· 论著 ·

环境因素对蕲艾叶中7种活性成分含量的影响

蒲锐[1], 万定荣[1], 陈普生[2], 夏恒建[2], 武娟[1], 郭双喜[2]

（[1]中南民族大学药学院，武汉 430074；[2]李时珍医药集团有限公司，湖北蕲春 435300）

摘要：目的：建立同时测定艾叶中多种活性成分含量的方法；通过对道地药材蕲艾叶样品中各活性成分的含量测定，分析环境条件对蕲艾叶品质的影响。方法：采用国家行业标准分别测定不同环境蕲艾叶样品采集点的土壤水分、pH值及有机质的含量；采用HPLC法同时测定蕲艾叶中7种活性成分含量，采用SPSS 22.0软件分析环境因素与7种活性成分含量变化的相关性。结果：未施化肥、长日照及土壤水分较充足的蕲艾叶样品中7种活性成分的平均总含量比施过化肥、较短日照及土壤干燥的样品分别高51.3%、22.8%和32.6%；隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A的含量与土壤水分含量呈显著正相关（$P<0.05$），棕失车菊素的含量与土壤有机质含量呈显著正相关（$P<0.05$）。结论：在蕲艾叶主产地湖北省蕲春县范围内，施用化肥、土壤干燥、较短日照时数通常不利于蕲艾叶中7种活性成分包括5种有机酸的积累，结合前期研究，建议蕲艾种植在日照、土壤水分较充足的环境，避免施用化肥。

关键词：环境因素；蕲艾叶；活性成分；含量测定；相关性；有机酸；黄酮类

基金资助：国家重点研发计划项目（No.2016YFF0202802）

Effects of environmental factors on the contents of the seven active components of Artemisia argyi leaf in Qichun

PU Rui[1], WAN Ding-rong[1], CHEN Pu-sheng[2], XIA Heng-jian[2], WU Juan[1], GUO Shuang-xi[2]

([1]College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; [2]LI Shi-zhen Pharmaceutical Group Co. Ltd., Qichun 435300, China)

Abstract: Objective: To establish a method for simultaneous determination of contents of various active ingredients in the Artemisia argyi leaf, the effects of environmental conditions on the quality of Artemisia argyi leaf in Qichun (AALQ) were analyzed by determining the content of active ingredients in the samples of AALQ. Methods: Soil moisture, pH and organic matter contents of the samples in AALQ of the different environments were determined by the national industry standards and the seven active components in AALQ were detected by HPLC. The correlation between environmental factors and contents of the seven active ingredients was analyzed by SPSS 22.0. Results: The average total content of the seven active ingredients in AALQ without chemical fertilizer was 51.3% higher than that with chemical fertilizer. The average total content of seven active ingredients in AALQ with longer sunshine hours was 22.8% higher than that with shorter sunshine hours. The average total content of seven components in AALQ with sufficient soil moisture was 32.6% higher than that with lower soil moisture. The contents of cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid B were positively correlated with soil moisture content in the experimental range ($P<0.05$). There was a significant positive correlation between contents of jaceosidin and soil organic matter in the experimental range ($P<0.05$). Conclusion: In Qichun county, Hubei Province, where AALQ growed with the application of chemical fertilizers, lower soil moisture and shorter sunshine hours, are usually not conducive to the accumulation of the seven active components containing the five organic acids of AALQ. Based on our previous studies, it is suggested that the water content of soil and sunshine should be sufficient, application of chemical fertilizers should be avoided in order to guarantee the quality of AALQ.

Key words: Environmental factors; Artemisia argyi leaf in Qichun; Active components; Content determination; Correlation; Organic acids; Flavonoids

Funding: National Key R&D Program of China (No.2016YFF0202802)

蕲艾叶是艾叶的道地药材，品质优良。文献[1]报道艾叶含有绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素等活性成分，其中有机酸成分所占比例也较大。绿原酸具有

通信作者：万定荣，湖北省武汉市洪山区民族大道708号中南民族大学药学院，邮编：430074，电话：027-67841196

E-mail：wandr666@163.com

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抗菌、保肝、抗氧化、抗抑郁等药理作用[2]；隐绿原酸为绿原酸同分异构体，具有抗氧化作用[3]；异绿原酸A-C具有抗菌、抗炎、抗氧化、降压等药理作用[3-4]；棕失车菊素具有抗炎、抗癌、抗过敏等药理作用[5-7]；异泽兰黄素则具有抗炎、抗肿瘤等药理作用[6-7]。目前，笔者尚未见采用HPLC法同时测定不同环境艾叶包括蕲艾叶中这7种活性成分含量的研究报道。因此笔者对此进行了比较研究，以期为蕲艾叶药材的质量评价及合理栽培提供参考。

材料

1. 药材　蕲艾叶样品共21份，于2017年5月27日采于湖北蕲春县不同地点与环境（表1），经中南民族大学药学院万定荣教授鉴定，均为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant.的干燥叶（阴干）。

表1　不同地点与不同环境的蕲艾叶样品信息

编号	采集地	日照情况	其他信息
1	蕲春八里湖基地	全日照	平坦耕地
2	蕲春竹林湖基地1	全日照	平缓坡地
3	蕲春竹林湖基地2	全日照	平缓坡地
4	蕲春竹林湖基地3	全日照	平缓坡地
5	蕲春三江村1	全日照	小土山坡地疏林下
6	蕲春三江村2	全日照	水塘边土坝路上
7	蕲春清水河基地1	全日照	平坦耕地
8	蕲春清水河基地2	全日照	平坦耕地
9	蕲春清水河基地3	全日照	平坦耕地，周边积水
10	蕲春漕河镇独山村1	全日照	低洼无水荒草地
11	蕲春漕河镇独山村2	半日照	高大草丛旁，土略潮
12	蕲春张塝镇韩塝村1	全日照	山顶平缓坡地
13	蕲春张塝镇韩塝村2	2/3日照	山丘间平坦耕地
14	蕲春檀林镇雷冲村1	全日照	平坦肥沃耕地
15	蕲春檀林镇雷冲村2	2/3日照	山丘旁肥沃耕地
16	李时珍医药集团1	全日照	施化肥
17	李时珍医药集团1	全日照	不施化肥
18	李时珍医药集团2	全日照	施化肥
19	李时珍医药集团2	全日照	不施化肥
20	李时珍医药集团3	全日照	施化肥
21	李时珍医药集团3	全日照	不施化肥

2. 试剂　对照品绿原酸（批号：110753-2011415，纯度96.2%）购自中国食品药品检定研究院；隐绿原酸（批号：wkq18031901）、异绿原酸A（批号：wkq18041207）、异绿原酸B（批号：wkq18012408）、异绿原酸C（批号：wkq18050905）、异泽兰黄素（批号：wkq16082105），均购自四川省维克奇生物科技有限公司，经HPLC归一化法测定其纯度分别为98.9%、97.8%、98.5%、97.6%、98.7%；棕失车菊素（批号：P06J9F63077，经HPLC归一化法测定其纯度为98.2%）购自上海源叶生物科技有限公司；甲醇和其他试剂均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

3. 仪器　UltiMate 3000型高效液相色谱仪（二极管阵列检测器，Chromeleon色谱工作站，美国戴安公司）；BDS hypersil C_{18}色谱柱（250mm×4.6mm，5μm，赛默飞世尔科技[中国]有限公司）；AB256-S型1/10万电子分析天平（梅特勒-托利多[上海]有限公司）。

方法与结果

1. 土壤水分的测定　取各新鲜土壤样品约30.0g，精密称定，参照《中华人民共和国国家环境保护标准》“土壤 干物质和水分的测定重量法”（HJ 613—2011）规定的方法[8]进行测定。结果见表2。

2. 土壤pH值的测定　取各风干土壤样品约10.0g，精密称定，按照《中华人民共和国农业行业标准》“土壤pH的测定”（NY/T 1377—2007）规定的方法[9]进行测定。结果见表2。

3. 土壤有机质的测定　准确称取通过0.25mm孔径试验筛的风干土样0.25g（精确到0.0001g，称样量按规定根据预先测定有机质含量而定），按照《中华人民共和国农业行业标准》“土壤检测 第6部分：土壤有机质的测定”（NY/T 1121.6—2006）项下方法[10]进行测定。结果见表2。

表2　湖北蕲春县不同地点及环境土壤的水分含量、pH值及有机质含量检测结果

编号	水分（%）	pH值	有机质（g/kg）
1	12.4	7.0	15.2
2	9.1	6.3	23.0
3	13.3	6.8	30.5
4	3.7	5.5	23.4
5	3.4	5.2	27.3
6	12.6	6.7	25.4
7	17.8	6.8	29.1
8	10.7	5.7	29.1
9	41.1	5.2	29.1
10	16.0	5.2	37.1
11	25.7	6.7	28.4
12	8.6	5.7	23.9
13	15.3	4.5	30.5
14	10.0	4.6	21.7
15	11.6	4.8	21.6
17	6.4	6.8	25.8
19	6.4	6.8	25.8
21	6.4	6.8	25.8

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4. HPLC法同时测定7种活性成分的含量

4.1 供试品溶液制备　取剪碎的各蕲艾叶样品约0.50g，精密称定，置100mL圆底烧瓶中，加入70%甲醇溶液25mL，称定重量，85℃水浴回流60min，放冷，再称定重量，用70%甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过。精密量取续滤液5mL，置10mL容量瓶中，加70%甲醇至刻度，摇匀，用0.22μm微孔滤膜滤过，即得。

4.2 混合对照品溶液的制备　精密称取绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素对照品各适量，置于10mL量瓶中，以甲醇溶解并定容至刻度即得分别含绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素（0.361、0.258、0.410、0.496、0.401、0.376、0.411mg/mL）混合对照品溶液。

4.3 色谱条件　采用BDS Hypersil C_{18}色谱柱（4.6mm×250mm，5μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B），梯度洗脱（0～18min，12%→19%A；18～30min，19%→23%A；30～43min，23%→32%A；43～54min，32%→42%A；54～60min，42%→60%A；60～70min，60%→83%A）；流速：0.8mL/min；柱温：25℃；检测波长：340nm；进样量10μL。混合对照品溶液和蕲艾叶样品溶液的HPLC色谱图见图1-图2。

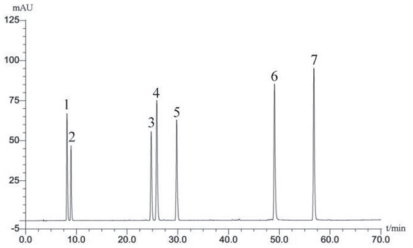

图1　混合对照品溶液的HPLC谱图

注：1. 绿原酸；2. 隐绿原酸；3. 异绿原酸B；4. 异绿原酸A；5. 异绿原酸C；6. 棕失车菊素；7. 异泽兰黄素。下图同。

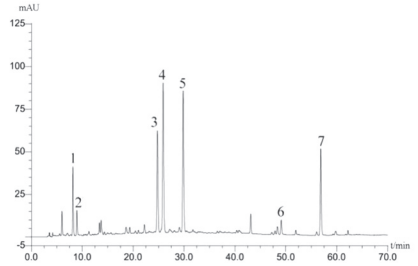

图2　蕲艾叶样品溶液的HPLC谱图

5. 方法学验证

5.1 线性关系考察　将混合对照品溶液稀释成一系列的梯度浓度后，进样，按“4.3”项色谱条件测定峰面积，以待测化合物峰面积为纵坐标（Y）及对照品的浓度为横坐标（X）制作标准曲线，并计算回归方程，绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素的回归方程分别为Y=0.3415X+0.0292（r=0.9999）、Y=0.3394X+0.0241（r=0.9999）、Y=0.3418X+0.0728（r=0.9999）、Y=0.4152X+0.0159（r=0.9999）、Y=0.4174X+0.0169（r=0.9999）、Y=0.6123X-0.0101（r=0.9999）、Y=0.6028X-0.0255（r=0.9998）。结果表明，绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素的浓度分别在1.44～361、1.03～258、1.64～410、1.98～496、1.60～401、1.50～376、1.64～411μg/mL范围内，与相对应的峰面积呈良好的线性关系。

5.2 其他项验证　取蕲艾叶剪碎样品（5号）约0.5g各若干份，按“4.1”项下的方法制备供试品溶液，按中药化学成分含量测定方法学验证的要求，分别进行精密度、重复性、稳定性试验。结果表明，各项试验供试液中绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素的含量RSD均<1.80%，表明仪器精密度、测定的重复性均良好，供试品中相关物质及其含量在48h内稳定。在样品的加样回收率试验中，取6份剪碎的5号蕲艾叶样品（每份0.5000g，精密称定），各加入分别含1.05、0.39、2.10、2.78、2.49、0.18、0.98mg上述成分的混合对照品溶液，检测，得上述7种成分的加样回收率分别为100.5%、99.9%、100.6%、97.9%、98.1%、99.9%、98.7%，说明各成分含量测定的准确度较好。方法学验证结果表明，所建立的含量测定方法符合定量分析的要求。

6. 样品含量测定结果　按照“4.1”项下方法制备21批蕲艾叶药材样品溶液，精密吸取供试品溶液各10μL，按“4.3”项色谱条件进样分析，分别测定绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、棕失车菊素、异泽兰黄素的含量。21批样品含量测定结果（按干燥品计）见表3。

以上样品HPLC检测结果显示，21批蕲艾叶均含绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C等5种有机酸成分和棕失车菊素、异泽兰黄素2种黄酮类成分。7种活性成分的平均含量分别为3.24、0.98、5.60、12.22、9.09、0.83、2.54mg/g。

上述测定结果中，3份施化肥（含氮、磷、钾的复合肥）蕲艾叶样品与3份未施化肥样品中7种活性成分的平均总含量分别为25.78、39.01mg/g，未施化肥

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

者比施化肥者高51.3%。其中5种有机酸的平均总含量依次分别为21.57、35.60mg/g，未施化肥者比施化肥者高65.0%。

对蕲春县3个地点不同日照时数的蕲艾叶样品的测定结果可知，3份日照时数较短的蕲艾叶样品与3份日照时数较长的样品中7种活性成分的平均总含量分别为31.82、39.09mg/g，日照时数长者比日照时数短者高22.8%。其中5种有机酸的平均总含量分别为29.74、36.50mg/g，日照时数长者比日照时数短者高22.7%。

表3 21批蕲艾叶样品中7种成分含量测定结果（mg/g）

编号	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸B	异绿原酸A	异绿原酸C	棕失车菊素	异泽兰黄素
1	2.76	1.06	4.33	8.99	6.69	0.51	2.00
2	4.94	1.24	3.14	12.18	11.32	0.63	2.39
3	4.28	1.16	6.10	16.24	10.70	1.62	3.36
4	4.40	0.95	6.13	10.39	9.93	0.65	2.19
5	2.00	0.79	4.15	5.48	4.77	0.33	1.93
6	2.46	1.01	5.61	10.31	6.93	0.56	2.83
7	3.16	0.58	4.16	16.09	9.68	0.57	1.68
8	3.20	1.02	6.78	13.95	11.57	1.56	2.23
9	5.38	1.60	9.34	20.73	11.50	0.93	2.54
10	4.27	1.17	6.01	15.81	10.72	1.62	3.35
11	4.67	1.19	6.83	12.86	10.34	1.10	3.17
12	4.96	1.35	7.20	20.15	13.26	1.07	2.60
13	4.34	1.15	3.98	14.80	10.12	0.44	1.74
14	2.34	0.53	3.18	10.05	5.45	0.42	1.77
15	1.38	0.69	2.28	6.69	5.42	0.37	1.89
16	1.43	0.81	2.60	5.73	4.76	0.55	3.86
17	1.78	0.57	3.83	9.27	8.24	0.65	3.24
18	2.29	0.99	6.44	10.40	7.75	0.88	3.11
19	3.08	1.20	15.30	17.55	15.88	0.48	2.28
20	2.22	0.69	4.25	7.72	6.64	1.71	2.51
21	2.74	0.96	6.07	11.18	9.15	0.78	2.80

另外通过对蕲春县3个土壤水分含量相差显著的采样点（竹林湖基地、清火河基地、三江村）蕲艾叶样品的测定结果可知，土壤水分含量较低与土壤水分较充足的样品中7种活性成分平均总含量分别为31.47、41.73mg/g，后者平均总含量比前者高32.6%。其中5种有机酸的平均总含量分别为28.50、37.78mg/g，后者比前者高32.6%。

7. 7种活性成分含量-环境因素相关性分析 采用SPSS 22.0软件对1~15号样品各采集点的土壤水分、pH值、有机质与其样品中活性物质含量检测数据进行相关性分析，结果见表4。可知，隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A的含量与样品采集点环境因素中土壤水分含量呈显著正相关（$P<0.05$），棕失车菊素的含量与土壤有机质含量呈显著正相关（$P<0.05$）。土壤pH值相对于其他环境因素对7种活性成分含量的影响不显著。

表4 蕲艾叶活性成分含量与环境因素相关系数

活性成分	土壤水分（%）	土壤pH值	土壤有机质
绿原酸	0.438	0.117	0.369
隐绿原酸	0.515*	0.125	0.253
异绿原酸B	0.564*	0.156	0.399
异绿原酸A	0.573*	0.078	0.496
异绿原酸C	0.323	0.173	0.443
棕失车菊素	0.224	0.217	0.606*
异泽兰黄素	0.278	0.373	0.479

注：*表示在0.05 水平（双侧）上显著相关。

讨论

本实验比较了不同提取溶剂（甲醇、乙醇）及不同溶剂浓度（30%、50%、70%、90%、100%甲醇）、不同提取方法（超声处理、回流）、不同溶剂体积（10、15、20、25、30mL），以及不同提取时间（20、40、60、80min）对7种活性成分提取效果的影响，确定本文中的最佳提取条件。以70%甲醇溶液为空白对照，在200~760nm范围内对供试品溶液进行全波长扫描，结果显示样品溶液在波长330nm处有最大吸收。结合文献记载，经HPLC比较325、330、340、360nm处检测结果，发现在340nm处，7种活性成分均有较好的色谱峰，且各峰分离度较好，故确定340nm为检测波长。

本研究建立了艾叶中7种活性成分的含量测定方法，可在一定程度上用于评价艾叶的质量。经对21批不同环境的蕲艾叶药材进行了含量测定，结果表明在湖北蕲春县范围内，施化肥与否、土壤水分含量、日照时数长短对蕲艾叶中有关活性物质的含量均有显著影响。即施用化肥、较干燥的土壤、短日照往往不利于蕲艾叶中7种活性成分包括5种有机酸的积累。结合前期对不同环境条件对蕲艾叶样品中挥发油、总黄酮、鞣质含量影响的研究结果[11]，建议蕲艾（艾）种植在日照和土壤水分较充足的环境，避免施用化肥。

参 考 文 献

[1] 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.中国中药杂志,2018,43(5):977-984

[2] 那袭雪,张文涛,谈远锋,等.绿原酸及其异构体药理作用及不良反应研究进展.辽宁中医药大学学报,2018,20(3):140-144

[3] Iwai K,Kishimoto N,Kakino Y,et al.In vitro antioxidative effects

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans.Journal of Agricultural & Food Chemistry,2004,52(13):4893–4898

[4] 龙厚宁,王洪凤,张硕,等.UPLC法同时测定不同银黄制剂中10种成分.中草药,2017,48(3):505–510

[5] Hye-Yeon H,Joon K H,Seung-Hwa J,et al.The flavonoid jaceosidin from Artemisia princeps induces apoptotic cell death and inhibits the Akt pathway in oral cancer cells.Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,2018,2018:1–9

[6] Lee S H,Bae E A,Park E K,et al.Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from Artemisia princeps in IgE-induced hypersensitivity.International Immunopharmacology, 2007,7(13):1678–1684

[7] Ji H Y,Kim S Y,Kim D K,et al.Effects of eupatilin and jaceosidin on cytochrome P450 enzyme activities in human liver microsomes. Molecules,2010,15(9):6466–6475

[8] 中华人民共和国环境保护部.中华人民共和国国家环境保护标准:土壤 干物质和水分的测定重量法(HJ 613—2011),2011:1–3

[9] 中华人民共和国农业部.中华人民共和国农业行业标准:土壤pH的测定(NY/T 1377—2007),2007:1–3

[10] 中华人民共和国农业部.中华人民共和国农业行业标准:土壤检测 第6部分:土壤有机质的测定(NY/T 1121.6—2006),2006:1–3

[11] 蒲锐,万定荣,赵百孝,等.环境条件对蕲艾叶品质影响的研究.世界科学技术–中医药现代化,2019,21(12):2739–2745

（收稿日期：2019年6月5日）

·论著·

变应性鼻炎病证结合模型的构建与评价

刘宝[1,2]，黄翔明[1]，王丹丹[1]，慕德宏[1]，刘慧霞[1]，李东棋[1]，田理[1]

（[1]成都中医药大学附属医院，成都 610072；[2]成都中医药大学博士后流动站，成都 610072）

摘要：目的：通过多因素复合建立变应性鼻炎（AR）病证结合动物模型，有利于AR基础研究推进及中医新药制剂研发。方法：冷水负重竭力游泳、高脂饥饿饲养、皮下注射肾上腺素复合卵清蛋白（OVA）致敏的方法制作AR大鼠病证结合动物模型，通过大鼠行为学、鼻黏膜组织病理改变、血流变学、血清IL-4、IFN-γ表达验证病证结合模型。结果：与空白组比较，模型组鼻黏膜上皮破坏，上皮细胞变性增生，黏膜下水肿变性；全血黏度、血浆黏度和红细胞沉降率及IL-4表达升高，IFN-γ表达降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。中药组治疗后相应各指标较模型组显著改善（$P<0.05$，$P<0.01$）。结论：采用上述复合方法制作AR大鼠病证结合模型，结合宏观表征和实验室指标综合评价符合气虚血瘀证AR病证表现，该方法可成功建立AR病证结合动物模型，具有可行性。

关键词：变应性鼻炎；病证结合动物模型；气虚血瘀证；造模方法；模型评价；克敏芪丹滴鼻液

基金资助：四川省科学技术厅项目（No.2016JY0218），四川省博士后科研项目特别资助，成都中医药大学“杏林学者”学科人才提升计划（No.BSH2018017)

Establishment and evaluation of the combination with disease and syndrome model of allergic rhinitis

LIU Bao[1,2], HUANG Xiang-ming[1], WANG Dan-dan[1], MU De-hong[1], LIU Hui-xia[1], LI Dong-qi[1], TIAN Li[1]

([1]Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; [2]Postdoctoral Station of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

Abstract: Objective: The establishment of animal model of allergic rhinitis (AR) through a multi-factor combination is beneficial to the promotion of basic research of AR and the development of new preparations of traditional Chinese medicine. methods: The AR animal model was induced by cold water weight-bearing swimming, high-fat starvation feeding, subcutaneous injection of epinephrine combined with ovalbumin (OVA). The model was verified by behavioral study, histopathology, hemorheology and the expression of serum IL-4, IFN-γ. Results: Compared with blank group, the nasal mucosa

通信作者：田理，四川省成都市十二桥路39号成都中医药大学附属医院，邮编：610072，电话：028–87783242

E-mail：18980880129@qq.com

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net