

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.05.028

UPLC 测定纤毛婆婆纳主要环烯醚萜成分的含量

罗朝梅, 卢秋霞, 贺丽波, 张士彦, 孙意冉, 唐琳

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 建立超高效液相色谱法(UPLC)同时测定纤毛婆婆纳中梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和6-O-藜芦酰梓苷4种主要环烯醚萜类成分含量。采用 Waters ACOUITY T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);柱温为 40 °C;流动相为乙腈-水(0.1%甲酸+2.5 mmol 甲酸铵);流速为 0.4 mL/min;检测波长为 260 nm。结果表明梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和6-O-藜芦酰梓苷4种主要环烯醚萜类成分含量。结果表明梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和6-O-藜芦酰梓苷分别在 1.562 ~ 50 μg/mL ($R^2 = 0.9987$)、1.562 ~ 50 μg/mL ($R^2 = 0.9989$)、4.689 ~ 143 μg/mL ($R^2 = 0.9996$)、1.562 ~ 50 μg/mL ($R^2 = 0.9998$) 范围内呈现良好的线性关系, 平均回收率分别为 100.21% (RSD=1.3%)、99.43% (RSD=1.8%)、100.6% (RSD=2.5%)、102.7% (RSD=0.65%)。该方法简便、灵敏、经济、可靠, 可用于纤毛婆婆纳的质量控制和评价。

关键词: 超高效液相色谱; 纤毛婆婆纳; 环烯醚萜; 含量测定

中图分类号: Q946.889 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2019)05-0971-05

Study on the content determination of main iridoid glycosides in *Veronica ciliata* Fisch by UPLC

LUO Chao-Mei, LU Qiu-Xia, HE Li-Bo, ZHANG Shi-Yan, SUN Yi-Ran, TANG Lin

(Key Laboratory Bio-resources and Eco-environment of Ministry Education,

College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: A UPLC method has been developed in the current investigation for simultaneous determination of four main iridoid glycosides, which were verposide, catalposide, amphicoside and 6-O-veratroyl-catalposide in *Veronica ciliata* Fisch. The separation was performed at 40 °C on Waters ACOUITY T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); the mobile phase was acetonitrile-water(0.1% formic acid+2.5 mmol ammoniumformate); the flow rate was 0.4 mL/min and the detection wavelength was 260 nm. The results showed that the calibration curves were the good linear relationships in the range of 1.562 ~ 50 μg/mL ($R^2 = 0.9987$) for verposide, 1.562 ~ 50 μg/mL ($R^2 = 0.9989$) for catalposide, 4.689 ~ 143 μg/mL ($R^2 = 0.9996$) for amphicoside, 1.562 ~ 50 μg/mL ($R^2 = 0.9998$) for 6-O-veratroylcatalposide, the average recovery rate were 100.21% (RSD=1.3%), 99.43% (RSD=1.8%), 100.6% (RSD=2.5%), 102.7% (RSD=0.65%), respectively. The method is simple, sensitive, economical and reliable, and can be used for quality control and evaluation of *Veronica ciliata* Fisch.

Keywords: UPLC; *Veronica ciliata* Fisch.; The iridoid glycosides; Content determination

收稿日期: 2018-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(第 31570351 号)

作者简介: 罗朝梅(1993—), 女, 布依族, 贵州罗甸人, 硕士生, 主要研究领域为天然产物. E-mail: 352167736@qq.com

通讯作者: 唐琳. E-mail: tanglin@scu.edu.cn

1 引言

纤毛婆婆纳(*Veronica ciliata* Fisch.)，别名“帕夏嘎”，一年生草本植物，系玄参科婆婆纳属，主要分布于中亚、西伯利亚以及我国西藏、内蒙古、四川省甘孜和阿坝藏族自治州等地区。其作为一种传统的珍贵藏药材，已经有一百多年历史^[1]，常用于清热解毒、祛风利湿、保肝利胆、治疗肝炎^[2]。近年来研究发现纤毛婆婆纳不仅能有效地保护由四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠急性肝损伤^[3]，也能有效地保护由叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的大鼠正常肝细胞(BRL-3A 细胞)氧化应激损伤^[4]。此外，在很多治疗肝胆疾病的藏药成方制剂中均存在“帕夏嘎”药材。综上所述，纤毛婆婆纳具有一定肝脏疾病治疗作用。

纤毛婆婆纳的主要成分是环烯醚萜苷类：高坤等人采用柱层析从纤毛婆婆纳中分离得到 8 种化合物，其中 5 种都为环烯醚萜苷类成分(梓苷、梓醇等)^[5]；之后尹利等人利用多种现代色谱技术从纤毛婆婆纳中分离得到 21 种化合物，其中 15 种化合物都为环烯醚萜苷类成分(梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和 6-O-藜芦酰梓苷等)^[6-9]。本课题组最新研究表明纤毛婆婆纳中 4 种主要环烯醚萜苷为梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和 6-O-藜芦酰梓苷(未发表)。现代药理学研究证明：梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和 6-O-藜芦酰梓苷等环烯醚萜苷类成分具有保肝、抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性^[8-19]，可能是纤毛婆婆纳发挥其生物活性的物质基础。

另外，此藏药材成分组成复杂，不同地区文化差异，使药材使用不统一不规范，其真伪性，安全性和有效性无法得到有效保证，因此有必要建立高效的分析方法对其中主要化合物的含量进行测定^[20-21]。目前已有研究报道利用 UPLC 测定纤毛婆婆纳中梓苷和梓醇的含量^[9]；但同时测定其 4 种主要成分(梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和 6-O-藜芦酰梓苷)的研究尚未见报道。UPLC 是一种新的液相色谱技术，其优势在于其色谱柱(填料中加入耐高压、耐酸碱的 BEH、T3 等杂化材料)粒径(小于 2 μm)更小，这不仅提高了柱效，使化合物峰高变高，峰宽变窄，分离灵敏度得到显著提升，而且能同时快速有效地分析多种不同类型成分，所需样品浓度低，操作简便^[22]。因此，本研究拟建立 UPLC 分析方法，对其 4 种主要成分进行同时定量，为其品种鉴定，资源利用和质量控制提供实验

依据。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 植物材料 纤毛婆婆纳干燥全草购买于西藏藏药厂，经四川大学生命科学学院白洁副教授鉴定为纤毛婆婆纳。

2.1.2 试剂与仪器 乙腈、甲醇为色谱纯，购买于 swell 科学仪器有限公司；其他试剂均为分析纯，购买于成都科伦试剂厂。

Mettler-Toledo 分析天平购买于瑞士 Metter 公司；RM-220 纯水仪购买于成都威斯达智能公司；KH-300DB 型数控超声清洗器购买于昆山合创超声仪器公司；旋转蒸发仪 RE-52AA 购买于上海亚荣生化仪器厂；5418 型离心机购买于德国 Eppendorf 公司；超高效液相色谱仪(UPLC)、配备二极管阵列检测器(PDA)购买于美国 Waters 公司。

2.2 方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取梓醇对照品 1.04 mg、梓苷对照品 1.04 mg、胡黄连苷Ⅱ对照品 1 mg 和 6-O-藜芦酰梓苷 1 mg，取适量色谱甲醇定容后，等体积吸取各对照品溶液，充分混合，得到梓醇为 50 μg/mL、梓苷为 50 μg/mL、胡黄连苷Ⅱ为 143 μg/mL 和 6-O-藜芦酰梓苷为 50 μg/mL 的混合对照品储备液，离心，备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取纤毛婆婆纳粉末 100 mg，与 95% 乙醇 500 mL(固液比 1:5)室温浸提 24 h，过滤，此过程重复 3 次，过滤液集中合并，于旋转蒸发仪中浓缩干燥至浸膏状后，溶解于水中，依次用石油醚(10 次)，乙酸乙酯(10 次)，正丁醇(10 次)(体积比 1:1)萃取，最后正丁醇萃取液减压干燥浓缩，得到纤毛婆婆纳正丁醇萃取相，取适量正丁醇萃取相用 10 mL 色谱甲醇定容，充分混匀，离心，0.22 μm 微孔滤膜过滤后，备用。

2.2.3 UPLC 色谱条件 色谱柱：Waters ACQUITY T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)；流动相为乙腈-水(0.1% 甲酸+2.5 mmol 甲酸铵)；流速为 0.4 mL/min；梯度洗脱条件采用卢秋霞色谱条件^[9]：10%~22% 乙腈(0~0.8 min), 22%~32% 乙腈(0.8~2.6 min), 32%~40% 乙腈(2.6~3 min), 40%~95% 乙腈(3~5 min), 95% 乙腈(5~5.01 min), 95% 乙腈(5.01~8 min)，样品室温为 25 °C；柱温为 40 °C；检测波长为

260 nm; 进样量为 1 μL .

3 结果与分析

3.1 线性关系考察

取 2.2.1 项方法条件下的对照品混合储备液, 分别稀释 1、2、3、4 倍。将不同稀释倍数的对照品混

合液分别注入超高效液相色谱仪, 测定各成分峰面积。将各对照品的各成分峰面积(Y)和对照品浓度(X)制作标准曲线, 进行线性回归, 计算线性范围, 并测定各成分的检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)。见表 1。

表 1 纤毛婆婆纳中 4 种环烯醚萜苷指标成分线性关系考察结果

Tab. 1 Linearities of the calibration curves of four iridoid glycosides in *Veronica ciliata* Fisch

成分	回归方程	R^2	线性范围 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOD($S/N = 3$) /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ($S/N = 10$) /($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Verposide	$Y=2683X+692.1$	0.9998	1.562~50	0.26	0.87
梓苷	$Y=4496X+2489$	0.9989	1.562~50	0.24	0.80
胡黄连苷Ⅱ	$Y=2877X+2704$	0.9996	4.689~143	0.78	1.04
6-O-藜芦酰梓苷	$Y=3790X+1396$	0.9987	1.562~50	0.23	0.74

表 2 回收率实验结果

Tab. 2 Results of recovery test

成分	本底量 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标量 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得值 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%	成分	本底量 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标量 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得值 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%	
	15.38	22	18.75	100.5				4.85	7.5	5.86	98.6			
	11.36	22	16.78	101.3				3.93	7.5	6.08	101.3			
	13.09	22	17.45	99.5				4.21	7.5	6	104			
	15.38	14.67	15.04	99.7				4.85	5	4.68	97.9			
梓醇	11.36	14.67	12.85	102.1	100.21	1.3	胡黄连苷Ⅱ	3.93	5	4.55	104	100.6	2.5	
	13.09	14.67	13.89	98.6				4.21	5	4.63	101.2			
	15.38	7.33	11.28	98.5				4.85	2.5	3.37	97.3			
	11.36	7.33	9.23	101.4				3.93	2.5	2.35	100.3			
	13.09	7.33	10.21	100.3				4.21	2.5	3.36	100.8			
	17.72	23.75	20.89	100.3				1.71	4.25	2.92	103.7			
	14.99	23.75	18.99	96.3				2.24	4.25	3.26	102.9			
	15.82	23.75	19.65	98.3				2.51	4.25	3.47	103.3			
	17.72	15.83	16.71	98.1				1.71	2.83	2.23	103.4			
梓苷	14.99	15.83	15.56	101.9	99.43	1.8	6-O-藜芦酰梓苷	2.24	2.83	2.55	103.6	102.7	0.65	
	15.82	15.83	15.68	98.7				2.51	2.83	2.68	102.1			
	17.72	7.92	12.98	101.2				1.71	1.42	1.51	101.5			
	14.99	7.92	11.43	98.8				2.24	1.42	1.82	102.9			
	15.82	7.92	11.97	101.3				2.51	1.42	1.95	101.4			

3.2 精密度实验

取 2.2.3 方法条件下的同一份对照品混合液注入超高效液相色谱仪, 重复测定 6 次, 计算各成分峰面积。结果表明: 梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和 6-O-藜芦酰梓苷的峰面积 RSD 分别为 0.39%、0.37%、0.17% 和 0.29% ($N=6$)。说明仪器的精密度良好。

度良好。

3.3 重复性实验

精密称取同一批次的纤毛婆婆纳样品 6 份, 进行超高效液相色谱分析。结果表明: 梓醇、梓苷、胡黄连苷Ⅱ和 6-O-藜芦酰梓苷的峰面积 RSD 分别为: 0.19%、0.27%、0.28%、0.31% ($N=6$)。说明方法重复

性良好。

3.4 稳定性实验

精密吸取 1 μL 室温放置的同一份供试品溶液于 0、6、12、24 h 依次进样分析, 计算各成分峰面积。结果表明: 梓醇、梓苷、胡黄连苷 II 和 6-O-藜芦酰梓苷的峰面积 RSD 分别为 1.11%、1.04%、1.50%、1.14% ($N=4$)。说明 24 h 内测定的供试品稳定性好。

3.5 加样回收实验

精密吸取同一体积和浓度的供试品溶液, 共 9 份, 分别测定梓醇、梓苷、胡黄连苷 II 和 6-O-藜芦酰梓苷 4 种环烯醚萜类成分的峰面积, 计算各成分峰面积积分值, 然后设置 50%、100%、150% 低中高混合对照品目标浓度, 每一浓度取 3 份, 等体积加入对应的供试品溶液, 混匀, 注入超高效液相色谱仪, 测定各成分峰面积。结果见表 2, 梓醇、梓苷、胡黄连苷 II 和 6-O-藜芦酰梓苷 4 种指标成分回收率在 99.43%~102.7% 范围之内, RSD 分别为 1.3%、1.8%、2.5%、0.65% ($N=9$)。结果说明方法具有良好的准确性。

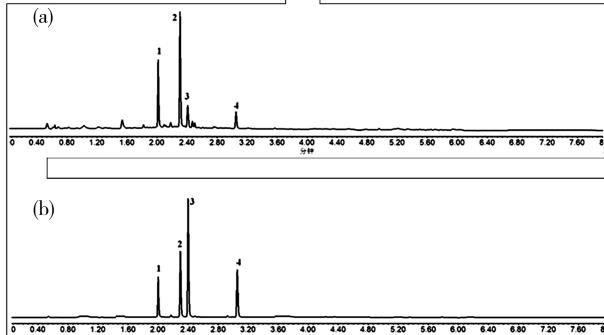


图 1 UPLC 色谱图

(a) 供试品; (b) 混合对照品: 1 梓醇, 2 梓苷, 3 胡黄连苷 II, 4 6-O-藜芦酰梓苷

Fig. 1 UPLC chromatograms

(a) The sample; (b) standard mixture: 1 verposide, 2 catalposide, 3 amphicoside, 4 6-O-veratroylcatalposide

表 3 样品含量测定结果 (g/g, $n=3$)

Tab. 3 Determination result of content of samples

化合物	样品 1/%	样品 2/%	样品 3/%
梓醇	52.18(26.09)	53.1(26.55)	51.98(25.99)
梓苷	90.38(45.19)	92.76(46.38)	90.54(45.27)
胡黄连苷 II	22.04(11.02)	23.44(11.72)	22.72(11.36)
6-O-藜芦酰梓苷	15.08(7.54)	15.54(7.77)	15.114(7.57)

3.6 样品含量的测定

取同一批纤毛婆婆纳样品 3 份, 在 2.2.2 项方法条件下制备供试品溶液, 2.2.3 项色谱条件

下测定各成分峰面积, 并计算含量, 结果见表 3。供试品和混合对照品 UPLC 色谱图如图 1。

4 讨 论

纤毛婆婆纳中的环烯醚萜类成分是其发挥药效作用的物质基础, 通过正丁醇萃取富集得到的 4 种主要环烯醚萜类成分(梓醇、梓苷、胡黄连苷 II 和 6-O-藜芦酰梓苷)都具有较强的药理活性^[10-19]。因此, 以纤毛婆婆纳中的 4 种主要环烯醚萜类成分作为其质量控制指标。

参考尹利提取方法^[6], 提取溶剂为 95% 乙醇: 试验将 95% 乙醇室温浸提和水加热回流提取进行比较, 结果显示 95% 乙醇提取物的抗氧化活性优于水加热回流提取物, 这主要是因为 95% 乙醇能较有效地提取纤毛婆婆纳中的环烯醚萜类成分。

参考前期药材色谱检测方法以及卢秋霞色谱条件^[9], 对甲醇-水、乙腈-水等流动相系统以及流动相梯度, 检验波长, 进样量, 流速进行考察, 结果显示在流动相为乙腈-水 (0.1% 甲酸 + 2.5 mmol 甲酸铵), 进样量为 1 μL , 流速为 0.4 mL/min 条件下, 纤毛婆婆纳 4 种主要环烯醚萜类成分相对应的色谱峰分离效果最好, 检测时间最短, 在 8 min 内已达到良好的基线分离^[23-24]。

传统的化合物含量测定方法(高效液相色谱 (HPLC) 和紫外分光光度法)存在一些弊端: HPLC 法灵敏度低, 分析时间长; 紫外分光光度法不能同时测定多种成分含量, 操作繁琐。而本研究采用的 UPLC 分离灵敏度强, 分析时间短, 检测成本低, 操作简便; 方法简单快捷, 线性关系良好, 精密度高, 稳定性好, 重复性好, 且加样回收率符合规定, 有利于中药材复杂成分的含量测定。可用于纤毛婆婆纳主要环烯醚萜成分的质量控制, 为纤毛婆婆纳的研究开发奠定基础。

参考文献:

- [1] 西藏自治区革命委员会卫生局. 西藏常用中草药 [M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 1971.
- [2] 候宽昭. 中国种子植物科属词典 [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [3] Yin L, Wei L, Fu R, et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Veronica ciliata* Fisch. extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. Molecules, 2014, 19: 7223.
- [4] Sun Y, Lu Q, He L, et al. Active Fragment of *Veronica ciliata* Fisch. Attenuates t-BHP-Induced oxi-

- dative stress injury in HepG2 cells through antioxidant and antiapoptosis activities [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4727151.
- [5] 高坤, 李旭琴, 刘安. 西北高寒植物长果婆婆纳化学成分研究[J]. *西北植物学报*, 2003, 23: 633.
- [6] 尹利. 传统藏药纤毛婆婆纳生物有效成分与生物活性研究[D]. 成都: 四川大学, 2014.
- [7] Li Y, Lu Q, Tan S, et al. Bioactivity-guided isolation of antioxidant and anti-hepatocarcinoma constituents from *Veronica ciliata* [J]. *Chem Cent J*, 2016, 10: 27.
- [8] Tan S, Lu Q, Shu Y, et al. Iridoid glycosides fraction isolated from *Veronica ciliata* Fisch. protects against acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2017, 2017: 6106572.
- [9] Lu Q, Sun Y, Shu Y, et al. HSCCC separation of the two iridoid glycosides and three phenolic compounds from *Veronica ciliata* and their in vitro antioxidant and anti-hepatocarcinoma activities [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1234.
- [10] Lee S U, Sung M H, Ryu H W, et al. Verposide inhibits TNF- α -induced MUC5AC expression through suppression of the TNF- α /NF- κ B pathway in human airway epithelial cells [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 168.
- [11] 王奇志, 管福琴, 孙浩, 等. 梓苷的抗肿瘤活性研究[J]. *中成药*, 2012, 34: 2381.
- [12] 顾伟, 范昕建, 吴疆, 等. 胡黄连苷Ⅱ对H2O2损伤L-02细胞的保护作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16: 3274.
- [13] Le M Q, Kim M S, Song Y S, et al. 6-O-Veratroyl catalpol suppresses pro-inflammatory cytokines via regulation of extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B in human monocytic cells [J]. *Biochimie*, 2015, 119: 52.
- [14] Quan J, Piao L, Xu H, et al. Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2009, 73: 849.
- [15] Peng W, Qiu X Q, Shu Z H, et al. Hepatoprotective activity of total iridoid glycosides isolated from *Paederia scandens* (Lour.) Merr. var. *tomentosa* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 317.
- [16] Liu Y F, Liang D, Luo H, et al. Hepatoprotective iridoid glycosides from the roots of *Rehmannia glutinosa* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75: 1625.
- [17] Tundis R, Loizzo M R, Menichini F, et al. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2008, 8: 399.
- [18] 余鸽, 龙凤来, 黄时伟. 环烯醚萜药理作用研究进展[J]. *陕西林业科技*, 2009, 2: 69.
- [19] Kwak J H, Kim H J, Lee K H, et al. Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrina* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32: 207.
- [20] 罗思齐. 中草药活性成分含量测定概述[J]. *中草药*, 1989, 20: 19.
- [21] 罗国安, 王义明, 曹进, 等. 建立我国现代中药质量标准体系的研究[J]. *世界科学技术*, 2002, 4: 5.
- [22] Swartz M E. UPLCTM: an introduction and review [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2005, 28: 1253.
- [23] 高意, 周光明, 张彩虹, 等. HPLC 测定香椿中的有机酸和黄酮 7 种活性成分[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2017, 54: 1039.
- [24] 李数数, 王静, 侯静, 等. 藏红花侧芽中 L-瓜氨酸的提取与测定[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1297.

引用本文格式:

- 中 文: 罗朝梅, 卢秋霞, 贺丽波, 等. UPLC 测定纤毛婆婆纳主要环烯醚萜成分的含量[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 971.
- 英 文: Luo C M, Lu Q X, He L B, et al. Study on the content determination of main iridoid glycosides in *Veronica ciliata* Fisch by UPLC [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 971.