

基于 6 种咖啡酰基奎宁酸类成分结合化学计量法评价不同产地苗药黑骨藤的质量

安兰兰, 李开敏, 何倩倩, 杨婉珠, 刘 刚, 刘育辰*

贵州中医药大学, 贵阳 贵州 550025

摘 要: **目的** 进行不同来源苗药黑骨藤抗类风湿性关节炎有效部位中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B, 异绿原酸 A、异绿原酸 C 6 种咖啡酰基奎宁酸类化学成分测定并结合化学计量学综合分析其质量, 为合理有效评价苗药黑骨藤抗类风湿性关节炎功效提供依据。**方法** 采用 HPLC-UV 法同时测定, 色谱柱为 Xtimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水-乙腈, 梯度洗脱, 进样量 10 μL, 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 327 nm; 采用 SPSS24.0 及 SIMCA14.1 软件进行综合分析评价黑骨藤药材的质量。**结果** 对 21 批不同来源黑骨藤样品进行了含量测定; 通过聚类分析, 将 21 批样品分为 III 类, 其中第 II 类和第 III 类质量较好; 主成分分析和偏最小二乘判别分析结果与聚类结果一致, 筛选得到绿原酸和异绿原酸 C 是引起不同来源黑骨藤质量差异的标志物。**结论** 通过对 6 种咖啡酰基奎宁酸类成分含量测定结合化学计量法, 可以进一步针对黑骨藤抗类风湿性关节炎的功效品质进行评价, 为黑骨藤质量控制提供参考依据。

关键词: 黑骨藤; 咖啡酰基奎宁酸类; 化学计量学; 抗类风湿性关节炎有效部位; 质量评价; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)22-5850-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.023

Evaluating the quality of Miao medicine *Periploca forrestii* Schltr based on 6 caffeoylquinic acid components combined with stoichiometry

AN Lan-lan, LI Kai-min, HE Qian-qian, YANG Wan-zhu, LIU Gang, LIU Yu-chen

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: Objective To investigate the effects of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, and isochlorogenic acid C in effective parts of rhizoma arthritis against rhizoma arthritis from different sources of Miao medicine *Periploca forrestii* Schltr. The determination of 6 kinds of caffeoylquinic acid chemical components and comprehensive analysis of their quality combined with chemometrics provide a basis for a reasonable and effective evaluation of the efficacy of Miao Medicine *Periploca forrestii* Schltr against rheumatoid arthritis. **Methods** Simultaneous determination was performed by HPLC-UV method. The column was Xtimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile, gradient elution, the injection volume was 10 μL, and the flow rate was 1 mL/min. The column temperature is 25 °C and the detection wavelength is 327 nm. SPSS24.0 and SIMCA14.1 software are used for comprehensive analysis and evaluation of the quality of medicinal materials. **Results** The content of 21 batches of *Periploca forrestii* Schltr samples from different sources was determined. Through the cluster analysis, the 21 batches of samples were classified into type III, of which the quality of types II and III was better; principal component analysis and partial least squares discriminant analysis The results were consistent with the clustering results. The chlorogenic acid and isochlorogenic acid C were screened to be the markers that caused the differences in the quality of *Periploca forrestii* Schltr from different sources. **Conclusion** The determination of the contents of six caffeoylquinic acid components combined with stoichiometry can further evaluate the efficacy and quality of the anti-rheumatoid arthritis effect of *Periploca forrestii* Schltr, and provide a reference basis for the quality control of *Periploca forrestii* Schltr.

Key words: *Periploca forrestii* Schltr.; coffee acyl quinines; chemometrics; anti-rheumatoid arthritis effective fraction; quality evaluation; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81860700); 国家自然科学基金项目 (81560618); 国家自然科学基金项目 (U1812403); 贵州省国内一流建设学科项目 (中药学) (GNYL (2017) 008 号)

作者简介: 安兰兰 (1995—), 女, 贵州遵义人, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药化学及中药新药的研究。E-mail: 2918422741@qq.com

*通信作者 刘育辰 (1982—), 女, 吉林长春人, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制等研究工作。E-mail: lyc8564732@163.com

黑骨藤是萝藦科 (Asclepiadaceae) 杠柳属植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的干燥根或全株, 是贵州省少数民族用药, 收载于《中华本草》(苗药卷)^[1]。味苦、辛, 具有祛风除湿, 活血消痛之功效, 用于风湿关节痛, 跌扑损伤, 月经不调^[2]。前期文献调研表明^[3], 黑骨藤具有抗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、强心、抗肿瘤及免疫抑制等作用, 其主要含有的化学成分类型主要为醌类、黄酮类、苯丙素类、萜类和 C21 甾体类等。本课题组前期研究发现, 黑骨藤醋酸乙酯部位有良好的体内抗 RA 活性, 为黑骨藤抗 RA 有效部位。研究表明, 黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类成分具有较好的抗 RA 活性^[4]。而黑骨藤质量控制方法目前主要依据《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 年版), 但在该标准中对黑骨藤的检测仅限于性状、显微及部分理化鉴别试验, 不能很好的控制黑骨藤的药材质量^[5]。将这些功效成分作为黑骨藤抗 RA 有效部位含量测定的指标性成分, 同时结合化学计量学方法^[6-7], 用于黑骨藤抗 RA 功效的质量评价研究还不够深入^[8-9]。因此, 本研究通过 HPLC-UV 法测定黑骨藤醋酸乙酯部位 6 种咖啡酰基奎宁酸类成分含量结合聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 及偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 综合评价黑骨藤药材质量, 对于指导黑骨藤药材合理采收、产地加工、资源开发具有重要意义^[10]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-2030CN 高效液相色谱仪, 包括自动进样系统、柱温箱、二极管阵列检测器和色谱工作站 (日本岛津公司); XS205 型十万分之一天平 (瑞士梅特公司); FA2204B 型电子天平 (上海天美天平仪器有限公司); DRHH-2 型数显恒温水浴锅 (上海双捷实验设备有限公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品 (批号 CHB190121)、新绿原酸对照品 (批号 CHB190217)、隐绿原酸对照品 (批号: CHB180905)、异绿原酸 A 对照品 (批号 CHB180921)、异绿原酸 B 对照品 (批号 CHB180923)、异绿原酸 C 对照品 (批号 CHB180925) 购于成都克洛玛生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。乙腈为色谱纯 (美国天地公司), 其他试剂均为分析纯, HPLC 用水为娃哈哈有限公司纯净水。

21 批不同来源于黑骨藤药材, 经贵州中医药大学刘育辰教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的干燥根茎, 具体信息见表 1。

表 1 样品来源信息

Table 1 Source information of samples

编号	来源	编号	来源
S1	贵阳市花果园本草药行	S12	贵州福泉哈峰凤岗景区 1 号
S2	贵阳市花果园博信中药材经营部	S13	贵州道真 1 号
S3	贵阳市花果园王氏虫草行	S14	贵州黔陶 1 号
S4	贵阳市花果园铤铭药行	S15	贵州息烽
S5	贵阳市花果园药材市场	S16	贵州兴仁县回龙镇
S6	贵阳市花果园鸿源药行	S17	贵州水城县
S7	贵州花溪近郊	S18	广西柳州
S8	贵州龙宫	S19	广西桂林
S9	贵州道真县上坝镇标水岩 2 号	S20	广西柳州
S10	贵州安顺 1 号	S21	云南丘北县
S11	贵州惠水县九龙寺		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Xtimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱, 洗脱程序为 0~16 min, 8%~9%B; 16~21 min, 9%~11%B; 21~25 min, 11%~13%B; 25~60 min, 13%~16%B; 60~85 min, 16%B; 85~90 min, 16%~17%B; 90~98 min, 17%~20%B; 98~104 min, 20%~21%B; 104~115 min, 21%~22%B; 进样量 10 μL; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 327 nm。色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取对照品新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 5.02、5.00、5.02、5.03、5.04、5.01 mg 置于 5 mL 量瓶, 加甲醇定容至刻度, 配制成相应浓度单一对照品储备液; 再精密吸取各对照品储备液适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 20.08、100.00、20.08、20.12、20.16、100.20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取药材样品粉末 16.0 g, 按料液比 1:25 加入 70%乙醇溶液 400 mL, 加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 水浴蒸干, 加水使成混悬液, 分别依次用等量石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 各萃取 3 次, 将 3 次醋酸乙酯萃取液合并, 减

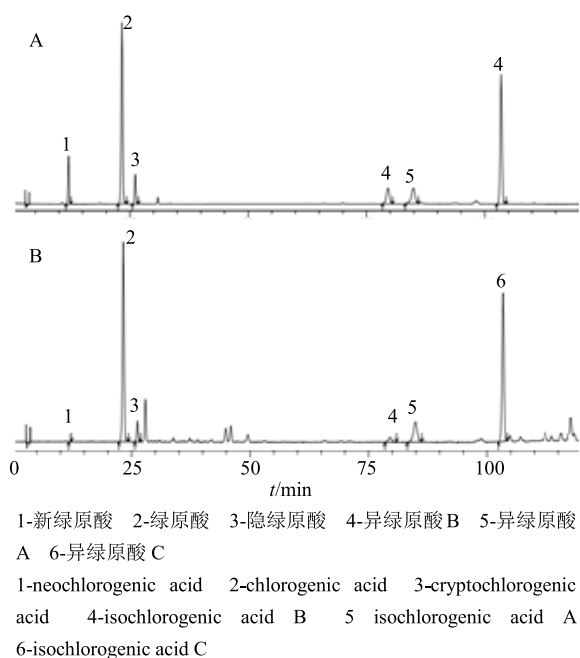


图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC for mixed reference substance (A) and samples (B)

压浓缩, 水浴蒸干, 真空干燥, 研磨至粉末状, 得黑骨藤醇提物醋酸乙酯萃取部位 (HGT-C)。精密称定 HGT-C 部位粉末 25 mg, 置 10 mL 量瓶, 加甲醇 2 mL, 超声处理 2 min, 放冷, 加甲醇定容至刻度、摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密量取上述单一对照品储备液各 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 制备得到混合对照品 1; 再精密吸取混合对照品 1, 置 100 mL 量瓶, 加甲醇定容, 制备得到混合对照品 2。按“2.1”项下色谱条件, 混合对照品 1 分别进样 1、5、10、15、20 μL , 混合对照品 2 分别进样 1、10 μL , 测定各成分的峰面积, 以各成分的进样量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得各成分的线性回归方程、相关系数 (r) 及线性范围; 以信噪比 (S/N) 约为 3:1 的对照品溶液浓度作为检测限 (LOD), 以 S/N 约为 10:1 的对照品溶液浓度为定量限 (LOQ)。结果见表 2。

表 2 6 个咖啡酰基奎宁酸类成分的线性关系

Table 2 Linearity correlations of 6 coffee acyl quinines analytes

化合物	线性回归方程	r	线性范围/ μg	LOQ/ng	LOD/ng
新绿原酸	$Y=3 \times 10^6 X-29\ 654$	0.999 1	0.010 04~2.008 00	0.200 8	0.040 16
绿原酸	$Y=3 \times 10^6 X-51\ 805$	0.999 6	0.010 00~2.000 00	0.200 0	0.010 00
隐绿原酸	$Y=3 \times 10^6 X-39\ 017$	0.999 6	0.010 04~2.008 00	0.200 8	0.040 16
异绿原酸 B	$Y=3 \times 10^6 X-57\ 403$	0.999 6	0.010 06~2.012 00	2.012 0	0.804 80
异绿原酸 A	$Y=3 \times 10^6 X-70\ 520$	0.999 6	0.015 12~2.016 00	2.016 0	0.806 40
异绿原酸 C	$Y=3 \times 10^6 X-51\ 563$	0.999 6	0.010 02~2.004 00	2.004 0	1.002 00

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各成分峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的峰面积 RSD 分别为 0.24%、0.32%、0.36%、0.59%、0.99%、0.47%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 分别在室温下放置 0、2.5、5、10、20、40 h, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录各成分峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的峰面积 RSD 分别为 2.13%、2.13%、2.32%、2.46%、2.45%、2.08%, 表明供试品溶液在 40 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批黑骨藤样品 (S3) HGT-C 部位供试品, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 计算其质量分数 RSD。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的质量分数 RSD 分别为 1.77%、1.29%、1.08%、0.76%、1.14%、1.28%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批黑骨藤样品 (S3) HGT-C 部位供试品粉末 12.5 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 分别精密加入不同质量浓度的新绿原酸 (12.78 $\mu\text{g/mL}$)、绿原酸 (472.40 $\mu\text{g/mL}$)、隐绿原酸 (46.08 $\mu\text{g/mL}$)、异绿原酸 B (29.12 $\mu\text{g/mL}$)、异绿原酸 A (118.60 $\mu\text{g/mL}$) 和异绿原酸 C (424.80 $\mu\text{g/mL}$) 对

照品各 1 mL, 超声 2 min, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 平行制备 6 份。按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 计算其回收率分别 102.4%、100.1%、98.27%、101.0%、100.8%、96.26%, RSD 值分别为 1.06%、1.67%、1.51%、2.88%、0.77%、0.95%, 表明建立的含量测定方法准确性

良好。

2.9 样品测定

取 21 批黑骨藤药材样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 计算样品中各成分的质量分数, 结果见表 3。

表 3 21 批样品测定结果
Table 3 Determination results of 21 batches of samples

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
S1	0.945 0	28.579 0	3.218 0	1.804 0	8.050 0	34.358 0
S2	0.836 0	18.536 0	2.720 0	1.071 0	2.937 0	11.377 0
S3	0.963 0	36.741 0	3.626 0	2.249 0	9.174 0	32.238 0
S4	0.976 0	24.976 0	3.062 0	—	7.517 0	34.723 0
S5	—	3.257 0	0.897 0	—	1.752 0	3.263 0
S6	0.715 0	19.529 0	2.392 0	1.401 0	7.334 0	26.588 0
S7	1.100 0	31.097 0	3.585 0	2.024 0	6.195 0	24.647 0
S8	1.467 0	48.468 0	4.467 0	—	3.486 0	18.151 0
S9	0.737 0	6.595 0	1.573 0	—	2.075 0	4.353 0
S10	0.760 0	9.183 0	1.776 0	—	2.500 0	5.864 0
S11	—	5.062 0	1.014 0	—	—	—
S12	0.769 0	9.464 0	1.875 0	—	3.043 0	9.478 0
S13	—	4.670 0	0.868 0	—	2.425 0	10.372 0
S14	0.397 0	10.515 0	1.659 0	—	2.863 0	5.864 0
S15	5.942 0	20.932 0	8.472 0	—	3.341 0	6.610 0
S16	0.883 0	9.522 0	1.804 0	—	1.643 0	2.437 0
S17	0.709 0	14.555 0	1.477 0	—	6.771 0	54.758 0
S18	—	5.014 0	—	—	2.047 0	5.179 0
S19	—	3.998 0	—	1.650 0	4.081 0	6.147 0
S20	—	2.453 0	—	—	—	3.635 0
S21	0.427 0	9.481 0	1.490 0	1.504 0	9.661 0	34.080 0

3 化学计量分析

3.1 CA

以 21 批黑骨藤药材中 6 个咖啡酰基奎宁酸类成分含量为变量, 运用 SPSS 24.0 统计软件, 采用组间平均数联结法, 以平方欧氏距离作为样品相似度的距离公式, 对药材样品进行 CA。结果表明, 21 批样品聚为 3 类, S10、S14、S16、S5、S20、S9、S18、S19、S11、S12、S13、S2、S15 为第 I 类; S1、S4、S3、S7、S6、S21、S17 为第 II 类; S8 单独为第 III 类。聚类图见图 2。

通过 CA 结果可以看出, 第 I 类样品中 6 种成分都含量偏低, 且有 6 批样品不含新绿原酸, 11 批样品不含异绿原酸 B, 其中采集于广西省的 3 批药材中绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 含量均较低, 且在柳州采集的 2 批样品均不含新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B; 第 II 类样品中绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 含量都较高, 其余成分也基本都能够检测得到; 而自成一类的 S8 样品中, 其绿原酸含量是 21 批样品中最高的, 但没有检测到异绿原酸 B。

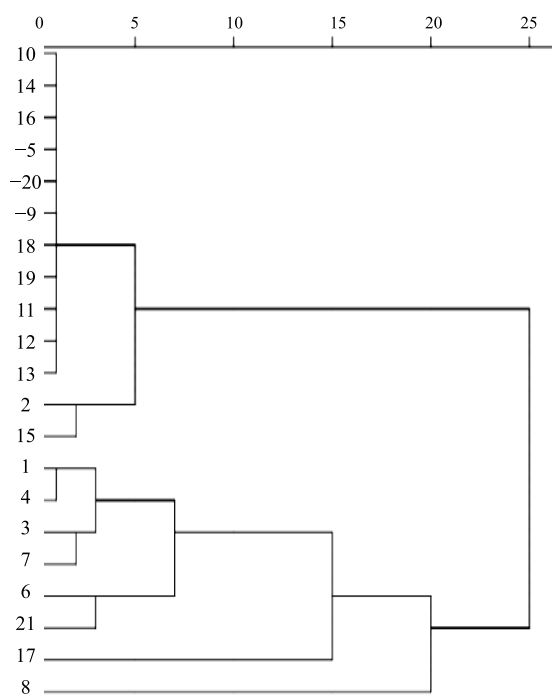


图 2 21 批样品聚类分析树状图

Fig.2 Cluster analysis of 21 batches of samples

3.2 PCA 和 PLS-DA

采用多元变量统计软件 SIMCA14.1 得到 PCA 得分图以及其 3D 图和 21 批样品的 PLS-DA 得分图、3D 图及 VIP 图。结果表明, 采用非监督模式识别方法 PCA 来观察样品的自然聚集。21 批样品同样也聚为 3 类, 且分离更加显著, 与 CA 结果一致。可以更加直观的显示样品间的差异, 贵州龙宫采集黑骨藤偏离 4 个象限在外, 广西分布在第 3 象限, 云南、贵州分布在第 1、2、4 象限。其中 1、2 象限的药材质量较好, 且可以看出广西产区与云南、贵州产区有一定的差别。

结合变量重要性投影 (VIP) 法, 以 VIP 值大于 1 为标准, 筛选得到具有统计学意义的 2 个差异性标志物, 其影响程度依次为峰 2 > 峰 6 > 峰 5 > 峰 3 > 峰 4 > 峰 1, 分别为绿原酸、异绿原酸 C、异绿原酸 A、隐绿原酸、异绿原酸 B、新绿原酸。其中绿原酸和异绿原酸 C 这 2 个成分是引起不同地方黑骨藤变化的标志物, 为黑骨藤的质量控制提供科学依据。

4 讨论

4.1 检测波长的选择

本实验通过 DAD 检测器进行 190~450 nm 全波长扫描, 结果显示在 327 nm 波长下色谱峰分离

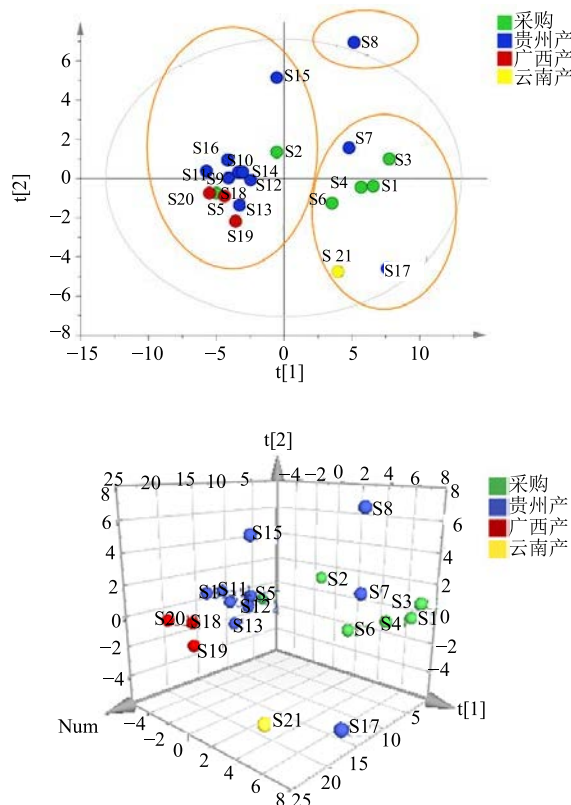


图 3 21 批样品的 PCA 得分图及其 3D 图

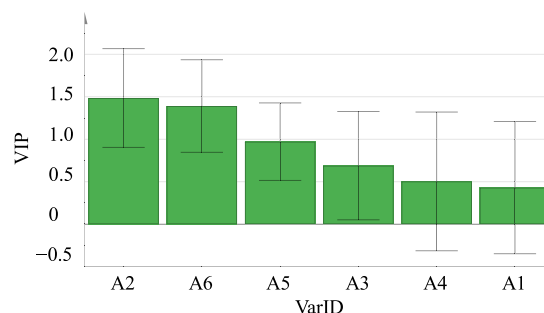
Fig. 3 PCA of score plot or 3D for 21 *Periploca forrestii* Schltr samples

图 4 重要性变量投影图

Fig. 4 VIP plot of PLS-DA

度较好, 响应值较高, 信息较完全。

4.2 流动相系统的选择

本实验考察了乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%醋酸水、乙腈-0.2%甲酸水、乙腈-0.05%甲酸水等流动相系统, 结果表明, 乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱时色谱峰峰形较好, 分离度较高, 因此选用乙腈-0.1%甲酸水溶液。

4.3 柱温、体积流量、色谱柱的选择

本实验柱温考察了 20、25、30 ℃。结果显示

在 25 ℃下各个色谱峰分离较好, 体积流量考察了 0.8、1.0、1.2 mL/min 结果显示在 1.0 mL/min 下各个色谱峰分离较好。选用了 CAPCELL PAK C₁₈ MGII、Xtimate C₁₈ 及 Agilent C₁₈ 3 种色谱柱, 结果显示当色谱柱为 Xtimate C₁₈ 时各个被测成分分离效果更好。

4.4 小结

本研究建立了 HPLC-UV 法分析测定黑骨藤抗风湿性关节炎有效部位活性成分含量的方法, 在对多批次样品分析基础上, 所建立的定量分析结合化学计量分析方法可用于黑骨藤的质量控制及质量标准^[11]的提高, 为中药不同产地批次间的质量评价研究提供借鉴。

参考文献

- [1] 邱德文. 中华本草 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005.
- [2] 贵州省中药材、民族药材质量标准 (2003 年版) [S]. 2003.
- [3] 李雪峰, 刘育辰, 刘 刚, 等. 苗药黑骨藤化学成分及

药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2018, 40(4): 904-912.

- [4] 王 霞, 蒋 礼, 何燕玲, 等. 黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类化合物体外抗风湿性关节炎机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1362-1367.
- [5] 王 强, 韩隆胤, 魏赓权, 等. 《贵州省中药材、民族药材质量标准》中黑骨藤化学鉴定方法之商榷 [J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(11): 112-113.
- [6] 于鹤丹. 多元统计分析方法在中药质量评价中的应用 [J]. 数理医药学杂志, 2006, 19(1): 85-87.
- [7] 孙立丽, 王 萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [8] 刘育辰, 刘丽苹, 刘 刚, 等. 苗药黑骨藤多指标的含量测定及聚类分析 [J]. 中国药房, 2018, 29(12): 1636-1639.
- [9] 董 莉. 黑骨藤抗炎作用及质量控制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [10] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [11] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.