

不同产地溪黄草中酚酸类成分测定和主成分分析

龚建平¹, 刘盼盼¹, 徐云龙², 孙勇兵¹, 陈焱³, 吴东¹, 黄文平^{1*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西省中医药研究院, 江西 南昌 330077

3. 恩施土家族自治州市场监督管理局, 湖北 恩施 445000

摘要: 目的 建立同时测定不同产地溪黄草中绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸的高效液相色谱法, 比较评价不同产地溪黄草质量的差异性。方法 采用 Cosmosil 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1%冰醋酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 330 nm; 进样量 10 μL。采集溪黄草中 4 个成分定量数据, 运用 SIMCA 13.0 软件进行主成分分析 (PCA), 辅助结合正交偏最小二乘 (OPLS)、聚类分析 (HCA) 进行判别。结果 绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸分别在 0.014~0.280、0.026~0.520、0.012~0.240、0.240~4.800 μg 线性关系良好; 平均回收率分别为 100.63%、99.08%、99.30%、101.23%, RSD 值分别为 0.92%、1.34%、2.05%、0.86%。经主成分分析得出, 咖啡酸和迷迭香酸是两个不同产地溪黄草构成差异的主要原因。结论 HPLC 法同时测定溪黄草中 4 种酚酸类成分绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸较为稳定, 其中咖啡酸、迷迭香酸可作为区分不同产地溪黄草的质量标准之一。

关键词: 溪黄草; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 迷迭香酸; 高效液相色谱; 主成分分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)07-1956-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2019.07.004

Determination and principal component analysis of phenolic acids in *Isodon sorra* from different habitats

GONG Jian-ping¹, LIU Pan-pan¹, XU Yun-long², SUN Yong-bing¹, CHEN Xi³, WU Dong¹, HUANG Wen-ping¹

1. National Engineering Research Center for Solid Preparation Technology of Chinese Medicines, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. Jiangxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330077, China

3. Enshi Tujia Autonomous Prefecture Market Supervision and Administration Bureau, Enshi 445000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, and rosmarinic acid in *Isodon sorra* (Maxim.) Kudo from different habitats, and to compare and evaluate the quality difference of *I. sorra* from different habitats. **Methods** The separation was carried out on Cosmosil column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol - 0.1% glacial acetic acid solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and the detective wavelength was set at 330 nm. The volume of injection was 10 μL. Quantitative data of 4 components in *I. sorra* were collected. PCA was carried out by SIMCA 13.0 Software, and the discrimination was assisted by OPLS and HCA. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, and rosmarinic acid were 0.014 — 0.280, 0.026 — 0.520, 0.012 — 0.240, and 0.240 — 4.800 μg, respectively. The average recovery rates were 100.63%, 99.08%, 99.30%, and 101.23%, respectively. The RSD values were 0.92%, 1.34%, 2.05%, and 0.86%. The results of PCA showed that caffeic acid and rosmarinic acid were the main reasons for the differences in the composition of *I. sorra* from two different habitats. **Conclusion** Simultaneous determination of 4 phenolic acids in *I. sorra* by HPLC is relatively stable. Caffeic acid and rosmarinic acid can be used as one of the quality standards to distinguish *I. sorra* from different habitats.

Key words: *Isodon sorra* (Maxim.) Kudo; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; rosmarinic acid; HPLC; PCA

收稿日期: 2019-04-22

基金项目: 国家重大研究发展计划项目 (2017YFC1702906); 江西省卫计委中医药科研项目 (2018B144)

作者简介: 龚建平, 男, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂和功能性食品。E-mail: 1815784092@qq.com

*通信作者 黄文平, 男, 助理研究员, 从事中药药物质基础及质量标准研究。E-mail: huangwenping89@126.com

溪黄草为唇形科香茶菜属线纹香茶菜 *Isodon striatus* (Benth.) Kudo 或溪黄草 *I. sorra* (Maxim.) Kudo 的干燥地上部分,《广西中药材标准》《广东中药材标准》均有收载。溪黄草具有清热、利湿、退黄的功效,用于湿热黄疸、湿热泻痢、急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎而有黄疸者^[1]。溪黄草在广东各地临床应用较为普遍,并开发出多种中成药或保健品,如溪黄草冲剂、溪黄草茶和溪黄八珍茶等。溪黄草中主要含有酚酸类、黄酮类、香豆素、挥发油等成分^[2-4]。药理学实验表明,溪黄草的水提物具有抗炎、保肝作用^[4],其中抗炎、抗病毒作用的主要成分为酚酸类化合物^[5-7]。因此,酚酸类成分对溪黄草的质量控制具有一定的意义。目前,《中国药典》还从未收录溪黄草中多种酚酸类成分的检测标准,且相关研究较少^[8-9]。本研究建立了同时测定溪黄草中有机酸的方法,采用主成分分析将不同产地的溪黄草进行区别归属,分析出哪些主要成分可用于质量控制,为溪黄草的质量控制和临床用药选择提供依据。

1 仪器与材料

Agilent LC-1260 型高效液相色谱仪系列;万分之一 BS224S 型电子天平 (Sartorius);十万分之一 AUW220D 型电子天平(日本岛津公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器由巩义市予华仪器有限责任公司生产;KQ5200 型水浴锅由昆山市超声仪器有限公司生产。

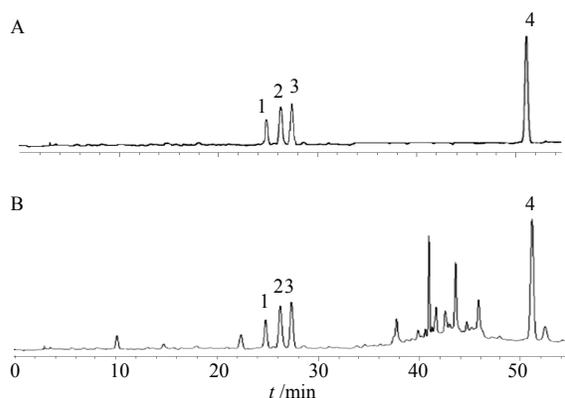
绿原酸(批号 110753-201415)、隐绿原酸(批号 110753-201314)、咖啡酸(批号 110885-200102)、迷迭香酸(批号 111871-201404)对照品均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇为色谱纯(Merck),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

溪黄草药材共 20 批,分别购于广东、福建,经江西中医药大学龚建平教授鉴定为溪黄草 *Isodon sorra* (Maxim.) Kudo 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[10]

Cosmosil 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%冰醋酸水溶液,梯度洗脱(0~28 min, 12%~26%甲醇;28~38 min, 26%~42%甲醇;38~55 min, 42%甲醇);体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;检测波长为 330 nm;进样量 10 μL。色谱图的各峰与相邻峰分离良好,见图 1。



1-绿原酸 2-隐绿原酸 3-咖啡酸 4-迷迭香酸

1-chlorogenic acid 2-cryptochlorogenic acid 3-caffeic acid 4-rosmarinic acid

图1 混合对照品(A)和溪黄草样品(S8, B) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *I. sorra* samples (S8, B)

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸对照品适量,加入 70%乙醇配成单一对照品储备液,再分别取各储备液,制成含上述 4 个成分分别为 14、26、12、240 μg/mL 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取溪黄草药材粉末(过 4 号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 25 mL,称定质量,回流提取 30 min 后,再次称定质量,用 70%乙醇补足减失质量,滤过,滤液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 1、3、6、10、15、20 μL,按上述色谱条件分别进样,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标进行线性回归,得回归方程。绿原酸: $Y=6\,626.752\,2X-0.421\,6$ ($r=0.999\,8$);隐绿原酸: $Y=2\,852.045\,2X-0.4256$ ($r=0.999\,8$);咖啡酸: $Y=6\,971.958\,9X-0.321$ ($r=0.999\,9$);迷迭香酸: $Y=1\,772.000\,6X+3.896\,9$ ($r=0.999\,7$)。绿原酸在 0.014~0.280 μg、隐绿原酸在 0.026~0.520 μg、咖啡酸在 0.012~0.240 μg、迷迭香酸在 0.24~4.80 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定峰面积,结果绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸峰面积的 RSD 值分别为 0.53%、0.45%、0.44%、1.32%。

2.6 稳定性试验

取批次 S8 的溪黄草样品,制备供试品溶液,

室温放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 结果绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸峰面积的 RSD 值分别为 0.87%、1.26%、1.43%、0.53%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批次 S8 溪黄草样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸平均质量分数分别为 0.418 2、0.061 3、0.345 1、0.442 3 mg/g, RSD 值分别为 1.22%、2.32%、1.22%、0.37%。

2.8 回收率试验

取批次 S8 的溪黄草样品约 0.5 g, 精密称定 6 份, 按 80%、100%、120% 的量各加入绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率, 结果绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸平均回收率分别为 100.63%、99.08%、99.30%、101.23%, RSD 值分

别为 0.92%、1.34%、2.05%、0.86%。

2.9 样品测定

取 20 批溪黄草样品各 3 份, 制备供试品溶液, 采用标准曲线法计算绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸的质量分数, 见表 1。

2.10 主成分分析

采集 20 批溪黄草中 4 个成分定量数据, 运用 SIMCA 13.0 软件进行主成分分析, 将不同产地的溪黄草样本分为 2 类, 即 S1~S13、S14~S20, 前者来源广东, 后者来源福建, 可直观地发现不同地理来源的溪黄草的差异。将所得主成分经正交偏最小二乘法 (OPLS-DA) 处理, 得到更确切的结果。统计结果对区分产地的差异性提供了依据, 见图 2。

将绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸的质量分数进行聚类分析, 用聚类热图显示结果, 见图 3。可见咖啡酸、迷迭香酸是两个不同产地溪黄草构成差异的主要原因。

表 1 溪黄草中绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Results of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, and rosmarinic acid in *I. sorra* ($n = 3$)

批次	产地	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	迷迭香酸
S1	广东平远基地, 广东	0.370	0.045	0.320	0.339
S2	广州华南植物园, 广东	0.357	0.059	0.328	0.370
S3	广东饶平基地, 广东	0.385	0.056	0.344	0.372
S4	广州中医药大学, 广东	0.392	0.052	0.337	0.359
S5	广东潮州, 广东	0.392	0.058	0.347	0.347
S6	广东汕头, 广东	0.353	0.052	0.334	0.345
S7	广州白玉山, 广东	0.359	0.061	0.350	0.370
S8	广东清远, 广东	0.418	0.061	0.345	0.442
S9	广东开平, 广东	0.373	0.050	0.316	0.427
S10	广东翁源, 广东	0.415	0.050	0.342	0.317
S11	广东英德, 广东	0.366	0.054	0.320	0.373
S12	广东饶平, 广东	0.364	0.058	0.341	0.340
S13	广东台山, 广东	0.380	0.050	0.331	0.369
S14	福建龙岩, 福建	0.331	0.054	0.486	0.917
S15	福建龙岩, 福建	0.313	0.049	0.440	0.910
S16	福建下坝, 福建	0.317	0.053	0.477	0.931
S17	福建武平, 福建	0.308	0.047	0.480	0.933
S18	福建武平, 福建	0.344	0.057	0.439	0.936
S19	福建武平, 福建	0.319	0.051	0.462	0.943
S20	福建下坝, 福建	0.343	0.051	0.476	0.922

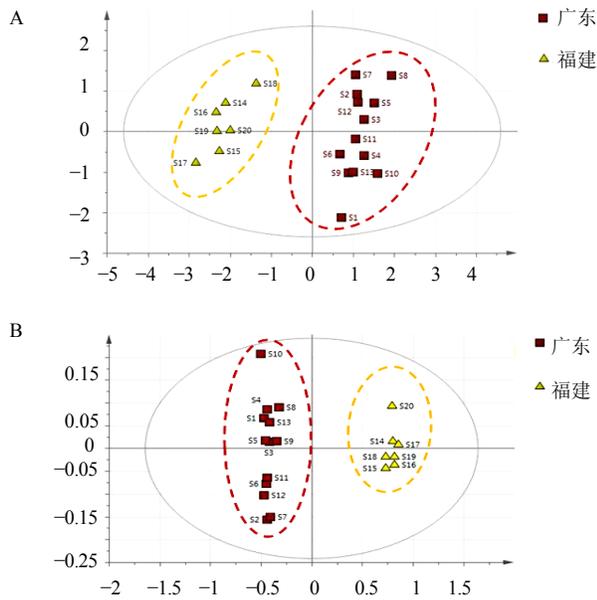


图2 溪黄草中酚酸成分的PCA (A) 和OPLS-DA (B) 图
Fig. 2 PCA (A) and OPLS-DA (B) charts of phenolic acids in *I. sorra*

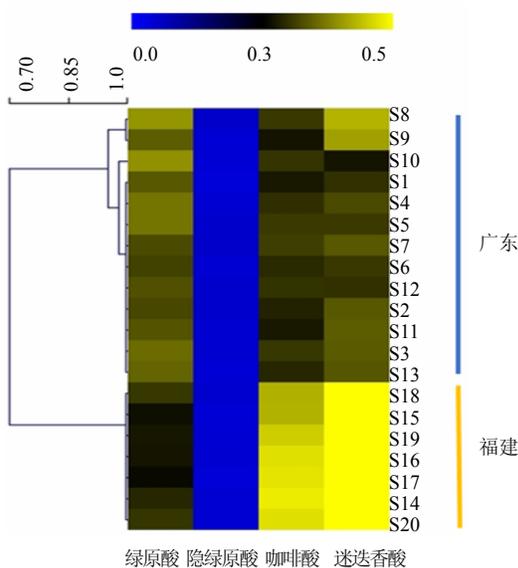


图3 广东及福建组样本中酚酸成分的聚类分析热图
Fig. 3 Cluster analysis thermogram of phenolic acids in Guangdong and Fujian group

3 讨论

以甲醇作为流动相较乙腈的分析效果更佳,且流动性中含有的少量醋酸可较好地改善峰形。结合酚酸类化合物的结构特征,最终选定 330 nm 为检

测波长较为合适。

成分测定结果表明,不同产地的 20 批溪黄草样品中,4 个酚酸类成分含量有一定的差异,迷迭香酸的平均含量较其他成分高,其次是咖啡酸。根据主成分分析、聚类分析结果,所收集的广东批次与福建批次能较好区分,说明不同省份对溪黄草中酚酸含量的影响较为显著,尤其是咖啡酸和迷迭香酸,可作为差异性的标记成分。因此,在针对某一成分起效时,可以选定特定产地的药材入药,如溪黄草水提物中的咖啡酸具有抗肝炎作用^[5, 11],就可选用该成分含量较高的福建产区的药材。主要成分的差异性,对产地的差异具有一定的影响,而药效成分是否与主要成分为同一物质,则需要后期的药效实验以验证。

参考文献

- [1] 何国增, 范文昌. 广东地产药材溪黄草药理作用与临床应用研究进展 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(21): 243-244.
- [2] 梁均方. 溪黄草化学成分的研究 [J]. 嘉应学院学报, 2007, 25(6): 37-39.
- [3] 陈晓, 廖仁安, 谢庆兰, 等. 溪黄草化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2001, 32(7): 592-593.
- [4] 郑琴. 溪黄草化学成分的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2010.
- [5] 吴剑峰. 溪黄草的研究综述 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(8): 498-500.
- [6] 班丽娜, 徐远金. HPLC/MS 同时测定双黄连口服液中的 4 种有效成分 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 265-268.
- [7] 周燕园. HPLC 法测定墨旱莲配方颗粒中绿原酸和咖啡酸 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 374-377.
- [8] 唐海明, 陈建南, 张 扬, 等. HPLC 法同时测定不同来源溪黄草药材中 8 个水溶性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 228-234.
- [9] 乃海燕. 迷迭香酸的研究进展 [J]. 美国中华临床医学杂志, 2005, 7(1): 183.
- [10] 朱德全, 黄 松, 陈建南, 等. 不同品种、不同产地溪黄草咖啡酸与迷迭香酸的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 114-117.
- [11] 李 林, 黄松明, 赵三龙. 迷迭香酸对大鼠肾小球系膜细胞增殖中氧化应激及炎症介质分泌的影响 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 21(12): 888-890.