

不同地区和生长物候期藏药花锚有效成分齐墩果酸的含量变化研究

杨慧玲^{1,2}, 刘健全^{1*} (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:目的 探讨花锚中齐墩果酸不同产地和物候期的变化。方法 用高效液相色谱法对不同产地(栽培和野生)和物候期(栽培)花锚样品中齐墩果酸含量进行了比较分析。结果 齐墩果酸的含量随海拔和物候期的变化明显。结论 随海拔的增加,花锚中齐墩果酸的含量有一定的升高;栽培植物的含量低于野生植物;随物候生长有一定的规律变化,花期含量最高。

关键词:花锚;齐墩果酸;高效液相色谱法;海拔;生长物候期

中图分类号:R931.6 文献标识码:A 文章编号:1001-2494(2004)09-0659-02

Variations of oleanolic acid content in *Halenia elliptica* from different origins and growth phases

YANG Hui-ling^{1,2}, LIU Jian-quan^{1*} (1. Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Science, Xining 810008, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the variations of oleanolic acid contents in *Halenia elliptica* D. Don from different origins and growth phases. **METHODS** Oleanolic acid contents in artificially cultivated and naturally distributed samples of different growth phases and origins were determined by HPLC. **RESULTS** The contents of oleanolic acid varied remarkably with growth phases and altitudes. **CONCLUSION** The contents of oleanolic acid increased with altitudes, lower in artificially cultivated samples than that of naturally distributed samples at the same altitude and reached the highest at flowering stage.

KEY WORDS: *Halenia elliptica*; oleanolic acid; HPLC; altitude; growth stage

花锚(*Halenia elliptica* D. Don)为龙胆科(Gentianaceae)花锚属(*Halenia*)2年生草本植物^[1],以全草入药,为藏族药物系统中用于治疗肝胆系统疾病的常用植物之一^[2],广布于青藏高原,亦称“藏茵陈”。花锚具有清热利湿、平肝利胆的功能,对治疗急性黄疸型肝炎和慢性胆囊炎等疾病也有很好的疗效,齐墩果酸可能也是治疗这些疾病的成分之一^[3-4]。本实验比较了野生状态下不同海拔、栽培条件下不同生长期花锚的齐墩果酸含量^[5],为确定该药材的采收时期、不同地区药材的质量以及栽培地点的选择提供理论依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪系列:Waters 600E 液相色谱仪, Waters 486 紫外检测器, Waters 746 数据处理系统, Millipore 溶剂过滤系统。色谱柱:Phenomenex kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

齐墩果酸(oleanolic acid)对照品(本所植化室分离^[2],纯度为 97.5%),水为重蒸水,甲醇(色谱纯),其他试剂为分析纯。试剂使用之前均通过 Millipore 溶剂过滤系统过滤。

药材样品的采集时间为 2000 年 9 月至 2002 年 9 月。栽培样品分为幼苗期、蕾期、花期和果期采集,自然分布的花锚采集时期为果期。凭证标本存于中国科学院西北高原生物研究所标本馆,所有样品均由中国科学院西北高原生物研究

所刘健全研究员鉴定为 *Halenia elliptica* D. Don。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

流动相:甲醇-水-磷酸(体积比 96:4:2);检测波长:220 nm;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:室温;进样量:10 μL。

2.2 检测波长的选择

将齐墩果酸对照品用 50% 甲醇溶解后,在 150 ~ 300 nm 进行扫描,由于在 190 nm 处基线不稳,杂峰较多,而在 220 nm 处基线稳定,波形较好,故选择 220 nm 作为检测波长。

2.3 提取方法的选择

取花锚药粉适量(过 40 目筛)精密称定 1.5 g,放入锥形瓶中加无水乙醇 40 mL 称重,分别冷浸 1, 2 和 3 h,超声 10, 20 和 30 min,补重后过滤到 50 mL 的量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,过微孔滤膜 0.45 μm,进样 10 μL 测定,结果超声 30 min 提取率最高,杂峰较少,故采用超声 30 min 提取。

2.4 提取溶剂的选择

取一定量的花锚粉末精密称定 1.5 g 于锥形瓶中,分别加 75%, 90% 无水乙醇和甲醇 40 mL 称重,超声提取 30 min,补重后过滤到 50 mL 的量瓶中,分别用各自的提取剂定容至刻度,再过微孔滤膜 0.45 μm 测定,结果用无水乙醇提取率最高,杂质较少,故选用无水乙醇作为提取剂。

基金项目: 归国留学人员重点科研项目、中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX-SW-106)、中国科学院“西部之光”人才培养计划和全国优秀博士论文专项基金资助

作者简介: 杨慧玲,女,硕士研究生 * 作者简介: 刘健全,男,研究员,博士生导师
lijqdx@public.xn.qh.cn.

Tel: (0971) 6153387 Fax: (0971) 6143282 E-mail:

中国药学杂志 2004 年 9 月第 39 卷第 9 期

Chin Pharm J, 2004 September, Vol. 39 No. 9 · 659 ·

2.5 线性关系

准确称取齐墩果酸对照品适量,用50%甲醇溶解并制成一定浓度的对照品储备液,精密吸取对照品储备液适量,用50%甲醇稀释成浓度为 $0.472 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。精密吸取 $0.472 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的齐墩果酸对照品溶液4,8,10,12,16 μL 进样,按“2.1”项色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,相应齐墩果酸对照品进样量(μg)为横坐标,进行回归分析,回归方程和相关关系如下: $Y = -3\,944.10 + 43\,972.77X, r = 0.997$,线性范围为 $1.89 \sim 7.55 \mu\text{g}$ 。

2.6 精密度实验

取同一样品溶液按“2.1”项色谱条件重复进样5次(每次 $10 \mu\text{L}$),样品峰面积积分值的RSD为1.22%。

2.7 稳定性实验

精密吸取同一样品溶液,进样 $10 \mu\text{L}$,分别于配制后0,2,4,6,8,12 h,依次测定,结果表明,供试品溶液在12 h内基本稳定,RSD=0.84%。

2.8 样品测定

取花锚全草粉末约20 g(过40目筛),精密称定1.5 g于锥形瓶中,加无水乙醇40 mL称重,超声提取30 min,补重滤去残渣,过滤到50 mL量瓶中,并用无水乙醇洗涤容器和残渣数次,过滤洗液并入50 mL量瓶中并用无水乙醇定容至刻度,微孔滤膜过滤($0.45 \mu\text{m}$)制成供试品溶液。吸取 $10 \mu\text{L}$ 进样测定,每个样品重复至少3次,结果见表1,2和图1,2。

表1 栽培和野生花锚不同生长期齐墩果酸的含量

Tab 1 Contents of oleanolic acid in cultivated and wild *Halenia elliptica* D. Don during different growth stages

地点	幼苗期/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	蕾期/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	花期/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	果期/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
西宁	0.34 ± 0.02		0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.04
湟中		0.38 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.29 ± 0.01

表2 不同海拔栽培和野生花锚果期齐墩果酸的含量

Tab 2 Contents of oleanolic acid in *Halenia elliptica* D. Don from different altitudes

采集地点	海拔/m	纬度	经度	齐墩果酸含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
青海西宁	2200	$36^{\circ}36.684'$	$101^{\circ}45.009'$	0.32 ± 0.04
青海大通	2500	$36^{\circ}37.177'$	$101^{\circ}10.950'$	0.24 ± 0.01
青海互助	2600	$36^{\circ}64.928'$	$102^{\circ}17.907'$	0.45 ± 0.01
青海湟中	2620	$36^{\circ}47.680'$	$101^{\circ}32.970'$	0.29 ± 0.01
西藏郎县	3050	$29^{\circ}01.320'$	$93^{\circ}53.030'$	0.29 ± 0.01
西藏波密	3160	$29^{\circ}39.267'$	$96^{\circ}12.288'$	0.60 ± 0.03
西藏曲水	3650	$29^{\circ}17.590'$	$94^{\circ}21.460'$	0.69 ± 0.02
西藏帮达	4370	$30^{\circ}27.360'$	$97^{\circ}10.080'$	0.92 ± 0.04

3 讨论

表1是不同生长期人工栽培和野生居群花锚中齐墩果酸的含量。从表1可以发现花锚花期齐墩果酸含量最高,而幼苗期、蕾期和果期都低于花期的含量。可见物候期影响着花锚药材中齐墩果酸的含量,花锚中齐墩果酸的含量随物候期变化呈一定的规律性,花期之前呈上升趋势,在花期达到了最高值,之后又呈下降趋势。花期采收的花锚齐墩果酸含量最高。而且从生物量的角度考虑,花期的生物量高于果期更高于其他时期,因此花期得到的药材最多质量也最好。

· 660 · *Chin Pharm J*, 2004 September, Vol. 39 No. 9

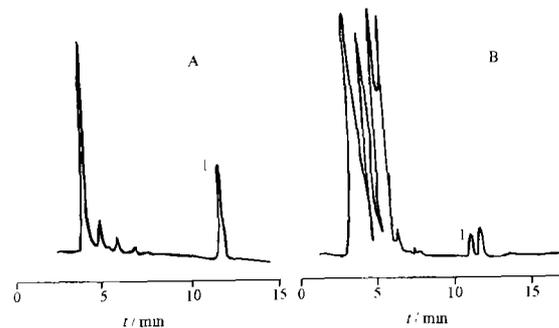


图1 对照品(A)与样品(B)HPLC色谱图

1-齐墩果酸

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

1-oleanolic acid

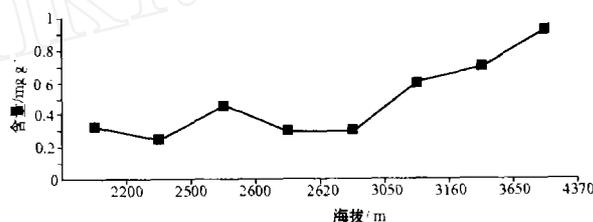


图2 花锚果期齐墩果酸含量随海拔高度变化的趋势

Fig 2 Contents of oleanolic acid in *Halenia elliptica* D. Don at fruitage from different altitudes

表2是不同海拔栽培和野生花锚果期齐墩果酸的含量,除西藏朗县的材料以外,高海拔地区花锚中齐墩果酸含量明显高于低海拔地区。由此可见,海拔也影响着花锚中齐墩果酸的含量,随着海拔的升高,花锚中齐墩果酸的含量呈一定的增加趋势,尤其对于西藏海拔较高地区的花锚,趋势较为显著。

此外,从青海互助2600 m采集的花锚种子人工栽培到两个地点(西宁、大通),其相同时期(果期)的含量都有一定程度的降低,即使海拔高度相似(大通)时,也是表现为减少的趋势(图2)。可见花锚中齐墩果酸的含量除受海拔影响外,可能还受到其他生态因素的影响,如土壤、降雨等生态因子;因为栽培地与野生状态下土壤的理化性质显然不一样。因此,将来的研究应集中在单一生态因子控制上比较其变化。我们的研究表明,各地产花锚中齐墩果酸存在较大的差异,这种差异可能是该植物对不同生态环境的综合反应,药材质量与产地密切相关。这种差异无论在收购野生药材和栽培药材时都应加以认真对待。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 西宁:青海植物志(3)[M]. 青海人民出版社,1996.
- [2] 孙洪发,胡伯林,丁经业,等. 花锚的三种新口山酮甙[J]. 植物学报,1987,29(4):422.
- [3] 胡伯林,孙洪发,樊淑芬,等. 花锚的口山酮成分——I[M]. 北京:科学出版社:高原生物学集刊,1984,2:121.
- [4] 孙洪发,樊淑芬,丁经业,等. 青海产六种“藏茵陈”生药中齐墩果酸含量测定[M]. 北京:科学出版社:高原生物学集刊,1987,6:243.
- [5] 邢俊波,李萍,刘云. 不同产地、不同物候期金银花中绿原酸的动态变化研究[J]. 中国药理学杂志,2003,38(1):19.

(收稿日期:2003-06-20)

中国药理学杂志2004年9月第39卷第9期