

基于质量标志物-有效对照提取物模式的黑骨藤质量评价

刘 刚， 安兰兰^{*}， 周环娟， 付 艳， 王瑞鑫， 刘育辰^{*}， 孙庆文， 张永萍
(贵州中医药大学，贵州 贵阳 550025)

摘要：目的 明确黑骨藤抗风湿性关节炎药效物质基础、质量标志物，建立该药材质量评价体系。方法 采用 CIA 模型药理学实验验证黑骨藤对照提取物的抗风湿关节炎作用，UPLC 法测定黑骨藤有效对照提取物含量，构建其抗风湿性关节炎功效的质量评价体系，并应用于药材质量控制。结果 黑骨藤对照提取物、对照品可有效缓解足趾肿胀，减小关节炎评分、CIA 大鼠血清促炎细胞因子水平，改善组织病理学变化。对照提取物法、单体对照品法含量测定结果基本一致。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 为质量标志物。结论 该方法具有检测指标多、效率高、成本低等优点，可为构建黑骨藤及其他中药质量评价新模式提供借鉴。

关键词：黑骨藤；质量评价；质量标志物；有效对照提取物模式

中图分类号：R283 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2023)12-4114-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.044

中药质量是中药有效性和安全性的反映和表征^[1]，目前中药质量标准多是通过使用对照品测定一种或多种成分的含量评价中药质量，而部分对照品不易获得，检测成本高，且与传统功效的关联性不强，难以反映中药质量与疗效的关系^[2-4]。鉴于此，国内学者相继提出了“对照提取物”^[5]、“中药质量标志物 (quality markers, Q-markers)”^[6]中药质量评价方法，为中药质量控制研究带来了新思路，已被应用于多种中药的质量评价^[7-9]。对照提取物法可同时测定样品 (包括药材、中成药和提取物等) 中的多个指标性成分，且可大大降低检验成本，但其指标与功效关联性不强，因此，在确认其 Q-Marker 的基础上，以 Q-Marker 作为指标性成分更为科学，这种对照提取物称为“有效对照提取物”。

黑骨藤为萝藦科植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的干燥全株^[10]，其乙醇提取物乙酸乙酯部位为其抗风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的有效部位^[11]，本研究采用药理学与化学相结合的方法，以黑骨藤为研究对象，制备其抗 RA 的有效对照提取物，明确其 Q-Marker，建立基于有效对照提取物-中药质量标志物模式的黑骨藤质量评价体系，尝试构建能体现中医药特色且与临床疗效相关联的中药质量评价新模式，为进一步完善中药质量评价体系提供新思路。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪，配置二元梯度泵、高能自动进样器、DAD 检测器和色谱工作站 (美国 Agilent 公司)；FA2204B 型电子天平 (万分之一，上海天美天平仪器有限公司)；MS205DU 型电子天平 [十万分之一，梅特勒-托利多仪器 (中国) 有限公司]；DZ-2BCIV 型真空干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)；TD5A-WS 型离心机 (湖南湘立科学仪器有限公司)；JE1002 型电子天平 (上海浦春计量仪器有限公司)；MNT-150 型数显卡尺 (浙江德清信泰电子科技有限公司)；Rayto RT-6100 酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司)；CX22 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)；RM2235 石蜡切片机、DM1000 徕卡显微成像系统 (德国 Leica 公司)。

1.2 试剂与药物 黑骨藤经贵州中医药大学药学院刘育辰教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr.，具体见表 1。雷公藤多苷片 (批号 1450003，贵州汉方药业有限公司)。新绿原酸 (批号 CHB190217)、绿原酸 (批号 BD33230、CHB190121)、隐绿原酸 (批号 CHB180905)、绿原酸甲酯 (批号 CHB190117)、异绿原酸 B (批号 CHB180923)、异绿原酸 A (批号 CHB180921)、异绿原酸 C (批号 CHB180925) 均购于成都克洛玛生物科技有限公司，纯度均大于 98%。PRP-512B 型树脂 (北京

收稿日期：2023-03-31

基金项目：国家自然科学基金项目 (81860700)

作者简介：刘 刚 (1979—)，男，博士生，高级实验师，从事中药、民族药化学及中药新药研究。Tel：(0851) 88233089，E-mail：liugang888_2000@163.com

#共同第一作者：安兰兰 (1995—)，女，硕士生，从事中药、民族药化学及中药新药研究。Tel：(0851) 88233089，E-mail：2918422741@qq.com

*通信作者：刘育辰 (1982—)，女，博士，教授，从事中药、民族药化学及中药新药研究，Tel：(0851) 88126916，E-mail：lyc8564732@163.com

聚福树脂厂)；牛Ⅱ型胶原溶液(批号 200297)、弗氏完全佐剂(批号 200200)、弗氏不完全佐剂(批号 200336)均购于美国 Chondrex 公司。EDTA 脱钙液(型号 B0317-11, 四川杨克斯特科技有限公司)；7122 苏木素、伊红(美国 Thenrmo Fisher Scientific 公司)。乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司)；其余试剂均为分析纯；水为纯净水(杭州

娃哈哈集团有限公司)。SPF 级 SD 大鼠, 体质量(200±20 g), 购于湖南省长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(湘) 2019-0014, 实验动物使用许可证号 SYXK(黔) 2021-0005, 于室温下适应性饲养 7 d。实验经贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准(审批号 20210161)。

表 1 样品信息

编号	收集时间	来源	收集方式
S1	2020 年 8 月	贵阳学院	采集
S2	2020 年 10 月	贵阳市南明区	采集
S3	2020 年 8 月	贵阳市清镇市百花湖畔	采集
S4	2020 年 5 月	毕节市织金县绮陌街道	采集
S5	2020 年 8 月	贵阳市白云区桃花园村	采集
S6	2020 年 5 月	贵阳市开阳县南江布依族苗族梯子岩	采集
S7	2020 年 8 月	毕节市织金县绮陌街道大冲头	采集
S8	2020 年 5 月	毕节市织金县官寨苗族乡大峡谷	采集
S9	2018 年 4 月	贵阳花果园药材市场(1 号)	购买
S10	2020 年 12 月	贵阳王氏虫草行	购买
S11	2020 年 12 月	贵阳博信中药材经营部	购买
S12	2020 年 12 月	贵阳銑铭土特产经营部	购买

2 方法与结果

2.1 对照提取物制备 取黑骨藤粗粉适量置于圆底烧瓶中, 加入 25 倍量 70% 乙醇, 加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩至无醇味, 加水混悬, 依次用等量石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取, 各 3 次, 合并乙酸乙酯萃取液, 减压浓缩, 真空干燥, 即得乙酸乙酯萃取部位。

精密称取黑骨藤乙酸乙酯萃取部位 10 g, 加等量 PRP-512B 型树脂拌样, 装柱。依次用 20%、30%、50% 甲醇梯度洗脱, 每个梯度 4 000 mL。其中, 20% 甲醇洗脱段前 1 000 mL 合并为第 1 段(a1), 中间 2 500 mL 合并为第 2 段(a2), 后 500 mL 为第 3 段(a3), 30%、50% 甲醇洗脱段各自合并, 分别为 a4、a5。精密称取 a5 段 2 g, 用等量 PRP-512B 型树脂拌样, 装柱, 依次用 20%、30%、50% 甲醇梯度洗脱, 各自合并为 b1 段、b2 段、b3 段。将以上 a2 段和 b3 段按一定比例合并, 即得黑骨藤对照提取物。

2.2 对照提取物抗类风湿性关节炎有效性验证

2.2.1 造模、分组和给药 56 只大鼠随机选取 8 只作为空白对照组, 其余 48 只参考文献[12]方法建立 CIA 药理模型, 并随机分成 6 组, 分别为雷公藤多苷(TG)对照组(10 mg/kg)、模型组、对照提取物给药低剂量组(36 mg/kg)、对照提取物给药高剂量组(144 mg/kg)、对照品(按对照提取物中各成分所占比例混合配制)给药低剂量组、对照品给药高剂量组, 每组 8 只。各药物用生理盐水溶液分散, 空白对照组和模型组给予生理盐水溶液, 给药体积均为 10 mL/kg, 灌胃 28 d, 每天 1 次。

2.2.2 一般指标检测 从造模前 1 d 及造模成功后第 7 天开始, 每 7 d 测量各组大鼠右足趾、左足趾厚度, 两者厚度差值作为肿胀度, 并记录体质量变化。

2.2.3 关节炎指数(arthritis index, AI)评分 从造模成功后的第 7 天开始, 每天观察并详细记录各组大鼠全身的

关节病变程度, 按照 5 级评分法评价^[13], 将 4 个关节的积分进行累计, 即为每只大鼠的 AI。

2.2.4 血清因子测定、滑膜病理变化观察 大鼠给药第 28 天后禁食 12 h 以上, 不禁水, 用麻醉剂麻醉, 腹主动脉取血, 迅速将血液于冰浴上静置 30 min, 置于离心机中离心 20 min(转速 4 000 r/min), 取上清液, 置于-80 ℃冰箱中备用。根据 ELISA 试剂盒说明书操作, 大鼠取血后麻醉脱颈处死, 去除左后足踝关节皮毛, 用动物骨剪取下踝关节, 置于 4% 多聚甲醛中性固定液中固定, 常规脱钙后包埋组织块于石蜡中, 切成 5 μm 薄片, 脱蜡后伊红染色, 显微镜下观察组织病理学变化。

2.2.5 统计学分析 采用 SPSS 24.0、Graphpad Prism 8.0.2 软件进行分析及作图, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 再进行单因素方差分析, 方差齐时组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时组间两两比较采用 Tamhance's T2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.2.6 药理实验结果

2.2.6.1 黑骨藤对照提取物对 CIA 大鼠的影响 (1) 对 CIA 大鼠后足足趾厚度的影响。给药前, 与模型组比较, 各给药组对后足足趾厚度的影响无显著性差异($P > 0.05$), 空白对照组有极显著差异($P < 0.01$), 给药第 28 天后仍有极显著性差异($P < 0.01$), 说明造模成功, 模型相对稳定; 给药第 28 天后, 与模型组比较, TG 组、对照提取物给药低剂量组、对照提取物给药高剂量组对右后足足趾厚度的影响均有极显著性差异($P < 0.01$); 同样给药第 28 天后, 与模型组比较, TG 组、对照提取物给药低剂量组、对照提取物给药高剂量组对左后足足趾厚度的影响也均有极显著性差异($P < 0.01$)。

(2) 对 CIA 大鼠 AI 值的影响。给药前, 与模型组比较, 各给药组无显著性差异($P > 0.05$); 给药第 28 天后,

与模型组比较，对照提取物给药低剂量组、高剂量组和 TG 组均有极显著性差异 ($P<0.01$)；模型组第 0~28 天无显著性差异 ($P>0.05$)；对照提取物给药高剂量组在给药第 13 天之后有极显著差异 ($P<0.01$)，TG 组与对照提取物给药低剂量组在给药第 20 天后有极显著性差异 ($P<0.01$)。

(3) 对 CIA 大鼠血清促炎细胞因子表达的影响。与模型组比较，对照提取物给药低剂量组大鼠血清中 TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)，对照提取物给药高剂量组大鼠血清中 TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)，TG 组大鼠血清中 TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)；与空白对照组比较，模型组大鼠血清中 TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)，TG 组 TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)。

2.2.6.2 对照品对 CIA 大鼠的影响

(1) 对照品对 CIA 大鼠后足足趾厚度的影响。给药前，与模型组比较，各药物组无统计学意义 ($P>0.05$)，空白对照组有极显著差异 ($P<0.01$)，给药 28 d 后仍有极显著性差异 ($P<0.01$)，说明造模成功，模型相对稳定；给药 28 d 后，与模型组比较，对照品低、高剂量组和 TG 组对右后足足趾厚度的影响均具有统计学意义 ($P<0.01$)；同样给药第 28 天后，与模型组比较，TG 组、对照品低剂量组、高剂量组对左后足足趾厚度的影响也均有统计学意义 ($P<0.01$)。

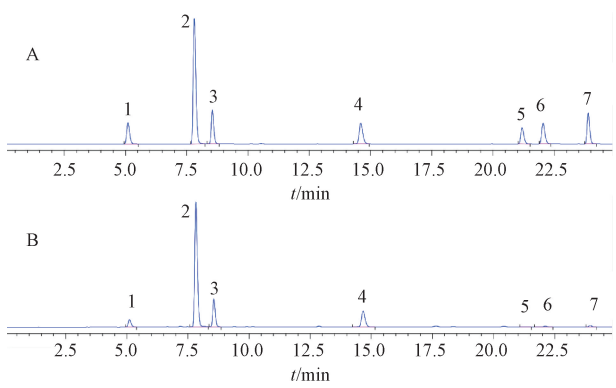
(2) 对照品对 CIA 大鼠 AI 值的影响。给药前，与模型组比较，各药物组无明显差异 ($P>0.05$)；给药第 28 天后，与模型组比较，对照品低剂量组、高剂量组和 TG 组有统计学意义 ($P<0.01$)。

(3) 对照品对 CIA 大鼠血清促炎细胞因子表达的影响。与模型组比较，对照品低剂量组大鼠血清中 TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)，对照品高剂量组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)；与 TG 组比较，对照品高剂量组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)；与对照品低剂量比较，对照品高剂量组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)；与空白对照组比较，模型组大鼠血清中 TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)，TG 组 and 对照品低剂量组大鼠血清中 TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)。

2.3 对照提取物成分含量测定 采用 UPLC 法。

2.3.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m)；流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~3.4 min, 7%~9% B；3.4~5.4 min, 9%~11% B；5.4~7 min, 11%~13% B；7~8.3 min, 13%~13.5% B；8.3~10 min, 13.5%~15% B；10~14.5 min, 15%~15.1% B；14.5~15 min, 15.1%~16% B；15~17 min, 16%~18% B；17~21 min, 18%~21% B；21~23 min, 21%~26% B；23~25 min, 26%~100% B)；体积流量 0.2 mL/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；检测波长 327 nm；进样量 2 μ L。色谱图见图 1。

2.3.2 对照品溶液制备 分别精密称取对照品新绿原酸 5.06 mg、绿原酸 25.05 mg、隐绿原酸 8.04 mg、绿原酸甲



1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸 4. 绿原酸甲酯 5. 异绿原酸 B 6. 异绿原酸 A 7. 异绿原酸 C

图 1 对照品 (A)、黑骨藤对照提取物 (B) UPLC 色谱图

酯 5.05 mg，异绿原酸 B 5.02 mg，异绿原酸 A 5.00 mg，异绿原酸 C 7.05 mg，置于 50 mL 量瓶中，50% 甲醇溶解并稀释至刻度，得对照品溶液①，摇匀，精密吸取 1 mL，置于 100 mL 量瓶中，50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，得对照品溶液②。

2.3.3 供试品溶液制备 精密称取黑骨藤对照提取物 14 mg，置于 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇 2 mL，超声处理 1 min，冷却至室温，50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 线性关系考察 精密吸取不同体积对照品溶液适量，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定。以对照品进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系 (I)

成分	回归方程	r	线性范围/mg
新绿原酸	$Y=7\ 864.2X-6.690\ 9$	1.000 0	0.001 012~0.506 0
绿原酸	$Y=8\ 249.6X+67.415$	0.999 7	0.005 010~2.505 0
隐绿原酸	$Y=6\ 566.1X-8.748\ 9$	1.000 0	0.001 608~0.804 0
绿原酸甲酯	$Y=9\ 457.8X-2.705\ 6$	1.000 0	0.001 010~0.505 0
异绿原酸 B	$Y=6\ 337.5X-16.799$	1.000 0	0.001 004~0.502 0
异绿原酸 A	$Y=8\ 611.3X-22.875$	1.000 0	0.001 000~0.500 0
异绿原酸 C	$Y=7\ 448.5X-27.798$	1.000 0	0.001 410~0.705 0

2.3.4.2 精密度试验 对照品溶液①在“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积 RSD 分别为 0.07%、0.10%、0.08%、0.09%、0.11%、0.15%、0.15%，表明仪器精密度良好。

2.3.4.3 重复性试验 精密称取对照提取物 6 份，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含量 RSD 分别为 1.09%、0.34%、0.51%、1.22%、1.10%、1.21%、2.13%，表明该方法重复性良好。

2.3.4.4 稳定性试验 按“2.3.3”项下方法制备供试品

溶液 1 份，于 0、2、4、8、12、20、24 h 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积 RSD 分别为 0.35%、0.14%、0.39%、0.28%、2.26%、0.34%、0.20%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4.5 加样回收率试验 精密称定各成分含量已知的对照提取物 6 份，每份 7 mg，按 100% 水平加入对照品溶液，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 平均加样回收率（RSD）分别为 102.51%（0.68%）、100.85%（1.27%）、99.05%（1.45%）、97.84%（2.37%）、100.33%（1.55%）、99.49%（1.53%）、97.70%（1.32%）。

2.3.5 样品含量测定 取 3 批对照提取物，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，计算含量。结果，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含量总和分别为 51.81%、53.30%、52.46%，表明该方法重复性良好，可用于制备对照提取物。

2.4 对照提取物在黑骨藤质量控制中的应用

2.4.1 对照提取物溶液制备 精密称取黑骨藤对照提取物 40.03 mg，置于 5 mL 量瓶中，加 50% 甲醇 2 mL，超声处理 1 min，放冷至室温，50% 甲醇定容至刻度，摇匀，溶解，制成新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 质量浓度分别为 0.205 0、2.958 8、0.763 3、0.455 2、0.016 8、0.031 3、0.059 2 mg/mL 的溶液 A，再分别稀释 10、100、250 倍，作为溶液 B、C、D。

2.4.2 供试品溶液制备 精密称取药材粉末 16.0 g，按“2.1”项下方法制备醇提物乙酸乙酯萃取部位（HGT-C），

精密称取 25 mg，置于 10 mL 量瓶中，2 mL 甲醇溶解并定容，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4.3 色谱条件 同“2.3.1”项，色谱图见图 2。

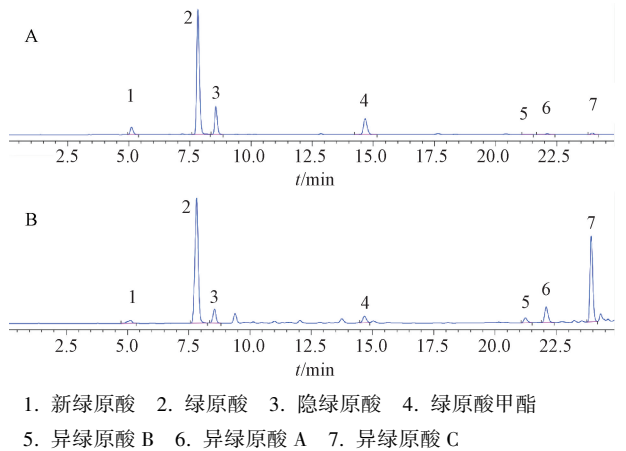


图 2 对照提取物（A）、黑骨藤（B）UPLC 色谱图

2.4.4 方法学考察

2.4.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.4.1”项下对照提取物溶液适量，在“2.4.3”项色谱条件下进样测定。以对照品进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 3，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 3 各成分线性关系（II）

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg
新绿原酸	$Y=7\ 806.4X-3.290\ 6$	0.999 8	0.000 8~0.061 5
绿原酸	$Y=8\ 377.8X-57.605$	0.999 8	0.011 8~0.887 7
隐绿原酸	$Y=6\ 600.3X-18.338$	0.999 7	0.003 1~0.229 0
绿原酸甲酯	$Y=9\ 401.4X+0.466\ 1$	1.000 0	0.001 8~0.136 6
异绿原酸 B	$Y=4\ 691.3X-7.280\ 9$	0.999 7	0.001 7~0.083 9
异绿原酸 A	$Y=9\ 426.4X-28.243$	0.999 6	0.003 1~0.156 6
异绿原酸 C	$Y=8\ 674.6X-56.651$	0.999 6	0.005 9~0.295 9

2.4.4.2 方法学考察 表 4 显示，该方法仪器精密度、方法重复性、稳定性、准确性均良好，可用于含量测定。

表 4 方法学考察结果

成分	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	绿原酸甲酯	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
精密度 RSD/%	0.40	0.10	0.10	0.30	1.50	0.70	0.30
重复性 RSD/%	0.20	1.00	1.10	1.60	0.70	1.20	1.10
稳定性 RSD/%	0.30	0.50	0.50	1.10	0.90	0.50	0.20
平均加样回收率/%	98.52	98.44	97.44	99.26	100.10	99.54	102.09

2.4.5 样品含量测定 取 12 批药材，按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4.3”项色谱条件下进样测定，分别采用对照提取物法、单体对照品法计算含量，结果见表 5。

3 讨论

3.1 药理实验研究 通过药理学实验验证，发现黑骨藤对照提取物和含有 7 种咖啡酰基奎宁酸类成分的对照品可有效缓解足趾肿胀，减小关节炎评分，并且有效减少了 CIA 大鼠血清中的促炎细胞因子水平，尤其是 TNF- α ，表明黑骨藤乙酸乙酯部位所含的咖啡酰基奎宁酸类成分具有良好

的抗 RA 活性。

3.2 黑骨藤抗 RA 质量标志物辨识 RA 是一种自身免疫性疾病，它导致滑膜组织和关节慢性炎症，导致关节功能障碍，最终导致残疾^[14]。CIA 模型与人 RA 具有共同的免疫学和病理学特征，因此常用于新药或其他治疗药物的初步药理学研究^[15]。体内外实验结果显示^[16-21]，黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类成分具有较好的抗类风湿性关节炎活性。本研究通过药理学实验证实对照提取物组和咖啡酰基奎宁酸类成分对照品，都具有一定的抗 RA 作用，进一步验证了黑骨藤中的 7 个咖啡酰基奎宁酸类成分是其抗 RA 的药效

表 5 各成分含量测定结果 (mg/g)

编号	新绿原酸		绿原酸		隐绿原酸		绿原酸甲酯		异绿原酸 B		异绿原酸 A		异绿原酸 C	
	对照 品法	对照提 取物法	对照 品法	对照提 取物法	对照 品法	对照提 取物法	对照 品法	对照提 取物法	对照 品法	对照提 取物法	对照 品法	对照提 取物法	对照 品法	对照提 取物法
S1	1. 201	1. 122	37. 513	39. 921	3. 515	3. 787	0. 418	0. 353	2. 195	2. 560	7. 928	7. 357	30. 678	27. 007
S2	2. 229	2. 159	21. 076	23. 733	5. 293	5. 556	0. 000	0. 000	1. 650	1. 824	3. 694	3. 488	12. 251	11. 183
S3	1. 901	1. 828	32. 452	34. 936	6. 070	6. 328	0. 948	0. 886	4. 847	6. 142	14. 265	13. 145	46. 423	40. 525
S4	2. 334	2. 265	26. 336	28. 913	6. 300	6. 557	1. 045	0. 984	1. 457	1. 563	3. 920	3. 695	17. 679	15. 844
S5	2. 226	2. 155	45. 735	48. 019	6. 352	6. 610	1. 603	1. 545	1. 847	2. 089	10. 363	9. 581	60. 814	52. 884
S6	2. 026	1. 954	58. 093	60. 184	6. 112	6. 371	1. 230	1. 170	1. 916	2. 183	5. 430	5. 074	33. 800	29. 687
S7	2. 193	2. 123	41. 498	43. 842	5. 497	5. 759	0. 953	0. 892	0. 843	0. 734	2. 359	2. 269	15. 574	14. 037
S8	2. 486	2. 417	41. 838	44. 182	7. 417	7. 669	0. 921	0. 859	1. 343	1. 408	3. 895	3. 672	15. 936	14. 348
S9	2. 650	2. 582	67. 308	69. 263	8. 973	9. 217	3. 322	3. 274	4. 385	5. 518	8. 942	8. 282	44. 481	38. 859
S10	3. 535	3. 474	81. 459	83. 197	10. 615	10. 851	1. 106	1. 045	1. 480	1. 593	3. 595	3. 398	19. 381	17. 307
S11	2. 570	2. 502	61. 969	64. 001	8. 002	8. 251	1. 998	1. 942	3. 317	4. 076	8. 063	7. 480	62. 687	54. 491
S12	2. 921	2. 855	51. 351	53. 543	10. 415	10. 651	1. 592	1. 534	3. 970	4. 958	6. 623	6. 164	22. 638	20. 102

物质基础。黑骨藤有效对照提取物中 7 种咖啡酰基奎宁酸类成分是黑骨藤中固有的化学成分，具有明确的化学结构式，药理实验验证其与黑骨藤抗 RA 功效密切相关，同时可进行定量测定，均满足 Q-marker 的基本条件。因此，上述 7 种咖啡酰基奎宁酸类成分可作为黑骨藤抗 RA 的 Q-marker。

3.3 含量测定色谱条件筛选 通过 DAD 检测器对 7 种成分的单一对照品溶液进行全波长扫描，以 327 nm 为最大吸收波长。并对流动相、柱温、进样量及体积流量进行考察。结果表明，流动相为乙腈-0.1% 甲酸时色谱峰峰形最好，分离效果最佳；柱温为 30 ℃时色谱峰分离度最好；进样量为 1、3 μL 时色谱峰出现拖尾现象，2 μL 时色谱峰峰形最佳；体积流量为 0.2 mL/min 时分离效果好，并且可节约试剂。

3.4 有效对照提取物法验证 本研究分别采用了对照提取物法和对照品法对黑骨藤中绿原酸等 7 种咖啡酰基奎宁酸类成分进行了含量测定分析，结果显示 2 种方法所得结果基本一致，说明对照提取物法可以用于黑骨藤的质量控制，检测成本更低，方法更简单，更符合中药多成分的特色^[22]，同时也解决了此类成分不稳定、难以制备的难题。上述结果为明确黑骨藤抗 RA 的药效物质基础和建立全面科学的相关质量评价体系提供了理论基础。

参考文献：

[1] 张铁军, 许 浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.

[2] 张雅娟, 姜云耀. 中药材质量的研究方法和进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(7): 106-112.

[3] 孙仁爽, 赵敏婧, 孟 军. 中药质量控制的研究进展[J]. 人参研究, 2018, 30(2): 52-55.

[4] 叶绘晟. 中药质量控制技术的探索[J]. 中医药管理杂志, 2017, 25(13): 15-17.

[5] 周德勇, 骆 宜, 苏 磊, 等. 决明子萜并吡喃酮类对照提取物研究及其在决明子药材质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(17): 3385-3390.

[6] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

[7] 席骏铂, 钱怡云, 段金廛, 等. 对照提取物用于当归药材质量控制的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3803-3807.

[8] 朱星宇, 赵根华, 高倩倩, 等. 对照提取物法测定补骨脂饮片中 7 种成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 85-91.

[9] 何风艳, 戴 忠, 马双成. 西红花苷对照提取物用于双环活血胶囊的质量控制研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12): 2204-2208.

[10] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 (2019 版第二册) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2021: 149.

[11] 金文渊. 苗药黑骨藤抗类风湿关节炎有效部位筛选及化学成分研究[D]. 贵阳: 贵州中医药大学, 2019.

[12] 李 琪, 陈 秀, 徐 艳, 等. 基于多元统计分析对秦艽中环烯醚萜苷抗胶原诱导型关节炎作用机制的研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 46-52.

[13] 易剑峰, 汤响林. 芍药苷对胶原诱导型关节炎大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 668-672.

[14] Yamanishi Y, Boyle D L, Pinkoski M J, *et al.* Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 123-130.

[15] Li H Z, Gong X, Zhang L, *et al.* Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(6-7): 538-546.

[16] Mirza F, Lorenzo J, Drissi H, *et al.* Dried plum alleviates symptoms of inflammatory arthritis in TNF transgenic mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 52: 54-61.

[17] Fu X H, Lyu X L, Liu H, *et al.* Chlorogenic acid inhibits BAFF expression in collagen-induced arthritis and human synovioocyte MH7A cells by modulating the activation of the NF-κB signaling pathway[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 8042097.

[18] 李 莹, 陈思颖, 巩仔鹏, 等. 离体外翻肠囊法研究红禾

麻提取物在正常与类风湿性关节炎模型大鼠中的肠吸收特性差异[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 405-411.

[19] Zhang L, Fan Y, Su H W, *et al.* Chlorogenic acid methyl ester exerts strong anti-inflammatory effects via inhibiting the COX-2/NLRP3/NF-κB pathway [J]. *Food Funct*, 2018, 9 (12): 6155-6164.

[20] 杨 敏. 苦丁茶中异绿原酸的提取纯化工艺及其抗类风湿关节炎的药效学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.

[21] 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类风湿性关节炎机制研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1362-1367.

[22] 周德勇, 张 乐, 姜艳艳, 等. 薄荷酚类对照提取物 HPLC 含量测定研究及其在薄荷药材质量控制中的应用[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 582-589.

紫苏叶抗急性肝损伤活性组分筛选及机制研究

王琪瑶^{1,2}, 张艳蕾³, 龚张斌³, 张 勇^{2,4*}, 贾 琦^{1*}, 李医明¹, 朱维良^{2,4}
(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: **目的** 筛选紫苏叶发挥保肝活性的关键组分并探究其作用机制。**方法** 小鼠随机分为 8 组, 正常组和模型组灌胃 PBS, 给药组分别灌胃 30 mg/kg 奥贝胆酸阳性药和 120 mg/kg 紫苏叶水煎液、醇沉上清液、醇沉固体、总黄酮以及多糖, 每天 1 次, 连续 7 d。末次给药后 2 h, 各组小鼠 (除正常组外) 腹腔注射 0. 5% CCl₄ 花生油 (10 mL/kg) 进行造模。造模结束后, 收集血清和肝脏组织, 全自动生化分析仪检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性及总胆红素 (TBIL) 水平, HE 染色观察肝组织病理形态变化, 试剂盒检测肝组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, ELISA 法检测肝组织中转化生长因子-β1 (TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-6 (IL-6) 及白细胞介素-1β (IL-1β) 水平, RT-qPCR 法检测肝组织 *NLRP3*、半胱氨酸蛋白酶-1 (*caspase-1*) 和 *IL-1β* mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 紫苏叶固体组和总黄酮组小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肝组织 SOD 活性和 TGF-β1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), MDA、TNF-α、IL-6、IL-1β 水平和 *NLRP3*、*caspase-1*、*IL-1β* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 水溶性总黄酮是紫苏叶发挥保肝作用的关键活性组分, 抑制 NLRP3/*caspase-1* 炎性小体信号通路可能是其抗 CCl₄ 致急性肝损伤的作用机制之一。

关键词: 紫苏叶; 水溶性总黄酮; CCl₄ 致急性肝损伤; NLRP3/*caspase-1*

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)12-4119-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2023. 12. 045

肝损伤是指由化学毒物、某些药物、酒精以及自身免疫问题导致的肝细胞受损^[1]。目前, 由于化学添加剂的滥用以及食品安全问题, 化学性肝损伤已逐渐成为临床中最常见的肝损伤类型^[2], 其发病率呈逐年上升的趋势^[3], 严重危害着人体的健康。中医药在防治肝病方面积累了大量的临床经验, 具有其独特的优势, 已成为肝脏疾病的临床研究热点。

紫苏为唇形科紫苏属植物紫苏 *Perilla frutescens* 的带叶嫩枝, 属于药食同源中药, 味辛, 性温, 归肺、脾经^[4]。紫苏叶、梗、果实可分别入药, 其中紫苏叶是其最常用入药部位, 《名医别录》始载其功效, 谓能“下气, 除寒

中”^[5], 具有解表散寒、行气和胃功效, 主治风寒感冒、恶心呕吐、鱼蟹中毒等症^[6]。现代研究表明, 紫苏叶具有抗炎^[7]、抗氧化^[8]、抑菌^[9]、抗肿瘤^[10]和保肝等生理活性。现有文献报道, 紫苏叶水提物和多糖对急性化学性肝损伤有保护作用并且可以改善 2 型糖尿病大鼠肝损伤^[11-13]。但上述研究并未系统比较紫苏叶水煎液各组分之间的保肝活性差异, 同时也未见紫苏叶水煎液中总黄酮的保肝活性相关报道。本研究旨在探讨紫苏叶传统水煎液不同组分对四氯化碳 (CCl₄) 诱导的小鼠急性化学性肝损伤的保护作用, 筛选最佳活性组分并探究其作用机制。

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773791); 国家自然科学基金青年项目 (81603270)

作者简介: 王琪瑶 (1996—), 女, 硕士, 研究方向为中药化学成分及生理活性。E-mail: 2420395283@qq.com

* 通信作者: 张 勇 (1986—), 男, 博士, 助理研究员, 从事中药药效物质研究。E-mail: zhangyong109@simmm. ac. cn
贾 琦 (1963—), 女, 副教授, 从事中药化学成分和活性成分研究。E-mail: q_jia@126.com