳提取工艺,

并分析湖北蕲春、浙江宁波、河南汤阴、河北保定、河南南阳 5 个不同产地及河南汤阴 2013—2017 年 5 个不同年份艾叶绿原酸含量的差异,结果表明,艾叶绿原酸最佳提取工艺条件乙醇体积分数 36.96%、料液比为 1 g : 15.16 mL、提取时间为 59.98 min,考虑到实际操作需要,将艾叶绿原酸最佳提取工艺条件修正为乙醇体积分数 37%、料液比为 1 g : 15 mL、提取时间为 60 min;不同产地艾叶中绿原酸含量差异较大,其中河北保定的艾叶绿原酸含量相对最高,达到 10.65%,稍高于湖北蕲春,显著高于河南南阳、河南汤阴、浙江宁波等产区的艾叶 ($P < 0.05$),河南汤阴的艾叶绿原酸含量居中,为 10.22%,显著高于浙江宁波、河南南阳产区的艾叶;不同年份艾叶中的绿原酸含量差异也较大,2017 年河南汤阴的艾叶绿原酸含量相对最高,为 10.22%,显著高于其他年份,2013、2014 年的艾叶绿原酸含量相对较低,分别为 7.19%、6.97%,显著低于其他年份的。

不同产地及不同年份的艾叶绿原酸成分含量存在明显差异,这就要求在制剂生产和临床应用中须区别对待,以确保其安全与有效;随贮藏时间的延长,艾叶中的绿原酸含量整体呈逐渐降低的趋势,与传统认为的“陈艾质量较好”存在一定出入,这可能是由于陈艾主要用于艾灸,其质量评价体系主要考虑燃烧热值,而在临床应用中未考虑到艾叶中有效成分的变化,这须更为深入地探讨研究。

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.
[2] 梅全喜. 艾叶的研究与应用[M]. 北京:中国中医药出版社,2013.
[3] 王惠君,王文泉,卢 诚,等. 艾叶研究进展概述[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):15-19.
[4] 张 元,康利平,郭兰萍,等. 艾叶的本草考证和应用研究进展[J]. 上海针灸杂志,2017,36(3):245-255.
[5] 于 晓. 艾叶化学成分及一测多评分析方法的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2016.
[6] 曹 玲,于 丹,崔 磊,等. 艾叶的化学成分、药理作用及产品开发研究进展[J]. 药物评价研究,2018,41(5):918-923.
[7] 顾 衢,余晓玲,张 毅. 艾叶的现代研究及临床新用[J]. 中医临床研究,2016,8(22):58-60.
[8] 范恺磊,蔡 皓,刘 晓,等. 香附与艾叶对治疗原发性痛经作用机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2017(1):139-143.
[9] 郭 龙,焦 倩,张 丹,等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的艾叶药材质量控制研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):977-984.
[10] 刘红杰,李天昊,詹 莎,等. 艾叶挥发油致小鼠急性肝毒性作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2017,22(3):248-252.
[11] 黄显章,康利平,高 丽,等. 基于古代本草记载的不同产地艾叶中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3504-3508.
[12] 施高翔,汪天明,吴生兵,等. 艾叶挥发油诱导白念珠菌凋亡[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3572-3577.
[13] 王珊珊,成绍武,宋祯彦,等. 艾叶提取物激活凝血因子Ⅺ发挥止血活血功能[J]. 中华中医药学刊,2017(10):2488-2492.