

基于指纹图谱及非挥发性成分定量结合化学模式识别法评价不同产地艾叶质量

曾维艳¹, 陈肖^{1#}, 王洋¹, 孙丰慧^{1,2}, 代敏^{2*}, 蒲忠慧^{1,2*}

1. 成都医学院检验医学院, 四川 成都 610500

2. 四川省动物源性食品兽药残留防控技术工程实验室, 四川 成都 610500

摘要: 目的 以非挥发性化学成分为指标, 评价不同产地艾叶 *Artemisia argyi* 质量, 为其进一步开发利用提供科学依据。方法 采用高效液相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC), 以指纹图谱定性, 绿原酸和黄酮等多指标成分定量, 结合聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 对艾叶进行化学模式识别研究。结果 建立了 20 批艾叶的指纹图谱, 相似度为 0.739~0.983, 标定了 28 个共有峰, 指认了绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素 5 个成分, 含量测定表明不同产地艾叶绿原酸和黄酮成分存在显著差异; HCA 分析 20 批艾叶为 3 类; PCA 得到 7 个主成分的累积方差贡献率为 86.676%; OPLS-DA 分析表明绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素可能是影响艾叶药材质量的差异标志物。结论 指纹图谱定性及多非挥发性成分定量结合化学模式识别可用于艾叶药材鉴别和质量控制。

关键词: 艾叶; 指纹图谱; 绿原酸; 木犀草苷; 圣草酚; 棕矢车菊素; 异泽兰黄素; 化学模式识别; 质量控制

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-6084-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.026

Quality evaluation of *Artemisiae Argyi Folium* from different areas by fingerprint and non-volatile components quantification combined with chemical pattern recognition

ZENG Wei-yan¹, CHEN Xiao¹, WANG Yang¹, SUN Feng-hui^{1,2}, DAI Min², PU Zhong-hui^{1,2}

1. School of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. Sichuan Provincial Engineering Laboratory for Prevention and Control Technology of Veterinary Drug Residue in Animal-origin Food, Chengdu 610500, China

Abstract: Objective The non-volatile chemical components were used as indicators to evaluate the quality of Aiyue (*Artemisiae Argyi Folium*) from different origins and to provide scientific basis for its further development and utilization. **Methods** HPLC was used to distinguish the quality of *Artemisiae Argyi Folium* by qualitative fingerprinting and quantitative identification of multi-index components, such as chlorogenic acid and flavonoids, combined with the discriminant analysis of hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** The fingerprint of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium* were established and the similarity were 0.739—0.983, a total of 28 common peaks were calibrated and five of them were identified by comparing with reference substance; The content determination results showed that there were obvious differences in the chemical components of *Artemisiae Argyi Folium* from different habitats; The results of HCA demonstrated that there were obvious three categories distinctions; PCA analysis indicated that the cumulative variance contribution rate of the seven principal components were 86.676%; OPLS-DA analysis showed that chlorogenic acid, cynaroside, eriodictyol, jaceosidin and eupatilin may be the markers of quality difference among them. **Conclusion** Qualitative fingerprinting and simultaneous quantification of multi-nonvolatile components coupled with chemometrics analysis can be used for

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204601); 国家自然科学基金资助项目 (31970137); 国家自然科学基金资助项目 (82102442); 四川省应用基础面上项目 (2023NSFSC0172); 中国博士后基金 (2023M730382); 国家级大学生创新创业计划项目 (202313705018)

作者简介: 曾维艳 (2000—), 女, 在读本科, 主要从事中药质量分析。E-mail: 2830943861@qq.com

*通信作者: 蒲忠慧 (1982—), 女, 博士, 副教授, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: zhonghui.pu@163.com

代敏 (1974—), 女, 博士, 教授, 主要从事中药抗耐药菌机制研究。E-mail: daimin1015@163.com

#共同第一作者: 陈肖 (2001—), 男, 在读本科, 主要从事中药质量分析。E-mail: 1096362973@qq.com

the identification and quality control of *Artemisiae Argyi Folium*.

Key words: *Artemisiae Argyi Folium*; fingerprint; chlorogenic acid; cymaroside; eriodictyol; jaceosidin; eupatilin; chemical pattern recognition; quality control

艾叶 *Artemisiae Argyi Folium* 为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et. Vant. 的干燥叶, 又名艾蒿、白蒿、灸草等。其野生资源丰富, 在中国分布广泛, 主产于河南、河北、湖北等地^[1]。艾叶味苦, 辛性温, 归肝脾肾经, 具有温经止血、散寒止痛, 外用可祛湿止痒之功效, 用于吐血、衄血、少腹冷痛、经寒不调、宫冷不孕、皮肤瘙痒等症^[2]。艾叶中含有挥发油、黄酮、鞣质、苯丙素、多糖等多种成分^[3-5]。现代研究集中艾叶挥发油成分较多, 对非挥发性成分的研究较少。前期研究发现, 艾叶中绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素和异泽兰黄素是艾叶发挥抗菌消炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性的重要效应物质^[6-7]。因此, 本研究针对艾叶以上 5 种非挥发性成分, 采用指纹图谱定性、HPLC 定量, 结合聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别法综合评价艾叶品质, 为建立艾叶多指标质控标准和道地性提供参考依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪 (G7114A 1260 VWD Detector, LC-1260 2.4.0.628 色谱工作站, 美国 Agilent 公司); SB25-12D 型超声波清洗仪 (宁波新艺超声设备有限公司); ME204 型万分之一分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 材料

绿原酸 (批号 PS000626)、木犀草苷 (批号 PS011538) 以上对照品均购自成都普思生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 圣草酚 (批号 MUST-22102917)、异泽兰黄素 (批号 MUST-22110608)、棕矢车菊素 (批号 MUST-22091507) 购自成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$; 甲醇 (色谱级, Sigma 公司); 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

2022 年 6 月集中收集艾草药材共计 20 批, 分别来自湖北 (5 批)、河南 (5 批)、河北 (5 批) 和四川 (5 批) 等地, 具体信息详见表 1。所有药材经

成都医学院药学院李羿教授鉴定为植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et. Vant. 的干燥叶。药材标本保存于成都医学院四川省动物源性食品兽药残留防控技术工程实验室。

表 1 艾叶药材来源信息

Table 1 Sources of medicinal materials of *Artemisiae Argyi Folium*

编号	产地	编号	产地
S1	湖北蕲春蕲州镇	S11	河北安国安平县
S2	湖北蕲春株林镇	S12	河北安国南娄底
S3	湖北蕲春狮子镇	S13	河北安国深泽县
S4	湖北蕲春漕河镇	S14	河北邯郸
S5	湖北襄阳老河口	S15	河北衡水
S6	河南南阳桐柏	S16	四川新都
S7	河南南阳卧龙	S17	四川都江堰
S8	河南汤阴古贤镇	S18	四川广元
S9	河南汤阴伏道镇	S19	四川眉山
S10	河南信阳息县	S20	四川雅安

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.2 mol/L 磷酸 (A)-甲醇 (B); 梯度洗脱: 0~5 min, 10%~15% B; 5~10 min, 15%~20% B; 10~30 min, 20%~40% B; 30~40 min, 40% B; 40~45 min, 40%~50% B; 45~48 min, 50%~55% B; 48~50 min, 55%~60% B; 50~60 min, 60%~70% B。体积流量 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称定艾叶粉末 (过二号筛) 5.0 g, 置具塞三角瓶中, 加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 100 kHz 超声处理 30 min, 放至室温, 用 70% 乙醇称定补足减失质量, 摇匀, 将溶液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得^[8-9]。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称定绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素对照品适量置 5 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 制成质量浓度分别 1.60、0.60、1.05、1.00、2.00 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.2.3 空白溶液的制备 以提取溶剂 (70% 乙醇) 作为空白溶液。

2.3 艾叶指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 精密称取艾叶药材粉末(S6) 5 g(过二号筛),按“2.2.1”项下方法制备供试品,按“2.1”项下色谱条件测定,连续进样6次,记录色谱图,以8号峰绿原酸为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间的RSD在0.12%~0.29%,相对峰面积RSD在0.56%~1.75%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 精密称取同一艾叶药材粉末(S6) 5 g,按“2.2.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,以8号峰绿原酸为参照峰,计算得到各共有峰的相对保留时间的RSD在0.06%~0.26%,相对峰面积RSD在1.14%~1.81%,表明方法重复性好。

2.3.3 稳定性试验 取同一艾草供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,分别在0、4、8、12、24、48 h进行测定,以8号峰绿原酸为参照峰,计算得到各共有峰的相对保留时间的RSD在0.14%~0.34%,相对峰面积RSD在0.93%~1.65%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.3.4 指纹图谱建立及相似度评价 分别精密称取艾草粉末5.0 g,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将20批艾叶色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2008A版)》中,采用中位数法,时间窗设为0.5 min,经多点校正后进行色谱峰匹配生成样品叠加指纹图谱(图1)。以保留时间为15.92 min的8号峰为参照峰,最终确定了28个共有峰,指认出其中5个,分别为绿原酸(8号)、

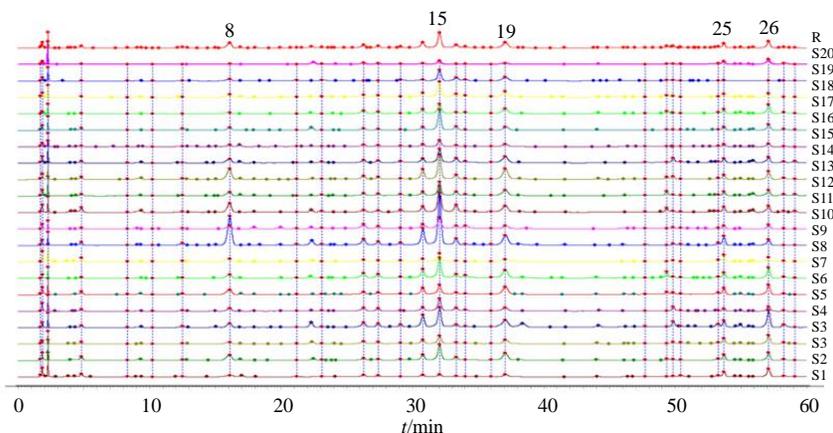
木犀草苷(15号)、圣草酚(19号)、棕矢车菊素(25号)、异泽兰黄素(26号)。

以对照指纹图谱为参照,各样品图谱的相似度评价结果(表2)表明,20批不同产地艾叶相似度为0.739~0.983,说明20批艾草样品具有很高的相似性,所建立的指纹图谱方法可用于评价艾叶药材的整体质量。

2.4 化学模式识别

2.4.1 HCA 将20批艾叶药材28个共有峰的峰面积导入SIMCA-P 14.1软件进行HCA,见图2。样品聚为3类:S3、S5、S10、S15~S20为第1类;S9为第2类;S1~S2、S4、S6~S8、S11~S14为第3类。结果表明不同产区艾叶质量存在一定差异性:四川产区与湖北襄阳、河南豫南地区(信阳)具有一定的相似性,河北大部分产区与河南豫北地区(汤阴)相似度极大。

2.4.2 PCA 将20批艾叶药材28个共有峰的峰面积导入SIMCA-P 14.1软件进行主要成分PCA,以特征值>1为提取标准^[10],得到艾叶药材指纹图谱共有峰特征值(表3)。前7个主成分贡献率分别为30.109%、16.187%、13.962%、9.905%、7.226%、5.583%、3.703%,累积方差贡献率为86.676%,代表了艾叶的整体信息。主成分矩阵(表4)分析了各个共有峰对7个主成分不同的独立方差贡献率,第1主成分主要代表了峰8、14、15、19、20;第2主成分主要代表了峰3、5、24、26;第3主成分代表了峰1、2、3、4;第4主成分代表了峰10、27、28;第5主成分代表了峰2、6、17、23;第6主成分代表了峰21;第7主成分代表了峰6。



8-绿原酸 15-木犀草苷 19-圣草酚 25-棕矢车菊素 26-异泽兰黄素
8-chlorogenic acid 15-cynaroside 19-eriodictyol 25-jaceosidin 26-eupatilin

图1 20批艾叶药材的指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

表 2 20 批艾叶药材指纹图谱相似度评价

Table 2 Fingerprint similarity evaluation of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

编号	相似度/%																				
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	R
S1	1.000																				
S2	0.822	1.000																			
S3	0.897	0.931	1.000																		
S4	0.816	0.902	0.955	1.000																	
S5	0.757	0.935	0.919	0.910	1.000																
S6	0.904	0.961	0.949	0.918	0.888	1.000															
S7	0.761	0.940	0.942	0.939	0.955	0.923	1.000														
S8	0.856	0.958	0.931	0.883	0.915	0.936	0.897	1.000													
S9	0.889	0.906	0.796	0.790	0.883	0.796	0.863	0.853	1.000												
S10	0.799	0.877	0.882	0.862	0.945	0.839	0.929	0.868	0.875	1.000											
S11	0.777	0.952	0.865	0.851	0.945	0.860	0.929	0.904	0.948	0.897	1.000										
S12	0.773	0.961	0.906	0.885	0.952	0.925	0.959	0.914	0.877	0.897	0.964	1.000									
S13	0.782	0.979	0.889	0.883	0.937	0.928	0.943	0.910	0.945	0.891	0.960	0.959	1.000								
S14	0.787	0.958	0.915	0.895	0.966	0.925	0.940	0.920	0.875	0.898	0.953	0.983	0.958	1.000							
S15	0.836	0.960	0.939	0.908	0.944	0.932	0.948	0.943	0.857	0.900	0.920	0.960	0.936	0.957	1.000						
S16	0.831	0.901	0.86	0.856	0.943	0.795	0.917	0.872	0.894	0.878	0.959	0.915	0.899	0.910	0.901	1.000					
S17	0.848	0.922	0.973	0.950	0.921	0.944	0.975	0.893	0.783	0.883	0.867	0.926	0.897	0.914	0.938	0.864	1.000				
S18	0.795	0.954	0.889	0.883	0.960	0.889	0.966	0.903	0.914	0.921	0.968	0.968	0.966	0.960	0.948	0.950	0.917	1.000			
S19	0.850	0.875	0.751	0.752	0.896	0.774	0.863	0.815	0.866	0.834	0.926	0.912	0.905	0.908	0.860	0.907	0.790	0.952	1.000		
S20	0.897	0.803	0.915	0.874	0.809	0.842	0.811	0.849	0.810	0.746	0.812	0.787	0.822	0.796	0.858	0.746	0.877	0.739	0.811	1.000	
R	0.790	0.983	0.945	0.931	0.974	0.939	0.975	0.948	0.926	0.933	0.971	0.976	0.980	0.975	0.970	0.942	0.945	0.980	0.900	0.815	1.000

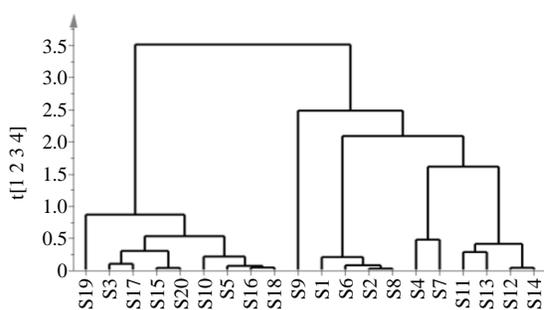


图 2 20 批艾叶药材的聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

2.4.3 OPLS-DA 通过 OPLS-DA 进一步筛选不同产区艾叶差异贡献率较大的成分,建立的 OPLS-DA 模型累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.854 和 0.868, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.788, 提示模型稳定及预测能力较好^[11]。由图 3 可知, OPLS-DA 结果与 HCA 几乎一致, 四川各产区与湖北襄阳、河南信阳聚为一类, 河北大部分产区与安阳汤阴聚为

表 3 20 批艾叶主成分特征值及贡献率

Table 3 Characteristic value and contribution rate of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	8.430	30.109	30.109
2	4.532	16.187	46.295
3	3.909	13.962	60.257
4	2.774	9.905	70.163
5	2.023	7.226	77.389
6	1.563	5.583	82.973
7	1.037	3.703	86.676

一类, 信阳位于河南省最南部, 南接湖北, 安阳位于河南省最北部, 北临邯郸, 位置毗邻, 环境气候条件更相似, 因此具有一定的相似性。

变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 是筛选差异性化合物的重要指标, 值越大, 该色谱峰的贡献越大^[12]。在 0.95 的置信区间内, 提取模型中 3 类艾叶 28 个共有峰的 VIP, 见图 4。VIP>1 的 13 个成分作为差异性标志物, 排序依次为峰 8 (绿原

表 4 20 批艾叶共有峰成分矩阵

Table 4 Component matrix of common peaks of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

峰号	共有峰	主成分贡献值						
		1	2	3	4	5	6	7
1	未指认	0.144	0.522	0.538	-0.102	-0.224	0.217	-0.254
2	未指认	0.324	0.443	0.663	0.011	0.087	0.119	0.253
3	未指认	0.032	0.640	0.578	0.196	-0.047	-0.075	-0.194
4	未指认	0.532	0.425	0.519	-0.057	0.000	0.184	0.243
5	未指认	0.180	0.565	0.470	0.147	0.377	0.413	-0.009
6	未指认	0.389	-0.086	0.311	-0.180	0.643	0.123	0.386
7	未指认	0.733	-0.095	0.178	-0.353	0.113	-0.309	0.122
8	绿原酸	0.800	-0.258	0.260	-0.332	-0.067	-0.020	-0.264
9	未指认	0.174	-0.579	0.377	-0.396	-0.084	-0.143	0.074
10	未指认	0.161	-0.604	0.375	0.557	0.120	-0.176	-0.020
11	未指认	0.722	-0.166	-0.503	-0.106	0.244	0.278	-0.118
12	未指认	0.679	-0.056	-0.642	0.182	0.112	0.172	-0.103
13	未指认	0.702	-0.164	0.160	0.209	0.014	-0.442	0.181
14	未指认	0.937	-0.082	-0.176	-0.173	-0.053	0.030	-0.140
15	木犀草苷	0.840	-0.414	0.116	-0.152	-0.170	-0.040	-0.162
16	未指认	0.592	-0.618	0.328	0.284	-0.024	0.065	-0.082
17	未指认	-0.065	-0.559	-0.372	0.093	0.501	0.410	0.224
18	未指认	0.445	-0.605	0.319	-0.007	-0.150	0.062	0.150
19	圣草酚	0.815	-0.018	0.100	0.098	-0.299	0.247	-0.174
20	未指认	0.832	0.154	-0.349	0.169	-0.103	-0.132	0.088
21	未指认	0.183	-0.198	-0.102	0.461	-0.479	0.626	0.142
22	未指认	0.441	0.282	-0.055	0.460	0.300	-0.244	-0.087
23	未指认	0.188	0.156	-0.073	-0.130	0.725	-0.010	-0.475
24	未指认	0.507	0.526	-0.376	-0.400	-0.075	-0.122	0.237
25	棕矢车菊素	0.793	0.350	-0.045	-0.291	-0.071	0.079	0.063
26	异泽兰黄素	0.549	0.559	-0.471	0.257	-0.110	0.005	0.047
27	未指认	0.405	0.425	-0.394	0.538	-0.052	-0.296	0.173
28	未指认	0.136	-0.114	0.350	0.810	0.148	-0.101	-0.079

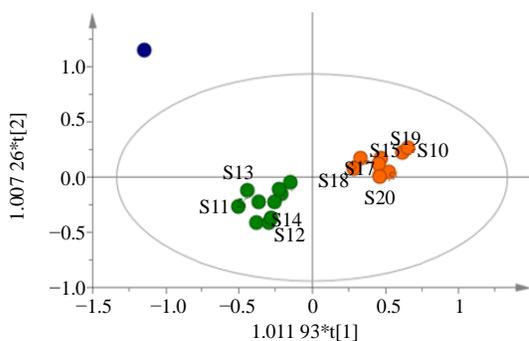


图 3 20 批艾叶 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 Score plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis for 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

酸) > 峰 15 (木犀草苷) > 峰 14 > 峰 25 (棕矢车菊素) > 峰 7 > 峰 19 (圣草酚) > 峰 4 > 峰 3 > 峰 20 > 峰 5 > 峰 2 > 峰 11 > 峰 26 (异泽兰黄素), 以上成分可作为艾叶质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 预测的备选, 有待更深入研究挖掘。

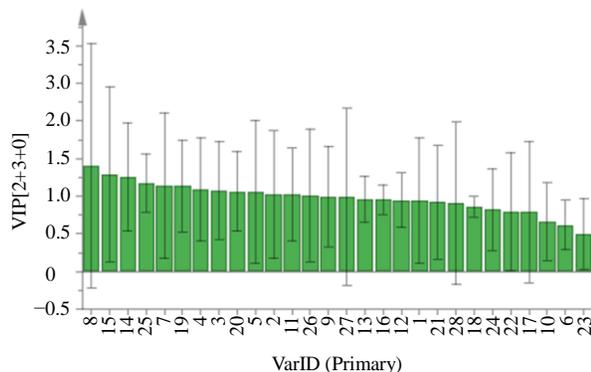


图 4 20 批艾叶 28 个共有峰 VIP 值

Fig. 4 VIP value of 28 common peaks of 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium*

2.5 定量测定

2.5.1 专属性试验 取“2.2”项下制备供试品溶液、混合对照品溶液以及空白溶液, 滤过后分别按“2.1”

项下色谱条件进样分析。结果表明,各待测成分的色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,以各成分计的理论板数均在9000以上,且空白溶液对测定无干扰,说明此方法专属性良好,见图5。

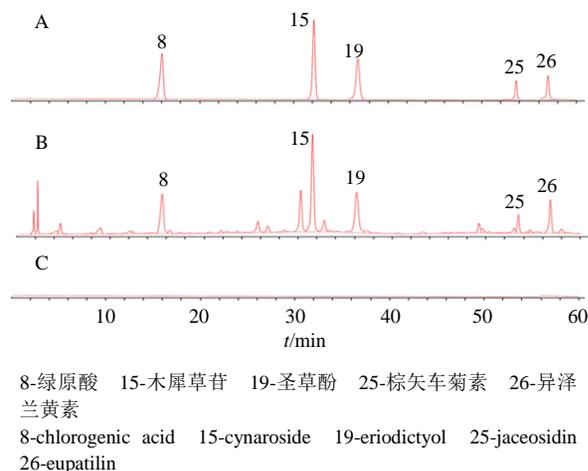


图5 混合对照品溶液(A)、供试品溶液(B)及阴性对照(C)的HPLC图

Fig. 5 HPLC chromatograms of mixed substance solution (A), test solution (B) and negative control (C)

2.5.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适量,用甲醇稀释制成系列浓度的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以待测化合物峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,得到各成分标准曲线。在定量范围内各化合物的线性关系良好($r > 0.9991$),详见表5。

表5 艾叶中5种成分的回归方程、相关系数、线性范围
Table 5 Calibration curves, correlation coefficients, linear ranges of five components of *Artemisiae Argyi Folium*

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
绿原酸	$Y=9\ 283.4 X+4.341$	0.999 9	0.012 5~1.600 0
木犀草苷	$Y=32\ 370 X-11.128$	0.999 8	0.009 0~0.600 0
圣草酚	$Y=21\ 391 X+92.475$	0.999 8	0.016 0~1.050 0
棕矢车菊素	$Y=61\ 153 X+29.022$	0.999 7	0.001 0~0.500 0
异泽兰黄素	$Y=20\ 706 X+85.476$	0.999 9	0.002 0~2.000 0

2.5.3 精密度试验 取混合对照品储备液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素峰面积的RSD分别为0.95%、0.97%、1.20%、0.98%、1.15%、1.32%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一产地(S18)的艾叶粉末3.0 g,按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续测定次,

根据峰面积计算样品中5种成分含量。结果绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素峰面积含量的RSD分别为0.83%、0.73%、1.32%、1.08%、1.15%、1.13%,表明方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取艾叶供试品溶液(S18)适量,按“2.1”项下色谱条件分别于0、4、8、12、24、48 h进样测定,记录峰面积。结果绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素峰面积的RSD分别为0.98%、1.33%、1.18%、1.25%、1.33%、1.28%,表明供试品溶液在48 h内较稳定。

2.5.6 加样回收率试验 取已测定各成分含量的艾叶供试品(S6)9份,分别按已知含量的1:0.5、1:1、1:1.5加入各对照品,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算得到绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素的平均加样回收率分别为97.36%、98.18%、98.45%、96.87%、99.72%,RSD分别为1.18%、1.32%、1.45%、1.67%、1.48%,表明该方法准确度良好。

2.5.7 样品含量测定 精密称取20批不同产地艾叶粉末(过二号筛)5.0 g,分别按“2.2项”下方法制备样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果由表6可知,20批不同产地艾叶中5种成分含量差异显著。由图6箱线图可知,绿原酸在河北艾叶中含量为2.064 9~6.066 5 mg/g,整体高于其它产区,其次河南,再次湖北,四川产地最低;木犀草苷和圣草酚在各产地的含量高低依次为河南>河北>湖北>四川,尤其以河南安阳汤阴伏道镇(S9)最高,分别达5.077 5、3.225 8 mg/g;棕矢车菊素河南汤阴艾叶的含量较高,其余产地含量相差不大;异泽兰黄素各产地艾叶差异明显,以湖北蕲春产地最高,质量分数为1.357 3~2.84 mg/g,河南南阳和汤阴产地含量较高。由此可见,绿原酸可作为河北艾叶标志性成分;木犀草苷和圣草酚可作为河南艾叶的指标性成分;异泽兰黄素可作为区分湖北艾叶与其他产地艾叶的差异性成分;以上5个成分含量在四川产区整体偏低。

3 讨论

《中国药典》2020年版中以艾叶挥发油类成分作为质控指标,挥发油的含量受产地、采集时节和储存时间的影响较大^[13-14],难以全面真实反映艾叶的质量与品质。绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素和异泽兰黄素为艾叶非挥发性代表成分,也是艾叶的主要药效成分^[15-18]。因此,本研究针对以

表 6 艾叶中 5 种成分的含量测定

Table 6 Contents determination of five components of *Artemisiae Argyi Folium*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	绿原酸	木犀草苷	圣草酚	棕矢车菊素	异泽兰黄素
S1	1.385 5	0.405 3	0.799 5	0.242 0	1.433 7
S2	3.731 8	1.935 8	1.996 1	0.292 4	1.357 3
S3	1.479 0	1.192 2	1.221 1	0.304 0	1.677 9
S4	1.419 6	1.629 2	1.468 1	0.281 9	2.840 0
S5	1.673 0	1.639 3	1.013 9	0.123 2	0.934 0
S6	2.919 1	1.323 0	2.245 4	0.346 4	1.799 2
S7	2.166 2	2.633 3	2.295 5	0.281 0	1.884 2
S8	2.067 7	2.228 0	1.045 6	0.342 2	0.855 6
S9	6.392 2	5.077 5	3.225 8	0.467 4	1.036 7
S10	1.809 5	1.375 2	0.800 7	0.223 6	0.897 0
S11	4.333 9	2.610 4	1.701 2	0.219 6	0.957 6
S12	2.318 3	1.701 9	1.662 5	0.160 1	1.039 6
S13	6.066 5	3.301 5	3.348 3	0.371 0	1.710 4
S14	2.064 9	1.412 0	1.598 0	0.174 1	0.976 3
S15	2.961 4	0.797 3	0.713 9	0.115 1	0.541 3
S16	1.461 2	2.589 0	0.978 7	0.162 9	1.027 6
S17	1.023 6	1.359 4	1.460 1	0.233 5	1.655 8
S18	1.975 6	1.974 9	1.622 9	0.159 9	0.711 7
S19	0.927 0	1.044 5	0.893 2	0.020 7	0.110 4
S20	0.324 0	0.504 6	0.401 6	0.157 3	1.003 9

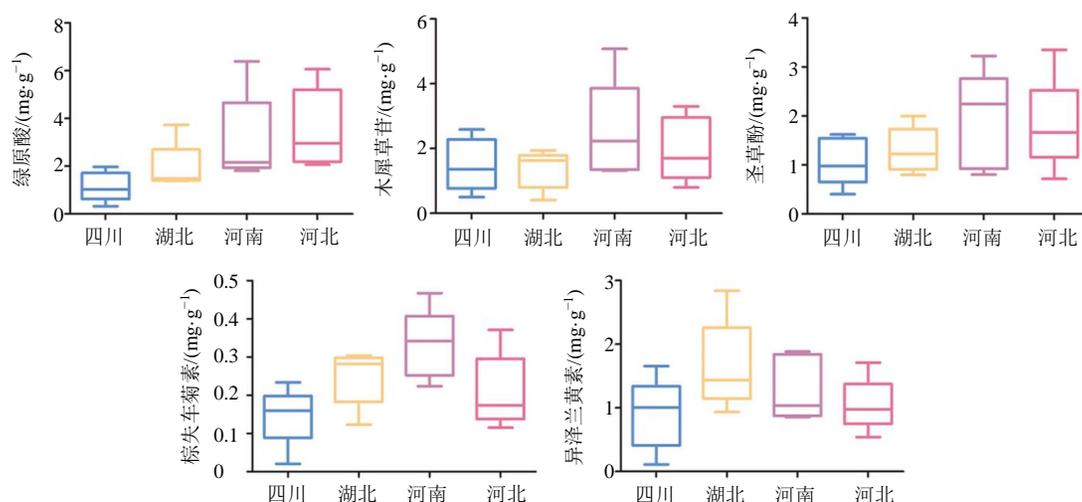


图 6 不同产地艾叶中 5 种成分含量箱线图

Fig. 6 Determination results of five components of *Artemisiae Argyi Folium* from different origins

上 5 种非挥发性成分,以特征指纹图谱质量控制模式定性,多指标质量控制模式定量,结合化学模式识别全面评价不同产地艾叶的质量。结果表明 20 批艾叶药材质量差异较小,相似度在 0.739~0.983,标定了 28 个共有峰,建立的指纹图谱方法专属性强、简便准确,可用于艾叶非挥发性成分的质量控制。

为了更全面地评价艾叶的品质,本研究结合历代文献^[19]记载艾叶的道地产区和目前艾叶的实际使用情况,在同一时间(2022 年 6 月)采集了湖北“蕲艾”(蕲春艾叶)、河南“北艾”(汤阴艾叶)、河

北“祁艾”(安国艾叶)及四川艾叶 20 批样品,在指纹图谱基础上建立了艾叶中 1 种酚酸(绿原酸)和 4 种黄酮(木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素)共计 5 种指标成分的含量测定方法。在流动相选择上发现甲醇-0.2 mol/L 磷酸梯度洗脱体系中绿原酸、木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素和异泽兰黄素色谱峰峰形更佳,邻近峰对其定量无影响,对称性良好,响应值高。含量测定结果表明,不同产地艾叶中绿原酸和黄酮类成分含量差异明显。4 个产区绿原酸平均质量分数为 1.142 3~3.547 9

mg/g, 整体高于李皓翔等^[20]报道的不同产地艾叶中绿原酸含量(0.049%~0.354%), 河北艾叶绿原酸含量最高, 可作为区分河北艾叶的差异性成分; 木犀草苷和圣草酚在各个产区含量差异较大, 二者含量在河南产区有相对优势, 整体高于其它产区; 棕矢车菊素含量在4个产区中变化较小, 河南汤阴艾叶的含量较高, 其余产地含量相差不大; 异泽兰黄素的含量在20批样品中变化较为明显, 其中湖北蕲春及邻近的河南南阳艾叶中异泽兰黄素含量明显其它产区, 该结果与文献研究报道基本一致^[21-22]; 四川艾叶中以上5种成分整体偏低。由此可见, 艾叶中绿原酸和黄酮类木犀草苷、圣草酚、棕矢车菊素和异泽兰黄素含量与药材基原、地域分布、种植技术及区域的土壤、日照等生长环境密切相关。

为了进一步区分不同产地艾叶化学成分之间的差异, 基于含量测定结果, 采用HCA、PCA和OPLS-DA等化学计量法将艾叶区分为3类, 7个主成分累积方差贡献率为86.676%; 通过变量权重要性排序发现共有峰8(绿原酸)、15(木犀草苷、14、25(棕矢车菊素)、7、19(圣草酚)、4、3、20、5、2、11、26(异泽兰黄素)等成分可作为区分和鉴别不同产区艾叶药材质量标志物。本课题组后续将会深入艾叶未知成分研究, 以期为评价艾叶药材的品质及其道地性提供更为全面地参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2020: 91.
- [3] 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.
- [4] 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*, 2017, 1063: 84-92.
- [5] 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.
- [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] 薛贵民, 赵晨光, 薛金凤, 等. 艾草种子的化学成分研究 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2605-2611.
- [8] 王小俊, 邓玉环, 张丽萍, 等. UPLC-DAD-MS 定性和定量分析蕲艾中的酚酸和黄酮类成分 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 983-989.
- [9] 兰晓燕, 朱龙波, 黄显章, 等. 艾叶中主要化学成分的鉴定及其含量测定研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7630-7637.
- [10] 陈欢, 高萌, 罗小泉, 等. 不同产地枳壳药材中12种有效成分的主成分分析和判别分析 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3433-3437.
- [11] 黄建猷, 胡筱希, 麦琬婷, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地消瘤藤质量 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4334-4340.
- [12] Gao S, Chen H G, Zhou X. Study on the spectrum-effect relationship of the xanthine oxidase inhibitory activity of *Ligustrum lucidum* [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(21): 3281-3292.
- [13] 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.
- [14] 靳然, 于密密, 赵百孝, 等. 不同年份蕲艾叶及不同比例艾绒化学成分研究 [J]. 中国针灸, 2010, 30(5): 389-392.
- [15] 周洁, 李晔, 刘洋, 等. 不同产地艾叶中主要化学成分的研究现状分析 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4882-4894.
- [16] 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.
- [17] 刘孟奇, 回成程, 陈随清, 等. 艾叶及其腺毛显微鉴定研究 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7532-7542.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 李皓翔, 范卫锋, 郑依玲, 等. 不同产地艾叶中8种活性成分的HPLC比较分析 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(7): 1556-1559.
- [21] 王哲, 李晓华, 李波, 等. 不同产地艾叶中异泽兰黄素和棕矢车菊素含量的比较 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(34): 30-33.
- [22] 龚敏, 卢金清, 肖宇硕. 不同产地艾叶中总黄酮及其3种主要苷元的含量测定 [J]. 中国药师, 2019, 22(5): 966-968.

[责任编辑 时圣明]