

一测多评法测定艾叶中 7 个黄酮类成分的含量*

孙立秋, 王丹, 赵英楠, 时志春, 李军, 王金兰, 赵明, 张树军**

(齐齐哈尔大学化学与化学工程学院 黑龙江省工业大麻加工技术创新中心 国家市场监督管理总局技术创新中心(工业大麻),
齐齐哈尔 161006)

摘要 目的:建立同时测定艾叶中 7 个黄酮类成分(5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素)的一测多评含量测定方法(QAMS法)。**方法:**采用高效液相色谱法, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为洗脱流动相, 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 30 ℃。以异泽兰黄素为内参物, 建立与其他 6 个黄酮类成分的相对校正因子, 并计算 7 个待测成分的含量, 实现一测多评。同时与外标法进行比较, 以验证 QAMS 法的准确性和可行性。**结果:**在一定的线性范围内, 异泽兰黄素与 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、蔓荆子黄素的相对校正因子值分别为 0.958、1.387、1.000、0.950、0.957、1.297(相对校正因子的 RSD < 2.0%), 并与常规外标一点法比较, 20 批艾叶中 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素的含量测定结果分别为 0.031 4~0.623 5、0.000 9~0.092 6、0.020 6~0.170 7、0.011 0~0.184 7、0.011 7~0.864 0、0.253 2~2.555 0、0.015 6~0.250 7 mg·g⁻¹。**结论:**以异泽兰黄素为内参物, 建立艾叶中 7 个黄酮类成分的 QAMS 法准确、可行, 可用于艾叶的定量分析及质量控制。

关键词:一测多评; 相对校正因子; 高效液相色谱; 艾叶; 黄酮; 异泽兰黄素

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)05-0806-10
doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.05.08

Simultaneous determination of seven flavanoids in *Artemisiae Argyi Folium* by quantitative analysis of multi-components by single marker*

SUN Li-qiu, WANG Dan, ZHAO Ying-nan, SHI Zhi-chun, LI Jun,
WANG Jin-lan, ZHAO Ming, ZHANG Shu-jun**

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Heilongjiang Industrial Hemp Processing Technology Innovation Center, Technology Innovation Center of Industrial Hemp for State Market Regulation, Qiqihar 161006, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneous determination of 7 flavanoids (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone, apigenin, hispidulin, kaempferol, jaceosidin, eupatilin and casticin) in *Artemisiae Argyi Folium*. **Methods:** The HPLC system

* 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(145109512)

** 通信作者 Tel:(045)22742562;E-mail:chou2035@sina.com

第一作者 Tel:(045)22742562;E-mail:ssunliqiu@163.com

consisted of the Agilent ZORBAX SB - C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with gradient elution of acetonitrile and 0.2% phosphoric acid as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, a detection wavelength of 350 nm, and a column temperature of 30 °C. Eupatilin was selected as the internal reference substance, the relative correction factors between eupatilin and the other 6 flavanoids were established, and the contents of these 7 constituents in samples were calculated to realize QAMS. At the same time, compared with the external standard method to verify the accuracy and feasibility of the QAMS method. **Results:** Within a certain linear range, the relative correction factors between eupatilin and 5 - hydroxy - 6, 7, 3', 4' - tetramethoxyflavone, apigenin, hispidulin, kaempferol, jaceosidin as well as casticin were 0.958, 1.387, 1.000, 0.950, 0.957 and 1.297, respectively (RSDs of RCFs were less than 2.0%). The contents of 5 - hydroxy - 6, 7, 3', 4' - tetramethoxyflavone, apigenin, hispidulin, kaempferol, jaceosidin, eupatilin, casticin in 20 batches of *Artemisiae Argyi Folium* were 0.031 4 - 0.623 5 mg · g⁻¹, 0.000 9 - 0.092 6 mg · g⁻¹, 0.020 6 - 0.170 7 mg · g⁻¹, 0.011 0 - 0.184 7 mg · g⁻¹, 0.011 7 - 0.864 0 mg · g⁻¹, 0.253 2 - 2.555 0 mg · g⁻¹ and 0.015 6 - 0.250 7 mg · g⁻¹, respectively.

Conclusion: Using eupatilin as the internal reference, QAMS method for 7 flavanoids is established. The method is accurate and reliable, and can be used for quality control and quantitative analysis of *Artemisiae Argyi Folium*.

Keywords: QAMS; RCF; HPLC; *Artemisiae Argyi Folium*; flavanoid; eupatilin

一测多评(quantitative analysis of multi - components by single marker, QAMS)由王智民等^[1]于2006年首次提出,是一种高效、简便的测定方法,适合中药特点的多指标质量控制评价。该方法利用在样品中各活性成分之间的关系,仅选定1个化学成分(内参物,通常为典型成分且对照品价低易得),经严格的方法学考察,建立内参物与其他多种成分间的相对校正因子,实现多个同类成分含量的测定^[2]。2010年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)^[3]首次收录QAMS法,但该方法仅限应用于黄连。随着该方法克服了对照品紧缺,多指标测定费用高等问题,已被广泛应用于多种中药质量评价的研究中^[4-8],如在2020年版《中国药典》^[9]QAMS法的应用已拓展至中药饮片、提取物及制剂等。

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶,常于夏季花未开时采摘,除去杂质,晒干。艾叶性辛、温,味苦,归肝、脾、肾经,具有温经止血,散寒止痛之功效,主要用于吐血、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,外用可祛湿止痒^[9]。现代药理活性研究阐明,艾叶具有抗菌、抗病毒、抗氧化、降血糖、止血、抗肿瘤等药用功效^[10-13]。艾叶作为我国传统大宗药材,在中药和民间均有广泛应用^[13-15],全国各地均有广泛种植,主要以湖北蕲春、河南安阳、浙江宁波和河北

安国为艾叶道地药材主产区^[16]。艾叶中富含挥发油类、有机酸类、黄酮类、多糖类和萜类等多种生物活性成分^[17-21]。黄酮类成分作为艾叶中一类主要活性成分,已有多项研究表明艾叶黄酮类具有抗氧化、抗肿瘤、抑菌、消炎等多种药理活性^[22-25],但目前对于不同产地因地区差异产生的艾叶中黄酮类成分含量内在质量控制研究相对较少。本文采用高效液相色谱法,以异泽兰黄素为内参物,建立QAMS法同时测定不同产地艾叶中5 - 羟基 - 6,7,3',4' - 四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素7个黄酮类成分的含量,并对QAMS法在中药材艾叶质量控制的研究以及科学性和可行性进行验证。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相系统:配有 G1312B 二元梯度泵, G1329B 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314F DAD 检测器(安捷伦公司); Sartorius QUINTIX125D - 1CN 型十万分之一分析天平(赛多利斯贸易有限公司);JP - 060 型超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司);TG16G 型台式高速离心机(凯达集团有限公司)。

1.2 试药

20批艾叶药材(样品)购自全国7个省、市、自治区的药店或药材市场,湖北蕲春产6批(S1~S6),河

南南阳产 5 批 (S7 ~ S11), 山东临沂、山东日照、河北安国、安徽六安各产 1 批 (S12 ~ S15), 陕西西安产 2 批 (S16 ~ S17) 和黑龙江齐齐哈尔产 3 批 (S18 ~ S20), 经齐齐哈尔大学张树军教授鉴定为菊科蒿属植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶。

对照品: 异泽兰黄素 (批号 A0732)、棕矢车菊素 (批号 A0731)、芹菜素 (批号 A0113)、高车前素 (批号 A1000)、山柰酚 (批号 A0129)、蔓荆子黄素 (批号 A0363), 纯度均 $\geq 98\%$, 购于成都曼思特生物科技有限公司。5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮为实验室自制, 经 HPLC (面积归一化法) 分析, 其纯度 $>98\%$ 。

甲醇、乙腈、磷酸, 均为色谱纯, 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) - 0.2% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱时间程序 (0 ~ 10 min, 20% A → 30% A; 10 ~ 25 min, 30% A → 35% A; 25 ~ 30 min, 35% A → 40%

A; 30 ~ 40 min, 40% A → 100% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

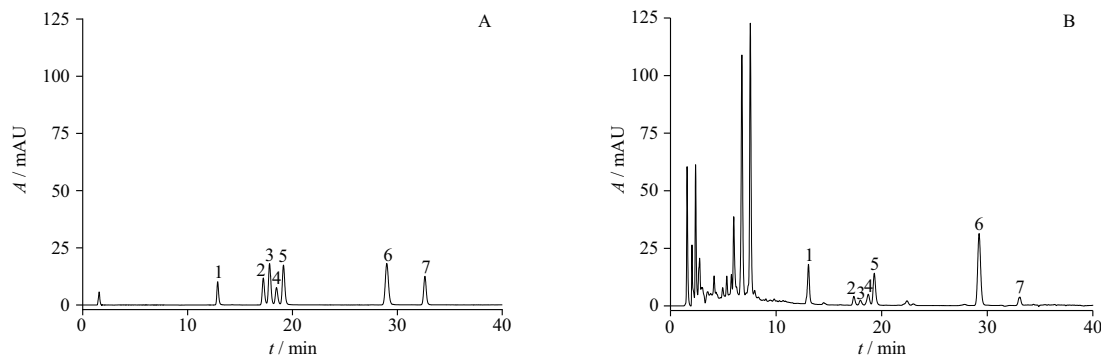
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素的对照品适量, 分别置量瓶中, 加甲醇溶解, 配制成质量浓度依次为 10.0、1.0、2.0、2.5、10.0、25.0、5.0 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 低温避光保存, 备用。

2.2.2 供试品溶液 艾叶样品经研磨粉碎, 称取粉末 (过 4 号筛) 约 0.2 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 10 mL, 称量, 超声 (140 W, 42 Hz) 提取 60 min, 再次称量, 以 70% 乙醇为提取剂补足减失的量, 摇匀, 转移至离心管内, 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜进行滤过, 即得。

2.3 QAMS 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 在“2.1”项色谱条件下, 样品中 7 个待测成分的色谱峰峰形及分离效果良好, 符合要求。混合对照品以及艾叶样品色谱图见图 1。



1. 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone) 2. 芹菜素 (apigenin) 3. 高车前素 (hispidulin) 4. 山柰酚 (kaempferol) 5. 棕矢车菊素 (jaceosidin) 6. 异泽兰黄素 (eupatilin) 7. 蔓荆子黄素 (casticin)

图 1 混合对照品 (A) 和艾叶样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Artemisiae Argyi Folium* sample (B)

2.3.2 线性关系考察及检测限、定量限测定 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、2、5、8、10、15、20 μL, 按“2.1”项下色谱条件, 以色谱峰峰面积 Y 为纵坐标, 对照品质量 X (μg) 为横坐标制作标准曲线, 得到各成分的线性回归方程、相关系数 (r) 以及线性范围。取混合对照品溶液, 经甲醇逐级稀释后, 以信噪比 (S/N) 约为 3.0 计算检测限 (LOD), S/N 约为 10.0 计算定量限 (LOQ)。结果见表 1。

2.3.3 相对校正因子计算 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样 2、4、6、8、10、12 μL 进行测定分析。按照公式 $f_{i,s} = f_i / f_s = (m_i \times A_s) / (m_s \times A_i)$ (m_i 为内参物 i 的浓度, A_i 为内参物 i 的峰面积, m_s 为内参物 s 的浓度, A_s 为内参物 s 的峰面积), 分别计算异泽兰黄素对 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、蔓荆子黄素的相对校正因子, 见表 2。

表 1 回归方程、线性范围、检测限及定量限

Tab. 1 The regression equations, linear ranges, LODs and LOQs

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/ng	LOD/ ng	LOQ/ ng
5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)	$Y = 2\ 056.9X - 4.389\ 9$	0.999 6	10.0 ~ 200.0	0.05	0.18
芹菜素(apigenin)	$Y = 1\ 656.4X - 0.691\ 2$	0.999 5	1.0 ~ 20.0	0.28	0.91
高车前素(hispidulin)	$Y = 1\ 929.9X - 0.464\ 8$	0.999 6	2.0 ~ 40.0	0.16	0.54
山柰酚(kaempferol)	$Y = 2\ 141.4X - 1.480\ 3$	0.999 4	2.5 ~ 50.0	0.28	0.92
棕矢车菊素(jaceosidin)	$Y = 1\ 901.3X + 2.890\ 9$	0.999 7	10.0 ~ 200.0	0.16	0.54
异泽兰黄素(eupatilin)	$Y = 1\ 704.8X - 3.984\ 9$	0.999 9	25.0 ~ 500.0	0.23	0.75
蔓荆子黄素(casticin)	$Y = 1\ 857.2X - 4.935\ 4$	0.999 6	5.0 ~ 100.0	0.25	0.84

表 2 6个黄酮类成分与异泽兰黄素的相对校正因子

Tab. 2 Relative correction factors of 6 flavonoids components to eupatilin

进样体积 (injection volume)/ μ L	相对校正因子(relative correction factor)					
	5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)	芹菜素 (apigenin)	高车前素 (hispidulin)	山柰酚 (kaempferol)	棕矢车菊素 (jaceosidin)	蔓荆子黄素 (casticin)
2	1.388	0.942	0.994	0.937	0.950	1.290
4	1.394	0.954	1.001	0.982	0.960	1.284
6	1.385	0.946	1.006	0.951	0.960	1.296
8	1.388	0.988	1.010	0.952	0.968	1.295
10	1.389	0.962	0.982	0.945	0.954	1.298
12	1.373	0.953	1.023	0.944	0.960	1.310
平均值(mean)	1.386	0.958	1.003	0.952	0.959	1.296
RSD/%	0.51	1.7	1.4	1.6	0.64	0.67

2.3.4 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件连续进样6次进行分析,记录各色谱峰峰面积,计算RSD。5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素峰面积的RSD($n=6$)分别为0.58%、0.64%、1.0%、0.74%、0.66%、1.1%和0.77%,结果表明仪器的精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 精密称取S1样品粉末(过4号筛),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于配制后的0、2、4、8、12、24 h按“2.1”项下色谱条件进行进样分析,记录峰面积。5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素峰面积的RSD($n=6$)分别为0.27%、0.42%、0.33%、0.46%、0.25%、0.30%和0.41%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 精密称取S1样品粉末(过4号筛)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件,分别进样分析,记录峰面积。5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素的平均含量($n=6$)分别为0.233 3、0.092 1、0.043 0、0.087 6、0.245 6、0.764 2、0.059 4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为1.1%、1.3%、1.4%、1.2%、0.98%、1.1%和1.2%,表明该方法的重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密称取S15样品粉末(过4号筛)9份,每份约0.1 g,分成3组,每组3份,分别按照供试品中待测成分的量与对照品量之比为1:0.8、1:1、1:1.2,精密加入对照品适量,按照“2.2.2”项下的方法制备供试溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算各待测物质的平均加样回收率和RSD,结果见表3,表明该方法的回收率良好。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab. 3 Results of recovery test

成分 (component)	样品量 (sample weight)/ g	原含量 (original amount)/ mg	加入量 (added)/ mg	测得量 (measured)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramet hoxyflavone)	0.103 3	0.051 4	0.041 0	0.092 2	99.6	100.1	1.0
	0.101 0	0.052 0	0.041 0	0.092 3	98.4		
	0.100 2	0.051 8	0.041 0	0.092 6	99.6		
	0.102 5	0.051 2	0.051 2	0.102 7	100.6		
	0.100 6	0.051 4	0.051 2	0.103 2	101.2		
	0.102 6	0.051 0	0.051 2	0.102 5	100.6		
	0.103 0	0.051 4	0.061 4	0.112 4	99.3		
	0.100 9	0.050 9	0.061 4	0.112 5	100.3		
	0.102 1	0.050 6	0.061 4	0.113 0	101.6		
芹菜素(apigenin)	0.103 3	0.005 9	0.004 8	0.010 7	100.0	99.6	1.5
	0.101 0	0.006 3	0.004 8	0.011 0	97.9		
	0.100 2	0.006 1	0.004 8	0.010 8	97.9		
	0.102 5	0.005 8	0.006 0	0.011 7	98.3		
	0.100 6	0.006 2	0.006 0	0.012 3	101.7		
	0.102 6	0.006 4	0.006 0	0.012 3	98.3		
	0.103 0	0.006 1	0.007 2	0.013 3	100.6		
	0.100 9	0.005 8	0.007 2	0.013 1	101.4		
	0.102 1	0.005 8	0.007 2	0.013 0	100.0		
高车前素(hispidulin)	0.103 3	0.011 0	0.009 1	0.020 0	98.9	100.2	1.1
	0.101 0	0.011 3	0.009 1	0.020 3	98.9		
	0.100 2	0.011 3	0.009 1	0.020 4	100.0		
	0.102 5	0.011 0	0.011 4	0.022 6	101.8		
	0.100 6	0.011 5	0.011 4	0.023 0	100.9		
	0.102 6	0.011 8	0.011 4	0.023 1	99.1		
	0.103 0	0.011 5	0.013 7	0.025 3	100.7		
	0.100 9	0.011 6	0.013 7	0.025 3	100.0		
	0.102 1	0.011 3	0.013 7	0.025 2	101.5		
山柰酚(kaempferol)	0.103 3	0.009 3	0.007 5	0.016 8	99.7	99.8	0.85
	0.101 0	0.009 3	0.007 5	0.016 8	99.7		
	0.100 2	0.009 4	0.007 5	0.016 8	98.4		
	0.102 5	0.009 4	0.009 4	0.018 9	101.1		
	0.100 6	0.009 4	0.009 4	0.018 8	100.0		
	0.102 6	0.009 4	0.009 4	0.018 8	100.0		
	0.103 0	0.009 5	0.011 3	0.020 7	99.3		
	0.100 9	0.009 6	0.011 3	0.020 8	99.3		
	0.102 1	0.009 5	0.011 3	0.020 9	101.1		
棕矢车菊(jaceosidin)	0.103 3	0.086 1	0.069 1	0.154 8	99.4	99.9	0.51
	0.101 0	0.086 8	0.069 1	0.155 2	99.0		
	0.100 2	0.085 8	0.069 1	0.155 0	100.1		
	0.102 5	0.086 6	0.086 4	0.173 3	100.3		
	0.100 6	0.085 8	0.086 4	0.172 6	100.5		

表 3(续)

成分 (component)	样品量	原含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD/ %
	(sample weight)/ g	(original amount)/ mg	(added)/ mg	(measured)/ mg	(recovery)/ %	(average recovery)/ %	
异泽兰黄(eupatilin)	0.102 6	0.086 0	0.086 4	0.172 2	99.8		
	0.103 0	0.086 0	0.103 7	0.189 9	100.2		
	0.100 9	0.086 3	0.103 7	0.190 4	100.4		
	0.102 1	0.085 9	0.103 7	0.189 3	99.7		
	0.103 3	0.084 7	0.068 1	0.153 2	100.6	99.5	2.0
	0.101 0	0.084 0	0.068 1	0.152 3	100.2		
	0.100 2	0.085 3	0.068 1	0.153 3	99.8		
	0.102 5	0.084 3	0.085 2	0.169 1	99.6		
	0.100 6	0.084 1	0.085 2	0.168 8	99.4		
	0.102 6	0.085 1	0.085 2	0.171 0	100.9		
葛荆子黄素(casticin)	0.103 0	0.083 6	0.102 2	0.180 0	94.3		
	0.100 9	0.084 1	0.102 2	0.187 1	100.7		
	0.102 1	0.085 0	0.102 2	0.187 4	100.2		
	0.103 3	0.009 6	0.007 9	0.017 5	100.0	100.1	1.4
	0.101 0	0.009 7	0.007 9	0.017 5	98.5		
	0.100 2	0.009 5	0.007 9	0.017 3	98.7		
	0.102 5	0.009 5	0.009 9	0.019 3	99.0		
	0.100 6	0.009 7	0.009 9	0.019 5	99.0		
	0.102 6	0.009 5	0.009 9	0.019 6	102.0		
	0.103 0	0.010 1	0.011 9	0.022 2	101.7		
0.100 9	0.009 5	0.011 9	0.021 6	101.9			
0.102 1	0.009 8	0.011 9	0.021 7	100.0			

2.4 校正因子的重复性考察

2.4.1 不同仪器和不同色谱柱考察试验 试验分别考察 2 台高效液相色谱仪 Agilent 1260、Ulimite 3000 和 2 种色谱柱 Agilent ZORBAX SB - C₁₈ (150 mm × 4.6

mm, 5 μm)、Thermo Scientific™ Hypersil GOLD C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm), 各待测成分的相对校正因子结果见表 4。表明, 相对校正因子在不同的色谱柱和仪器下无显著性影响, 具有较好的适用性。

表 4 采用不同仪器和色谱柱测艾叶中 7 个黄酮类成分的相对校正因子

Tab. 4 The relative correction factors of seven flavanoids in Artemisiae Argyi Folium by different instruments and chromatographic columns

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	相对校正因子(relative correction factor)				
		5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)	芹菜素 (apigenin)	高车前素 (hispidulin)	山柰酚 (kaempferol)	棕矢车菊素 (jaceosidin)
Agilent 1260	Agilent ZORBAX SB - C ₁₈	1.375	0.987	0.931	0.984	0.980
	Thermo Scientific™ C ₁₈	1.387	0.993	0.944	0.952	0.966
Ulimite 3000	Agilent ZORBAX SB - C ₁₈	1.394	1.024	0.956	0.966	0.944
	Thermo Scientific™ C ₁₈	1.388	0.982	0.974	0.947	0.951
平均(mean)		0.997	0.951	0.962	0.960	1.269
RSD/%		1.6	1.6	1.4	1.4	1.1

2.4.2 不同流速对相对校正因子的影响 采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 考察流速为 0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹ 时的相对校正因子, 结果流速为 0.8 mL · min⁻¹ 时 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、葛荆子黄素相对校正因子分别为 1.372、0.977、0.948、0.974、0.962、1.273; 流速为 1.0 mL · min⁻¹ 时上述成分的相对校正因子分别为 1.382、0.966、0.931、0.958、0.944、1.254, 流速为 1.2 mL · min⁻¹ 时上述成分的相对校正因子分别为 1.380、1.001、0.970、0.968、0.971、1.280。3 种流速下求得上述成分相对校正因子的 RSD ($n = 3$) 分别为 0.86%、0.94%、1.0%、0.77%、1.2% 和 1.2%, 说明相对校正因子在不同流速下具有良好适用性。

2.4.3 不同柱温对相对校正因子的影响 采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 考察柱温为 25、30、35 °C 时的相对校正因子, 结果柱温为 25 °C 时 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前

素、山柰酚、棕矢车菊素、葛荆子黄素的相对校正因子分别为 1.383、0.984、0.932、0.964、0.957、1.252, 柱温为 30 °C 时上述成分的相对校正因子分别为 1.342、0.970、0.970、0.982、0.973、1.240, 柱温为 35 °C 时上述成分的相对校正因子分别为 1.347、0.956、0.940、0.968、0.960、1.260。3 种柱温下求得的相对校正因子的 RSD ($n = 3$) 分别为 0.94%、1.3%、1.2%、1.2%、0.95% 和 1.0%, 说明相对校正因子在不同柱温下具有良好的适用性。

2.5 QAMS 法中待测成分色谱峰的定位

QAMS 法待测成分色谱峰可以用相对保留值法 $R_{i/s} = t_{R(i)}/t_{R(s)}$ 以及各色谱峰的紫外吸收特征来准确地定位。本研究考察了相对保留时间在不同色谱柱和不同品牌仪器上的重现性, 结果见表 5。还考察了 Agilent 1260 高效液相色谱仪, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温分别为 25、30、35 °C, 以及流速为 0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹ 时的相对保留时间。结果显示, 各成分的相对保留时间无明显差异变化, 则可选用相对保留值作为目标成分色谱峰的定位指标。

表 5 采用不同仪器和色谱柱测艾叶中 7 个黄酮类成分的相对保留时间

Tab. 5 The relative retention time of seven flavanoids in Artemisiae Argyi Folium by different instruments and chromatographic column

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	相对保留时间(relative retention time)				
		5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)	芹菜素 (apigenin)	高车前素 (hispidulin)	山柰酚 (kaempferol)	棕矢车菊素 (jaceosidin)
Agilent 1260	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	0.842	0.923	1.028	1.102	1.212
	Thermo Scientific™ C ₁₈	0.833	0.914	1.034	1.123	1.243
Ultimate 3000	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	0.842	0.935	1.045	1.122	1.233
	Thermo Scientific™ C ₁₈	0.853	0.927	1.068	1.136	1.217
平均(mean)		0.925	1.044	1.121	1.226	1.771
RSD/%		0.76	1.5	1.2	1.2	0.94

2.6 样品测定

取 7 个产地的 20 批艾叶, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 使用建立的 QAMS 法计算艾叶中 7 个黄酮类成分的含量, 结果见表 6。

2.7 QAMS 法与外标法测定结果比较

取供试品溶液, 按照“2.1”项色谱条件进样测定, 采用外标法 (ESM) 计算艾叶中 7 个黄酮类成分的

含量, 并将测定的计算结果与 QAMS 法的计算结果进行比较, 验证 QAMS 法用于测定艾叶中 7 个黄酮类成分含量的准确性, 结果见表 6。结果表明 2 种方法测定的结果无显著差异, 表明 QAMS 法测定艾叶中 7 个黄酮类成分的含量具有可行性。同时对 2 种方法的含量测定结果进行 t -检验, 结果无显著性差异 ($P > 0.05$), 显示 QAMS 法准确可行。

表 6 QAMS 法与 ESM 测得艾叶中 7 个黄酮类化学成分的含量 ($n=3$)
 Tab. 6 Quantitative determination of seven flavonoids in *Artemisia Argyi* Folium using QAMS and ESM

编号 (No.)	5-羟基-6,7,3',4'-四甲 氧基黄酮(5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone)		芹菜素 (apigenin)		高车前素 (hispidulin)		山柰酚 (kaempferol)		棕矢车菊素 (jacosidin)		异泽兰黄素 (eupatilin)		葛荆子黄素 (casticin)								
	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %	含量(content)/ (mg·g ⁻¹)	RE/ %							
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS							
S1	0.233 4	0.233 1	-0.13	0.093 4	0.092 6	-0.86	0.042 5	0.043 3	1.88	0.086 4	0.087 3	1.04	0.243 2	0.245 8	1.07	0.765 8	0.764 2	-0.21	0.058 6	0.059 5	1.54
S2	0.312 0	0.312 6	0.19	0.065 4	0.066 3	1.38	0.059 2	0.058 8	-0.68	0.100 4	0.101 6	1.20	0.312 1	0.313 0	0.29	1.033 1	1.043 7	1.22	0.082 1	0.081 4	-0.85
S3	0.162 4	0.164 1	1.07	0.088 2	0.089 9	1.88	0.139 8	0.142 3	1.77	0.117 6	0.116 1	-1.30	0.628 7	0.626 5	-0.35	1.707 6	1.713 5	0.34	0.123 8	0.123 6	-0.13
S4	0.276 3	0.275 2	-0.38	0.061 1	0.060 5	-1.03	0.092 0	0.091 8	-0.21	0.123 4	0.121 1	-1.85	0.556 5	0.552 5	-0.72	1.247 5	1.267 7	1.62	0.102 1	0.103 5	1.39
S5	0.621 7	0.623 5	0.28	0.067 0	0.066 4	-0.88	0.164 3	0.165 1	0.46	0.142 2	0.141 7	-0.33	0.617 4	0.619 5	0.34	2.183 0	2.171 6	-0.52	0.115 4	0.117 3	1.64
S6	0.519 2	0.516 6	-0.51	0.067 8	0.068 9	1.64	0.174 0	0.175 4	0.81	0.105 4	0.104 3	-1.02	0.713 2	0.714 1	0.12	2.542 4	2.555 0	0.50	0.117 2	0.117 3	0.08
S7	0.243 6	0.245 7	0.87	0.066 4	0.065 2	-1.86	0.116 8	0.114 6	-1.90	0.132 5	0.132 9	0.27	0.664 5	0.667 5	0.44	1.458 2	1.462 9	0.33	0.162 1	0.163 0	0.58
S8	0.188 4	0.184 7	-1.95	0.067 1	0.066 3	-1.19	0.129 4	0.129 9	0.35	0.165 4	0.164 3	-0.68	0.421 6	0.417 2	-1.04	2.101 3	2.067 3	-1.62	0.146 7	0.145 7	-0.70
S9	0.357 2	0.358 3	0.32	0.081 4	0.082 0	0.79	0.172 0	0.170 7	-0.73	0.154 2	0.157 1	1.87	0.801 4	0.812 2	1.35	1.596 9	1.628 4	1.97	0.166 3	0.165 2	-0.63
S10	0.244 0	0.243 5	-0.21	0.067 3	0.068 0	1.01	0.086 6	0.085 1	-1.76	0.142 5	0.143 4	0.64	0.327 7	0.328 8	0.35	1.305 4	1.329 5	1.84	0.112 1	0.110 4	-1.51
S11	0.502 0	0.495 7	-1.25	0.061 3	0.062 3	1.71	0.067 5	0.068 8	1.88	0.184 4	0.184 7	0.14	0.479 1	0.477 7	-0.30	1.312 2	1.300 9	-0.86	0.086 8	0.088 1	1.48
S12	0.146 5	0.147 5	0.69	0.068 2	0.067 7	-0.79	0.024 1	0.024 5	1.68	0.020 1	0.020 4	1.46	0.064 2	0.063 2	-1.62	0.283 3	0.281 5	-0.65	0.254 7	0.250 7	-1.58
S13	0.082 2	0.083 0	1.01	0.064 2	0.063 9	-0.45	0.087 4	0.089 0	1.78	0.113 5	0.112 7	-0.69	0.279 6	0.275 7	-1.39	0.759 0	0.762 9	0.52	0.045 7	0.044 8	-1.93
S14	0.280 1	0.275 0	-1.82	0.077 4	0.078 9	1.96	0.076 2	0.075 2	-1.26	0.103 5	0.101 9	-1.52	0.628 4	0.620 3	-1.29	1.068 4	1.084 2	1.48	0.268 4	0.273 0	1.71
S15	0.516 3	0.511 6	-0.91	0.060 4	0.059 8	-0.91	0.114 2	0.113 8	-0.35	0.093 3	0.094 0	0.76	0.857 8	0.864 0	0.72	0.839 6	0.851 7	1.44	0.098 9	0.099 4	0.49
S16	0.032 8	0.033 2	1.16	0.001 0	0.001 0	0.79	0.021 3	0.020 9	-1.96	0.025 5	0.025 7	0.66	0.143 9	0.145 6	1.17	0.248 8	0.253 2	1.78	0.031 2	0.031 0	-0.64
S17	0.058 8	0.058 5	-0.55	0.001 2	0.001 2	-1.67	0.021 0	0.020 6	-1.80	0.011 2	0.011 0	-1.79	0.011 5	0.011 7	1.32	0.036 8	0.037 4	1.63	0.015 8	0.015 6	-1.21
S18	0.054 4	0.053 8	-1.17	0.000 9	0.000 9	-1.11	0.028 3	0.027 9	-1.52	0.024 9	0.025 2	1.16	0.264 9	0.262 7	-0.83	0.476 6	0.470 8	-1.21	0.033 4	0.033 0	-1.29
S19	0.043 3	0.042 9	-0.92	0.002 4	0.002 4	-1.67	0.050 0	0.050 6	1.20	0.046 4	0.047 3	1.94	0.412 2	0.405 8	-1.55	0.447 9	0.442 0	-1.32	0.037 1	0.036 8	-0.81
S20	0.031 0	0.031 4	1.29	0.081 7	0.083 0	1.59	0.078 2	0.079 1	1.15	0.098 4	0.097 9	-0.51	0.771 2	0.758 5	-1.65	0.569 2	0.579 8	1.86	0.038 6	0.039 0	1.04

3 讨论

3.1 提取方法的选择

本研究根据黄酮类化合物的溶解性,分别采用提取溶剂(甲醇、乙醇)、提取溶剂浓度(50%、70%、80%、100%)和料液比(1:10、1:25、1:50)对艾叶中7个待测成分的含量测定进行考察,同时因超声提取法操作简单、便捷,因此选择超声提取法。根据结果显示,最终确定按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。

3.2 检测波长的选择

根据各成分在流动相中的紫外吸收谱图来确定检测波长。实验采用 Agilent 1260 G1314F VWD 检测器,着重考察了在 280、326、350、360 nm 等检测波长下艾叶中7个待测成分色谱峰的响应值和分离度,当检测波长为 350 nm 时,色谱峰响应值较高,分离度好,故选择 350 nm 作为本实验 QAMS 法的检测波长。

3.3 内参物的选择

在艾叶药材的7个黄酮类成分中,由于异泽兰黄素性质稳定,在样品中含量较多,易于分离提纯,可轻易获得,因此选作内参物。

3.4 待测成分色谱峰的定位

正确的定位待测成分色谱峰,是 QAMS 法成功应用的重点。本研究以相对保留值结合待测成分的紫外吸收光谱为依据,确定艾叶中黄酮类成分色谱峰的定位。

3.5 样品含量测定结果

本研究对7个产地20批艾叶进样测定,按照“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,在“2.1”项的色谱条件下进行样品分析测定,应用建立的 QAMS 法计算艾叶中7个黄酮类成分含量。20批艾叶中5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮、芹菜素、高车前素、山柰酚、棕矢车菊素、异泽兰黄素、蔓荆子黄素的含量测定结果分别为 0.031 4 ~ 0.623 5、0.000 9 ~ 0.092 6、0.020 6 ~ 0.170 7、0.011 0 ~ 0.184 7、0.011 7 ~ 0.864 0、0.253 2 ~ 2.555 0、0.015 6 ~ 0.250 7 mg · g⁻¹。7个黄酮类成分含量之和为 0.360 0 ~ 5.014 2 mg · g⁻¹。湖北蕲春、河南安阳产的艾叶中7个黄酮类成分的含量之和分别为 1.526 ~ 4.252 mg · g⁻¹、2.309 ~ 3.175 mg · g⁻¹,在7个产地中相对较高,在一定程度上说明药材质量较优。

3.6 小结

本研究建立 QAMS 法同时测定艾叶中7个黄酮类成分,方法学考察表明该方法准确可行。相对校正因子考察发现其在不同仪器、不同色谱柱、不同流速、不同柱温的条件下均具有良好的适用性,因此选用相对保留值作为目标成分色谱峰的定位指标。7个产地20批药材的测定结果与标准曲线法所测值无明显的差异,说明建立不同成分之间的相对校正因子具有较高的可行性。本研究通过 QAMS 技术实现同时测定艾叶中的多个指标成分,为艾叶的质量控制提供了更科学、更准确、更稳定的评价模式。

参考文献

- [1] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.一测多评法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1925
WANG ZM, GAO HM, FU XT, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine[J]. China J Chin Mater Med, 2006, 31(23): 1925
- [2] 王智民,钱忠直,张启伟.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657
WANG ZM, QIAN ZZ, ZHANG QW. The guidelines for establishment of QAMS[J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(6): 657
- [3] 中华人民共和国药典2010年版.一部[S].2010:76,101,416,1182,1493
ChP 2010. Vol I [S]. 2010: 76, 101, 416, 1182, 1493
- [4] 杜清,陈志,吴江,等.一测多评法同时测定斑花黄堇药材中4种生物碱成分[J].中草药,2021,52(19):6038
DU Q, CHEN Z, WU J, et al. Simultaneous determination of four alkaloids in different original *Corydalis conspersa* by QAMS[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(19):6038
- [5] 张作华,褚光松,王海燕,等.一测多评法同时测定苍耳子中5个酚酸类成分的含量[J].药物分析杂志,2021,41(9):1612
ZHANG ZH, CHU GS, WANG HY, et al. Simultaneous determination of five phenolic acids in *Xanthii Fructus* by QAMS[J]. Chin J Pharm Anal, 2021, 41(9):1612
- [6] 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
YU X, DAI YP, ZHOU Q, et al. Simultaneous determination of six organic acids in *Artemisiae Argyi Folium* by QAMS[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(12):2131
- [7] 彭瑶,曾嵘,吴尚洁,等.一测多评法测定藏族药烈香杜鹃中5种黄酮类成分的含量[J].中国中药杂志,2021,46(9):2229
PENG Y, ZENG R, WU SJ, et al. Content determination of five

- flavonoids in Tibetan medicine *Rhododendron anthopogonoides* by quantitative analysis of multi - components by single marker (QAMS)[J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(9):2229
- [8] 徐硕, 徐文峰, 邝咏梅, 等. 一测多评法测定罗布麻叶中6个黄酮类成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(7):1217
XU S, XU WF, KUANG YM, *et al.* Determination of six flavonoids in *Apocyni Veneti Folium* by quantitative analysis of multi - components by single marker [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(7):1217
- [9] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 91
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 91
- [10] SONG XW, WEN X, HE JW, *et al.* Phytochemical components and biological activities of *Artemisia argyi* [J]. *J Funct Food*, 2019, 52: 648
- [11] 马盖凡, 姜雪莲, 侯明楮, 等. 艾叶多糖提取、分离纯化及生物活性研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(11): 1164
MA GF, JIANG XL, HOU MZ, *et al.* Research progress in the extraction, separation, purification and biological activities of polysaccharides from leaves of *Artemisia argyi* [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2022, 42(11):1164
- [12] 何柳, 王云鹏, 谢卫红, 等. 艾叶水提物和酸提物的抗氧化及抗菌活性比较[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(10):205
HE L, WANG YP, XIE WH, *et al.* Comparative of antioxidant and antibacterial activities of aqueous and acidic extracts from *Artemisia argyi*[J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(10):205
- [13] XIAO JQ, LIU WY, SUN HP, *et al.* Bioactivity - based analysis and chemical characterization of hypoglycemic and antioxidant components from *Artemisia argyi* [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103268
- [14] 杨洋, 梅全喜, 杨光义, 等. 艾叶在古今瘟疫防治中的研究与应用[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(2):438
YANG Y, MEI QX, YANG GY, *et al.* Research and application of *Artemisia argyi* in prevention and treatment of ancient and modern plague [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(2): 438
- [15] 蔡平. 艾叶的药理作用及应用[J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(12):1137
CAI P. Pharmacological action and application of *Artemisia argyi* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2001, 12(12):1137
- [16] 马旭, 卫若楠, 于同月, 等. 艾叶的临床应用及其量效关系[J]. *吉林中医药*, 2021, 41(11):1502
MA X, WEI RN, YU TY, *et al.* A study of the clinical application and dose - effect relationship of argy wormwood leaf [J]. *Jilin J Chin Med*, 2021, 41(11):1502
- [17] 闫婷, 周正繁, 罗苗, 等. 不同产地艾叶挥发油的成分及含量分析[J]. *中药材*, 2022, 45(10):2425
YAN T, ZHOU ZF, LUO M, *et al.* Composition and content of essential oil in *Artemisia argyi* leaves from different producing areas [J]. *J Chin Med Mater*, 2022, 45(10):2425
- [18] 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
ZAHNG Y, KANG LP, GUO LP, *et al.* Herbalogical study of mugwort leaves and research advances in its application [J]. *Shanghai J Acup Moxib*, 2017, 36(3):245
- [19] 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
ZHOU J, LI Y, LIU Y, *et al.* Research status analysis of main chemical constituents in *Artemisia argyi* leaves from different producing areas [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(15):4882
- [20] 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
LAN XY, ZHU LB, HUANG XZ, *et al.* Study on identification and quantitation of main compounds in *Artemisiae Argyi Folium* [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(24):7630
- [21] 胡倩, 刘大会, 曹艳. 艾叶黄酮类化合物的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12):3648
HU Q, LIU DH, CAO Y. Research progress on flavonoids from *Artemisia argyi*[J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(12):3648
- [22] 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
LAN XY, ZHANG Y, ZHU LB, *et al.* Research progress on chemical constituents from *Artemisiae Argyi Folium* and their pharmacological activities and quality control [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(17):4017
- [23] 胡倩, 李静, 刘大会, 等. 艾叶总黄酮提取物体内抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(6):304
HU Q, LI J, LIU DH, *et al.* Antioxidant activity of total flavonoids extracts from *Folium of Artemisiae Argyi in vitro* and *in vivo* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(6):304
- [24] 王小俊, 陈霖霖, 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
WANG XJ, CHEN LL, FANG Y. Advances in pharmacological effect of eupatilin [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2019, 30(3):665
- [25] 王媛媛, 陈思涵, 许美婧, 等. 艾叶总黄酮与总多糖的提取工艺及其抗氧化性研究进展[J]. *广州化工*, 2020, 48(18):13
WANG YY, CHEN SH, XU MJ, *et al.* Advances in the extraction process and antioxidant properties of total flavonoids and total polysaccharides from *Artemisia argyi* [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2020, 48(18):13

(本文于2023年4月26日收到)