

## 苗药黑骨藤多指标的含量测定及聚类分析<sup>△</sup>

刘育辰<sup>1,2\*</sup>, 刘丽苹<sup>1</sup>, 刘刚<sup>1,2</sup>, 金文渊<sup>1</sup>, 龙毅<sup>1</sup>, 黄明喆<sup>1</sup>, 杨欣<sup>1,2</sup> (1. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)12-1636-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.12.12

**摘要** 目的: 建立同时测定苗药黑骨藤中绿原酸和杠柳毒苷含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Xtimate C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。采用 SPSS 23.0 统计软件根据药材样品中绿原酸和杠柳毒苷的含量进行聚类分析。结果: 绿原酸、杠柳毒苷检测进样量线性范围分别为 0.040 6~1.8 μg( $r=0.999\ 4$ )、0.016 8~2.3 μg( $r=0.999\ 9$ ); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 5.0%; 定量限分别为 0.918 0、0.084 3 μg/mL, 检测限分别为 0.102 0、0.025 3 μg/mL; 加样回收率分别为 102.66%~104.00% (RSD=0.53%,  $n=6$ )、96.44%~100.79% (RSD=1.73%,  $n=6$ ); 耐用性试验的 RSD 均小于 3.0%。18 份药材样品可聚为三大类, 即 S<sub>2</sub>、S<sub>4</sub>、S<sub>10</sub>、S<sub>12</sub>、S<sub>14</sub>~S<sub>18</sub> 聚为一类, S<sub>1</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>5</sub>~S<sub>7</sub>、S<sub>9</sub>、S<sub>11</sub>、S<sub>13</sub> 聚为一类, S<sub>8</sub> 为一类。结论: 该方法可用于黑骨藤药材的质量控制和品质评价; 不同产地黑骨藤药材中绿原酸和杠柳毒苷的含量有较大差异, 各成分含量与产地有一定关联。

**关键词** 黑骨藤; 绿原酸; 杠柳毒苷; 含量测定; 聚类分析

### Content Determination of Multiple Indicators in Miao Medicine *Periploca forrestii* and Cluster Analysis

LIU Yuchen<sup>1,2</sup>, LIU Liping<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>1,2</sup>, JIN Wenyuan<sup>1</sup>, LONG Yi<sup>1</sup>, HUANG Mingzhe<sup>1</sup>, YANG Xin<sup>1,2</sup> (1. College of Pharmacy, Guiyang University of TCM, Guiyang 550002, China; 2. National Engineering Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for content determination of chlorogenic acid and periplocin in Miao medicine *Periploca forrestii*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Xtimate C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 220 nm, and column temperature was maintained at 25 °C. The sample size was 10 μL. Cluster analysis was conducted according to the content of chlorogenic acid and periplocin in samples by SPSS 23.0 software. RESULTS: The linear range of chlorogenic acid and periplocin were 0.040 6-1.8 μg ( $r=0.999\ 4$ ) and 0.016 8-2.3 μg ( $r=0.999\ 9$ ), respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 5.0%. The quantitation limits were 0.918 0, 0.084 3 μg/mL, and detection limits were 0.102 0, 0.025 3 μg/mL, respectively. RSD of durability were lower than 3.0%. The recoveries were 102.66%~104.00% (RSD=0.53%,  $n=6$ ), 96.44%~100.79% (RSD=1.73%,  $n=6$ ), respectively. RSD of durability were lower than 3.0%. The result indicated that 18 batches of samples were divided into 3 categories by cluster analysis. S<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>10</sub>, S<sub>12</sub> and S<sub>14</sub>-S<sub>18</sub> were divided into one category; S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>5</sub>-S<sub>7</sub>, S<sub>9</sub>, S<sub>11</sub> and S<sub>13</sub> were divided into another category; S<sub>8</sub> was regarded as one category. CONCLUSIONS: The method can be applied for quality control and evaluation of *P. forrestii*. The contents of chlorogenic acid and periplocin in *P. forrestii* from different producing areas are different greatly. There is a certain correlation between the content of each component and the producing area.

**KEYWORDS** *Periploca forrestii*; Chlorogenic acid; Periplocin; Content determination; Cluster

黑骨藤为萝藦科(Asclepiadaceae)杠柳属(Periplo-

<sup>△</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560618); 贵州省科技合作计划项目(No.黔科合 LH 字[2015]7279 号); 贵州省科学技术基金项目(No.黔科合 J 字[2012]2069 号); 贵州省高校优秀科技创新人才支持计划(No.黔教合 KY 字[2015]496 号); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(No.黔科合 ZY 字[2013]3003 号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY-2015-072)

\* 副教授, 博士。研究方向: 中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。E-mail: lyc8564732@163.com

ca) 植物黑龙骨(*Periploca forrestii* Schltr.) 的干燥根或全株, 又名飞仙藤、黑骨头、柳叶过山龙、滇杠柳等, 苗语称嘎八又赊、锐松怪、蛙蟒塞, 其味苦, 辛、温, 有小毒, 具有祛风除湿、通经活络之功效, 多用于治疗风湿关节痛、跌打损伤、乳腺炎、闭经等病症。主要分布在贵州、云南、广西、西藏等地, 生长于 2 500 米以下山地疏林向阳处、阴湿杂木林下及灌木丛中<sup>[1-2]</sup>。

黑骨藤药材通常为野生, 无规范种植基地, 药材质

量难以控制,目前仍执行的是2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》<sup>[3]</sup>,此标准中只有来源、性状、显微鉴别和理化鉴别等传统项目。研究发现,黑骨藤药材含有黄酮类<sup>[4]</sup>、香豆素类<sup>[5]</sup>、强心苷类<sup>[6]</sup>、三萜类<sup>[6]</sup>、酚酸类<sup>[7]</sup>、C<sub>21</sub>甾类<sup>[4]</sup>、神经酰胺类<sup>[9]</sup>等多种成分,但目前其含量测定主要集中于总皂苷<sup>[9]</sup>、总黄酮<sup>[10]</sup>、黄酮苷<sup>[11]</sup>、强心苷<sup>[12]</sup>等单一指标。药理实验证明,黑骨藤药材中咖啡酰基奎宁酸类成分和滇杠柳苷类成分分别具有抗类风湿性关节炎<sup>[13]</sup>和强心作用<sup>[14]</sup>。因此,本研究以上述两类活性成分的代表绿原酸和杠柳毒苷作为质量控制指标,采用高效液相色谱法(HPLC)对贵州省不同产地的黑骨藤药材中两种成分的含量进行测定,并进行聚类分析,以便更全面地评价其质量。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UltiMate-3000 型 HPLC 仪,包括自动进样系统、柱温箱、二级管阵列检测器和 Chromeleon 色谱工作站[赛默飞世尔科技(中国)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);Q-2508 型高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司);JT1003 型电子分析天平(余姚市金诺天平仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

绿原酸对照品(批号: MUST-16031610,纯度: >98%)、杠柳毒苷对照品(批号: MUST-16072202,纯度: >98%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 药材

18份药材样品采自贵州省不同产地(见表1),经贵阳中医学院刘刚实验师鉴定为真品。

表1 黑骨藤药材样品来源

Tab 1 Source of *P. forrestii*

编号	产地	采集时间
S1	开阳县南江乡	2016年05月
S2	龙里县	2015年07月
S3	开阳县龙岗镇	2016年09月
S4	兴仁县	2014年12月
S5	道真县	2015年08月
S6	贵阳市香纸沟	2015年05月
S7	织金县	2015年07月
S8	安顺市	2015年07月
S9	贵阳市情人谷	2015年04月
S10	黔陶乡	2015年04月
S11	福泉市	2015年08月
S12	贵阳花溪平桥	2015年07月
S13	贵阳市乌当区相思河	2015年01月
S14	兴义市	2015年07月
S15	贵阳市花溪党武	2014年12月
S16	晴隆县	2015年07月
S17	凯里市	2015年07月
S18	凯里市	2015年07月

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Xtimate C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min, 9%→10% A; 12~30 min, 10%→21% A; 30~50 min, 21%→35% A; 50~60 min, 35%→70% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

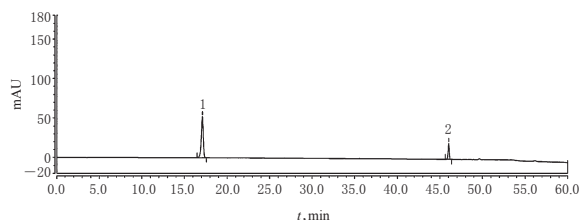
### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸对照品 5.08 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 以流动相溶解并定容, 摇匀, 制成质量浓度为 1.016 mg/mL 的绿原酸对照品溶液; 精密称取杠柳毒苷对照品 8.40 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 以流动相溶解并定容, 摇匀, 制成质量浓度为 0.840 mg/mL 的杠柳毒苷对照品溶液。再精密量取上述绿原酸对照品溶液 2 mL、杠柳毒苷对照品溶液 1 mL, 置于同一 50 mL 量瓶中, 加流动相定容, 摇匀, 制成绿原酸、杠柳毒苷质量浓度分别为 0.040 6、0.016 8 mg/mL 的混合对照品溶液。

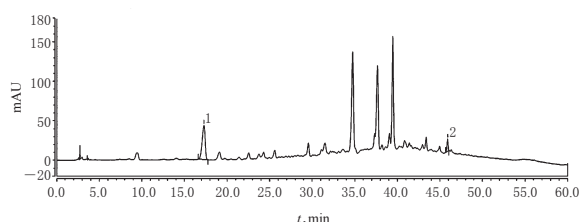
2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品粉末 2.0 g, 按料液比 1:25 加入 70% 乙醇溶液 50 mL, 加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 于 70 °C 水浴蒸干, 加 25 mL 水使成混悬液, 分别依次用等量石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 各萃取 3 次, 将 3 次正丁醇萃取液合并, 浓缩至干, 残渣用适量甲醇溶解, 转移并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。结果, 理论板数按绿原酸、杠柳毒苷峰计应大于 5 000; 保留时间分别为 17.2、46.0 min, 表明基线分离良好。



A. 混合对照品



B. 供试品

注: 1. 绿原酸; 2. 杠柳毒苷

Note: 1. chlorogenic acid; 2. periplocin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、5、10、

14、20、25  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得绿原酸、杠柳毒苷回归方程分别为 $y=36.258x-0.7658$ ( $r=0.9994$ )、 $y=19.240x-0.2695$ ( $r=0.9999$ )。结果表明,绿原酸、杠柳毒苷检测进样量线性范围分别为0.0406~1.8、0.0168~2.3  $\mu\text{g}$ 。

## 2.5 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,绿原酸、杠柳毒苷定量限分别为0.9180、0.0843  $\mu\text{g/mL}$ ,检测限分别为0.1020、0.0253  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸、杠柳毒苷峰面积的RSD分别为0.16%、1.64%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)8份,分别于室温下放置1、3、5、9、12、15、18、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、杠柳毒苷峰面积的RSD分别为4.15%、1.34%( $n=8$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

## 2.8 重复性试验

精密称取药材样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,绿原酸、杠柳毒苷含量平均值分别为0.2308、0.0622 mg/g, RSD分别为4.17%、2.41%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取已知含量药材样品(编号:S1)6份,每份1 g,分别加入绿原酸、杠柳毒苷对照品溶液各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery tests( $n=6$ )

待测成分	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %
绿原酸	232.4	200.0	440.4	104.00	103.44	0.53
	232.4	200.0	438.2	102.89		
	232.9	200.0	438.2	102.66		
	231.3	200.0	438.2	103.47		
	232.6	200.0	440.4	103.88		
	232.9	200.0	440.4	103.76		
杠柳毒苷	62.6	84.0	143.6	96.44	99.55	1.73
	62.6	84.0	147.0	100.49		
	62.8	84.0	145.6	98.59		
	62.3	84.0	146.8	100.60		
	62.7	84.0	147.4	100.79		
	62.8	84.0	147.1	100.39		

## 2.10 耐用性试验

2.10.1 流速考察 精密称取药材样品(编号:S2)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,再按“2.1”项下色谱条件(流速分别为0.8、1.0、1.2 mL/min)进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,绿原酸、杠柳毒苷含量平均值分别为0.2324、0.0621 mg/g, RSD分别为2.54%、1.70%,表明流速一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.10.2 柱温考察 精密称取药材样品(编号:S2)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,再按“2.1”项下色谱条件(柱温分别为25、30、35  $^{\circ}\text{C}$ )进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,绿原酸、杠柳毒苷含量平均值分别为0.2315、0.0610 mg/g, RSD分别为0.90%、2.70%,表明柱温一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

## 2.11 样品含量测定

取18份药材样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果( $n=3, \text{mg/g}$ )

Tab 3 Results of content determination of samples ( $n=3, \text{mg/g}$ )

编号	绿原酸	杠柳毒苷
S1	0.2308	0.0622
S2	0.1515	0.3063
S3	0.2278	0.1021
S4	0.1869	0.2339
S5	0.1972	0.0367
S6	0.0866	0.0421
S7	0.1643	0.0594
S8	0.3760	0.4852
S9	0.2122	0.0388
S10	0.1287	0.3141
S11	0.1217	0.0329
S12	0.2407	0.1890
S13	0.0471	0.0161
S14	0.2473	0.1881
S15	0.2425	0.1895
S16	0.2440	0.1935
S17	0.2502	0.1969
S18	0.2588	0.1984

## 2.12 聚类分析

以各共有峰相对峰面积为变量,采用SPSS 23.0统计软件对药材样品进行聚类分析,采用组间平均数联结法,以夹角余弦作为样品相似度的距离公式,结果见图2。由图2可见,聚类谱系中,将18份药材样品聚为三大类:即S2、S4、S10、S12、S14~S18聚为一类,S1、S3、S5~S7、S9、S11、S13聚为一类,S8为一类。

## 3 讨论

由表3可知,药材样品中绿原酸含量为0.0471~0.3760 mg/g,贵阳市乌当区相思河产药材样品中绿原酸含量最低,安顺市产药材样品中绿原酸含量最高;杠柳

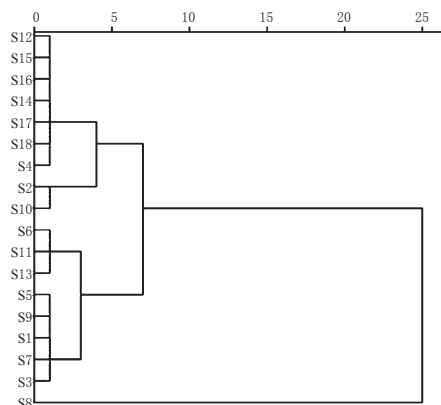


图2 聚类分析树状图

Fig 2 Dendrogram of cluster analysis

毒苷含量为0.016 1~0.485 2 mg/g,贵阳市乌当区相思河产药材样品中杠柳毒苷含量最低,安顺市产药材样品中杠柳毒苷含量最高。从各地区药材样品2种成分含量上来看,绿原酸和杠柳毒苷含量似有所关联,即贵阳市乌当区相思河产药材样品上述2种成分含量均最低,而安顺市产药材样品上述2种成分含量均最高,绿原酸含量两产地药材样品相差约8倍,杠柳毒苷含量两产地药材样品相差约30倍。笔者采样过程中发现,黑骨藤药材生长对周围生态环境的选择性非常强,它喜欢生长在向阴、水分充足的密林中。而安顺市药材产地环境恰恰符合上述特点。

聚类分析结果表明,绿原酸和杠柳毒苷含量与黑骨藤药材的产地具有一定的联系。18份药材样品主要聚为三大类,S1、S3、S5~S7、S9、S11、S13聚为一类,它们所处地理位置均在贵阳市以北区域;S2、S4、S10、S12、S14~S18聚为一类,它们所处地理位置基本在贵阳市以南区域;而自成一类的S8,其所处地理位置也在贵阳市以南区域。

综上所述,本方法可用于黑骨藤药材的质量控制和品质评价,不同产地黑骨藤药材中绿原酸和杠柳毒苷的含量有较大差异,各成分含量与产地有一定关联。本结论为该药材最佳产地的确定奠定了一定基础,有助于指

导药材种植及采收。

### 参考文献

- [1] 邱德文,杜江. 中华本草:苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社,2005:526-527.
- [2] 邱德文,杜江. 贵州十大苗药研究[M].北京:中国古籍出版社,2008:261-324.
- [3] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 2003年版.贵阳:贵州科技出版社,2003:381.
- [4] 张嫩玲,刘香,沈春祥,等. 黑龙骨的化学成分[J]. 中药材,2016,39(2):329-330.
- [5] 李勇,刘云宝,庾石山. 黑龙骨化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(10):1536-1538.
- [6] 徐冉,杜娟,邓璐璐,等. 滇杠柳中的一个新强心苷[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2286-2288.
- [7] 赵珊,张宝,熊丹丹,等. 苗药黑骨藤化学成分的研究[J]. 中草药,2017,48(8):1513-1518.
- [8] 赵超,甘秀海,龚小见,等. 黑骨藤中神经酰胺类化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):83-85.
- [9] 申海艳,龚小见,李文敏,等. 苗药黑骨藤中总皂苷含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):94-97.
- [10] 景小楠,钟菡,张宏,等. 黑骨藤中总黄酮含量的测定[J]. 四川师范大学学报(自然科学版),2010,33(1):89-92.
- [11] 陈华国,周欣,曹桂红,等. HPLC测定黑骨藤中槲皮素-3-O- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖苷含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(10):1284-1286.
- [12] 刘育辰,刘刚,张树芬,等. 苗药黑骨藤部分理化指标及杠柳毒苷含量的测定[J]. 贵州农业科学,2015,43(2):130-132.
- [13] 王霞,杨健,宋菲,等. 苗药黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类部位对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞MH7A增殖及炎症因子分泌的影响[J]. 中国药房,2017,28(28):3949-3952.
- [14] 邓士贤,王德成,王懋德,等. 滇杠柳苷的强心作用[J]. 药学学报,1964,11(2):75-79.

(收稿日期:2017-11-29 修回日期:2018-01-03)

(编辑:张静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅