

艾叶中主要化学成分的鉴定及其含量测定研究

兰晓燕¹, 朱龙波^{1,5}, 黄显章³, 刘大会⁴, 郝庆秀¹, 周利¹, 杨健¹, 郭兰萍¹, 张元^{1,2*}, 康利平^{1*}

1. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023

3. 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

4. 湖北中医药大学 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430065

5. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 鉴定艾叶 *Artemisiae Argyi Folium* 中主要化学成分的结构并建立其含量测定方法。方法 利用 UPLC-UV-Q/TOF 进行艾叶分析条件的优化, 在对 21 批艾叶分析的基础上, 确定其中紫外和质谱上主要的色谱峰, 利用精确相对分子质量和碎片离子鉴定其结构后, 利用对照品比对确定结构; 进一步采用 Waters Acquity I-ClassTM 液相色谱系统, Waters Acquity HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 乙腈-0.2%磷酸水为流动相, 体积流量 0.5 mL/min, 梯度洗脱, 柱温 40 °C, PDA 检测器, 检测波长为 326 nm, 建立艾叶中主要化学成分的含量测定方法。结果 推测鉴定了艾叶中 32 个主要化合物的结构, 利用对照品确定了其中 15 个化合物的结构, 并建立了其中 14 个化合物 (绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、咖啡酸、夏佛塔昔、芹菜素、高车前素、棕矢车菊素、异泽兰黄素、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮、蔓荆子黄素) 的 UPLC-UV 含量测定方法。14 个化合物的分离度良好, 稳定性和重复性良好, 且线性范围宽 (0.5~800.0 μg/mL)、线性较好 ($R^2>0.999$), 平均回收率在 94.88%~103.58%。结论 建立的艾叶中 14 个主要化合物的含量测定方法可以全面评价艾叶的质量。

关键词: 艾叶; UPLC-UV-Q/TOF; 绿原酸; 新绿原酸; 隐绿原酸; 异绿原酸 A; 异绿原酸 B; 异绿原酸 C; 咖啡酸; 夏佛塔昔; 芹菜素; 高车前素; 棕矢车菊素; 异泽兰黄素; 5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮; 蔓荆子黄素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7630-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.026

Study on identification and quantitation of main compounds in *Artemisiae Argyi Folium*

LAN Xiao-yan¹, ZHU Long-bo^{1, 5}, HUANG Xian-zhang³, LIU Da-hui⁴, HAO Qing-xiu¹, ZHOU Li¹, YANG Jian¹, GUO Lan-ping¹, ZHANG Yuan^{1, 2}, KANG Li-ping¹

1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Beijing Union University School of Biochemical Engineering, Beijing 100023, China

3. Henan Province Key Laboratory of Zhang Zhongjing Formulae and Herbs for Immunoregulation, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473000, China

4. Pharmacy Faculty, Hube University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

5. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To identify the structures of the main chemical constituents of *Artemisiae argyi Folium* and establish a method for their content determination. **Methods** UPLC-UV-Q/TOF was used to optimize the conditions for the analysis of *Artemisia argyi*. On the basis of the analysis of 21 batches of *Artemisia argyi Folium*, the main chromatographic peaks on ultraviolet and mass spectra were found. The

收稿日期: 2021-06-06

基金项目: 国家重点研发计划 (2020YFC1712700); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A05206); 中央本级重大增减支项目一名贵中药资源可持续利用能力建设 (2060302)

作者简介: 兰晓燕 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药质量研究。Tel: (010)64087964 E-mail: lanxy9@126.com

*通信作者: 康利平, 研究员, 主要从事中药分析和新资源开发研究。Tel: (010)64087964 E-mail: kang_liping21@163.com

张元, 副教授, 主要从事中药质量评价及功能性抗性淀粉的研究。Tel: (010)52272068 E-mail: zhangyuan333@126.com

structures were identified by accurate molecular weight and fragment ions. The structures were determined by comparison of standards. The structures were further determined by UPLC-UV and Waters Acquity I-Class™ solution. A method for content determination was established by using Waters Acquity HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), acetonitrile-0.2% phosphoric acid water as mobile phase, flow rate gradient elution at 0.5 mL/min, the column temperature was 40 °C, PDA detector, detection wavelength was 326 nm. **Results** The structures of the main compounds in 32 of *Artemisia argyi Folium* were identified, and 15 of them were identified by reference substances. The UPLC-UV method for simultaneous determination of 14 compounds (chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acids A-C, caffeic acid, chaffaloside, apigenin, plantain, cypermethrin, and isozelan yellow) in *Artemisia argyi Folium* were established. The 14 compounds have good separation, stability and repeatability, and wide linear range (0.5—800 μg/mL) and good linearity ($R^2>0.999$). The average recovery was 94.88%—103.58%. **Conclusion** The established method for the determination of 14 main compounds in *Artemisia argyi Folium* can evaluate the quality of *Artemisiae Argyi Folium*.

Key words: *Artemisia argyi Folium*; UPLC-UV-Q/TOF; chlorogenic acid; neochlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C; caffeic acid; chaffaloside; apigenin; plantain; cypermethrin; isozelan yellow

艾叶 *Artemisiae Argyi Folium* 为菊科蒿属植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶, 其性辛、温, 味苦, 归肝、脾、肾经, 具有温经止血、散寒止痛的功效, 主要治疗吐血、衄血、崩漏、月经过多、胎漏下血、少腹冷痛、经寒不调、宫冷不孕等疾病, 外用可以祛湿止痒^[1]。现代药理研究表明, 艾叶具有抗菌、抗病毒、平喘镇咳、祛痰、抗氧化、止血、抗凝血、护肝利胆、解热镇静、调血脂等作用^[2-4]。艾叶目前主要作为加工艾绒的材料用来灸疗, 灸疗时的热和芳香性气味是发挥药效的关键^[5], 所以大家更为关注其挥发性成分及燃烧后的艾烟等^[6-9]。艾叶作为中药配伍, 汤剂也是其主要用途, 所以非挥发性成分也应是艾叶中需关注的化学成分。文献研究表明, 绿原酸类、黄酮类及萜类等为其主要成分^[10-13], 且这些成分具有良好的药理活性^[14-18]。《中国药典》2020 年版中虽然以挥发油类成分作为艾叶的质控指标, 但笔者认为挥发性成分和燃烧学特征对艾绒(艾条)的质控较为关键^[19-21], 以非挥发性成分为指标进行艾叶的质控更为客观。一些学者进行了艾叶中绿原酸和黄酮类成分的含量测定研究^[22-25], 为艾叶的质量研究进行了有益探索。本研究采用 UPLC-UV-Q/TOF MS 串联分析了 21 批艾叶, 在确定艾叶紫外和质谱上共有色谱峰的同时, 利用精确相对分子质量和质谱裂解规律推测了共有峰的结构, 并利用对照品确定了 15 个化合物的确切结构, 进一步建立了这 14 个化合物的含量测定方法, 为艾叶的质量评价和控制研究提供了合理可控的方法。

1 仪器与材料

Waters Acquity I-Class UPLC™ 液相色谱仪串联

(包括二元高压溶剂管理器、自动进样器、柱温控制系统、PDA 检测器、Empower 3 工作站) Waters Xevo G2-S 高分辨质谱系统(美国 Waters 公司)。色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 和 BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。Mettler Toledo XS105DU 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司), 离心机(Eppendorf 公司, 德国), 超声波清洗器(SB-800 DTD, 宁波新芝生物科技股份有限公司)。甲醇(色谱纯, UN1230)和乙腈(色谱纯, UN1648)购自德国默克股份有限公司, 超纯水为超纯水系统自制(Thermo Barnstead Gen Pure UV/UF, 美国赛默飞公司)。

对照品新绿原酸(批号 906-33-2)、绿原酸(批号 327-97-9)、隐绿原酸(批号 905-99-7)、咖啡酸(批号 331-39-5)、夏佛塔昔(批号 51938-32-0)、异夏佛塔昔(批号 52012-29-0)、异绿原酸 B(批号 14534-61-3)、异绿原酸 A(批号 2450-53-5)、异绿原酸 C(批号 32451-88-0)、芹菜素(批号 520-36-5)、山柰酚(批号 520-18-3)、高车前素(批号 1447-88-7)、棕矢车菊素(批号 18085-97-7)、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮(批号 78417-26-2)、异泽兰黄素(批号 22368-21-4)、蔓荆子黄素(批号 479-91-4)质量分数均≥98%, 购自于北京融诚鑫德科技发展有限公司。

艾叶主要采自于湖北、河南、湖南等地, 经黄显章教授鉴定为菊科蒿属植物艾 *A. argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶, 具体样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

UPLC-UV 分析, 流动相为 0.2% 磷酸水溶液(A) -

表 1 艾叶样品信息

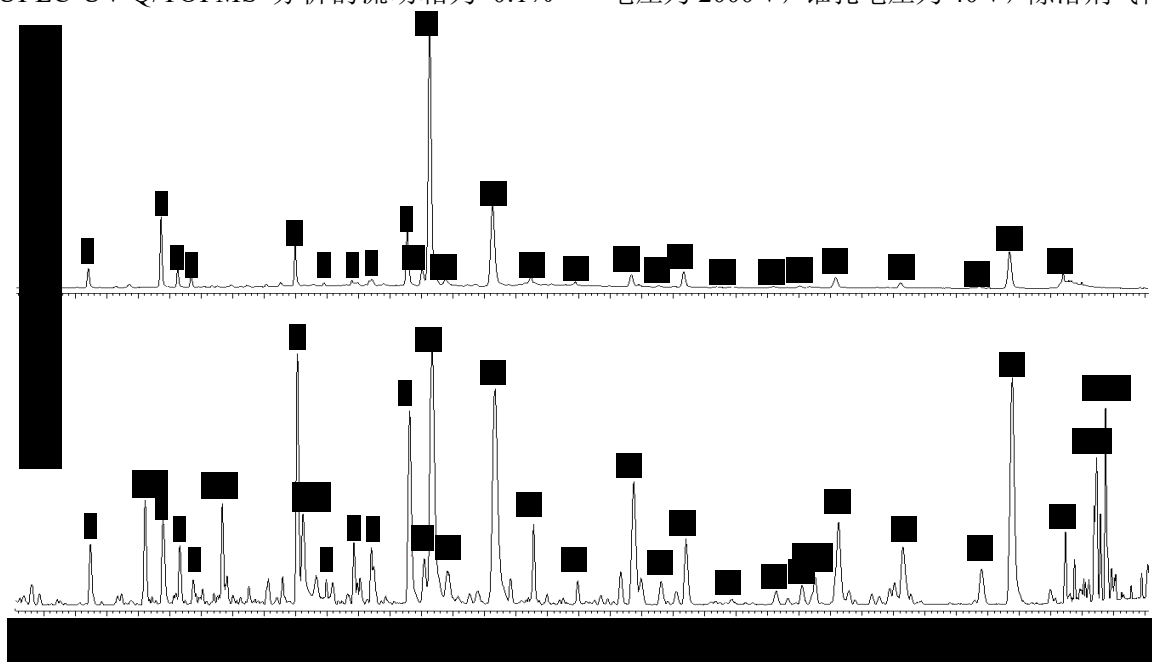
Table 1 Sources of 21 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

序号	采集地	采集时间	序号	采集地	采集时间
S1	河南汤阴	2015-06	S12	湖北襄阳	2018-06
S2	湖北蕲春	2016-09	S13	湖北襄阳	2018-06
S3	湖北襄阳	2018-06	S14	湖南汨雨	2018-06
S4	湖北随州	2018-06	S15	湖南汨雨	2018-06
S5	湖北蕲春	2016-06	S16	湖北蕲春	2018-06
S6	湖北孝感	2018-06	S17	湖北蕲春	2018-06
S7	河南南阳	2018-06	S18	湖南汨雨	2018-06
S8	湖北蕲春	2018-06	S19	湖南汨雨	2018-06
S9	湖北蕲春	2018-06	S20	湖北蕲春	2018-09
S10	湖北蕲春	2018-06	S21	湖北蕲春	2018-09
S11	湖北随州	2018-06			

乙腈 (B) 梯度洗脱: 0~0.2 min, 5% B; 0.2~0.8 min, 5%~10% B; 0.8~3.5 min, 10%~13% B; 3.5~4 min, 13%~15% B; 4~10 min, 15%~18% B; 10~10.5 min, 18%~19% B; 10.5~15.5 min, 19%~21.2% B; 15.5~19.5 min, 21.2%~32% B; 19.5~22.5 min, 32%~55% B; 22.5~23 min, 55%~98% B; 23~25 min, 98% B; 25~27 min, 5% B; 体积流量 0.5 mL/min, Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 检测波长 326 nm, 柱温 40 °C, 进样量 1 μL。色谱图见图 1-A。

UPLC-UV-Q/TOFMS 分析的流动相为 0.1%

甲酸水溶液 (A)-0.1%甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~0.3 min, 2%~5% B; 0.3~1.0 min, 5% B; 1.0~7.0 min, 5%~20% B; 7.0~9.0 min, 20% B; 9.0~9.5 min, 20%~25% B; 9.5~12.5 min, 25%~28% B; 12.5~18.0 min, 28%~40% B; 18.0~18.3 min, 40%~80% B; 18.3~21.0 min, 80%~98% B; 21.0~24 min, 98% B; 体积流量为 0.5 mL/min, Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), PDA 检测器, 柱温 40 °C, 进样量 1 μL。质谱采用 ESI 负离子模式, MS^E 采集模式。毛细管电压为 2000 V, 锥孔电压为 40 V, 除溶剂气体为氮



M1~M6 表示有较强的质谱信号但没有紫外吸收或很弱

M1-M6 represent strong signals in MS but no (or weak) signals in UV

图 1 艾叶提取物混合液 UPLC-UV (A) 和 UPLC-UV-Q/TOF MS (B) 比较图谱

Fig. 1 UV (A) and MS (B) chromatograms for mixed sample solution of *Artemisiae Argyi Folium* by UPLC-UV-Q/TOF MS

气, 900 L/h, 除溶剂温度为 450 °C, 离子源温度为 100 °C, 扫描范围为 m/z 50~1200, 碰撞气体: 氦气。低能量扫描时 trap 电压为 6 eV, 高能量扫描时 trap 电压为 50~70 eV。准确质量数用亮氨酸脑啡肽作校正液 (554.2620)。MassLynx 为操作系统, 质谱图见图 1-B。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、夏佛塔苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、芹菜素、高车前素、棕矢车菊素、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮、异泽兰黄素、蔓荆子黄素, 加入色谱甲醇超声溶解后, 转移至量瓶配制质量浓度依次为 0.77、0.768、0.798、0.77、0.818、0.79、0.824、0.766、0.758、0.808、0.742、0.776、0.782、0.800 mg/mL 的混合对照品母液, 并逐级稀释成 10 个质量浓度, 待用。

2.3 艾叶样品溶液的制备

精密称取不同艾叶样品各 200 mg, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 的甲醇 10 mL, 称定质量, 超声提取 60 min, 放置室温后, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 12 000×g 离心 15 min, 取每个样品的上清液经 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 续滤液转移到液相小瓶待定量分析。分别取相同量的 21 个样品溶液混合后作为质控的混样备用。

2.4 艾叶样品的 UPLC-UV-Q/TOF MS 分析

通过混合样品的 UV 和 MS 图谱, 可以紫外和质谱图上标示出主要共有的 26 个色谱峰 (峰 1~26), 另外质谱上还有响应较高的 6 个色谱峰在紫外色谱图上基本没有色谱峰 (M1~M6), 见图 1。为了推测鉴定这 32 个化合物的结构, 首先通过分析这些色谱峰的精确相对分子质量、碎片离子峰及其相对丰度、保留时间等信息并参考文献^[4,11-12,26-28], 推测了它们可能的结构, 主要是绿原酸和黄酮类化合物, 然后购买了 16 个对照品进行质谱和色谱的比对, 最终确定了 15 个化合物的结构, 推测了 11 个化合物的结构, 还有 6 个化合物缺少碎片信息没有鉴定可能的结构, 各化合物具体 LC-MS 数据见表 2。

绿原酸类化合物均有 m/z 191.05 [奎宁酸-H]⁻的碎片, 多有 m/z 179.03 [咖啡酸-H]⁻, 173.04 [191.05-H₂O]⁻、161.02 [179.03-H₂O]⁻、135.04 [179.03-CO₂]⁻的离子。咖啡酰基在奎宁酸上的取代位置不一样, 其在质谱上碎片离子稍有差异, 而且相互之间的离

子丰度具有显著差异: 奎宁酸 4 位有咖啡酰基取代时, m/z 173.04 的离子丰度较 m/z 161.02、179.03、191.05 高, 3 位取代时基本只有 m/z 191.05 的离子碎片, 5 位取代时 m/z 179.03、191.05 的离子碎片丰度均较高。

10.98 min 的色谱峰显示 m/z 677.150 5 [M-H]⁻的准分子离子峰, 说明这是个 3 咖啡酰基奎宁酸的化合物, m/z 515.119 0 [M-H-C₉H₆O₃]⁻, 353.083 0 [M-H-2C₉H₆O₃]⁻, 191.050 8 [M-H-3C₉H₆O₃]⁻分别为分子离子峰连续脱 3 个咖啡酸的离子碎片, 其 m/z 191.050 8、179.029 3、173.040 5、161.018 2 的碎片丰度相当, 判断奎宁酸有 4 位取代, 推测该化合物可能为 3,4,5-三咖啡酸奎宁酸。

黄酮碳苷中显示 [M-H-H₂C₂O₂]⁻, [M-H-H₃C₃O₃]⁻, [M-H-H₄C₄O₄]⁻的碎片离子, 分别为分子离子峰脱去糖基碎片形成的脱 60、90、120 的离子。黄酮氧苷一般显示脱去 162 和 146 等糖基形成的碎片离子。黄酮类化合物主要为不同数量和位置的羟基和氧甲基取代, 主要显示 [M-H]⁻和连续的脱 CH₃ 的信号, 一般有几个氧甲基就脱几个 CH₃, 而且羟基被甲基取代后, 其保留时间明显增长。

M5 和 M6 的精确分子离子提示其分子式为 C₁₈H₃₀O₃, 再根据保留时间和文献报道^[29], 推测其可能为亚油酸和 11(E)-十八碳二烯酸。

将 21 批次样品的紫外和质谱色谱图分别叠加比对, 可以确定不同批次样品中紫外和质谱上的共有峰, 见图 2。共有峰有 1~5、9、11~14、16、18~23、25、26, 其中峰 12、14、16、18、19 5 个化合物没有找到对照品确定他们的结构。所以拟建立这 14 个共有化合物的含量测定方法来进行艾叶质控的研究。

2.5 定量测定

2.5.1 线性关系考察 取稀释好的混合对照品溶液, 每个浓度进样 1 μL, 按上述“2.1”项下的条件进样分析, 以峰面积为纵坐标, 以各对照品的质量浓度为横坐标建立标准曲线。计算的 14 个对照品的线性回归方程、相关系数、线性范围、最低定量限和最低检测限见表 3。结果表明艾叶中 14 种化学成分有良好的线性范围和线性关系, 且检测灵敏度较高。

2.5.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 按“2.1”项下条件连续进样 6 次, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、夏佛塔苷、异绿原酸 B、异绿原酸

表 2 艾叶中主要色谱峰的液质数据

Table 2 UPLC-Q-TOF MS data of identification compounds from *Artemisiae Argyi Folium*

峰号	保留时间/min	m/z[M-H]	偏差	分子式	MS/MS	化合物鉴定
1	3.24	353.085 5	-1.8	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 0, 191.051 4, 179.0325, 135.0420	新绿原酸*
M1	4.11	255.083 1	-2.4	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	—	未鉴定
2	4.40	353.085 4	-1.9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.086 1, 191.053 6	绿原酸*
3	4.66	353.086 3	-1.0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.086 8, 191.053 4, 179.032 1, 173.042 5, 161.020 7, 135.041 7	隐绿原酸*
4	4.83	179.033 2	-1.2	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 0, 135.043 9	咖啡酸*
M2	5.33	387.164 2	-1.3	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	—	未鉴定
5	6.53	563.140 3	0.2	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.143 5, 473.107 1, 443.096 3, 383.075 2, 353.064 0, 325.070 9, 297.075 1	夏佛塔昔*
M3	6.61	277.105 2	-2.4	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	277.104 7, 233.114 5, 215.103 4	未鉴定
6	6.98	563.140 7	0.6	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	503.117 9, 473.107 6, 443.0977, 383.073 3, 353.065 5, 325.070 4, 297.075 7	异夏佛塔昔*
7	7.42	609.145 1	-0.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 1, 463.088 8, 301.0293, 300.022 3	芦丁
8	7.69	463.086 5	-1.7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301.031 1, 300.023 3	异槲皮昔
9	8.30	515.119 3	0.3	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 3, 353.084 4, 335.073 8, 191.051 1, 179.029 9, 173.040 3, 161.019 3, 135.040 1	异绿原酸 B*
10	8.50	515.118 7	-0.3	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.117 7, 353.084 3, 335.067 4, 191.050 2, 179.029 4, 173.038 0, 161.019 8, 135.039 4	1,5-二咖啡酸奎宁酸
11	8.66	515.118 9	-0.1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.117 7, 353.084 1, 191.050 9, 179.029 7, 173.038 0, 161.018 8, 135.042 3	异绿原酸 A*
12	8.93	515.119 2	0.2	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 3, 353.084 4, 191.050 8, 179.029 5, 173.039 6, 161.018 9, 135.039 8	异绿原酸 A 异构体
13	9.66	515.119 0	0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 7, 353.084 1, 191.050 7, 179.030 0, 173.040 5, 161.019 6, 135.041 8	异绿原酸 C*
14	10.27	549.197 8	0.6	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂	549.196 4, 387.161 6	未鉴定(含咖啡酰基)
15	10.98	515.117 9	-1.1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.117 8, 353.083 8, 191.050 7, 179.0284, 173.0398, 161.019 8, 135.039 6	异绿原酸 C 异构体
16	11.86	207.063 3	-2.4	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	—	未鉴定
17	12.28	315.048 8	-1.7	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.022 7	泽兰黄酮
18	12.70	677.150 5	-0.1	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	677.150 6, 515.119 0, 353.083 0, 191.050 8, 179.029 3, 173.040 5, 161.018 2, 135.039 6	3,4,5-三咖啡酸奎宁酸
19	13.41	315.048 4	-2.1	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	300.022 4	泽兰黄酮异构体
20	14.10	269.043 8	-1.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.043 6, 151.000 2, 117.03 18	芹菜素*
21	14.54	299.053 8	-1.6	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	284.030 8	高车前素*
M4	14.74	327.216 7	-0.4	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	—	未鉴定
22	15.10	329.064 3	-1.8	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.064 1, 314.040 7, 299.017 0	棕矢车菊素*
23	16.13	359.075 0	-1.7	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.075 2, 344.051 5, 329.028 3, 314.006 1	5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮*
24	17.37	313.069 0	-2.2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	298.043 2, 283.019 7, 255.024 2	黄酮素
25	17.86	343.080 3	-1.5	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.080 6, 328.056 4, 313.033 0, 298.008 7	异泽兰黄酮*
26	18.73	373.090 7	-1.6	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373.090 8, 358.071 5, 343.046 3, 328.020 2, 300.025 5, 285.002 4, 257.005 4, 229.013 8	蔓荆子黄素*
M5	19.22	293.209 7	-2.0	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	—	亚油酸
M6	19.38	293.209 9	-1.8	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	—	11(E)-十八碳二烯酸

*为经对照品比对鉴定

*compared and identified by the reference standards

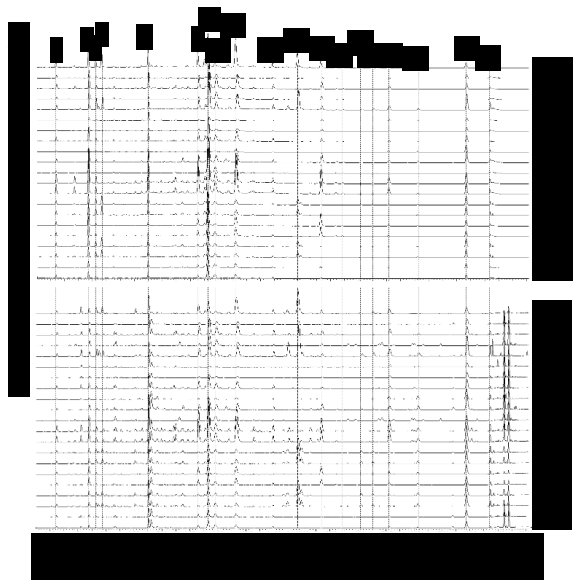


图 2 21 批次艾叶的 UPLC-UV (A) 和 UPLC-UV-Q/TOF MS (B) 的比较图谱

Fig. 2 Fingerprint of 21 batches of *Artemisiae Argyi Folium* samples by UPLC-UV (A) and UPLC-UV-Q/TOF MS (B)

A、异绿原酸 C、芹菜素、高车前素、棕矢车菊素、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮、异泽兰黄酮、蔓荆子黄素色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.25%、1.07%、1.18%、1.15%、1.35%、0.99%、1.24%、1.28%、1.22%、1.2%、1.17%、1.19%、1.08%、1.13%，结果表明仪器精密性良好。

2.5.3 稳定性试验 精密称取艾叶 0.2 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下条件分别于 0、2、4、8、16、24、48、72 h 进样 1 μL 分析，计算样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、夏佛塔昔、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、芹菜素、高车前素、棕矢车菊素、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮、异泽兰黄酮、蔓荆子黄素含量的 RSD 值分别为 1.2%、1.11%、1.25%、1.24%、1.09%、1.16%、1.01%、1.13%、1.25%、1.11%、1.08%、1.14%、1.12%、1.22%。

2.5.4 重复性试验 精密平行称取 6 份同一批艾叶 0.2 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”

表 3 14 种化学成分的线性方程、相关系数、线性范围、最低定量限和最低检测限

Table 3 Calibration curves, correlation coefficients, linear ranges, limit of quantitation and detection of fifteen constituents

化合物	线性方程	R^2	线性范围/ng	定量限/ng	检测限/ng
新绿原酸	$Y=5780 X-8070$	0.999 6	0.963~770.0	0.96	0.29
绿原酸	$Y=5750 X-8140$	0.999 6	0.96~768.0	0.96	0.29
隐绿原酸	$Y=4950 X-7030$	0.999 5	0.997~798.0	0.99	0.30
咖啡酸	$Y=8740 X-894$	0.999 9	0.240~770.0	0.24	0.09
夏佛塔苷	$Y=3990 X-6220$	0.999 5	1.020~818.0	1.02	0.31
异绿原酸 B	$Y=6250 X-39 100$	0.999 4	0.987~790.0	0.98	0.29
异绿原酸 A	$Y=7840 X-52 200$	0.999 3	1.030~824.0	1.03	0.31
异绿原酸 C	$Y=8030 X-50 600$	0.999 3	0.957~766.0	0.95	0.28
芹菜素	$Y=7610 X-889$	0.999 9	0.474~758.0	0.47	0.14
高车前素	$Y=7840 X-1850$	0.999 9	1.010~808.0	1.01	0.30
棕矢车菊素	$Y=5760 X-1530$	0.999 9	0.927~742.0	0.93	0.28
5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮	$Y=7590 X-1340$	0.999 8	0.485~194.0	0.48	0.16
异泽兰黄素	$Y=6550 X-9160$	0.999 6	0.977~782.0	0.98	0.29
蔓荆子黄素	$Y=4240 X-248$	0.999 9	0.500~800.0	0.50	0.15

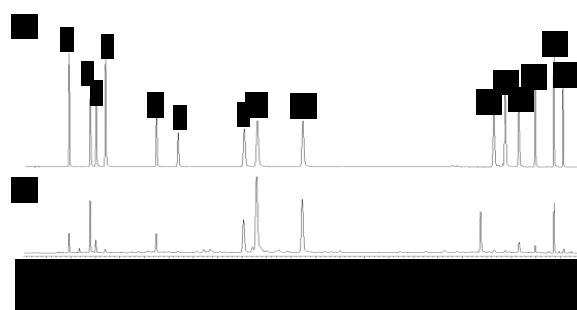
项下条件进样分析, 计算样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、夏佛塔苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、芹菜素、高车前素、棕矢车菊素、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮、异泽兰黄素、蔓荆子黄素含量的 RSD 值分别为 2.10%、2.22%、1.92%、1.54%、1.85%、1.28%、1.64%、1.77%、1.45%、1.23%、1.12%、1.41%、1.21%、1.23%。

2.5.5 加样回收率试验 精密称定已知含量的同一批艾叶 9 份, 各 0.2 g, 按照 1:0.8、1:1、1:1.2 的质量比例分别精密加入单一对照品溶液, 每个比例 3 份, N_2 气流挥干溶剂后, 按“2.3”项下条件制备供试品, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 计算各对照品的加样回收率, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、夏佛塔苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、芹菜素、高车前素、棕矢车菊素、5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮、异泽兰黄素、蔓荆子黄素含量的加样回收率分别为 94.9%、96.7%、96.9%、96.5%、103.6%、100.8%、100.5%、99.2%、98.6%、102.0%、100.8%、97.4%、99.3%、97.2%。

2.5.6 样品含量测定 取 21 不同批次的艾叶, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每个样品重复 3 次, 含量取 3 次平均值。按“2.1”项方法测定了 14 个化合物的含量, 结果见图 3 和表 4。

3 讨论

通过 UPLC-UV-Q/TOF MS 分析, 确定了艾叶 70%醇提取物在紫外和质谱上均具有良好响应的化



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-夏佛塔苷 6-异夏佛塔苷 9-异绿原酸 B 11-异绿原酸 A 13-异绿原酸 C 20-芹菜素 21-高车前素 22-棕矢车菊素 23-5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮 25-异泽兰黄素 26-蔓荆子黄素

1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-Caffeic acid 5-schaftoside 6-isoschaftoside 9-isochlorogenic acid B 11-isochlorogenic acid A 13-isochlorogenic acid C 20-apigenin 21-hispidulin 22-jaceosidin 23-5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxy flavone 25-eupatilin 26-casticin

图 3 混合对照品溶液 (A) 和艾叶供试品溶液 (B) 的 UPLC-UV 色谱图 (326 nm)

Fig. 3 UPLC of mixed reference solution (A) and sample solution (B) (326 nm)

合物, 推测了 21 批次样品中 32 个化合物的结构, 其中共有的色谱峰 19 个, 并通过对照品比对确定了其中 15 个化合物的结构 (异夏佛塔苷含量太低, 没有进行含量测定)。为了更好的分离表征艾叶中的代谢物尤其是其中 14 个化合物的分离, 选择了 HSS T3、HSS C₁₈、BEH C₁₈ 等色谱柱, 甲醇-水、乙醇-水以及甲酸和磷酸等流动相和添加剂进行

表 4 21 批次艾叶中 14 种化学成分含量测定结果

Table 4 Contents of 14 compounds in 21 batches of *Artemisiae Argyi Folium* samples

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)													
	1	2	3	4	5	9	11	13	20	21	22	23	25	26
S1	0.079	0.176	0.135	0.149	0.257	0.200	0.377	0.441	0.000	0.023	0.072	0.000	0.109	0.023
S2	0.039	0.069	0.029	0.000	0.084	0.051	0.166	0.085	0.000	0.000	0.029	0.000	0.083	0.021
S3	0.054	0.178	0.042	0.000	0.215	0.152	0.465	0.231	0.000	0.000	0.074	0.021	0.115	0.035
S4	0.046	0.130	0.039	0.000	0.159	0.090	0.301	0.157	0.000	0.000	0.065	0.069	0.197	0.031
S5	0.022	0.043	0.023	0.000	0.051	0.036	0.070	0.065	0.000	0.000	0.053	0.051	0.138	0.030
S6	0.053	0.137	0.045	0.000	0.123	0.121	0.300	0.184	0.000	0.000	0.040	0.000	0.123	0.021
S7	0.024	0.049	0.022	0.000	0.043	0.039	0.092	0.062	0.000	0.000	0.035	0.000	0.081	0.020
S8	0.020	0.033	0.018	0.000	0.120	0.030	0.050	0.043	0.000	0.000	0.043	0.014	0.069	0.016
S9	0.053	0.114	0.121	0.087	0.114	0.134	0.352	0.256	0.025	0.029	0.106	0.067	0.270	0.077
S10	0.030	0.128	0.022	0.000	0.036	0.048	0.337	0.103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.012
S11	0.029	0.133	0.022	0.000	0.036	0.052	0.401	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.011
S12	0.105	0.386	0.079	0.016	0.384	0.360	1.248	0.547	0.000	0.017	0.131	0.000	0.205	0.059
S13	0.106	0.388	0.080	0.015	0.395	0.353	1.237	0.537	0.000	0.017	0.132	0.055	0.204	0.058
S14	0.048	0.108	0.065	0.066	0.152	0.039	0.214	0.099	0.025	0.020	0.032	0.037	0.160	0.037
S15	0.050	0.113	0.069	0.070	0.150	0.043	0.232	0.109	0.024	0.020	0.031	0.039	0.158	0.038
S16	0.047	0.210	0.035	0.000	0.056	0.100	0.400	0.175	0.000	0.000	0.045	0.030	0.118	0.026
S17	0.044	0.191	0.033	0.000	0.053	0.085	0.325	0.146	0.000	0.015	0.043	0.025	0.112	0.027
S18	0.048	0.108	0.066	0.067	0.148	0.040	0.225	0.102	0.025	0.020	0.031	0.038	0.158	0.035
S19	0.045	0.098	0.059	0.055	0.145	0.036	0.186	0.093	0.024	0.019	0.030	0.034	0.151	0.036
S20	0.038	0.068	0.030	0.012	0.087	0.055	0.182	0.089	0.000	0.000	0.030	0.066	0.092	0.020
S21	0.039	0.069	0.030	0.000	0.085	0.052	0.171	0.084	0.000	0.000	0.029	0.064	0.087	0.020

1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-夏佛塔苷 9-异绿原酸 B 11-异绿原酸 A 13-异绿原酸 C 20-芹菜素 21-高车前素 22-棕矢车菊素 23-5,7,3'-三羟基-6,4',5'-三甲氧基黄酮 25-异泽兰黄素 26-蔓荆子黄素

1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-caffeic acid 5-schaftoside 9-isochlorogenic acid B 11-isochlorogenic acid A 13-isochlorogenic acid C 20-apigenin 21-hispidulin 22-jaceosidin 23-5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavone 25-eupatilin 26-casticin

色谱条件的进一步优化,14 个化合物得到了良好分离,建立了其 UPLC-UV 的含量测定方法。同时我们还进行了 TOF 和 UV 的定量结果比对,发现质谱的定量灵敏度虽然能高 1 个数量级,但定量范围稍窄,不适合同时定量分析含量差异较大的化合物,如异绿原酸 A(含量较高,上限超出线性范围)和高车前素等。艾叶中主要含有绿原酸类和黄酮类化合物,其中绿原酸类含量较高,异绿原酸 A 的含量最高,黄酮类化合物中夏佛塔苷、棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量较高。咖啡酸、绿原酸、异泽兰黄素等化学物质,也正是止血、抗氧化、抗炎、抗肿瘤的主要药效基础^[14-18]。不同产地艾叶中的各化合物的含量差异较大,个别化合物的含量差异在 10 倍以上;同样蕲春的艾叶,不同储藏时间、不同采集时间的含量也具有一定差异。本研究结果和文献报道^[24-25]的含量较为一致,但具体数值上有一定差异。这说明了艾叶质量除了和产地相关外,和艾叶的海拔高度、采收时间、晾晒方式、储藏(绿原酸类化合物在不同环境下的稳定性可能有差异)等相关,需要更多的研究阐明影响艾叶质量不同因素的作用。制定艾叶的质量标准还需要更深一步的研究。

该方法虽然可以较为全面的评价艾叶的质量,但存在使用对照品较多的情况,有学者研究了一测多评方法进行 6 个绿原酸类化合物的含量测定^[30],可以较好的减少对对照品的使用^[31]。另外使用标准提取物进行不同样品的质量控制研究可以更大程度的减少对对照品的使用,并全面控制药材质量。艾叶的系统植化研究还不够深入,本实验中含量较高的几个未定量化合物和未鉴定结构的化合物都还需要进一步的分离鉴定研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 236.
- [2] Song X W, Wen X, He J W, et al. Phytochemical components and biological activities of *Artemisia argyi* [J]. *J Funct Foods*, 2019, 52: 648-662.
- [3] 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.
- [4] 李真真, 吕洁丽, 张来宾, 等. 艾叶的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(6): 1059-1066.
- [5] 项平. 承淡安针灸经验集(名医经典) [M]. 上海: 上海

- 科学技术出版社, 2004: 236.
- [6] Xiang F, Bai J H, Tan X B, *et al.* Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 125: 582-587.
- [7] 宋叶, 张鹏云, 戴卫波, 等. 不同产地艾叶挥发油成分的比较研究 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(4): 845-851.
- [8] 吴子建, 王斌, 段文秀, 等. 顶空进样-气相色谱-质谱联用法检测 3 年陈艾条燃烧产物中挥发性成分 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2017, 36(2): 64-67.
- [9] 张元, 康利平, 詹志来, 等. 不同采收时间对艾叶挥发油及其挥发性主成分与毒性成分变化的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(3): 410-419.
- [10] Lv J L, Li Z Z, Zhang L B. Two new flavonoids from *Artemisia argyi* with their anticoagulation activities [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(6): 632-639.
- [11] Han B S, Xin Z Q, Ma S S, *et al.* Comprehensive characterization and identification of antioxidants in *Folium Artemisiae Argyi* using high-resolution tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1063: 84-92.
- [12] Ren D B, Ran L, Yang C, *et al.* Integrated strategy for identifying minor components in complex samples combining mass defect, diagnostic ions and neutral loss information based on ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry platform: *Folium Artemisiae Argyi* as a case study [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1550: 35-44.
- [13] Xue G M, Zhu D R, Han C, *et al.* Artemisianins A-D, new stereoisomers of seco-guaianolide involved heterodimeric [4+2] adducts from *Artemisia argyi* induce apoptosis via enhancement of endoplasmic Reticulum stress [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 84: 295-301.
- [14] 兰晓燕, 张元, 朱龙波, 等. 艾叶化学成分、药理作用及质量研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4017-4030.
- [15] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55(10): 2273-2280.
- [16] 宋瑾. 中草药体外止血及抗菌活性的评价研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- [17] 苏国莹. 咖啡酸和绿原酸抑制 AGEs 诱导的炎症反应 [D]. 华南理工大学, 2018.
- [18] 王小俊, 陈林霖, 方颖. 异泽兰黄素的药理作用研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(3): 665-668.
- [19] Zhang Y, Kang L P, Li H M, *et al.* Characterization of moxa floss combustion by TG/DSC, TG-FTIR and IR [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 288: 121516.
- [20] 郭媛, 许雪梅, 尹林子, 等. 不同灸材和艾材燃烧辐射的光谱特性 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(14): 2233-2238.
- [21] 郑婷婷, 田瑞昌, 刘国辉, 等. 艾叶及其燃烧产物有效成分的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1): 241-244.
- [22] Guo L, Zhang D, Xue Z J, *et al.* Comparison of *Artemisiae argyi Folium* and *Artemisiae lavandulaefoliae Folium* by simultaneous determination of multi-components with single reference standard method and chemometric analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2019, 30(1): 14-25.
- [23] 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.
- [24] 王小俊, 邓玉环, 张丽萍, 等. UPLC-DAD-MS 定性和定量分析蕪艾中的酚酸和黄酮类成分 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 983-989.
- [25] 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.
- [26] Zhang J Y, Wang Z J, Li Y, *et al.* A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in *Flos Lonicerae Japonicae* [J]. *Talanta*, 2016, 147: 16-27.
- [27] Ouyang H, Li J, Wu B, *et al.* A robust platform based on ultra-high performance liquid chromatography Quadrupole time of flight tandem mass spectrometry with a two-step data mining strategy in the investigation, classification, and identification of chlorogenic acids in *Ainsliaea fragrans* Champ [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1502: 38-50.
- [28] Qiao X, Li R, Song W, *et al.* A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1441: 83-95.
- [29] Yoshikawa M, Shimada H, Matsuda H, *et al.* Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vasorelaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* Levl. et Vant.: Moxartenone and moxartenolide [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1996, 44(9): 1656-1662.
- [30] 于晓, 戴衍朋, 周倩, 等. 一测多评法测定艾叶中 6 个有机酸类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(12): 2131-2138.
- [31] 谭鹏, 许莉, 牛明, 等. 一测多评法同时测定补骨脂中 16 种化学成分的含量 [J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3937-3946.

[责任编辑 时圣明]