

图 2 REMMD 对小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 的生长抑制作用(400×)

A-空白对照组; B-12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; C-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; D-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD

Fig 2 Inhibition effect of REMMD on growth of NIH 3T3 cell lines(400×)

A-negative control group; B-12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; C-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; D-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD

本实验以小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 为靶细胞, 采用 MTT 法观察 REMMD 对其生长的抑制作用, 并观察 REMMD 作用后对其形态变化的影响。结果显示, REMMD 可显著抑制 NIH/3T3 细胞生长, 呈浓度依赖关系。体外实验数据表明其具有一定的抗纤维化作用, 作用机制有待进一步探讨。这对于进一步开展 REMMD 抗肝纤维化的动物体内实验具有指导意义。

致谢: 醉香含笑地下部位的挥发性化学成分 GC-MS 分析由扬州大学分析测试中心陆春良老师协助完成, 在此致谢。

REFERENCES

- [1] ZHONG Y H. Cultivation technique of *Michelia macclurei* Dandy. [J]. Guangxi Forest Sci(广西林业), 2005(4): 42-43.

- [2] MING J, GU W C. Research advances on *Michelia* Linn. in China [J]. J Cent South Forest Univ(中南林学院学报), 2004, 24(5): 147-152.
- [3] HUANG R Z, TAN D F, ZHENG Y S, et al. Chemical constituents of the volatile oils from leaves of *Michelia macclurei* Dandy [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2009, 17(4): 406-408.
- [4] SARGENT J M, TAYLOR C G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia [J]. Br J Cancer(英国肿瘤杂志), 1989, 60(2): 206-210.
- [5] SONG X K. Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Tsoongiodendron odorum* Chen.[D]. Shenyang: Shenyang Pharm Univ, 2001.
- [6] SONG X K, WU L J, TU P F. Studies on bioactive constituents in bark of *Tsoongiodendron odorum* Chen. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(8): 676-678.
- [7] LIU C H, HU Y Y, WANG X L, et al. Effects of salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression [J]. World J Gastroenterol(世界华人消化杂志), 2000, 6(3): 361-364.

收稿日期: 2011-04-13

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

张小梅¹, 梁旭明^{1*}, 孙冠芸¹, 杨荣平¹, 须建²(1.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2.重庆医药高等专科学校, 重庆 401331)

摘要: 目的 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。方法 色谱柱: Boston Symmetrix C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(85:15), 流速 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。结果 齐墩果酸和熊果酸的线性范围分别为 1.728~25.92 μg ($r=0.999\ 9$)、2.188~32.82 μg ($r=0.999\ 9$), 齐墩果酸的平均回收率为 99.9%, RSD 为 2.12%, 熊果酸的平均回收率为 99.9%, RSD 为 1.66%。通过比较不同产地和批次翼首草样品的测定结果, 可知不同产地和批次中翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量有着较大差别, 其中甘肃、青海和四川西宁所产齐墩果酸和熊果酸含量远远高于其它产地。结论 该方法简便、准确、重复性好, 试验结果为翼首草的药用研究、产品的开发提供了依据。

关键词: 高效液相色谱法; 翼首草; 齐墩果酸; 熊果酸; 不同产地; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)12-1125-04

基金项目: 中国药典 2010 版一部标准研究(YS-262)

作者简介: 张小梅, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (023)89029068 E-mail: ZX761@yahoo.com.cn *通信作者: 梁旭明, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (023)89029108 E-mail: liangxuming2004@yahoo.com.cn

Determination of Oleanolic Acid and Orsolic Acid in *Pterocephalus Hookeri* from Different Batches and Different Regions by HPLC

ZHANG Xiaomei¹, LIANG Xuming^{1*}, SUN Guanyun¹, YANG Rongping¹, XU Jian²(1.Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2.Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Determination of oleanolic acid and orsolic acid in *Pterocephalus hookeri* from different batches and different origins. **METHODS** The separation was performed on an ODS column with the mobile phase of CH₃OH-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm and the column temperature was 30 °C. **RESULTS** The oleanolic acid and orsolic acid linearity range respectively was 1.728–25.92 μg($r=0.999\ 9$), 2.188–32.82 μg($r=0.999\ 9$), the average recovery of oleanolic acid was 99.9%, RSD was 2.12%, the ursolic acid average recovery was 99.9%, RSD was 1.66%. From the results obtained in this study, contents of oleanolic acid and orsolic acid differed from *Pterocephalus hookeri* collected from different batches and regions. And the contents of oleanolic acid and orsolic acid in *Pterocephalus hookeri* from Gansu, Qinghai, Xining were higher than others. **CONCLUSION** This method is stable, reliable, reproduceable. The experimental results supply the basic information for medicinal investigation and the product development of *Pterocephalus hookeri*.

KEY WORDS: HPLC; *Pterocephalus hookeri*; oleanolic acid; orsolic acid; different regions; content determination

翼首草为川续断科植物匙叶翼首草 *Pterocephalus hookeri* (C. B. Clarke) Hoeck 的干燥全草。性寒、味苦、有小毒，具有解毒除瘟，清热止痢，祛风通痹之功效，为藏医常用药材^[1]。匙叶翼首草中的主要成分为齐墩果烷型五环三萜皂苷类化合物齐墩果酸和熊果酸。它们具有相似的抗炎、解毒等药理作用，这可能与它们互为同分异构体有关。齐墩果酸具有护肝、解肝毒、抗炎、抗病毒、抗过氧化、抗突变、抗癌以及降糖、降脂作用^[2]，而熊果酸则具有肝损伤保护、抗肿瘤活性、抗菌、抗炎、及抗病毒作用^[3]，一般使用 HPLC 测定齐墩果酸和熊果酸的含量^[4-6]。文献测定翼首草中齐墩果酸和熊果酸含量时所用药材产地和样本均较少^[7-8]，本实验采用高效液相色谱法对来自 3 个主产区、10 批翼首草药材中齐墩果酸和熊果酸进行了含量测定，比较不同批次、不同产地翼首草齐墩果酸和熊果酸的含量，为翼首草优质药材的选择和临床应用提供一定的参考依据。

1 仪器、试剂及试剂

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司，配 Waters 2996 检测器，Waters Empower 化学工作站)；AEG-45SM 电子天平(十万分之一，日本岛津公司)；BP121S 电子天平(万分之一，北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

齐墩果酸熊、熊果酸(中国药品生物制品检定

所，供含量测定用，批号分别为：110709-200505，110742-200516)。

1.3 试剂

甲醇为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯，均购自重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液和供试品溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 8.64 mg、熊果酸对照品 10.94 mg，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并稀释至刻度。摇匀即得 0.864 mg·mL⁻¹ 的齐墩果酸、1.094 mg·mL⁻¹ 的熊果酸对照品混合溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取翼首草粉末(过三号筛)2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 50 mL，超声处理(功率 250 W，频率 40 Hz)30 min，冷却，过滤，用少量甲醇润洗滤渣，合并滤液，蒸干，残渣加甲醇转移至 10 mL 量瓶，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2 色谱条件

色谱柱：Boston Symmetrix ODS-R C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(85：15)；检测波长：210 nm；柱温：30℃；流速：0.8 mL·min⁻¹。

2.3 标准曲线的制备

分别精密吸取混合对照品溶液 2，4，6，10，20，30 μL，注入液相色谱仪，测定峰面积。分别

以齐墩果酸和熊果酸的含量(μg)为横坐标(X)、峰面积积分值为纵坐标(Y), 进行线性回归, 分别得到回归方程: 齐墩果酸 $Y=4.9 \times 10^4 X-1.0 \times 10^4$ ($r=0.999\ 9$), 线性范围 $1.728\sim 25.92\ \mu\text{g}$; 熊果酸 $Y=4.2 \times 10^4 X-7.4 \times 10^4$ ($r=0.999\ 9$), 线性范围 $2.188\sim 32.82\ \mu\text{g}$ 。各对照品在线性范围内含量与峰面积有很好的相关性。

2.4 仪器精密度试验

精密吸取齐墩果酸与熊果酸混合对照品溶液(浓度为齐墩果酸 $0.864\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 熊果酸 $1.094\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $10\ \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定峰面积积分值, 其结果 RSD 分别为 1.58% , 0.74% , 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取对照品溶液及重复性试验项下的供试品溶液各 $10\ \mu\text{L}$, 分别于 $0, 4, 8, 12, 24, 48\ \text{h}$ 进样, 测定峰面积积分值, 结果表明, 对照品溶液及供试品溶液均在 $48\ \text{h}$ 内稳定, 对照品中齐墩果酸和熊果酸 RSD 分别为 1.69% 和 1.24% , 供试品溶液中齐墩果酸与熊果酸的 RSD 分别为 1.61% ,

1.15% 。

2.6 重复性试验

取同一批号样品(第 2 批) 6 份, 每份约 $2\ \text{g}$, 精密称定, 按“ $2.1.2$ ”项下方法制备供试液, 精密吸取各供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 按“ 2.2 ”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 计算含量, 结果供试品中齐墩果酸和熊果酸 RSD 分别为 1.11% 和 1.72% , 表明重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取齐墩果酸对照品、熊果酸对照品适量, 置 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得含齐墩果酸 $0.681\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、熊果酸 $1.68\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品溶液; 另取同一批号样品(第 2 批) 9 份, 每份约 $1\ \text{g}$, 精密称定, 精密加入齐墩果酸和熊果酸混合对照品溶液适量(3 种不同水平, 各 3 份), 按“ $2.1.2$ ”项下方法制备供试品溶液和“ 2.2 ”项下色谱条件进样, 计算齐墩果酸、熊果酸的平均回收率分别为 99.9% , 99.9% ; RSD 分别为 2.12% , 1.66% 。表明本法具有较好的回收率, 结果见表 1 。

表 1 加样回收率试验结果
Tab 1 Results of recovery test

编号	称样量/g	样品中齐墩果酸/mg	样品中熊果酸/mg	加入齐墩果酸量/mg	加入熊果酸量/mg	测得齐墩果酸含量/mg	测得熊果酸含量/mg	齐墩果酸回收率/%	熊果酸回收率/%
1	0.997 0	0.631 5	1.694 7	0.544 8	1.344 0	1.171 2	3.019 9	99.1	98.6
2	1.030 6	0.651 8	1.751 8	0.544 8	1.344 0	1.199 4	3.086 8	100.5	99.3
3	0.973 6	0.615 7	1.654 9	0.544 8	1.344 0	1.161 7	2.993 6	100.2	99.6
4	0.987 3	0.624 4	1.678 2	0.681 0	1.680 0	1.298 6	3.423 3	99.0	103.9
5	0.995 0	0.629 3	1.691 3	0.681 0	1.680 0	1.312 1	3.383 7	100.3	100.7
6	1.018 1	0.643 9	1.730 6	0.681 0	1.680 0	1.358 0	3.379 8	104.9	98.2
7	1.000 9	0.633 0	1.701 3	0.817 2	2.016 0	1.429 0	3.710 1	97.4	99.6
8	1.002 8	0.634 2	1.704 6	0.817 2	2.016 0	1.436 4	3.717 9	98.2	99.9
9	1.002 1	0.633 7	1.703 4	0.817 2	2.016 0	1.447 5	3.704 6	99.6	99.3
平均值/%								99.9	99.9
$\text{RSD}/\%$								2.12	1.66

2.8 样品测定

取不同产地翼首草粉末(过 3 号筛) $2\ \text{g}$, 精密称定。照“ $2.1.2$ ”项下方法制备供试液, 精密吸取各供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 按“ 2.2 ”项下色谱条件进样, 混合对照品及样品色谱图见图 1 。测定对照成分峰面积, 计算含量, 即得。样品的含量测定结果见表 2 。

3 讨论

本课题为 2010 版中国药典新上品种翼首草质量标准, 严格按照中国药典 2005 版中药质量标准研究技术要求规定完成。齐墩果酸和熊果酸属于五环三萜类化合物, 属同分异构体, 广泛存在于自然界中, 具有多种显著的生物活性, 因此以齐墩果酸和熊果酸为含量测定的药材也不少, 但齐

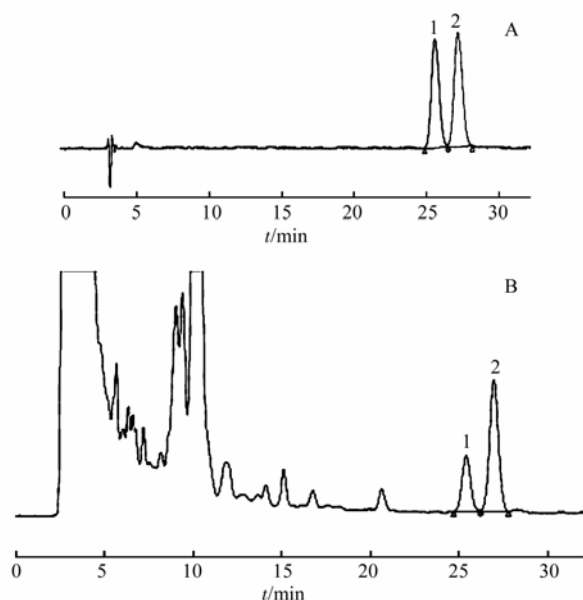


图1 HPLC 色谱图

A-混合对照品; B-供试品; 1-齐墩果酸; 2-熊果酸

Fig 1 HPLC Chromatograph

A-mix control; B-sample; 1-oleanolic acid; 2-orsolic acid

表2 样品含量测定(n=2)

Tab 2 Content detemination of samples(n=2)

批次	产地	齐墩果酸含量 平均值/%	熊果酸含量 平均值/%	总含量/ %
1	四川甘孜	0.060 0	0.161 1	0.221 1
2	四川甘孜	0.070 2	0.184 0	0.254 2
3	四川道孚县	0.075 0	0.262 4	0.337 4
4	青海	0.061 6	0.216 7	0.278 3
5	四川西宁	0.092 5	0.362 1	0.454 6
6	四川西宁	0.099 1	0.410 3	0.509 4
7	甘肃	0.096 9	0.414 4	0.511 3
8	甘肃	0.091 3	0.333 5	0.424 8
9	甘肃	0.098 8	0.375 4	0.474 2
10	青海	0.094 6	0.376 4	0.471 0

墩果酸和熊果酸在液相色谱中较难分离, 试验就齐墩果酸和熊果酸分离中色谱柱、流动相、流速、柱温、检测波长分别进行了考察得出了优选的条件。结果发现齐墩果酸和熊果酸的分离对柱效要求很高, 对柱子的选择性高, 因此在做齐墩果酸

和熊果酸的含量时一定要选择合适的色谱柱。

分别测定了 3 个主产区、10 批翼首草药材中齐墩果酸和熊果酸的含量, 同一样品中熊果酸的含量均高于齐墩果酸。而同时笔者也测定了翼首草水解样品中齐墩果酸和熊果酸的含量, 发现水解后齐墩果酸远远高于熊果酸, 说明翼首草中以齐墩果酸为母核结合的皂苷含量较高。

不同产地、不同批次翼首草药材含量有一定的差别, 其中甘肃、青海和四川西宁产翼首草药材中齐墩果酸和熊果酸的总含量明显高于四川其它产地, 为临床应用提供一定的参考依据。由于本实验未进行不同产地、不同批次翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量与其主要功效动物实验对比研究, 因此不能说明其含量与主要功效的相关性, 在下一步的研究中有必要对其进行研究便于更好地为临床服用。

REFERENCES

- [1] Drugs Standard of Ministry of Health of the People's Republic of China(Drugs of Tibetan) Vol I [中华人民共和国卫生部药品标准(藏药).第一册] [S]. 1995.
- [2] TIAN L, MA L, DU L S. Pharmacological action research survey of oleanolic acid [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2002, 27(12): 884-886.
- [3] XIONG B B. Pharmacology research development of orsolic acid [J]. Foreign Med Sci(Sec Pharm) (国外医学 药学分册), 2004, 31(3): 133-136.
- [4] ZHONG B H, GUO M, LAN X Y. Determination of oleanolic acid in Weilingxian by HPLC-ELSD [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(6): 494-496.
- [5] SUN J P, ZHANG J, QIN X M, et al. A pre-column derivatization HPLC-UV method for the determination of oleanolic acid in *Achyranthes bidentata* Bl. [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(1): 49-53.
- [6] CHEN Z H, LIU W. The quality analysis of defferent areas of Henan's *Spica Prunellae* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(4): 291-293.
- [7] LIU X L, ZHOU J B, TAO Y D, et al. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in Yishoucao by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(7): 546-548.
- [8] FENG Y, ZHANG Y. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in Yishoucao by HPLC-ELSD [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med(成都中医药大学学报), 2007, 30(3): 54-56.

收稿日期: 2011-03-21