

茵陈标准汤剂量值传递规律研究

倪丽丽¹, 戴莹¹, 窦志华^{2*}, 王兆龙³, 周云中^{3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学南通中西医结合临床医学院, 江苏 南通 226006

3. 精华制药集团股份有限公司, 江苏 南通 226005

摘要: **目的** 研究茵陈标准汤剂的量值传递规律。**方法** 制备 15 批茵陈标准汤剂, HPLC 法建立标准汤剂及其原料饮片指纹图谱, 建立对照指纹图谱, 标定共有峰, 并进行相似度评价, 四级杆飞行时间串联质谱对共有峰进行鉴定, 对采用对照品比对确认的成分进行含量测定, 通过共有峰传递数及峰面积比值变化、指标成分转移率、出膏率对标准汤剂进行量值传递规律分析。**结果** 茵陈饮片和标准汤剂指纹图谱相似度均大于 0.9, 分别标定共有峰 16 个和 15 个, 共有峰个数传递率 93.75%, 采用对照品比对确认了共有峰中的 1-咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸、对羟基苯乙酮、1,3-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸 13 个成分, 在茵陈中首次检测到了咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷和黄酮二糖碳苷芹菜素-6,8-C-二葡萄糖苷, 标准汤剂和饮片共有峰面积比值与成分转移率呈现较好的正向直线关系, 新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸平均转移率超过 100%, 绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸平均转移率分别只有 47.59%和 22.33%, 提示标准汤剂制备过程中有机酸类成分可能发生了相互转化, 绿原酸可能部分转化成了隐绿原酸和新绿原酸, 3,5-二咖啡酰奎宁酸可能部分转化成了 1,3-二咖啡酰奎宁酸和 3,4-二咖啡酰奎宁酸, 芦丁、金丝桃苷平均转移率分别为 31.36%、28.36%, 其余成分平均转移率在 50%~70%, 标准汤剂平均出膏率为 19.76%。**结论** 研究揭示的茵陈标准汤剂量值传递规律为茵陈配方颗粒及含茵陈经典名方物质基准建立奠定了基础。**关键词:** 茵陈; 标准汤剂; 物质基准; 量值传递; 指纹图谱; 转移率; 出膏率; 新绿原酸; 隐绿原酸; 1,3-二咖啡酰奎宁酸; 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 绿原酸; 3,5-二咖啡酰奎宁酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2954-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.014

Study on law of quality value transmitting of *Artemisiae Scopariae Herba* standard decoction

NI Li-li¹, DAI Ying¹, DOU Zhi-hua², WANG Zhao-long³, ZHOU Yun-zhong³

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Nantong Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226006, China

3. Jinghua Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nantong 226005, China

Abstract: **Objective** To study the law of quality value transmitting of *Artemisiae Scopariae Herba* (ASH) standard decoction. **Methods** Fifteen batches of ASH standard decoction were prepared. Fingerprints of these 15 batches standard decoction and its raw pieces were determined by HPLC, the control fingerprints were established, the common peaks were calibrated and the similarity was evaluated. Components of common peaks were identified by Q-TOF/MS and the contents of components confirmed by reference substance were determined. The common peaks transfer number, peak area ratio, index components transfer rate and extraction rate were used to analyze the quality value transfer rule of standard decoction. **Results** The similarity of fingerprints of ASH and its

收稿日期: 2020-02-07

基金项目: 江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2018674); 江苏省中医药科技计划项目(YB201836); 南通市“226 工程”科研资助计划项目(201714)

作者简介: 倪丽丽, 在读硕士, 主要从事中药药效物质及质量评价研究。Tel: 18796181975 E-mail: 1321718162@qq.com

*通信作者 窦志华, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主任中药师, 主要从事中药药效物质及质量评价研究。

Tel: (0513)85116018 E-mail: zhihuadou@163.com

周云中, 硕士, 教授级高级工程师, 主要从事中药质量评价研究。Tel: (0513)85609154 E-mail: Zhouyunzhong@jhoa.net

standard decoction were greater than 0.9, 16 and 15 common peaks were calibrated respectively, and the transfer rate of the common peaks number was 93.75%. Thirteen components of the common peaks were confirmed by reference substance, including 1-caffeoylquinic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, cryptochlorogenic acid, *p*-hydroxyacetophenone, 1,3-dicaffeoylquinic acid, rutin, hyperoside, isoquercetin, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid. Caffeoylquinic acid glucoside and a di-*C*-glycoside named apigenin 6,8-di-*C*- β -*D*-glucoside were first detected in ASH. The ratio of the common peaks area of ASH standard decoction to that of ASH raw pieces showed a good positive linear relationship with the components transfer rate. The average transfer rates of neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 1,3-dicaffeoylquinic acid and 3,4-dicaffeoylquinic acid were more than 100%, while the average transfer rates of chlorogenic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid were only 47.59% and 22.33% respectively, suggesting that the organic acid components may be transformed into each other during the preparation of standard decoction, and part of chlorogenic acid may be transformed into cryptochlorogenic acid and neochlorogenic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid may be partially converted into 1,3-dicaffeoylquinic acid and 3,4-dicaffeoylquinic acid. The average transfer rates of rutin and hyperoside were 31.36% and 28.36%, respectively, and that of other components were between 50% and 70%. The average extraction rate of standard decoction was 19.76%. **Conclusion** The laws of quality value transmitting of ASH standard decoction revealed in this study laid a foundation for the establishment of the material reference of ASH formula granules and the classic prescriptions containing ASH.

Key words: *Artemisiae Scopariae Herba*; standard decoction; material reference; quality value transmitting; fingerprint; transfer rate; extraction rate; neochlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; 1,3-dicaffeoylquinic acid; 3,4-dicaffeoylquinic acid; chlorogenic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid

中药饮片标准汤剂是以中医理论为指导、临床应用为基础,参考现代提取方法,经标准化工艺制备而成的单味中药饮片水煎剂^[1]。标准汤剂提供参比标准,更能有效地反映中药饮片质量和临床用药本质^[2]。标准汤剂同时是中药配方颗粒和经典名方的物质基准^[3-6]。经典名方制剂研制分“经典名方物质基准”研制与制剂研制 2 个阶段;对汤剂而言,经典名方物质基准又可称为“标准汤剂”或“标准煎液”^[4]。与国家药典委员会 2016 年发布的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》^[7]相比,国家药品监督管理局 2019 年发布的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》^[3]增加了量值传递研究要求。经典名方物质基准研究也应关注关键质量属性的量值传递^[8]。

茵陈为菊科植物滨蒿 *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. 或茵陈蒿 *Artemisia capillaries* Thunb. 的干燥地上部分^[9],因其疗效确切、用途较广泛而被收录于历代本草和历版《中国药典》^[10]。茵陈的化学成分主要有有机酸类、黄酮类及其他成分如对羟基苯乙酮等^[11-12]。

目前,茵陈标准汤剂的文献报道有 3 篇。田芳等^[13]制备了 12 批茵陈标准汤剂,测定并计算了绿原酸转移率及出膏率,建立了茵陈饮片和标准汤剂 HPLC 指纹图谱,标定共有峰 8 个,对照品比对指认了绿原酸等 7 个有机酸类成分。李雅静等^[14]制备了 14 批茵陈标准汤剂,进行了类似研究,指纹图谱

标定共有峰 11 个,指认了绿原酸和蒙花苷 2 个成分(后者未见有对照品比对)。张影等^[15]建立了一测多评同时测定 12 批茵陈标准汤剂中绿原酸等 8 个有机酸类成分含量的方法。3 篇文献的标准汤剂均未达到“不少于 15 批”的要求^[3,8],前 2 篇仅测定了绿原酸 1 个成分,忽视了对羟基苯乙酮等具有明确利胆活性^[12]的其他有效成分,指纹图谱标定的共有峰也偏少,且未采用质谱法鉴定,2 篇文献标准汤剂制备采用回流法,1 篇文献使用饮片 50 g,不符合“不得使用连续回流提取设备和每煎使用饮片量不少于 100 g”的要求^[3]。

鉴于此,本研究按要求制备了 15 批茵陈标准汤剂,建立了标准汤剂及原料饮片 HPLC 指纹图谱,分别标定共有峰 15 个和 16 个,采用液质联用方法对共有峰进行了鉴别,建立了采用对照品比对确认的 9 个有机酸类成分、3 个黄酮类成分及对羟基苯乙酮共计 13 个成分含量测定的方法,并进行了相关研究。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱系统,包括 e2695 分离单元、2998 PAD 检测器及 Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司;UFLC-DAD-Triple-Q-TOF/MS 系统,包括岛津 Shimadzu Prominence UFLC 型液相色谱仪,日本岛津公司;AB SCIEX Triple TOF 4600 质谱仪,1.6 版 PeakView 质谱分析软件,美国 AB Sciex 公司;SK5200H 超声波清洗器,上海科导超

声仪器有限公司; Sartorius BT 25S 型电子天平, 德国赛多利斯公司。

对照品对羟基苯乙酮(批号 11897-201602, 质量分数 $\geq 99.9\%$)购自中国食品药品检定研究院; 绿原酸(批号 CHB170713, 质量分数 $\geq 98\%$)、新绿原酸(批号 CHB170914, 质量分数 $\geq 98\%$)、隐绿原酸(批号 CHB170828, 质量分数 $\geq 98\%$)、1-咖啡酰奎宁酸(批号 CHB170525, 质量分数 $\geq 98\%$)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(批号 CHB160620, 质量分数 $\geq 98\%$)、3,4-二咖啡酰奎宁酸(批号 CHB160725, 质量分数 $\geq 98\%$)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 CHB171013, 质量分数 $\geq 98\%$)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 CHB160726, 质量分数 $\geq 98\%$)、咖啡酸(批号 CHB160907, 质量分数 $\geq 98\%$)、芦丁(批号 CHB170303, 质量分数 $\geq 98\%$)、异槲皮苷(批号 CHB160912, 质量分数 $\geq 98\%$)、金丝桃苷(批号 CHB160904, 质量分数 $\geq 98\%$)购自成都克洛玛生物科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 美国 TEDIA 公司; 娃哈哈饮用纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

15 批茵陈饮片购自国内地市级以上中医院, 经南通市食品药品监督管理局龚旭东主任中药师鉴定, 其基原均为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaries* Thunb., 具体信息见表 1。

表 1 茵陈饮片信息

Table 1 Information of ASH

编号	批号	产地	生产企业
YP1	171208	河南	南通三越中药饮片有限公司
YP2	2017091402	江苏	盐城市中药饮片有限公司
YP3	1712176	山西	安徽毫药千草国药股份有限公司
YP4	171201	山西	安徽省万生中药饮片有限公司
YP5	17051814	山西	安徽协和成药业饮片有限公司
YP6	20171201	河北	河北凯达药业有限公司
YP7	170921	陕西	浙江桐君堂中药饮片有限公司
YP8	180109	江苏	南通三越中药饮片有限公司
YP9	17110102	河南	郑州瑞龙制药股份有限公司
YP10	151110	河南	南通三越中药饮片有限公司
YP11	21118001	河北	河北仁心药业有限公司
YP12	180302	山西	安徽省万生中药饮片有限公司
YP13	180306	河南	江西江中中药饮片有限公司
YP14	170501	山东	湖南省南国药都中药饮片有限公司
YP15	180308	河南	南通三越中药饮片有限公司

2 方法与结果

2.1 茵陈标准汤剂及溶液的制备

2.1.1 茵陈标准汤剂的制备 称取茵陈饮片各 100 g, 煎煮 2 次, 一煎加水 12 倍, 浸泡 30 min, 武火煮沸, 文火保持微沸 30 min, 趁热 4 层纱布滤过; 二煎加水 10 倍, 武火煮沸, 文火保持微沸 20 min, 趁热 4 层纱布滤过; 合并 2 次煎液, 50 °C 真空减压浓缩至 500 mL, 即得生药质量分数为 0.2 g/mL 的茵陈标准汤剂, 与表 1 中饮片编号对应的标准汤剂编号为 TJ1~TJ15。

2.1.2 茵陈标准汤剂供试品溶液的制备 精密量取 1 mL 茵陈标准汤剂, 置 50 mL 量瓶, 加 50% 甲醇 48 mL 左右, 超声处理(功率 200 W, 频率 53 kHz) 30 min, 放冷, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 茵陈饮片供试品溶液的制备 将茵陈饮片粉碎成粉末, 过四号筛, 取粉末约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇 45 mL 左右, 其余同“2.1.2”项操作。

2.1.4 成分鉴定用混合对照品溶液的制备 取 1-咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮、1,3-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品适量, 精密称定, 加入 50% 甲醇溶解, 稀释并混匀, 配制成质量分数分别为 3.34、1.29、48.08、1.91、0.47、0.76、0.44、0.63、2.08、0.73、1.26、30.58、3.41 $\mu\text{g/mL}$ 的成分鉴定用混合对照品溶液。

2.1.5 含量测定用混合对照品溶液的制备 精密称取 4,5-二咖啡酰奎宁酸 5.28 mg 置 10 mL 量瓶中, 1-咖啡酰奎宁酸 5.58 mg、新绿原酸 5.15 mg、绿原酸 20.04 mg、隐绿原酸 5.09 mg、3,4-二咖啡酰奎宁酸 4.98 mg、3,5-二咖啡酰奎宁酸 12.07 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 对羟基苯乙酮 5.08 mg 置 50 mL 量瓶中, 咖啡酸 5.07 mg、1,3-二咖啡酰奎宁酸 4.97 mg、金丝桃苷 5.54 mg、异槲皮苷 5.42 mg, 分别置 100 mL 量瓶中, 芦丁 5.05 mg 置 200 mL 量瓶中, 分别加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 分别配成以上 13 种对照品储备液; 分别精密吸取金丝桃苷储备液 0.4 mL, 新绿原酸储备液、3,4-二咖啡酰奎宁酸储备液和 4,5-二咖啡酰奎宁酸储备液各 0.5 mL, 隐绿原酸储备液和对羟基苯乙酮储备液各 0.6 mL, 咖啡酸储备液 0.75 mL, 芦丁储备液 0.8 mL, 1-咖啡酰奎

宁酸储备液、绿原酸储备液、异槲皮苷储备液和3,5-二咖啡酰奎宁酸储备液各1.0 mL, 1,3-二咖啡酰奎宁酸储备液1.5 mL, 置20 mL量瓶中, 加50%甲醇至刻度, 摇匀, 配制成含量测定用混合对照品工作液, 取该工作液分别稀释2、5、10倍, 配成含量测定用混合对照品系列溶液。

2.2 指纹图谱的建立及分析

2.2.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~35 min, 5%~10%乙腈; 35~65 min, 10%~25%乙腈; 65~67 min, 25%~90%乙腈; 60~80 min, 90%乙腈; 体积流量1 mL/min; 柱温30 ℃; 检测波长254 nm。

2.2.2 质谱条件 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度条件同“2.2.1”项。DuoSpray离子源, ESI电离方式, 负离子模式检测。离子源温度550 ℃, 离子源喷射电压-4 500 V, 雾化气(Gas 1) 60 psi (1 psi=6.895 kPa), 加热气(Gas 2) 60 psi, 气帘气(CUR) 35 psi。采用TOFMS-IDA-10MS/MS信息采集方式获取质谱信息, 其参数设置如下: 一级质谱解簇电压(DP) -80 V, 碰撞能量(CE) 为-10 eV, TOF-MS 累计时间为250 ms, 母离子扫描范围为105~1 500; 二级质谱子离子扫描范围为50~1 500, CE 为-35 eV, 碰撞能量扩展(CES) 为15 eV^[16]。

2.2.3 精密度试验 精密吸取 TJ1 供试品溶液 30 μL 连续进样 6 次, 记录各共有峰保留时间及峰面积, 以4号峰(绿原酸)为参照峰, 计算其他共有峰与参照峰的相对保留时间(RRT)和相对峰面积(RPA)的RSD, 结果RRT的RSD均≤0.19%, RPA的RSD均≤4.47%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取 TJ1 供试品溶液 30 μL, 分别于制备后0、6、12、18、24、36 h进样测定, 同“2.2.3”项下方法分析。结果RRT的RSD均≤0.23%, RPA的RSD均≤4.93%, 表明供试品溶液在36 h内稳定。

2.2.5 重复性试验 精密量取6份 TJ1, 每份1 mL, 按“2.1.2”项下方法制备成6个供试品溶液, 各精密吸取30 μL进样测定, 同“2.2.3”项下方法分析。结果RRT的RSD均≤0.18%, RPA的RSD均≤3.93%, 表明样品处理方法的重复性较好。

2.2.6 指纹图谱测定及对照指纹图谱的建立 分别精密吸取 YP1~YP15、TJ1~TJ15 供试品溶液各 30

μL 注入 Waters Alliance 高效液相色谱系统测定, 将指纹图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012版)》, 分别以 YP1 和 TJ1 指纹图谱作为参照谱, 使用中位数进行自动匹配, 加以多点校正, 生成茵陈饮片和标准汤剂的对照指纹图谱, 分别标定共有峰16个和15个。记录各批次饮片和标准汤剂指纹图谱共有峰的保留时间及峰面积, 以4号峰(绿原酸)为参照峰计算其他共有峰与参照峰的RRT, 计算标准汤剂与饮片相应批次各共有峰峰面积的比值(标准汤剂峰面积/饮片峰面积)。见图1和表2、3。

2.2.7 指纹图谱的相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012版)》分别对15批茵陈饮片和标准汤剂指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价, 结果均>0.9, 提示茵陈饮片质量总体稳定, 也提示标准汤剂的制备工艺稳定、可行。见表4。

2.2.8 共有峰的鉴定 分别精密吸取 YP1、TJ1 供试品溶液及成分鉴定用混合对照品溶液各20 μL, 注入 UFLC-DAD-Triple-Q-TOF/MS 系统测定, 提取总离子流图(图2), 根据准分子离子 [M-H]⁻ 信息判断并得到的一级质谱精确相对分子质量, 并根据产生的二级质谱碎片离子信息, 通过与对照品或文献数据比对, 结合在线检索 PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) 2 个数据库, 对茵陈饮片和标准汤剂共有峰进行成分鉴定, 结果见表5。除共有峰3、8、13外, 其余均通过对照品比对确认。

根据文献报道^[17-18], 3号峰推测为咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷, 以饮片的质谱数据为例(下同), 其一级质谱给出 m/z 515.140 6, 为准分子离子峰 [M-H]⁻, 二级质谱给出 m/z 353.088 9、323.076 8、191.055 2、161.023 7, 分别为 [M-H]⁻ 丢失葡萄糖(C₆H₁₀O₅)、丢失奎宁酸(C₇H₁₂O₆)、丢失葡萄糖和咖啡酰基(C₆H₁₀O₅+C₉H₆O₃)、丢失奎宁酸和咖啡酰基(C₇H₁₂O₆+C₉H₆O₃)而产生的碎片离子。从忍冬藤^[17]及忍冬的花蕾金银花^[18]中分离得到咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷已有文献报道, 而从茵陈中鉴定到该类成分为首次。

与文献数据^[19]比对发现, 8号峰的质谱数据符合黄酮二糖碳苷类成分的裂解规律, 且与芹菜素-6, 8-C-二葡萄糖苷的质谱数据完全一致, 其一级质谱产生准分子离子 m/z 593.153 5, 二级质谱主要产生

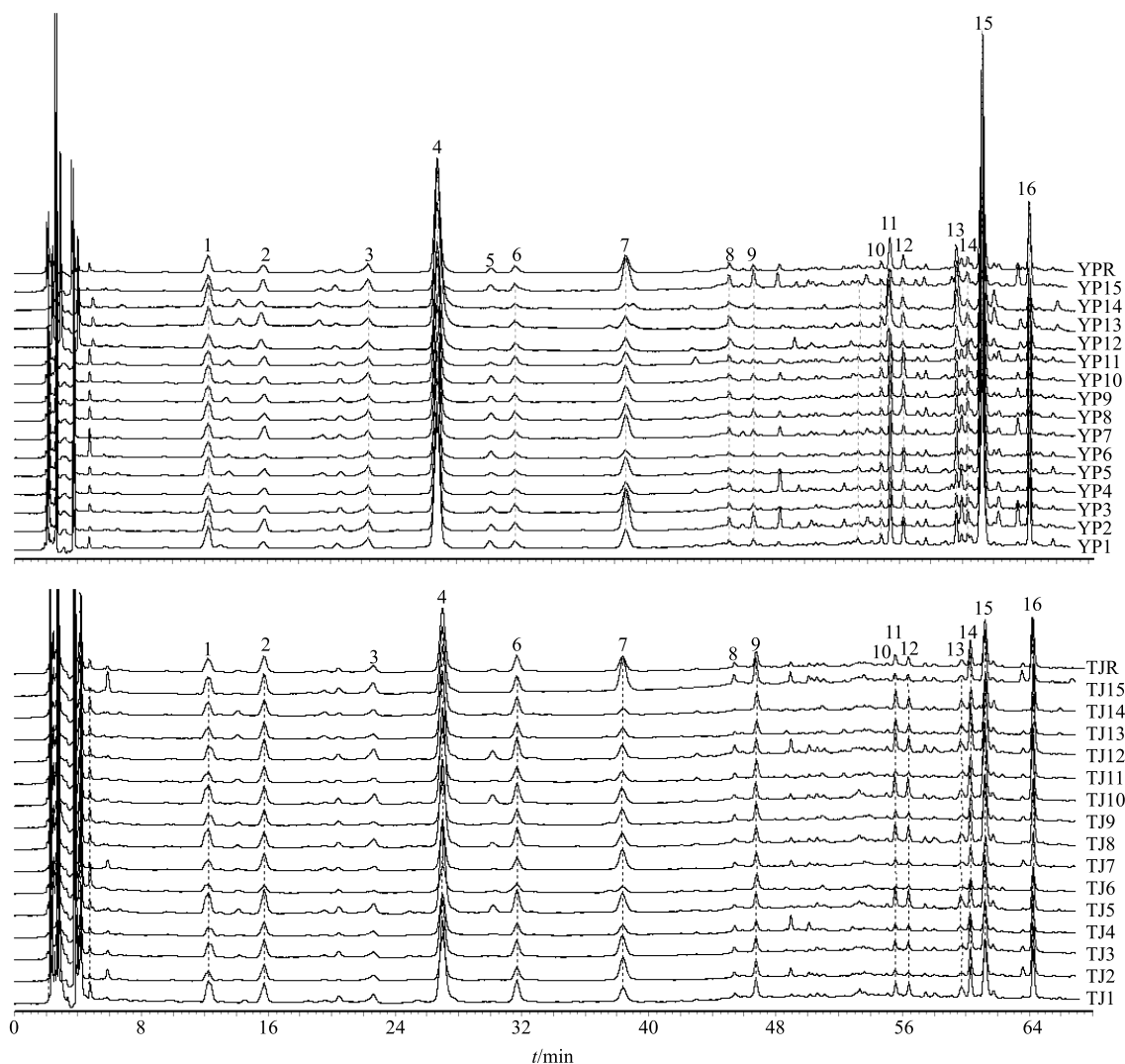


图 1 茵陈饮片 (YP1~YP15)、标准汤剂 (TJ1~TJ15) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (YPR、TJR)

Fig. 1 HPLC fingerprint of ASH raw pieces (YP1—YP15), ASH standard decoction (TJ1—TJ15) and their reference fingerprint (YPR, TJR)

表 2 茵陈饮片和标准汤剂指纹图谱共有峰的 RRT ($\bar{x} \pm s$)Table 2 RRT of fingerprint common peaks of ASH raw pieces and ASH standard decoction ($\bar{x} \pm s$)

峰号	RRT		峰号	RRT		峰号	RRT	
	饮片	标准汤剂		饮片	标准汤剂		饮片	标准汤剂
1	0.461±0.002	0.453±0.003	7	1.452±0.009	1.420±0.002	13	2.224±0.029	2.212±0.004
2	0.592±0.001	0.584±0.001	8	1.680±0.016	1.682±0.002	14	2.241±0.027	2.233±0.005
3	0.838±0.003	0.839±0.001	9	1.740±0.017	1.733±0.002	15	2.275±0.027	2.268±0.005
4	1.000±0.000	1.000±0.000	10	2.034±0.023	2.039±0.004	16	2.384±0.029	2.380±0.005
5	1.129±0.003		11	2.055±0.023	2.058±0.004			
6	1.187±0.002	1.174±0.001	12	2.086±0.024	2.089±0.004			

碳苷类的特征碎片离子： m/z 593.155 3、503.120 9、473.110 1、413.092 7、383.078 4，分别为母离子 $[M-H]^-$ 、母离子中的 1 个糖基脱去中性碎片 $C_3H_6O_3$ (90)、母离子中的 1 个糖基脱去中性分别

脱去 1 个中性碎片 $C_3H_6O_3$ (2×90)、母离子中的 2 个糖基分别脱去 $C_3H_6O_3$ 和 $C_4H_8O_4$ ($90+120$)。因此，8 号峰的成分推测为芹菜素-6,8-*C*-二葡萄糖苷，从茵陈中鉴定到该类成分也为首次。本课题组前期

表 3 茵陈标准汤剂与饮片的共有峰面积比值

Table 3 Ratio of common peaks area of ASH standard decoction to that of ASH raw pieces

TJ/YP	共有峰面积比值/%														
编号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16
1	94.24	259.52	48.55	46.66	271.55	60.10	118.42	242.23	28.31	21.89	46.81	89.90	251.56	23.80	67.01
2	40.33	92.41	92.28	30.10	135.77	48.25	49.27	88.69	17.94	15.64	32.97	9.17	141.63	13.38	54.41
3	88.82	182.01	48.34	53.53	188.06	71.94	101.34	212.46	34.45	29.00	55.66	49.42	199.77	26.68	65.48
4	75.25	166.69	113.64	36.70	234.88	61.81	91.74	296.67	15.60	18.37	39.63	24.91	214.17	13.46	55.77
5	108.36	275.19	97.59	60.52	508.98	90.82	103.84	351.97	33.44	30.62	70.18	152.25	347.23	27.66	91.37
6	46.36	117.41	34.12	29.27	142.28	44.90	111.67	510.41	20.52	29.67	56.62	57.09	83.84	9.89	32.58
7	64.74	102.90	87.89	32.81	138.75	70.55	69.83	202.50	17.90	16.61	32.70	21.86	137.42	11.91	43.10
8	95.58	178.24	72.24	57.36	205.69	69.45	85.51	187.38	38.99	40.19	59.39	101.62	170.38	33.86	80.11
9	65.48	151.19	116.60	35.58	178.56	76.36	86.88	416.94	16.98	16.54	28.65	58.18	108.63	14.08	38.91
10	95.95	199.87	109.19	60.83	262.66	76.78	73.38	292.13	33.00	36.54	57.26	97.52	239.99	32.84	76.17
11	63.62	130.15	98.48	35.17	136.49	55.88	83.89	472.12	22.11	19.89	33.71	46.24	82.83	13.35	42.22
12	128.07	207.86	96.45	65.19	239.00	87.53	137.75	370.08	63.54	54.57	157.69	80.75	449.54	32.41	117.13
13	51.15	84.38	43.29	25.90	171.39	37.64	39.53	403.35	16.84	16.24	36.53	92.42	79.00	9.89	46.59
14	54.53	325.40	32.11	36.03	254.76	57.00	78.24	383.10	18.64	27.44	67.85	64.28	193.97	16.65	129.49
15	105.07	143.15	70.83	62.06	256.88	85.98	72.80	149.16	24.11	30.80	68.47	51.39	163.50	25.47	68.29
平均	78.50	174.42	77.44	44.51	221.71	66.33	86.94	305.28	26.83	26.93	56.28	66.47	190.90	20.35	67.24

表 4 茵陈饮片和标准汤剂指纹图谱相似度评价结果

Table 4 Similarity evaluation results of fingerprint of ASH raw pieces and ASH standard decoction

饮片	相似度	标准汤剂	相似度
YP1	0.969	TJ1	0.990
YP2	0.981	TJ2	0.971
YP3	0.976	TJ3	0.980
YP4	0.984	TJ4	0.968
YP5	0.981	TJ5	0.983
YP6	0.973	TJ6	0.924
YP7	0.991	TJ7	0.984
YP8	0.992	TJ8	0.981
YP9	0.980	TJ9	0.973
YP10	0.994	TJ10	0.971
YP11	0.984	TJ11	0.996
YP12	0.958	TJ12	0.945
YP13	0.968	TJ13	0.994
YP14	0.938	TJ14	0.992
YP15	0.919	TJ15	0.973

采用对照品比对, 共有峰 13 鉴定为槲皮素-3-*O*-鼠李糖苷^[20]。

2.2.9 指纹图谱量值传递分析 茵陈饮片指纹图谱 16 个共有峰中除 5 号峰外的 15 个传递到标准汤剂,

共有峰个数传递率为 93.75%。表 2 中所有 RRT 的 RSD 最大为 1.30%, 提示各批次间饮片和标准汤剂指纹图谱共有峰的 RRT 变异都很小; 将饮片和标准汤剂 2 组 RRT 数据的均值 (每组 15 个, 剔除 5 号峰数据) 采用 SPSS Statistics 20 统计软件包进行配对样本 *t* 检验, 结果为 $t=2.361$, $P=0.33>0.05$, 表明两者的差异无统计学意义, 即饮片和标准汤剂指纹图谱相关共有峰的 RRT 基本一致, 共有峰鉴定结果也表明标准汤剂指纹图谱与饮片相同 RRT 的色谱峰为同一成分。因此, 从定性角度分析, 茵陈饮片的质量属性较好地通过指纹图谱传递到了标准汤剂。

由“2.1.1”~“2.1.3”项可知, 标准汤剂和饮片供试品溶液含生药的质量分数相同, 且指纹图谱测定进样量均为 30 μ L, 因此, 指纹图谱共有峰面积比值可一定程度反映量值传递。由表 3 可知, 平均峰面积比值最小的为 15 号峰 (3,5-二咖啡酰奎宁酸), 仅为 20.35%; 10 号峰 (芦丁)、11 号峰 (金丝桃苷) 分别为 26.83%、26.93%, 4 号峰 (绿原酸) 为 44.51%; 4 个共有峰平均峰面积比值超过 100%, 最高的 9 号峰 (1,3-二咖啡酰奎宁酸) 为 305.28%, 其次分别为 6 号峰 (隐绿原酸) 221.71%、14 号峰 (3,4-二咖啡酰奎宁酸) 190.90%、2 号峰 (新绿原酸)

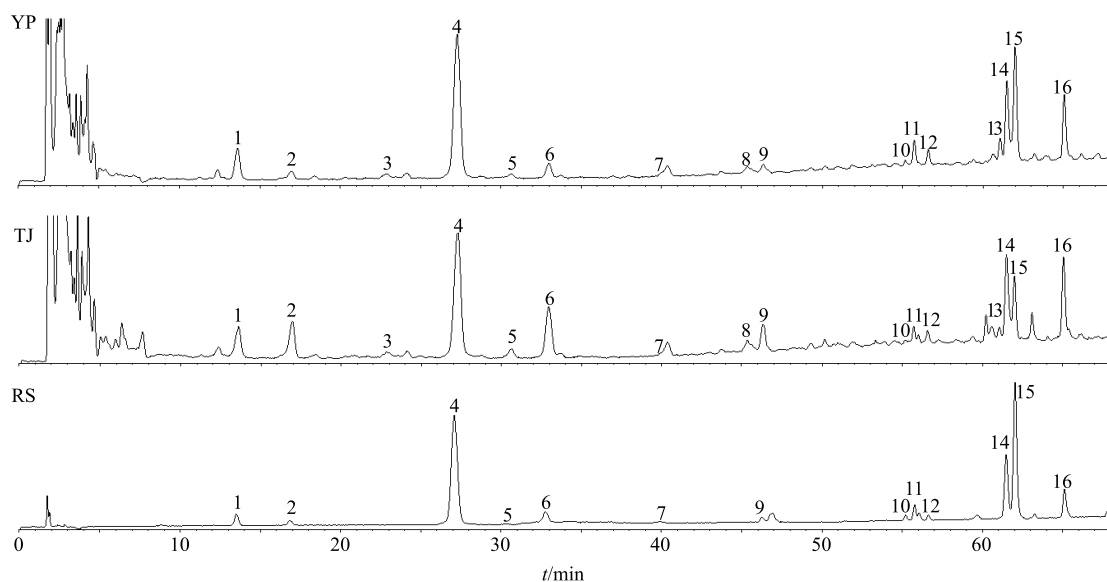


图 2 茵陈饮片 (YP)、标准汤剂 (TJ) 及混合对照品 (RS) 总离子流图 (负离子模式)

Fig. 2 TIC of ASH raw pieces (YP), ASH standard decoction (TJ) and mixed reference substances (RS) (negative ion mode)

表 5 茵陈饮片和标准汤剂指纹图谱共有峰 Q-TOF/MS 鉴定结果

Table 5 Q-TOF/MS identification results of common peaks in ASH raw pieces and ASH standard decoction fingerprints

峰号	t_R/min	分子式	饮片			标准汤剂			化合物名称	化合物种类
			$[M-H]^-$ 理论值	$[M-H]^-$ 实际值	误差 ($\times 10^{-6}$)	$[M-H]^-$ 实际值	误差 ($\times 10^{-6}$)			
1	13.525	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 8	353.088 5	2.0	353.089 0	3.4	1-咖啡酰奎宁酸	有机酸类	
2	16.933	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 8	353.088 5	2.0	353.088 9	3.1	新绿原酸	有机酸类	
3	22.909	$C_{22}H_{28}O_{14}$	515.140 6	515.140 9	0.5	515.142 4	3.4	咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷	有机酸类	
4	27.281	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 8	353.088 6	2.2	353.089 3	1.2	绿原酸	有机酸类	
5	30.533	$C_9H_8O_4$	179.035 0	179.035 8	4.6			咖啡酸	有机酸类	
6	32.916	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 8	353.088 3	1.4	353.089 4	4.5	隐绿原酸	有机酸类	
7	39.703	$C_8H_8O_2$	135.045 2	135.045 7	4.0	135.045 9	5.5	对羟基苯乙酮	其他类	
8	45.515	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.151 2	593.153 5	3.9	593.151 3	0.2	芹菜素-6,8-C-二葡萄糖苷	黄酮类	
9	46.316	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.119 5	515.120 1	1.2	515.121 8	4.5	1,3-二咖啡酰奎宁酸	有机酸类	
10	55.161	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.146 1	609.147 5	2.3	609.147 0	1.5	芦丁	黄酮类	
11	55.657	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.088 2	463.089 0	1.7	463.090 2	4.3	金丝桃苷	黄酮类	
12	56.590	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.088 2	463.089 6	3.0	463.090 3	4.5	异槲皮苷	黄酮类	
13	61.037	$C_{21}H_{20}O_{11}$	477.093 3	477.093 9	1.4	477.093 9	1.4	槲皮素-3-O-鼠李糖苷	黄酮类	
14	61.495	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.119 5	515.122 0	4.9	515.121 9	4.7	3,4-二咖啡酰奎宁酸	有机酸类	
15	61.913	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.119 5	515.121 2	3.3	515.121 9	4.7	3,5-二咖啡酰奎宁酸	有机酸类	
16	64.996	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.119 5	515.121 5	3.9	515.121 2	3.3	4,5-二咖啡酰奎宁酸	有机酸类	

174.42%，其余共有峰峰面积比值均在 50%~90%。

2.3 13 个成分含量测定方法的建立及转移率分析

2.3.1 色谱条件 对羟基苯乙酮、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷检测波长 254 nm，绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、1-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、

4,5-二咖啡酰奎宁酸检测波长 324 nm，其他同“2.2.1”项。该条件下的茵陈饮片、标准汤剂及混合对照品色谱图见图 3。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取含量测定用混合对照品系列溶液各 10 μL ，含量测定用混合对照品工作液 10、20、30、40 μL 进样测定，以峰面积

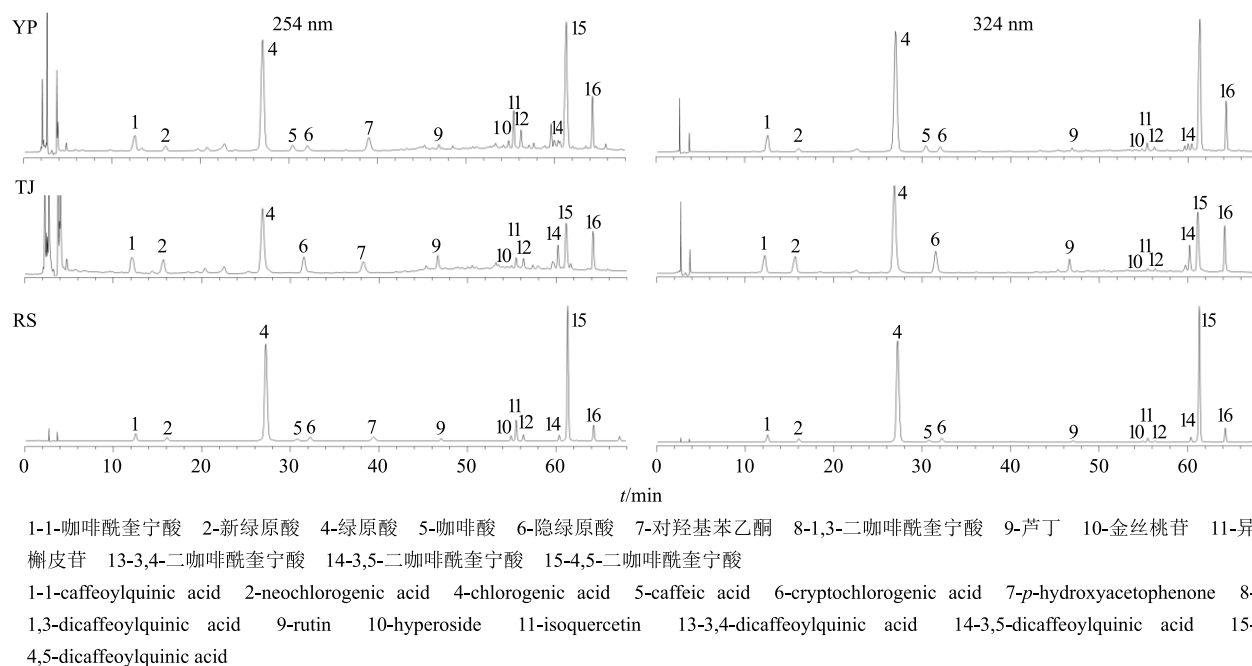


图 3 茵陈饮片 (YP)、标准汤剂 (TJ) 及混合对照品 (RS) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 Chromatograms of ASH raw pieces (YP), ASH standard decoction (TJ) and mixed reference substances (RS)

(Y) 对进样量 (X) 进行回归处理, 得 13 个成分的回归方程及线性范围, 分别为 1-咖啡酰奎宁酸 $Y=2\,727\,992\,X-19\,951$, $r=0.999\,9$, 线性范围 11.16~446.4 ng; 新绿原酸 $Y=2\,596\,569\,X-8\,979$, $r=0.999\,8$, 线性范围 5.15~206 ng; 绿原酸 $Y=3\,082\,489\,X-85\,406$, $r=0.999\,9$, 线性范围 40.08~1\,603.2 ng; 咖啡酸 $Y=5\,185\,155\,X-8\,600$, $r=0.999\,7$, 线性范围 1.901\,25~76.05 ng; 隐绿原酸 $Y=2\,550\,317\,X-10\,641$, $r=0.999\,9$, 线性范围 6.108~244.32 ng; 对羟基苯乙酮 $Y=2\,964\,041\,X-8\,403$, $r=0.999\,0$, 线性范围 3.048~121.92 ng; 1,3-二咖啡酰奎宁酸 $Y=2\,984\,967\,X-10\,539$, $r=0.999\,6$, 线性范围 3.727\,5~149.1 ng; 芦丁 $Y=1\,762\,687\,X-1\,495$, $r=0.999\,4$, 线性范围 1.01~40.4 ng; 金丝桃苷 $Y=2\,247\,955\,X-1\,710$, $r=0.999\,8$, 线性范围 1.108~44.32 ng; 异槲皮苷 $Y=2\,179\,328\,X-4\,643$, $r=0.999\,7$, 线性范围 2.71~108.4 ng; 3,4-二咖啡酰奎宁酸 $Y=1\,895\,746\,X-8\,116$, $r=0.999\,7$, 线性范围 4.98~199.2 ng; 3,5-二咖啡酰奎宁酸 $Y=2\,151\,237\,X-34\,458$, $r=0.999\,9$, 线性范围 24.14~965.6 ng; 4,5-二咖啡酰奎宁酸 $Y=2\,196\,013\,X-18\,686$, $r=0.999\,8$, 线性范围 13.2~528 ng。

2.3.3 精密度试验 分别精密量取含量测定用混合对照品工作液 10 μL , 连续 6 次进样测定, 记录对羟基苯乙酮、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷 254 nm

及 1-咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸 324 nm 下的峰面积积分值, 计算 RSD, 结果分别为 3.46%、3.29%、2.66%、0.98%、0.59%、1.03%、0.48%、1.92%、1.25%、0.63%、1.26%、1.42%、1.37%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 提取“2.2.4”项下测定的 254、324 nm 色谱图, 按“2.2.3”项下方法记录除咖啡酸外的 12 个成分的峰面积积分值, 计算 RSD, 结果分别为 4.37%、2.67%、3.42%、3.64%、3.00%、3.59%、2.39%、2.67%、2.95%、3.67%、2.82%、3.10%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 提取“2.2.5”项下测定的 254、324 nm 色谱图, 同“2.2.4”项纪录各成分的峰面积积分值, 代入回归方程计算 6 次测定的各成分的平均质量分数及其 RSD, 结果 12 个成分的平均质量分数分别为 0.050、0.008、0.025、0.027、0.171、0.175、0.833、0.226、0.078、0.194、0.504、0.287 mg/mL, RSD 分别为 2.31%、4.02%、3.32%、2.31%、1.77%、1.71%、1.11%、1.54%、1.57%、3.30%、2.22%、2.43%, 表明样品处理方法的重复性较好。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取编号为 TJ1 的茵陈标准汤剂 6 份, 每份 0.25 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用移液枪分别精密添加“2.1.5”项下配制的 1-咖啡

酰奎宁酸储备液 250 μL 、新绿原酸储备液 200 μL 、绿原酸储备液 55 μL 、隐绿原酸储备液 180 μL 、对羟基苯乙酮储备液 170 μL 、1,3-二咖啡酰奎宁酸储备液 350 μL 、芦丁储备液 15 μL 、金丝桃苷储备液 55 μL 、异槲皮苷储备液 125 μL 、3,4-二咖啡酰奎宁酸储备液 160 μL 、3,5-二咖啡酰奎宁酸储备液 180 μL 、4,5-二咖啡酰奎宁酸储备液 95 μL ，加 50% 甲醇至 24 mL 左右，按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液，分别精密吸取 30 μL 进样测定并计算以上 12 个成分的加样回收率及其 RSD，结果平均回收率分别为 103.34%、97.58%、104.87%、94.99%、97.37%、100.45%、98.44%、95.01%、97.82%、103.44%、101.96%、103.18%，RSD 分别为 3.47%、3.00%、1.96%、4.39%、2.87%、1.32%、1.94%、2.81%、1.80%、3.18%、4.17%、2.21%。

2.3.7 样品含量测定、转移率计算及分析 提取“2.1.6”项下测定的 YP1~YP15、TJ1~TJ15 的 254、324 nm 色谱图，同“2.2.4”项记录各成分的峰面积积分值，代入回归方程计算样品中各成分的含量。结果见表 7、8。

成分转移率计算：转移率 = $wv/(WvM)$ ，其中， w 表示标准汤剂中成分的质量分数 (mg/mL)， v 表示标准汤剂体积 (mL)， W 表示标准汤剂生药含量

(g/mL)， M 表示饮片成分的质量分数 (mg/g)。计算结果表明，平均转移率最低的为 3,5-二咖啡酰奎宁酸，仅 22.33%；芦丁、金丝桃苷分别为 31.36%、28.36%，绿原酸为 47.59%；4 个成分平均转移率超过 100%，最高的新绿原酸为 241.58%，其次分别为隐绿原酸 209.09%、1,3-二咖啡酰奎宁酸 191.10%、3,4-二咖啡酰奎宁酸 162.61%；其余成分平均转移率均在 50%~70%。12 个成分转移率均符合“转移率可接受的范围为均值加减 3 倍 SD ($\bar{x} \pm 3s$) (或均值的 70%~130%)”的要求^[3]。结果见表 9。

比较表 9 与表 3 数据发现，成分转移率与标准汤剂和饮片相关共有峰的峰面积比值基本一致，分别将 12 个成分（咖啡酸除外）的 15 批标准汤剂的转移率和相应共有峰面积比值采用 SPSS Statistics 20 统计软件包进行双变量相关分析，结果（表 10）表明，除 9 号峰 1,3-二咖啡酰奎宁酸（Pearson 相关系数为 1.336， $P=0.221>0.05$ ）外，其余各组数据的 Pearson 相关系数均 ≥ 0.8 ， P 值均 $=0.000<0.01$ ，提示标准汤剂与饮片共有峰面积比值和成分转移率呈现较好的正向直线关系。

2.4 标准汤剂出膏率检测及分析

量取 15 批茵陈标准汤剂各 50 mL，置已恒定质量的蒸发皿中，水浴蒸干，105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥至质量

表 7 茵陈饮片中 13 个成分含量测定结果

Table 7 Results of determination of 13 components in ASH raw pieces

样品 编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)												
	1-咖啡酰 奎宁酸	新绿 原酸	绿原酸	咖啡酸	隐绿 原酸	对羟基 苯乙酮	1,3-二咖啡 酰奎宁酸	芦丁	金丝 桃苷	异槲 皮苷	3,4-二咖啡 酰奎宁酸	3,5-二咖啡 酰奎宁酸	4,5-二咖啡 酰奎宁酸
YP1	1.162	0.247	7.907	0.232	0.379	0.381	0.157	0.119	0.533	0.261	0.472	9.043	2.073
YP2	1.075	0.305	6.373	0.183	0.456	0.806	0.357	0.099	0.262	0.108	0.590	8.600	2.559
YP3	0.889	0.280	4.866	0.182	0.447	0.499	0.142	0.073	0.287	0.147	0.487	6.792	2.534
YP4	0.574	0.165	5.040	0.084	0.290	0.231	0.083	0.127	0.281	0.121	0.361	6.158	1.280
YP5	1.008	0.176	6.965	0.108	0.266	0.370	0.081	0.114	0.586	0.238	0.365	7.436	1.364
YP6	0.913	0.175	4.454	0.201	0.287	0.148	0.093	0.059	0.146	0.100	0.382	7.102	1.579
YP7	0.823	0.236	5.927	0.096	0.390	0.498	0.157	0.084	0.272	0.111	0.486	8.339	2.062
YP8	0.997	0.283	7.035	0.208	0.441	0.329	0.177	0.092	0.403	0.259	0.638	7.806	2.316
YP9	0.907	0.279	5.518	0.181	0.437	0.331	0.117	0.108	0.371	0.173	0.746	9.558	2.854
YP10	0.916	0.281	6.993	0.233	0.407	0.359	0.148	0.123	0.527	0.340	0.553	9.290	2.681
YP11	0.796	0.321	6.961	0.083	0.516	0.259	0.103	0.101	0.217	0.107	0.790	12.182	2.738
YP12	0.842	0.286	6.706	0.103	0.512	0.313	0.176	0.102	0.332	0.135	0.418	8.204	2.276
YP13	1.187	0.326	10.803	0.093	0.516	0.430	0.133	0.215	0.767	0.244	0.937	16.922	2.412
YP14	1.408	0.205	9.125	0.098	0.302	0.193	0.163	0.110	0.638	0.207	0.379	8.561	1.028
YP15	0.860	0.295	4.914	0.187	0.427	0.692	0.423	0.081	0.200	0.102	0.494	7.104	2.634

表 8 茵陈标准汤剂中 13 个成分含量测定结果

Table 8 Results of determination of 13 components in ASH standard decoction

样品 编号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)												
	1-咖啡酰 奎宁酸	新绿 原酸	绿原酸	咖啡酸	隐绿 原酸	对羟基 苯乙酮	1,3-二咖啡 酰奎宁酸	芦丁	金丝 桃苷	异槲 皮苷	3,4-二咖啡 酰奎宁酸	3,5-二咖啡 酰奎宁酸	4,5-二咖啡 酰奎宁酸
TJ1	0.167	0.170	0.817	—	0.221	0.048	0.078	0.008	0.024	0.027	0.190	0.491	0.281
TJ2	0.086	0.094	0.436	—	0.126	0.081	0.059	0.005	0.009	0.010	0.171	0.265	0.293
TJ3	0.125	0.130	0.555	—	0.165	0.074	0.050	0.006	0.018	0.018	0.181	0.401	0.344
TJ4	0.073	0.093	0.408	—	0.122	0.030	0.036	0.005	0.011	0.012	0.103	0.191	0.154
TJ5	0.174	0.180	0.912	0.040	0.234	0.068	0.063	0.009	0.037	0.035	0.168	0.452	0.249
TJ6	0.074	0.056	0.277	—	0.080	0.016	0.034	0.004	0.010	0.013	0.067	0.174	0.112
TJ7	0.087	0.089	0.428	—	0.118	0.072	0.047	0.004	0.010	0.010	0.127	0.229	0.189
TJ8	0.155	0.124	0.877	0.023	0.187	0.048	0.067	0.008	0.033	0.032	0.192	0.579	0.365
TJ9	0.091	0.109	0.423	—	0.142	0.052	0.045	0.005	0.013	0.012	0.145	0.303	0.227
TJ10	0.165	0.142	0.925	0.048	0.202	0.057	0.067	0.009	0.040	0.041	0.203	0.621	0.423
TJ11	0.088	0.103	0.525	—	0.144	0.031	0.047	0.006	0.010	0.010	0.129	0.362	0.234
TJ12	0.111	0.154	0.855	0.046	0.211	0.047	0.055	0.012	0.036	0.029	0.288	0.545	0.512
TJ13	0.095	0.098	0.578	—	0.138	0.032	0.041	0.008	0.026	0.018	0.137	0.369	0.211
TJ14	0.115	0.120	0.668	—	0.173	0.019	0.052	0.005	0.035	0.025	0.140	0.317	0.226
TJ15	0.149	0.126	0.650	—	0.165	0.120	0.107	0.005	0.013	0.015	0.196	0.387	0.368

表 9 茵陈标准汤剂中 12 个成分转移率及出膏率

Table 9 Transfer rate of 12 components and extraction rate of ASH standard decoction

样品 编号	转移率/%												出膏 率/%
	1-咖啡酰 奎宁酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿 原酸	对羟基 苯乙酮	1,3-二咖啡 酰奎宁酸	芦丁	金丝 桃苷	异槲 皮苷	3,4-二咖啡 酰奎宁酸	3,5-二咖啡 酰奎宁酸	4,5-二咖啡 酰奎宁酸	
TJ1	71.97	343.26	51.68	291.50	62.97	248.87	32.77	22.96	50.74	200.78	27.13	67.88	19.48
TJ2	40.09	154.00	34.18	137.73	50.10	81.84	23.90	17.79	44.21	145.21	15.40	57.23	19.88
TJ3	70.43	231.67	57.03	184.83	73.93	176.84	41.11	30.83	61.54	186.23	29.49	67.94	15.10
TJ4	63.81	283.02	40.43	210.79	65.86	213.60	20.33	20.25	48.57	143.22	15.51	60.28	20.36
TJ5	86.42	510.67	65.46	438.53	92.05	385.51	37.79	31.59	72.91	230.40	30.38	91.42	23.87
TJ6	40.31	158.71	31.14	139.23	54.06	181.21	30.19	32.98	64.81	87.95	12.23	35.53	20.42
TJ7	53.12	188.67	36.11	151.18	71.95	150.51	24.77	18.56	43.51	130.38	13.75	45.90	18.17
TJ8	77.93	219.52	62.31	212.38	72.11	188.38	43.93	41.40	62.58	150.43	37.08	78.73	21.94
TJ9	49.87	194.74	38.36	162.52	78.33	191.69	22.48	18.02	36.07	97.49	15.86	39.69	15.23
TJ10	90.11	251.84	66.13	248.21	78.87	226.40	37.09	37.57	59.91	183.62	33.43	78.87	22.63
TJ11	55.11	160.26	37.73	139.74	60.11	227.34	27.66	22.30	44.84	81.63	14.85	42.78	20.74
TJ12	65.70	268.85	63.72	206.14	75.67	156.29	57.57	53.60	109.31	344.91	33.19	112.45	10.41
TJ13	39.87	150.27	26.74	133.90	37.00	153.27	18.49	16.69	35.90	73.17	10.91	43.64	25.30
TJ14	41.01	293.84	36.62	286.58	48.48	158.01	21.52	27.69	59.16	184.66	18.49	109.79	21.83
TJ15	86.46	214.36	66.18	193.11	86.79	126.69	30.84	33.11	74.21	199.05	27.21	69.95	21.07
均值	62.15	241.58	47.59	209.09	67.22	191.10	31.36	28.36	57.89	162.61	22.33	66.81	19.76
SD	18.09	94.06	14.55	81.85	15.17	68.65	10.67	10.47	18.68	69.87	9.00	24.25	3.79

表 10 茵陈标准汤剂与饮片共有峰面积比值和成分转移率双变量相关分析结果

Table 10 Bivariate correlation analysis results of ratio of common peak area and component transfer rate between ASH standard decoction and ASH raw pieces

共有峰编号 (成分)	Pearson 相关系数	P	共有峰编号 (成分)	Pearson 相关系数	P
1 (1-咖啡酰奎宁酸)	0.851	0.000	10 (芦丁)	0.971	0.000
2 (新绿原酸)	0.800	0.000	11 (金丝桃苷)	0.996	0.000
4 (绿原酸)	0.992	0.000	12 (异槲皮苷)	0.954	0.000
6 (隐绿原酸)	0.954	0.000	14 (3,4-二咖啡酰奎宁酸)	0.947	0.000
7 (对羟基苯乙酮)	0.949	0.000	15 (3,5-二咖啡酰奎宁酸)	0.996	0.000
9 (1,3-二咖啡酰奎宁酸)	0.336	0.221	16 (4,5-二咖啡酰奎宁酸)	0.986	0.000

恒定,取出,置干燥器中冷却,称定质量,计算出膏率(干浸膏质量/制备 50 mL 标准汤剂的饮片质量)。每批标准汤剂重复 3 次试验,15 批茵陈标准汤剂的出膏率为 10.41%~25.30%,计算平均值为 19.76%, $\bar{x} \pm 3s$ 为 8.40%~31.12%,茵陈标准汤剂出膏率符合“ $\bar{x} \pm 3s$ (或均值的 70%~130%) 为出膏率的允许范围”的要求^[3],平均出膏率介于文献报道的 14.74%^[14]和 26.63%^[13]之间。结果见表 9。

3 讨论

3.1 检测波长选择

实验中采用 DAD 检测器对样品色谱图进行了 210~800 nm 扫描,提取了 3D 扫描图,发现 254 nm 下出峰最为全面,因此选择其作为指纹图谱的检测波长;但是,该波长下茵陈饮片色谱图中 3,4-二咖啡酰奎宁酸与附近的色谱峰分离度不好,提取各主要成分色谱峰紫外吸收光谱图发现,绿原酸等 9 个有机酸类成分在 216 nm 和 324 nm 附近吸收较强,芦丁等 3 个黄酮类化合物在 254 nm 和 353 nm 附近吸收较强,对羟基苯乙酮在 280 nm 附近吸收较强,但对羟基苯乙酮在 324 nm 吸收很弱,因此含量测定选择 324 nm 作为有机酸类成分检测波长,254 nm 作为其他 4 个成分检测波长,324 nm 波长下解决了 3,4-二咖啡酰奎宁酸分离度不好问题。以上分析从图 3 可以看出。

3.2 成分转移率

新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸及 3,4-二咖啡酰奎宁酸 4 个成分转移率超过 100%,绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸转移率偏低,尤其是 3,5-二咖啡酰奎宁酸和绿原酸,平均转移率分别只有 22.33%和 47.59%。其原因可能是以上成分具有共同母核奎宁酸(结构见图 4),加热煎煮及浓缩过程中发生了成分转化。受热温度和受热时间对茵陈水提药液中绿原酸含量具有显著

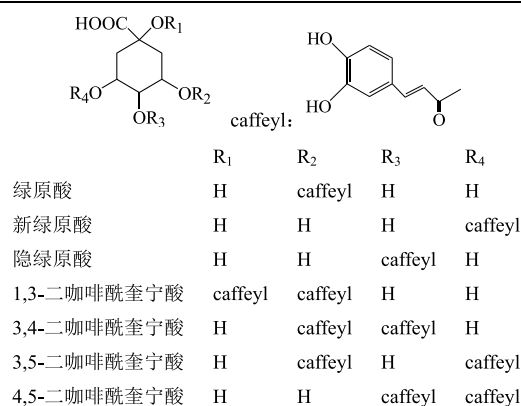


图 4 茵陈中主要有机酸类成分化学结构

Fig. 4 Chemical structures of main organic acids in ASH

影响^[21]。Yu 等^[22]研究发现,随着加热煎煮时间的延长,茵陈煎液中的绿原酸逐渐减少,4 h 后下降 43.2%,而新绿原酸和隐绿原酸则分别上升 3.07 和 2.03 倍;3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸分别下降 52.46 和 24.26%,而 1,3-二咖啡酰奎宁酸和 3,4-二咖啡酰奎宁酸则分别上升 4.04 和 1.71 倍,推测其原因为加热过程中发生了成分异构,部分绿原酸转化成了新绿原酸和隐绿原酸,部分 3,5-二咖啡酰奎宁酸转化成了 1,3-二咖啡酰奎宁酸和 3,4-二咖啡酰奎宁酸。本研究测定的茵陈标准汤剂中绿原酸的平均转移率 47.59%,介于文献报道的 44.53%^[13]和 50.99%^[14]之间,提示不同研究的结果基本一致,但由于可能存在同类成分在标准汤剂制备过程中发生相互转化,应尽可能测定并计算多成分的转移率,并对结果进行深入分析。

本课题组近期收集了 5 个企业生产的 28 批茵陈配方颗粒,采用本研究建立的方法测定了其中 13 个成分的含量,并折算为相当于各企业标示的生药中的含量,发现绿原酸的平均含量为本次测定的 15 批茵陈标准汤剂平均含量的 41.67%,而新绿原酸和隐绿原酸相应的比例则分别为 139.44%和

98.33%，提示在配方颗粒制备过程中由于加热干燥等原因，相关成分在进一步转化。由此可以认为，文献报道^[13-14]中的茵陈标准汤剂及国家药典委员会公示的茵陈配方颗粒统一标准^[23]沿用中国药典绵茵陈含量测定项下的绿原酸单个成分作为质量及转移率控制指标不合理。经计算，将绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸3个成分合计，15批茵陈标准汤剂平均转移率为62.78%，28批茵陈配方颗粒平均含量占15批茵陈标准汤剂平均含量的61.43%，因此建议将绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸3个成分合计作为茵陈标准汤剂及配方颗粒的质量控制指标。

研究中药饮片标准汤剂的出发点就是根据临床用药实际，作为参比标准来保障用药准确性和剂量一致性的^[1]，因此可忽视标准汤剂加工过程中的成分转化对临床疗效的影响，至于配方颗粒加工过程中的进一步转化是否影响临床疗效，有待进一步研究。

3.3 指纹图谱峰面积比值在量值传递分析中的应用

本研究结果显示，茵陈标准汤剂与饮片共有峰面积比值和成分转移率呈现较好的正向直线关系，提示研究过程中在对照品不足情况下，可以用共有峰比值来间接表征成分的转移率，从而将指纹图谱测定结果充分运用到标准汤剂质量属性表征，并且可大大降低多成分含量测定所需要的购买对照品的成本。

3.4 指纹图谱共有峰5未传递到标准汤剂

茵陈饮片指纹图谱共有峰5鉴定为咖啡酸，标准汤剂中仅部分批次检测到该成分，因此其指纹图谱未标定为共有峰（图1）。咖啡酸又名3,4-二羟基肉桂酸，是肉桂酸型酚酸中最易降解的一种单酸^[24]，温度对咖啡酸的提取结果影响最显著，超过40℃易造成咖啡酸降解^[25]，降解原因是发生了分解和聚合反应等^[26]。因此饮片指纹图谱共有峰5咖啡酸未传递到标准汤剂可能是因为该成分在加热煎煮及浓缩过程中发生了降解。

3.5 茵陈中鉴定的新成分

茵陈饮片和标准汤剂指纹图谱共有峰3推测为咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷，未见从茵陈中分离或鉴定到该类成分的文献报道。Yu等^[18]从忍冬的花蕾金银花中分离得到了5-O-[4'-O-(β-D-葡萄糖)咖啡酰]奎宁酸及2个新化合物3-O-[4'-O-(β-D-葡萄糖)咖啡酰]奎宁酸和4-O-[4'-O-(β-D-葡萄糖)咖啡酰]奎宁酸，结构均为咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷，并检索

文献发现此前只有咖啡、烟草、茄中存在5-O-[4'-O-(β-D-葡萄糖)咖啡酰]奎宁酸的记载。林永强等^[17]从忍冬藤中分离得到5-O-[4'-O-(β-D-葡萄糖)咖啡酰]奎宁酸，质谱检测给出的准分子离子峰[M-H]⁻ *m/z*的理论值为515.1406，与本研究测定结果完全一致。共有峰8的质谱数据与文献报道^[19]中的芹菜素-6,8-C-二葡萄糖苷质谱数据完全一致。目前尚未见茵陈中存在咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷和黄酮二糖碳苷类成分的报道，但需后续采用制备液相等方法分离到这2个成分，并采用结合核磁、红外等方法进一步确认。

3.6 茵陈的采收季节及香豆素类成分

《中国药典》规定茵陈的基原有滨蒿和茵陈蒿，并分为春季采收的“绵茵陈”和秋季采制的“花茵陈”^[9]。目前普遍认为茵陈中存在香豆素类成分^[11]，有的还认为是主要有效成分^[27]，但本研究建立的茵陈指纹图谱共有峰中未鉴定到该类成分，可能与采收季节有关，有研究发现，“绵茵陈”含绿原酸为主，几乎不含滨蒿内酯（6,7-二甲氧基香豆素），而“花茵陈”主要含滨蒿内酯^[28]，韩国研究人员从中国春季采收的茵陈中也未检测到滨蒿内酯^[29]。事实上，《中国药典》中“绵茵陈”和“花茵陈”的含量测定项也分别为绿原酸和滨蒿内酯^[9]。但中华中医药学会发布的《中药材商品规格等级 茵陈》（T/CACM 1021.198-2018）中提到“当前药材市场流通茵陈药材均为绵茵陈，未见有花茵陈销售”，因此香豆素类成分是否为茵陈的主要有效成分有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [2] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物 and 传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.
- [3] 国家药品监督管理局. 公开征求《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求（征求意见稿）》意见 [EB/OL]. [2019-11-08]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2138/359941.html>.
- [4] 国家药品监督管理局. 关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定的公告 [EB/OL]. [2018-05-29]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2093/228247.html>.
- [5] 陈素娟, 聂静, 张旗, 等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2173-2177.

- [6] 李学林, 王柯涵, 康 欢, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的黄柏配方颗粒汤剂与标准汤剂、传统汤剂对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 91-100.
- [7] 国家药典委员会. 关于征求《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求 (征求意见稿)》意见的通知 [EB/OL]. [2016-08-05]. <http://www.chp.org.cn/view/ff808081559d1ea301565ac24962560d?a=XWJX>.
- [8] 国家药品监督管理局. 公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求 (征求意见稿) 意见 [EB/OL]. [2019-03-22]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2101/335926.html>.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] 刘玉萍, 邱小玉, 刘 烨, 等. 茵陈的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2235-2241.
- [11] 曹锦花. 茵陈的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 489-494.
- [12] 叶 娉, 万 丽, 周 立, 等. HPLC 法测定滨蒿中对羟基苯乙酮 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 653-654.
- [13] 田 芳, 阮群珈, 石 星, 等. 茵陈饮片与茵陈标准汤剂的质量比较研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 98-102.
- [14] 李雅静, 孙 博, 朱广伟, 等. 基于传统煎药工艺的茵陈蒿饮片标准汤剂制备及质量标准研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1412-1416.
- [15] 张 影, 许华容, 李军山, 等. 基于一测多评法的茵陈标准汤剂中 8 种成分同时定量研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(9): 1661-1666.
- [16] 曹 瑞, 窦志华, 倪丽丽, 等. HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1100-1110.
- [17] 林永强, 郭东晓, 焦 阳, 等. 忍冬藤中咖啡酰奎宁酸葡萄糖苷的分离及含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 28-33.
- [18] Yu Y, Jiang Z B, Song W X, *et al.* Glucosylated caffeoylquinic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(3): 210-214.
- [19] 王璇璇, 李晓波, 彭崇胜. 2 种黄酮-6,8-C-二糖苷正、负离子模式下高分辨电喷雾质谱综合分析及其应用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4880-4887.
- [20] 曹 瑞. 茵陈蒿汤成分分析及组方药味质量评价研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [21] 江 滨, 王风云, 曾元儿, 等. 绵茵陈药材提取液中绿原酸稳定性影响因素考察 [J]. 中成药, 2007, 29(3): 359-362.
- [22] Yu F J, Qian H, Zhang J Y, *et al.* Simultaneous quantification of eight organic acid components in *Artemisia capillaris* Thunb. (Yinchen) extract using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high-resolution mass spectrometry [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 788-795.
- [23] 国家药典委员会. 关于中药配方颗粒品种试点统一标准的公示 [EB/OL]. [2019-11-08]. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080816e444b7f016e49cbaa380986?a=BZZY>.
- [24] 朱攀攀, 马亚琴, 窦华亭, 等. 超声局部效应对咖啡酸稳定性及抗氧化性的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(23): 12-17.
- [25] Ma Y Q, Chen J C, Liu D H, *et al.* Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound [J]. *Ultrason Sonochem*, 2009, 16(1): 57-62.
- [26] Sun Y J, Qiao L P, Ye X Q, *et al.* The sonodegradation of caffeic acid under ultrasound treatment: Relation to stability [J]. *Molecules*, 2013, 18(1): 561-573.
- [27] 李杨杨, 黄 成, 孟晓明, 等. 茵陈中 6,7-二甲氧基香豆素在 MDCK 模型中的吸收机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 973-977.
- [28] 韩 晋, 金 城, 刘太华, 等. 不同采收期和不同部位茵陈药材滨蒿内酯的含量测定与资源利用建议 [J]. 解放军药学学报, 2005, 21(2): 155-156.
- [29] Park K M, Li Y, Kim B, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis for quantitation of marker compounds of *Artemisia capillaris* Thunb. [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(12): 2153-2162.