

蒲公英质量标准提升及不同产地药用蒲公英质量评价^Δ

惠西珂^{1*},李超²,谷巍^{1#a},巢建国^{1#b},王凯¹,韩怡³,王玉卓⁴,王圆圆¹,张松保¹(1.南京中医药大学药学院,南京 210023;2.济川药业集团有限公司,江苏泰兴 225400;3.张家港中医医院药学部,江苏张家港 215600;4.山东宏济堂制药集团股份有限公司,济南 250103)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0818-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.09

摘要 目的:提升蒲公英药材质量标准,并评价不同产地药用蒲公英药材的质量。方法:在2020年版《中国药典》(一部)“蒲公英”项下规定的基础上,增加水溶性浸出物(热浸法)、醇溶性浸出物(热浸法)、总黄酮、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A的含量测定方法,同时以8个产地42批药用蒲公英药材为对象建立高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并基于上述结果进行主成分分析。结果:42批药用蒲公英药材的醇溶性浸出物含量为15.30%~30.40%,水溶性浸出物含量为27.59%~38.96%。总黄酮(紫外-可见分光光度法)和绿原酸、咖啡酸、菊苣酸、异绿原酸A(HPLC法)的质量浓度分别在0.016~0.096、0.003~0.196、0.004~0.117、0.025~1.578、0.002~0.152 mg/mL范围内线性关系良好(R^2 均大于0.999 0);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.00%($n=6$);平均加样回收率为98.97%~103.53%,RSD为1.19%~1.58%。42批药用蒲公英药材中总黄酮、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸、异绿原酸A的含量分别为0.734%~3.700%、0.004%~0.123%、0.006%~0.087%、0.073%~1.499%、0.005%~0.109%。42批药用蒲公英样品的HPLC指纹图谱共有峰相对保留时间的RSD为0~0.94%,相对峰面积的RSD为0~125.57%,其中39批样品相似度大于0.900。主成分分析结果显示,陕西产药用蒲公英药材的综合质量较优,河北产药材次之。结论:拟定蒲公英药材中醇溶性浸出物、水溶性浸出物、总黄酮、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸、异绿原酸A的含量分别不得低于17.0%、27.0%、1.383%、0.024%、0.021%、0.450%、0.021%。陕西产药用蒲公英药材除咖啡酸含量相对较低外,其余各项指标均较优;河北产药材的咖啡酸含量高于陕西产药材,其他各项指标略低于陕西产药材;其余产地的药用蒲公英药材综合质量相对较差,且同一产地不同批次间的药材质量不稳定。

关键词 蒲公英;质量标准;质量评价;高效液相色谱法;指纹图谱;主成分分析;药用蒲公英

Quality Standard Improve of *Taraxaci Herba* and Quality Evaluation of *T. officinale* from Different Origins

HUI Xike¹, LI Chao², GU Wei¹, CHAO Jianguo¹, WANG Kai¹, HAN Yi³, WANG Yuzhuo⁴, WANG Yuanyuan¹, ZHANG Songbao¹(1.School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China; 2. Jumpcan Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Taixing 225400, China; 3. Dept. of Pharmacy, Zhangjiagang Hospital of

Mol Psychiatry, 2018, 23(6):1496-1505.

[20] LI X Y, YE Z H, CHEN T, et al. The effects of donepezil on phencyclidine-induced cognitive deficits in a mouse model of schizophrenia[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2018, 175:69-76.

[21] WU J, QU J Q, ZHOU Y J, et al. Icariin improves cogni-

^Δ基金项目:国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项项目(No.2018YFC1706900);江苏省2019年中药资源普查专项;江苏省中药资源产业化过程协同创新中心建设重点项目(No.ZDXM-3-24);江苏省研究生科研创新计划项目(No.SJXC20-0559);张家港市科技计划项目(No.ZKR1907)

* 硕士研究生。研究方向:中药检验与分析。E-mail:1627105018@qq.com

#a 通信作者:教授,博士。研究方向:中药资源生产与合成生物学。E-mail:guwei9926@126.com

#b 通信作者:教授,硕士。研究方向:中药资源生产与品质评价。E-mail:jgchao1016@163.com

tive deficits by reducing the deposition of β -amyloid peptide and inhibition of neurons apoptosis in SAMP8 mice[J]. Neuroreport, 2020, 31(9):663-671.

[22] CHEVY Q, KEPECS A. When acetylcholine unlocks feedback inhibition in cortex[J]. Neuron, 2018, 97(3):481-484.

[23] WANG X, LI J, QIAN L, et al. Icariin promotes histone acetylation and attenuates post-stroke cognitive impairment in the central cholinergic circuits of mice[J]. Neuroscience, 2013, 236:281-288.

[24] NADERIPOOR P, AMANI M, ABEDI A, et al. Alterations in the behavior, cognitive function, and BDNF level in adult male rats following neonatal blockade of GABA-A receptors[J]. Brain Res Bull, 2021, 169:35-42.

(收稿时间:2020-12-18 修回日期:2021-01-22)

(编辑:唐晓莲)

TCM, Jiangsu Zhangjiagang 215600, China; 4. Shandong Hongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250103, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of Taraxaci Herba, and to evaluate the quality of *T. officinale* from different origins. METHODS: Based on the provisions of the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part I) under the item "Taraxaci Herba", the method of content determination was added for the detection of water-soluble extracts (hot extraction method) and alcohol-soluble extracts (hot extraction method), total flavonoids, chlorogenic acid, caffeic acid, cichoric acid and isochlorogenic acid A. HPLC fingerprint was established by using 42 batches of *T. officinale* from 8 producing areas as object, and principal component analysis was performed on the basis of above results. RESULTS: The contents of alcohol-soluble extracts in 42 batches of *T. officinale* were 15.30%-30.40%, and those of water-soluble extracts were 27.59%-38.96%. The concentration of total flavonoids (UV spectrophotometry), chlorogenic acid, caffeic acid, cichoric acid and isochlorogenic acid A (HPLC method) were 0.016-0.096, 0.003-0.196, 0.004-0.117, 0.025-1.578, 0.002-0.152 mg/mL, respectively (all $R^2 > 0.999$); RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.00% ($n=6$); average sample recovery were 98.97%-103.53%, and RSDs were 1.19%-1.58%. The contents of total flavonoids, chlorogenic acid, caffeic acid, cichoric acid and isochlorogenic acid A were 0.734%-3.700%, 0.004%-0.123%, 0.006%-0.087%, 0.073%-1.499%, 0.005%-0.109% respectively in 42 batches of *T. officinale*. For 42 batches of *T. officinale* samples in HPLC fingerprint, RSDs of the relative retention time of the common peak were 0-0.94%, and RSDs of the relative peak area were 0-125.57%. Among them, the similarity of 39 batches of samples was all higher than 0.900. Results of principal component analysis showed that the quality of *T. officinale* from Shaanxi province was better, followed by medicinal materials from Hebei province. CONCLUSIONS: Tentatively, the contents of alcohol-soluble extract, water-soluble extract, total flavonoids, chlorogenic acid, caffeic acid, cichoric acid and isochlorogenic acid A shall not be less than 17.0%, 27.0%, 1.383%, 0.024%, 0.021%, 0.450%, 0.021% for Taraxaci Herba. In addition to the low content of caffeic acid in *T. officinale* from Shaanxi province, the other indexes were better; the content of caffeic acid in *T. officinale* from Hebei province was higher than that from Shaanxi province, and other indicators were slightly lower than that from Shaanxi province. The quality of comprehensive evaluation of *T. officinale* from other origins was relatively poor, and the quality of different batches of medicinal materials from the same origin was unstable.

KEYWORDS Taraxaci Herba; Quality standard; Quality evaluation; HPLC; Fingerprint; Principal component analysis; *Taraxacum officinale*

蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.、碱地蒲公英 *T. sinicum* Kitag. 或同属数种植物的干燥全草,性味苦、甘、寒,归肝、胃经,具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋的功效,常用于治疗疔疮肿毒、乳痈、目赤、肺痈、肠痈、湿热黄疸和热淋涩痛等症^[1]。大多数清热解毒、抗菌消肿类中药复方制剂均含有蒲公英,且用量较大,故该药材的质量关系到相关制剂的疗效。然而,由于蒲公英同属植物品种较多且采收期不一,市面上所售的蒲公英药材质量良莠不齐,严重影响了临床疗效,因而有必要对其质量进行综合性评价。

2020年版《中国药典》(一部)“蒲公英”项下仅有性状、鉴别、水分检查和菊苣酸含量测定项^[2],并不能全面、综合地控制该药材质量。研究表明,蒲公英药材中主要含有酚酸类和黄酮类化合物^[3],其中有关咖啡酸、菊苣酸和绿原酸的研究较多,该3种成分具有显著的抗菌、抗炎等作用,并可有效抑制乳腺癌细胞增殖^[4-6];异绿原酸A与绿原酸属同分异构体,具有抗菌、抗炎和抗氧化作用^[7-9];黄酮类化合物具有很强的抗氧化和自由基清除作用^[10]。上述化合物在蒲公英药材中含量较高且作用明确,故本研究在2020年版《中国药典》(一部)“蒲公英”项下规定的基础上,增加了水溶性浸出物(热浸法)、醇

溶性浸出物(热浸法)、总黄酮、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A的含量测定,同时以8个产地共42批药用蒲公英为对象,建立了该药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并基于上述结果进行主成分分析,以期对蒲公英的种质资源筛选、质量控制和进一步开发利用提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有2695型HPLC仪、2998 PDA型紫外检测器(美国Waters公司),UV-1800PC型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),KH-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HH-S型恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

1.2 主要试剂

本研究所用的主要试剂有绿原酸、咖啡酸、芦丁对照品(南京良纬生物科技有限公司,批号分别为lw18022809、lw18013006、lw18012501,纯度均大于98%),菊苣酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号P02J9F51964,纯度>98%),异绿原酸A对照品(南京金益柏生物科技有限公司,批号JBZ-1451,纯度>98%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为

超纯水。

1.3 药材

本研究收集了甘肃、河南、湖北、山西、河北、安徽、江苏和陕西等8个蒲公英种植基地共42批蒲公英药材样品(表1)。所有样品均由南京中医药大学药学院巢建国教授鉴定为菊科植物药用蒲公英 *T. officinale* F.H. Wigg.的干燥全草。样品留样保存于南京中医药大学中药资源生产技术服务中心。

2 方法与结果

2.1 浸出物含量测定

按照2020年版《中国药典》(四部)通则2201“浸出物测定法”对蒲公英药材中的水溶性浸出物和醇溶性浸出物含量进行测定^[11]。每批样品平行测定3次,取均值。结果,42批蒲公英药材中醇溶性浸出物的含量为15.30%~30.40%,均值为23.04%;水溶性浸出物的含量为27.59%~38.96%,均值为34.48%。蒲公英药材的浸出物含量测定结果如表2所示。

参考以往发表过的文献^[12-14],并通过SPSS 22.0统计软件分析,将上述平均含量的98%置信区间下限的80%作为限量标准(下同),拟定蒲公英药材中醇溶性浸出物的含量不得低于17.0%,水溶性浸出物的含量不得低于27.0%。

2.2 总黄酮含量测定

以芦丁为对照品,采用紫外-可见分光光度法测定蒲公英药材中总黄酮的含量。

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品10 mg,置于50 mL量瓶中,加甲醇适量,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每1 mL中含芦丁

0.2 mg)。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛)2 g,加入甲醇20 mL,超声提取(功率250 W,频率40 kHz)2次,每次30 min,滤过,滤液合并至50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.2.3 测定方法 精密量取供试品溶液适量置于25 mL量瓶中,加水至6 mL;加入5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入4%氢氧化钠溶液10 mL,再加水定容,摇匀,放置15 min^[15],然后按照2020年版《中国药典》(四部)通则0401“紫外-可见分光光度法”在509 nm波长处测定其吸光度^[11,15]。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取“2.2.1”项下对照品溶液2、4、6、8、10、12 mL,按“2.2.3”项下方法测定。以吸光度(A)为纵坐标、芦丁质量浓度(c)为横坐标绘制标准曲线,得到回归方程 $A=11.151c+0.0155$ ($R^2=0.9998$)。结果表明,芦丁质量浓度在0.016~0.096 mg/mL范围内与其吸光度呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取供试品溶液(编号为河南9)适量,按“2.2.3”项下方法测定吸光度,重复测定6次。结果,吸光度的RSD=0.43% ($n=6$),表明该方法精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液(编号为江苏34)适量,按“2.2.3”项下方法分别在溶液制备后0、10、20、30、40、50、60 min测定吸光度。结果,吸光度的RSD=2.40% ($n=7$),表明供试品溶液在制备后60 min内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取样品(编号为甘肃7)粉末适量,

表1 不同产地的药用蒲公英药材样品信息

Tab 1 Sample information of *T. officinale* from different origins

样品编号	产地来源	批号	样品编号	产地来源	批号
甘肃1	甘肃省张掖市民乐县	181028	山西22	山西省运城市盐湖区	180812
甘肃2	甘肃省张掖市民乐县	180706	山西23	山西省运城市盐湖区	180918
甘肃3	甘肃省张掖市民乐县	180812	山西24	山西省运城市盐湖区	181026
甘肃4	甘肃省张掖市民乐县	180910	山西25	山西省运城市盐湖区	180803
甘肃5	甘肃省张掖市民乐县	181028	河北26	河北省保定市清苑县	181121
甘肃6	甘肃省张掖市民乐县	180805	河北27	河北省保定市清苑县	181122
甘肃7	甘肃省定西市渭源县路园镇	20051002	河北28	河北省保定市清苑县	181123
河南8	河南省鹿邑县杨湖口镇赵河滩村	180628	河北29	河北省保定市清苑县	181124
河南9	河南省鹿邑县杨湖口镇赵河滩村	180706	河北30	河北省保定市清苑县	181125
河南10	河南省鹿邑县杨湖口镇赵河滩村	180810	安徽31	安徽省亳州市谯城区	180802
河南11	河南省鹿邑县杨湖口镇赵河滩村	180908	安徽32	安徽省亳州市谯城区	180602
河南12	河南省鹿邑县杨湖口镇赵河滩村	181020	安徽33	安徽省亳州市谯城区	180628
河南13	河南省鹿邑县杨湖口镇赵河滩村	180804	江苏34	江苏省徐州市邳州市戴庄镇	200401
湖北14	湖北省襄阳市谷城县	180628	江苏35	江苏省徐州市邳州市戴庄镇	200402
湖北15	湖北省襄阳市谷城县	180702	江苏36	江苏省徐州市邳州市戴庄镇	200403
湖北16	湖北省襄阳市谷城县	180812	江苏37	江苏省徐州市邳州市戴庄镇	200404
湖北17	湖北省襄阳市谷城县	180918	江苏38	江苏省徐州市邳州市戴庄镇	200405
湖北18	湖北省襄阳市谷城县	181022	江苏39	江苏省徐州市邳州市戴庄镇	200406
湖北19	湖北省襄阳市谷城县	180801	陕西40	陕西省渭南市澄城县安里镇	20051001
山西20	山西省运城市盐湖区	180628	陕西41	陕西省渭南市蒲城县孙镇	20051301
山西21	山西省运城市盐湖区	180710	陕西42	陕西省渭南市华州区高塘镇	20051302

表2 42批蒲公英药材的浸出物含量测定结果(n=3, %)

Tab 2 Results of content determination of the extract from 42 batches of *T. officinale*(n=3, %)

样品编号	醇溶性浸出物	水溶性浸出物	样品编号	醇溶性浸出物	水溶性浸出物	样品编号	醇溶性浸出物	水溶性浸出物
甘肃1	18.78	31.22	湖北15	21.96	34.18	河北29	27.91	34.11
甘肃2	24.17	37.20	湖北16	23.85	29.22	河北30	30.40	38.96
甘肃3	25.74	38.62	湖北17	22.32	28.95	安徽31	15.30	30.14
甘肃4	25.76	38.22	湖北18	22.70	35.28	安徽32	16.63	31.01
甘肃5	23.43	36.19	湖北19	21.14	34.82	安徽33	21.97	34.48
甘肃6	20.36	33.18	山西20	18.81	32.87	江苏34	21.28	34.28
甘肃7	25.39	38.24	山西21	23.69	35.25	江苏35	21.08	33.15
河南8	18.48	27.59	山西22	26.59	38.69	江苏36	21.34	33.28
河南9	27.05	37.95	山西23	23.94	35.82	江苏37	19.11	31.00
河南10	22.14	30.47	山西24	27.36	38.22	江苏38	20.29	32.85
河南11	23.34	36.85	山西25	20.10	33.18	江苏39	20.51	31.91
河南12	23.69	32.35	河北26	29.11	36.25	陕西40	25.66	38.29
河南13	17.50	38.09	河北27	28.67	38.51	陕西41	23.29	36.25
湖北14	21.38	28.12	河北28	29.82	36.51	陕西42	25.81	36.44

共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下方法测定吸光度,并采用标准曲线法计算总黄酮(以芦丁计)的含量。结果,总黄酮含量的RSD=0.97%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取样品(编号为甘肃7)粉末适量,共6份,分别加入与其总黄酮含量相当的对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下方法测定吸光度,计算其总黄酮含量和加样回收率。结果,平均加样回收率为101.8%,RSD=0.59%(n=6),表明该方法准确度良好。

2.2.9 总黄酮的含量测定 取42批蒲公英药材样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下方法测定吸光度,采用标准曲线法计算其总黄酮含量。每批样品平行测定3次,取均值。结果,42批蒲公英药材中总黄酮的含量为0.734%~3.700%,均值为1.959%(表3)。拟定以干燥品计算,蒲公英药材中总黄酮的含量不得低于1.383%。

2.3 绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A的含量测定

采用HPLC法测定蒲公英药材中绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A的含量。

2.3.1 色谱条件 色谱柱为XTERRA®MS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(表4);检测波长为325 nm;流速为1.0 mL/min;柱温为40 °C;进样量为10 μL。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A对照品各适量,加甲醇制成每1 mL含0.196 mg绿原酸、0.117 mg咖啡酸、1.578 mg菊苣酸和0.152 mg异绿原酸A的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛,下同)约1 g,加入80%甲醇10 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)60 min,用80%甲醇补足减失

表3 42批蒲公英药材中总黄酮和4种酚酸类成分的含量测定结果(n=3, %)

Tab 3 Results of content determination of total flavonoids and 4 phenolic acids in 42 batches of *T. officinale*(n=3, %)

样品编号	总黄酮	绿原酸	咖啡酸	菊苣酸	异绿原酸A	样品编号	总黄酮	绿原酸	咖啡酸	菊苣酸	异绿原酸A
甘肃1	1.528	0.017	0.050	0.168	0.034	山西22	2.245	0.038	0.055	0.680	0.043
甘肃2	2.046	0.059	0.029	0.534	0.044	山西23	2.672	0.059	0.035	0.813	0.037
甘肃3	2.307	0.036	0.075	0.598	0.043	山西24	1.418	0.056	0.050	0.749	0.037
甘肃4	1.996	0.040	0.039	0.545	0.028	山西25	2.743	0.016	0.061	0.137	0.030
甘肃5	1.868	0.040	0.064	0.370	0.038	河北26	2.793	0.050	0.034	0.882	0.045
甘肃6	1.446	0.016	0.036	0.141	0.021	河北27	2.547	0.060	0.035	1.054	0.050
甘肃7	1.433	0.029	0.087	0.391	0.043	河北28	2.931	0.062	0.031	0.935	0.060
河南8	2.365	0.026	0.023	0.329	0.016	河北29	2.592	0.075	0.036	0.833	0.054
河南9	1.331	0.054	0.060	0.607	0.029	河北30	1.181	0.059	0.028	0.900	0.051
河南10	1.653	0.032	0.038	0.345	0.015	安徽31	0.734	0.013	0.032	0.208	0.008
河南11	1.474	0.026	0.056	0.400	0.016	安徽32	1.440	0.004	0.013	0.073	0.006
河南12	1.060	0.046	0.029	0.524	0.012	安徽33	2.005	0.020	0.039	0.288	0.009
河南13	1.219	0.007	0.010	0.077	0.005	江苏34	2.117	0.036	0.006	0.713	0.032
湖北14	1.839	0.014	0.041	0.156	0.025	江苏35	1.990	0.051	0.009	0.667	0.047
湖北15	1.793	0.039	0.023	0.594	0.023	江苏36	1.855	0.026	0.012	0.610	0.043
湖北16	1.529	0.053	0.024	0.700	0.023	江苏37	2.130	0.029	0.012	0.670	0.019
湖北17	1.410	0.040	0.032	0.460	0.022	江苏38	1.812	0.028	0.011	0.572	0.029
湖北18	1.465	0.037	0.029	0.379	0.014	江苏39	2.871	0.022	0.006	0.566	0.019
湖北19	1.250	0.024	0.063	0.188	0.018	陕西40	2.416	0.123	0.011	1.281	0.096
山西20	1.972	0.006	0.027	0.081	0.020	陕西41	3.700	0.095	0.008	1.499	0.109
山西21	2.473	0.041	0.045	0.361	0.052	陕西42	2.627	0.053	0.016	0.988	0.081
均值	1.959	0.039	0.034	0.548	0.034						

表4 蒲公英药材中4种酚酸类成分HPLC含量测定的流动相梯度洗脱程序

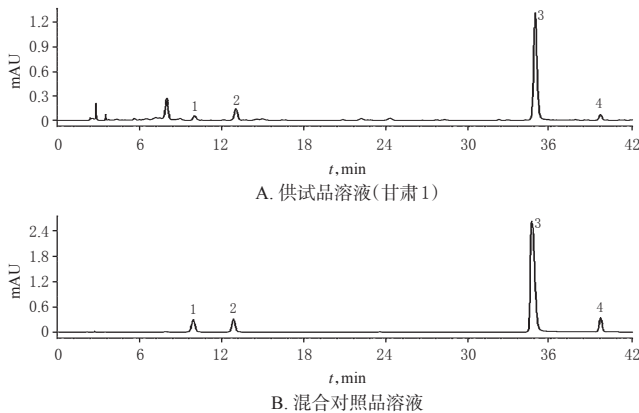
Tab 4 Mobile phase gradient elution program for HPLC content determination of 4 phenolic acids in *T. officinale*

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	9	91
10	9	91
20	12	88
36	18	82
40	20	80
50	50	50

的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 系统适用性试验 精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液与“2.3.3”项下供试品溶液各10 μL,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。结果显示,理论板数按咖啡酸峰计算不低于3 000,4种酚酸类成分色谱峰的分离度均大于1.5,拖尾因子为0.95~1.05。

2.3.5 线性关系考察 取“2.3.2”项下混合对照品溶液,用甲醇稀释成绿原酸质量浓度依次为0.098、0.049、0.025、0.012、0.006、0.003 mg/mL,咖啡酸质量浓度依次为0.059、0.029、0.015、0.007、0.004、0.002 mg/mL,菊苣酸质量浓度依次为0.789、0.395、0.197、0.099、0.049、0.025 mg/mL,异绿原酸A质量浓度依次为0.076、0.038、0.019、0.010、0.005、0.002 mg/mL的梯度浓度混合对照



注: 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 菊苣酸; 4. 异绿原酸 A

Note: 1. chlorogenic acid; 2. caffeic acid; 3. chicoric acid; 4. isochlorogenic acid A

图1 蒲公英药材和4种酚酸类成分混合对照品的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatogram of *T. officinale* and 4 phenolic acids mixed control

品溶液。取上述各梯度浓度混合对照品溶液和“2.3.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以各成分的质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果如表5所示。

表5 蒲公英药材中4种酚酸类成分的线性关系考察结果

Tab 5 Results of linear relationship of 4 phenolic acids in *T. officinale*

成分	线性范围,mg/mL	回归方程	R^2
绿原酸	0.003~0.196	$Y=3 \times 10^4 X - 16\ 713$	>0.999 9
咖啡酸	0.002~0.117	$Y=5 \times 10^4 X - 22\ 098$	>0.999 9
菊苣酸	0.025~1.578	$Y=4 \times 10^4 X - 1 \times 10^6$	0.999 4
异绿原酸 A	0.002~0.152	$Y=3 \times 10^4 X - 26\ 800$	>0.999 9

2.3.6 精密度试验 取“2.3.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果,4种酚酸类成分峰面积的RSD均小于2.00% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取样品(编号为山西22)粉末适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再于常温下放置0、4、8、12、18、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,4种酚酸类成分峰面积的RSD均小于2.00% ($n=6$),表明供试品溶液在常温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 取样品(编号为山西22)粉末适量,共6份,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中4种酚酸类成分的含量。结果,4种酚酸类成分含量的RSD均小于2.00% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(编号为甘肃4)粉末0.6 g,共6份,加入等量的对照品,按

“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按标准曲线法计算样品含量并计算加样回收率。结果,样品中绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A的平均加样回收率分别为103.53%、98.97%、99.46%、101.65%,RSD分别为1.58%、1.19%、1.52%、1.15% ($n=6$),表明该方法准确度良好。

2.3.10 4种酚酸类成分的含量测定 取42批蒲公英药材样品,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按标准曲线法计算样品含量。每批样品平行测定3次,取均值。结果,42批蒲公英药材中绿原酸、咖啡酸、菊苣酸和异绿原酸A的含量分别为0.004%~0.123%、0.006%~0.087%、0.073%~1.499%和0.005%~0.109%,均值分别为0.039%、0.034%、0.548%和0.034%(表3)。拟定按干燥品计算,蒲公英药材中绿原酸的含量不得低于0.024%、咖啡酸的含量不得低于0.021%、异绿原酸A的含量不得低于0.021%。

蒲公英药材的上述4种酚酸类成分中,2020年版《中国药典》(一部)只对菊苣酸进行了含量限定(不得低于0.45%)^[2],本研究也以此作为菊苣酸的限量标准。测定结果显示,42批蒲公英药材中菊苣酸的含量为0.073%~1.499%,其中河北、江苏和陕西所产药材的菊苣酸含量远远高出药典规定,且各产地药材的菊苣酸含量差异明显。

由表2和表3可以看出,河北产蒲公英药材中的浸出物和各种成分的含量均符合所拟定的限量标准;陕西产蒲公英药材中除咖啡酸含量略低以外,浸出物、总黄酮和其余3种酚酸类成分的含量均远远超过所拟定的限量标准。上述结果对筛选优质蒲公英种植基地具有一定的参考价值。

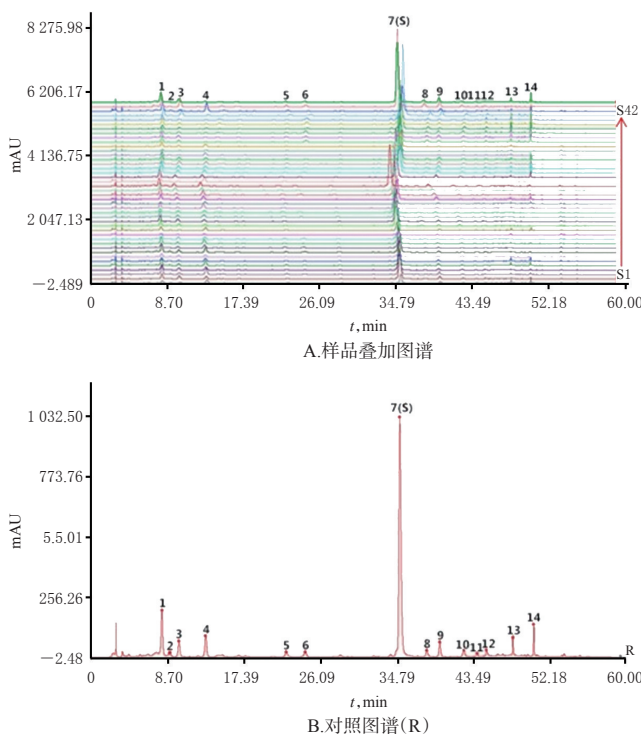
2.4 蒲公英药材的HPLC指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取样品(编号为甘肃7)粉末适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以菊苣酸色谱峰为参照峰,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,14个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.31%、相对峰面积的RSD均小于3.70% ($n=6$),表明该方法精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取样品(编号为甘肃1)粉末适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再于常温下放置0、4、8、12、18、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,以菊苣酸色谱峰为参照峰,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,14个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.45%、相对峰面积的RSD均小于4.05% ($n=6$),表明该方法稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取样品(编号为山西21)粉末适量,共6份,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,以菊苣酸色谱峰为参照峰,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结

果,14个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.21%、相对峰面积的RSD均小于3.23%($n=6$),表明该方法重复性良好。



注:S1~S42表示编号为甘肃1~陕西42的样品

Note:S1-S42 mean samples of No. Gansu 1-Shaanxi 42

图2 42批蒲公英药材的HPLC指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprints of 42 batches of *T. officinale*

2.4.4 指纹图谱的建立及共有峰的指认 取42批蒲公英药材样品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》软件进行分析,生成样品叠加图谱和对照图谱(R),如图2所示。因为7号峰的峰面积大、占总峰面积比例高、可辨识度好,具有代表性,故以该峰为参照峰(S),共标示出14个共有峰,其峰面积之和占总峰面积的90%以上。通过与混合对照品图谱(图1B)中的保留时间比对,指出4个共有峰,其中3号峰为绿原酸、4号峰为咖啡酸、7号峰为菊苣酸、9号峰为异绿原酸A。42批蒲公英药材共有峰相对保留时间的RSD为0~0.94%,相对峰面积的RSD为0~125.57%(表6),说明各批次蒲公英药材中各组分的含量存在明显差异,这可能是由于不同产地的种植方式、气候条件以及加工储存方式不同而导致的。

2.4.5 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》软件对42批蒲公英药材样品图谱与对照图谱(R)进行相似度分析,其中有39批样品的相似度>0.900,只有3批样品(湖北19、山西20、山西25)的相似度较低(分别为0.892、0.778、0.778),说明虽然不同批次蒲公英样品各组分含量存在一定的差异,但不同组

分在大多数批次样品中的比例处于同一水平;菊苣酸(7号峰)在样品组分中所占比例远远高于其他化合物,故该组分的含量差异直接影响各批次样品的相似度。

表6 蒲公英药材HPLC指纹图谱共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD

Tab 6 RSD of relative retention time and relative peak area of common peak in HPLC fingerprints of *T. officinale*

峰号	RSD, %		峰号	RSD, %	
	相对保留时间	相对峰面积		相对保留时间	相对峰面积
1	0.53	59.68	8	0.54	81.45
2	0.94	68.50	9	0.49	84.11
3	0.82	31.48	10	0.20	50.57
4	0.52	108.85	11	0.54	95.00
5	0.38	72.32	12	0.40	53.37
6	0.47	97.46	13	0.66	110.14
7(S)	0	0	14	0.70	125.57

3 主成分分析

采用SPSS 22.0软件,将符合2020年版《中国药典》标准(按干燥品计算,蒲公英药材中菊苣酸的含量不得低于0.45%^[2])的25批药材中的浸出物、总黄酮和4种酚酸类化合物共7个指标性成分的定量结果组成矩阵,数据经标准化处理后进行主成分分析,提取特征值>1的主成分。结果,所提取的主成分累计方差贡献率达到85.071%(表7),说明其在评价不同产地蒲公英药材样品质量的优劣中起主导作用^[16]。

表7 蒲公英药材含量测定主成分的特征值及累计方差贡献率

Tab 7 Eigen values of principal components and cumulative variance contribution rate of content determination of *T. officinale*

主成分	特征值	方差贡献率, %	累计方差贡献率, %
1	4.113	58.759	58.759
2	1.842	26.312	85.071

利用2个主成分对不同产地的蒲公英药材样品进行评价。以各成分因子得分与权重系数乘积之和计算样品中7个指标性成分的总因子得分值(F),以 F 值的大小评价各样品的质量优劣^[17], F 值越大,说明样品综合质量越好。权重系数为各主成分的方差贡献率与2个主成分的总方差贡献率之比。通过计算得到第1、2主成分的权重系数依次为0.691、0.309,再结合特征向量,得到主成分线性组合表达式 $F=0.691F_1+0.309F_2$ (为消除负值影响, F_1 、 F_2 进行坐标平移2个单位),从而计算出不同产地蒲公英药材的 F 值,并对其进行排序(表8)。由表8可以看出,陕西所产蒲公英药材的综合质量较优,河北所产蒲公英药材的综合质量仅次于陕西产药材;其余产地的蒲公英药材综合质量相对较差,且同一产地不同批次间的药材质量不稳定。

4 讨论

本研究以2020年版《中国药典》为基准,对8个产地

表8 25批蒲公英药材样品的主成分因子及综合质量评价结果

Tab 8 Principal component factors and comprehensive quality evaluation results of 25 batches of *T. officinale*

样品编号	F ₁	F ₂	F	排序	样品编号	F ₁	F ₂	F	排序
甘肃2	1.738	2.218	1.886	14	河北28	2.617	2.697	2.642	5
甘肃3	1.210	3.803	2.011	13	河北29	2.655	2.438	2.588	7
甘肃4	1.249	2.841	1.741	15	河北30	2.518	3.009	2.670	4
河南9	1.427	3.510	2.071	11	江苏34	1.735	0.960	1.495	17
河南12	0.912	1.674	1.147	22	江苏35	2.022	0.854	1.661	16
湖北15	1.279	1.519	1.353	20	江苏36	1.556	1.032	1.394	18
湖北16	1.472	1.146	1.371	19	江苏37	1.290	0.554	1.062	23
湖北17	0.841	1.231	0.962	25	江苏38	1.435	0.914	1.274	21
山西22	1.605	3.374	2.151	10	江苏39	1.151	0.705	1.013	24
山西23	1.985	2.135	2.031	12	陕西40	4.450	1.595	3.568	2
山西24	1.944	3.273	2.354	9	陕西41	4.907	1.049	3.715	1
河北26	2.301	2.780	2.449	8	陕西42	3.002	1.774	2.623	6
河北27	2.700	2.912	2.766	3					

42批蒲公英药材的质量进行多指标综合评价。在预试验中,分别对HPLC法的流动相(甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液)、柱温(25、30、35、40℃)、流速(0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min)以及供试品溶液的制备条件等进行了考察,最终建立了文中方法。经方法学验证,所建方法准确、可行、结果可靠。

本研究根据42批药材的含量测定结果,拟定蒲公英药材中咖啡酸的含量不得低于0.021%,这与2015年版《中国药典》(一部)“蒲公英”项下含咖啡酸不得低于0.020%的标准相差无几^[8],故此限量标准的拟定相对合理。2015年版药典对蒲公英药材中的咖啡酸进行了限量,而2020年版药典改成了对药材中菊苣酸的含量进行限量^[9]。发生此项改变的原因主要是相对于咖啡酸而言,菊苣酸在蒲公英药材中的含量较高且专属性较强,更能体现出药材质量的优劣,本研究结果也佐证了其改变的合理性。另外,本研究选择蒲公英药材中菊苣酸的限量值与2020年版药典规定一致,主要原因是通过对8个产地42批蒲公英药材进行分析后发现,以药典中菊苣酸限量为标准,42批样品的合格率为67%,这说明药典的标准相对较高,故本研究不再对该项标准进行提升。

因为中药是多成分、多靶点协同作用的结果,不可能通过测定某一特征成分的含量来控制其质量。而浸出物和指纹图谱则具有整体性和模糊性的优势,契合了中药组分复杂性和多样性的特点,能够较好地评价和控制中药材及其复方的质量,因而本研究同时也增加了水溶性浸出物(热浸法)和醇溶性浸出物(热浸法)的检测,还建立了8个产地42批蒲公英药材的HPLC指纹图谱,并对所得数据进行了主成分分析。

综上所述,本研究所建立的综合评价蒲公英药材质量的方法准确、可行、可靠,可为该药材的质量标准提升

提供依据。最终结果表明,陕西产蒲公英药材除咖啡酸含量相对较低外,其余各项指标均较优;河北产蒲公英药材的咖啡酸含量高于陕西药材;其余产地的蒲公英药材综合质量相对较差,且同一产地不同批次的药材质量不稳定。

参考文献

[1] 王连心,苗青,谢雁鸣,等.蒲地蓝消炎口服液临床应用专家共识[J].中国中药杂志,2019,44(24):5277-5281.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:367-368.

[3] 刘燕,兰瑞容,兑靖冬,等.HPLC法同时测定蒲公英中单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸的含量[J].中国药师,2017,20(9):1677-1679.

[4] 孙皓熠,郝宝燕,张浩超,等.咖啡酸研究概况[J].食品与药品,2017,19(2):151-154.

[5] 陈梦杰,孔静,张元元,等.蒲公英酚类特征成分含量测定及其特征图谱质量表征关联分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(16):12-20.

[6] 田苗苗,刘扬,刘树民.蒲公英治疗乳腺癌的活性成分及作用机制研究概况[J].中国药房,2019,30(13):1864-1867.

[7] 梁欣雨,周晓钢,何兵,等.一测多评法同时测定小儿金翘颗粒中7种成分的含量[J].中国药房,2020,31(10):1179-1184.

[8] 安兰兰,李开敏,何倩倩,等.基于6种咖啡酰基奎宁酸类成分结合化学计量法评价不同产地苗药黑骨藤的质量[J].中草药,2020,51(22):5850-5855.

[9] 韩彦琪,刘耀晨,武琦,等.基于网络药理学的痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)机制研究[J].中草药,2020,51(11):2967-2976.

[10] 周学东,陈艳,林瑞.蒲公英炮制中总黄酮含量变化及对胃炎治疗分析[J].世界中医药,2020,15(23):3612-3616.

[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:39、232.

[12] 赖正权,艾伟鹏,胡震,等.木贼的质量标准提升研究[J].中国药房,2020,31(9):1080-1085.

[13] 刘利琴,彭潇,马雪,等.贵州产红孩儿药材的质量标准提升研究[J].中国药房,2020,31(12):1458-1462.

[14] 顾安娜,王亚茹,商云霞,等.鲜百合的质量控制研究[J].上海中医药杂志,2021,55(1):78-82.

[15] 薛紫鲸,郭利霄,郭梅,等.不同采收期祁艾化学成分差异性研究[J].中国中药杂志,2019,44(24):5433-5440.

[16] 曹斯琼,吴文平,罗宇琴,等.王不留行炮制前后的UPLC指纹图谱比较及刺桐碱和王不留行黄酮苷的含量测定[J].中国药房,2020,31(19):2365-2370.

[17] 谈梦霞,陈佳丽,邹立思,等.不同贮藏条件对麦冬药材质量的影响[J].中药材,2018,41(11):2592-2598.

[18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:353.

(收稿日期:2020-08-28 修回日期:2021-03-14)

(编辑:胡晓霖)