

UPLC-PDA 法测定藏药翼首草不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸的含量^Δ

唐 策^{1*}, 苏锦松¹, 杨 娟¹, 左 芳¹, 孟宪丽¹, 邹忠梅², 张 艺^{1#}(1.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2.中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0929-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.19

摘 要 目的:建立测定藏药翼首草不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸含量的方法,并比较其不同部位之间的含量差异。方法:采用超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器(UPLC-PDA)测定翼首草不同药用部位(全草、地上部位和地下部位)齐墩果酸和熊果酸含量。色谱柱为Acquity UPLC HSS T3(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为甲醇-0.1 mol/L 乙酸铵溶液(88:12, V/V),流速为0.2 mL/min;检测波长为210 nm;柱温为30 ℃;进样量为5 μL。结果:齐墩果酸和熊果酸的检测质量浓度线性范围分别为10.65~1 065 μg/mL($r=0.999\ 6$)、18.8~1 880 μg/mL($r=0.999\ 4$),平均加样回收率分别为96.95%(RSD=1.24%, $n=9$)、98.12%(RSD=2.13%, $n=9$),精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%。不同药用部位的齐墩果酸和熊果酸含量的高低整体趋势为地上部位>全草>地下部位;翼首草全草中齐墩果酸和熊果酸平均总量为0.35%,地上部位中为0.56%,地下部位中为0.09%。结论:建立的方法快速、准确可靠、重复性好,适合于藏药翼首草不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸含量的测定。翼首草地上部位中齐墩果酸和熊果酸含量较全草、地下部位高,建议使用地上部位入药。

关键词 藏药;翼首草;超高效液相色谱;光电二极管阵列检测器;药用部位;齐墩果酸;熊果酸;含量测定

多血康胶囊对急性肺损伤过程中炎症因子有抑制作用。

综上所述,藏药多血康胶囊可改善由LPS引起的小鼠急性肺损伤的症状,减轻肺损伤程度,增加肺组织中抗氧化酶产生,减少血液中炎症介质的产生和渗出,对LPS诱导的急性肺损伤小鼠具有一定的保护作用。笔者推测其保护作用机制可能与其保护肺部血管内皮细胞功能、减少大分子物质渗出相关,但有待进一步的研究证实。

参考文献

[1] 帝玛尔·丹增彭措.晶珠本草[M].毛继祖,罗达尚,王振华,等,译.上海:上海科学技术出版社,2012:149.

[2] 罗达尚.新修晶珠本草[M].成都:四川科学技术出版社,2004:438,462,685.

[3] 佟昌慈,柳云恩,金红旭,等.红景天苷对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护机制研究[J].临床急诊杂志,2015,16(9):667-671.

[4] 白玛康卓,郭燕,边巴顿珠,等.藏药红景天减弱高原肺动脉高压大鼠肺小血管病理变化和血管内皮生长因子的增高[J].生理学报,2011,63(2):143-148.

[5] Yang B, Li XP, Ni YF, et al. Protective effect of isorhamnetin on lipopolysaccharide induced acute lung injury in

mice[J]. *Inflammation*, 2016, 39(1):1-9.

[6] 伍文彬,赖先荣,索朗其美,等.多血康对高原红细胞增多症的影响研究[J].中药药理与临床,2009,25(5):93-95.

[7] 伍文彬,赖先荣,索朗其美,等.藏药多血康对家兔血瘀症模型全血黏度及红细胞流变性的影响[J].西藏科技,2009(2):39-40.

[8] 李成玉.地塞米松对脂多糖致大鼠急性肺损伤的治疗作用[D].遵义:遵义医学院,2010.

[9] 朱贲贲,马晓鹏,吴科锋,等.13-甲基嘌呤对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及其机制研究[J].中国药房,2016,27(4):464-467.

[10] 宣国平,张琳,钟明媚.脂多糖致大鼠急性肺损伤模型取材时间选择[J].中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(2):136-138.

[11] Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4):345-350.

[12] 刘中原,李延平.细菌脂多糖的生物活性及作用机制[J].医学综述,2010,16(2):166-169.

[13] 祖峰.不同气管滴注方法在小鼠急性肺损伤模型中的比较性研究[D].长春:吉林大学,2010:18.

[14] 张秋萍,吴霞红,郑剑恒,等.生物样本中丙二醛测定方法研究进展[J].理化检验(化学分册),2016,58(8):979-985.

[15] 郭笑,陈冬雪,韩笑,等.人谷胱甘肽过氧化物酶的生物信息学分析[J].北华大学学报(自然科学版),2016,17(6):750-755.

Δ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81274193);四川省教育厅省属高校科研创新团队建设计划项目(No.11TD004)

* 博士研究生。研究方向:中药药效物质基础及质量标准化。电话:028-61800274。E-mail:409014182@qq.com

通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:民族药药效物质基础。电话:028-61800274。E-mail:9006zmy@sina.com

(收稿日期:2016-10-02 修回日期:2016-12-23)
(编辑:林 静)

Content Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid from Different Medicinal Parts in Tibetan Medicine *Pterocephalus hookeri* by UPLC-PDA

TANG Ce¹, SU Jinsong¹, YANG Juan¹, ZUO Fang¹, MENG Xianli¹, ZOU Zhongmei², ZHANG Yi¹ (1.College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.Peking Union Medical College/Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the method for the determination of oleanolic acid and ursolic acid in different medicinal parts of Tibetan medicine *Pterocephalus hookeri*, and compare the differences among the different parts. **METHODS:** The contents of oleanolic acid and ursolic acid from different medicinal parts (whole plant, aerial part, underground part) of *P. hookeri* were determined by UPLC-PDA. The separation was performed on Acquity UPLC HSS T3 column(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) with mobile phase consisted of methanol-0.1 mol/L ammonium acetate (88:12, V/V) at the flow rate of 0.2 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 30 °C. The sample size was 5 μL. **RESULTS:** The linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were 10.65-1 065 μg/mL ($r=0.999\ 6$) and 18.8-1 880 μg/mL ($r=0.999\ 4$), separately. The recoveries were 96.95% (RSD=1.24%, $n=9$) and 98.12% (RSD=2.13%, $n=9$), separately. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all less than 3%. The contents of oleanolic acid and ursolic acid from different medicinal parts in *P. hookeri* were in descending order of aerial part>whole plant>underground part; the average total content of oleanolic acid and ursolic acid from whole plants was 0.35%, the aerial part reached 0.56% and underground part was 0.09%. **CONCLUSIONS:** The method is rapid, accurate and reproducible, and it is suitable for the content determination of oleanolic acid and ursolic acid in different medicinal parts of Tibetan medicine *P. hookeri*. The contents of oleanolic acid and ursolic acid from aerial part of *P. hookeri* are higher than whole plant and underground part. It is suggested to use aerial parts of medicine.

KEYWORDS Tibetan medicine; *Pterocephalus hookeri*; UPLC; PDA; Medicinal parts; Oleanolic acid; Ursolic acid; Content determination

翼首草(藏语名为“榜孜毒乌”)^[1]为川续断科匙叶翼首草[*Pterocephalus hookeri*(C.B.Clarke)Höeck]的干燥全草,收载于2015年版《中国药典》(一部)^[2]及原卫生部《藏药部颁标准》^[3]中,为常用藏药。本课题组前期通过对藏药古籍文献、藏医院及现代药材标准进行整理调查,发现翼首草药用部位的规定不统一,其全草、地上部位、地下部位均可入药^[4-7]。2015年版《中国药典》(一部)中翼首草含量测定项下,要求全草中齐墩果酸和熊果酸的总含量不得低于0.20%^[2]。查阅文献[8-12]发现,齐墩果酸和熊果酸主要来自于翼首草的哪个部位仍不清楚。因此,本研究采用超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器(UPLC-PDA)测定翼首草全草、地上部位和地下部位中齐墩果酸和熊果酸的含量,明确齐墩果酸和熊果酸的主要来源部位,以期优化翼首草的用药部位,并为翼首草质量控制标准和资源的可持续利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC 仪,包括四元溶剂管理系统、样品管理系统、光电二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);BT125D 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

齐墩果酸对照品(批号:110709-200505,纯度:>98%)、熊果酸对照品(批号:742-9204,纯度:>98%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(美国 J.T.Baker 公司,色谱纯);水为屈臣氏蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

翼首草药材来源于四川、云南,经成都中医药大学

民族医药学院张艺研究员鉴定为川续断科匙叶翼首草[*Pterocephalus hookeri*(C.B.Clarke)Höeck]的干燥全草。将2013年8月采集的16批次翼首草,将其分为地上部位和地下部位,晾干,粉碎,过三号筛。16批次翼首草样品产地信息见表1。

表1 16批次翼首草样品产地信息

Tab 1 Production areas of 16 batches of *P. hookeri*

编号	产地	编号	产地
S1	四川省炉霍县 G317 国道卡加大桥	S9	四川省阿坝县洛尔达乡阿秋村
S2	四川省白玉县纳塔乡昌根村	S10	四川省阿坝县查理乡木多村
S3	四川省康定县江世乡	S11	四川省阿坝县麦昆乡草原社
S4	云南省迪庆州香格里拉县附近	S12	四川省阿坝县麦昆乡俄郎社
S5	四川省德格县壤塘乡黑嘎村	S13	四川省若尔盖县壤口
S6	四川省康定县塔公草原各日玛村	S14	四川省阿坝县各莫乡阿尔根
S7	四川省炉霍县更知乡前进村	S15	四川省阿坝县德格乡
S8	四川省阿坝县马尔乡	S16	云南省迪庆州香格里拉藏医院

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC HSS T3(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:甲醇-0.1 mol/L 乙酸铵溶液(88:12, V/V);流速:0.2 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 °C;进样量:5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取齐墩果酸、熊果酸对照品适量,加入甲醇制备成每 1 mL 含齐墩果酸 1.065 mg 和熊果酸 1.880 mg 的混合对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 取翼首草粉末(过三号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,放

冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,用少量甲醇洗涤滤渣及滤器,合并滤液,蒸干。残渣加甲醇适量使溶解,将溶液转移至10 mL量瓶中,甲醇定容,摇匀,滤过。取续滤液过0.22 μm的微孔滤膜,即得^[2]。

2.3 线性关系考察

吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液,按不同比例加入甲醇稀释,制成一系列质量浓度的样品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱峰。超高效液相色谱图见图1。以样品溶液质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,分别得到回归方程:齐墩果酸为 $y=1.03\times10^7x-1.86\times10^4$ ($r=0.999\ 6$)、熊果酸为 $y=8.83\times10^6x+4.60\times10^3$ ($r=0.999\ 4$)。结果表明,齐墩果酸质量浓度在10.65~1 065 μg/mL、熊果酸质量浓度在18.8~1 880 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

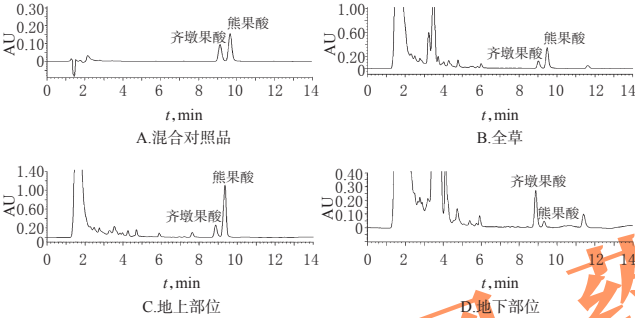


图1 超高效液相色谱图
Fig 1 UPLC chromatograms

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取“2.2.1”项下制备的混合对照品溶液5 μL,按“2.1”项下色谱条件,重复进样6次,测定峰面积。结果,齐墩果酸和熊果酸峰面积的RSD值分别为0.17%、0.50% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批次(S12)供试品溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h,按“2.1”项下色谱条件进样,测定峰面积。结果,齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD值分别为0.79%、0.87% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批次(S12)药材粉末6份,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样,测定含量。结果,齐墩果酸、熊果酸含量的RSD值分别为2.11%、2.86% ($n=6$),表明重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 取已知含量的翼首草药材粉末9份,每份约1 g,分别加入适量的混合对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。结果齐墩果酸、熊果酸的加样回收率分别为96.95% ($RSD=1.24\%, n=9$)、98.12% ($RSD=2.13\%, n=9$),表明该方法准确度较好。

2.5 样品含量测定

分别取不同产地、不同部位的翼首草药材粉末,按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,计算齐墩果酸和熊果酸的含量。16批次翼首草样品不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸的含量测定结果见表2;齐墩果酸和熊果酸分别在翼首草不同药用部位中的含量测定结果见图2;翼首草不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸的含量测定结果见图3。

表2 16批次翼首草样品不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸的含量测定结果($n=2$)

Tab 2 Contents of oleanolic acid and ursolic acid from different medical parts in 16 batches of *P. hookeri* ($n=2$)

编号	全草			地上部位			地下部位		
	齐墩果酸, mg/g	熊果酸, mg/g	总量, %	齐墩果酸, mg/g	熊果酸, mg/g	总量, %	齐墩果酸, mg/g	熊果酸, mg/g	总量, %
S1	1.27	2.35	0.362	1.06	4.90	0.596	0.52	0.21	0.073
S2	0.58	1.84	0.242	0.79	3.34	0.413	0.78	0.28	0.106
S3	0.86	1.92	0.278	0.93	4.37	0.530	1.22	0.21	0.143
S4	0.98	3.91	0.489	1.37	6.00	0.737	0.47	0.44	0.091
S5	0.99	3.79	0.478	1.30	6.32	0.762	0.32	0.24	0.056
S6	0.87	2.97	0.384	0.96	4.05	0.501	1.44	0.25	0.169
S7	0.83	2.25	0.308	0.88	3.99	0.487	0.59	0.15	0.074
S8	0.77	2.45	0.322	1.36	4.71	0.607	1.49	0.17	0.166
S9	0.56	2.17	0.273	1.33	4.56	0.589	0.52	0.13	0.065
S10	1.45	2.54	0.398	1.14	4.41	0.555	1.17	0.14	0.131
S11	0.59	2.46	0.305	0.91	3.86	0.477	0.24	0.12	0.036
S12	0.93	1.87	0.280	0.99	4.37	0.536	0.62	0.10	0.072
S13	0.77	3.09	0.386	0.83	4.14	0.497	0.38	0.34	0.072
S14	0.53	2.71	0.324	1.00	4.71	0.571	0.23	0.20	0.043
S15	0.60	2.69	0.329	0.89	4.21	0.51	0.17	0.22	0.039
S16	1.00	3.23	0.423	1.20	4.08	0.528	0.43	0.47	0.090

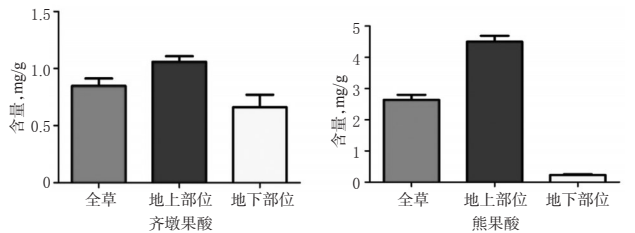


图2 齐墩果酸和熊果酸分别在翼首草不同药用部位中的含量测定结果($n=16$)

Fig 2 Contents of oleanolic acid and ursolic acid from different medical parts in *P. hookeri* ($n=16$)

3 讨论

笔者前期考察了Acquity UPLC BEH C₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Acquity UPLC BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和Acquity UPLC HSS T3(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)等色谱柱对齐墩果酸和熊果酸的分离效果,结果Acquity UPLC HSS T3(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱分离效果最佳。

笔者参照2015年版《中国药典》(一部)^[2]的含量测定方法,并通过优化,建立了测定藏药翼首草不同药用部位齐墩果酸、熊果酸含量的UPLC-PDA法。该法快

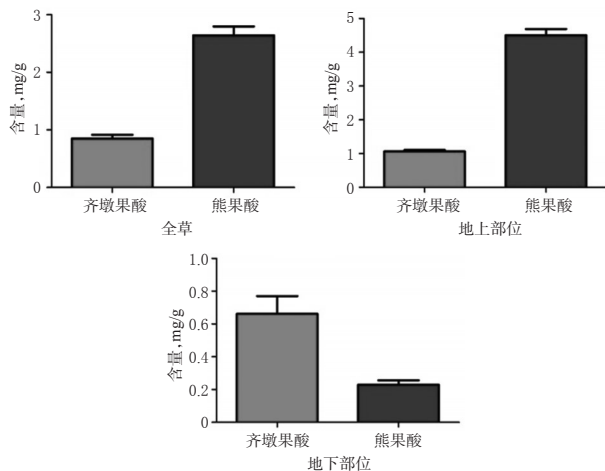


图3 翼首草不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸的含量测定结果($n=16$)

Fig 3 Contents of oleanolic acid and ursolic acid from different medical parts in *P. hookeri* ($n=16$)

速、准确可靠、重现性好,适合于翼首草药材中三萜类成分含量的测定。

2015年版《中国药典》(一部)规定,翼首草药材中含齐墩果酸和熊果酸的总量不得少于0.20%^[2]。从表2可以看出,齐墩果酸和熊果酸的总量在翼首草全草和地上部位中均达到要求,分别为0.35%、0.56%,然而地下部位中为0.09%,未能达到2015年版《中国药典》(一部)^[2]要求。

本文研究了同一产地不同批次的翼首草药材中不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸含量的高低,由图2可知,地上部位的齐墩果酸和熊果酸含量均高于地下部位,分别是地下部位的1.6、19.62倍。由图2和图3可知,地上部位中熊果酸的含量多于齐墩果酸,高出近4倍;而地下部位中齐墩果酸的含量较熊果酸含量多,高出近3倍。

翼首草为多年生草本植物,主产于海拔3 200~5 700 m的山坡、草地、草甸、林间等^[7],因连根采挖,在2000年就被列为一级濒危藏药物种^[13]。如何合理利用翼首草资源,防止其野生资源濒临枯竭,是必须进行的重要课题。本课题组前期对翼首草不同药用部位总皂苷的含量测定发现,翼首草地上部位总皂苷平均含量为5%^[14];也对翼首草不同药用部位中马钱苷进行含量测定,发现地上部位马钱苷较地下部位含量高^[15];同时对不同地区不同药用部位翼首草指纹图谱比较发现,地上部位指纹图谱较地下部位更全面^[16]。从资源化学的角度考虑,笔者建议翼首草的药用部位为地上部位,做到资源保护与合理开发利用并举。同时,应加强翼首草人工栽培研究,促使翼首草逐步发展到满足藏药临床用药及规模化生产需要。因此,本文首次对同一产地不同

批次翼首草不同部位中齐墩果酸和熊果酸含量进行测定,为进一步完善其质控标准提供了重要的依据。

参考文献

- [1] 张雪梅,杨丰庆,夏之宁.藏药翼首草的药理作用及其质量评价研究进展[J].中国药房,2012,23(35):3356-3358.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:381.
- [3] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第1册[S].北京:化学工业出版社,1995:138.
- [4] 张雨欣,李聪颖,刘川,等.基于DNA条形码及UFLC技术的藏药翼首草相关性的品质评价研究[J].中国中药杂志,2016,41(4):572-577.
- [5] 李聪颖.基于DNA条形码及UFLC技术的藏药翼首草遗传-化学相关性研究[D].成都:成都中医药大学,2015:25-28.
- [6] 帝玛尔·丹增彭措.晶珠本草[M].毛继祖,罗达尚,王振华,等,译.上海:上海科学技术出版社,1986:137.
- [7] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991:191-193.
- [8] 张小梅,梁旭明,孙冠芸,等.HPLC测定不同批次、不同产地翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].中国现代应用药学,2011,28(12):1125-1128.
- [9] 冯瑜娟,张艺.HPLC-ELSD法测定藏药翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].成都中医药大学学报,2007,30(3):54-56.
- [10] 刘小兰,周剑波,陶燕铎,等.高效液相色谱法测定翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].中国医院药学杂志,2008,28(7):546-548.
- [11] 张小梅,梁旭明,励娜,等.高效液相色谱法测定翼首草不同药用部位齐墩果酸和熊果酸的含量[J].中国医院药学杂志,2012,32(2):155-156.
- [12] 权红,甄梓娟,李连强,等.藏药匙叶翼首草中齐墩果酸及熊果酸的含量测定[J].中国现代中药,2016,18(6):762-765.
- [13] 李隆云,占堆,卫莹芳,等.濒危藏药资源的保护[J].中国中药杂志,2002,27(8):561-564.
- [14] 林升得,江道峰,张艺,等.分光光度法测定藏药翼首草不同药用部位总皂苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):101-104.
- [15] 谭德,古锐,张艺,等.HPLC测定藏药翼首草中马钱苷的含量[J].中国中药杂志,2011,36(24):3472-3474.
- [16] 李聪颖,范刚,张艺,等.藏族药翼首草不同药用部位UFLC指纹图谱比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9):42-45.

(收稿日期:2016-08-10 修回日期:2016-10-15)

(编辑:余庆华)