

# 柱前衍生 HPLC/FLD-APCI/MS 法同时测定藏药悬钩木中 6 种三萜酸类成分的含量<sup>Δ</sup>

马志良<sup>1,2\*</sup>, 赛桑杰<sup>1,2</sup>, 多杰<sup>1,2#</sup>(1.藏药新药开发国家重点实验室/青海省藏药新药开发重点实验室, 西宁 810016; 2.青海省藏医药研究院, 西宁 810016)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2243-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.16

**摘要** 目的:建立同时测定藏药悬钩木中山楂酸、科罗索酸、桦木酸、路路通酸、齐墩果酸、熊果酸等 6 种三萜酸类成分含量的方法。方法:采用柱前衍生高效液相色谱-荧光检测/质谱联用法。选择 2-(7H-二苯并[a,g]咔唑)乙基对甲苯磺酸酯为荧光衍生化试剂。色谱柱为 Hypersil C<sub>18</sub>, 流动相为 5% 乙腈水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 荧光激发波长为 300 nm, 发射波长为 395 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL; 采用大气压化学电离源、正离子模式, 喷雾压力为 60 psi, 干燥气流量为 9 L/min, 干燥气温度为 350 ℃, 气化温度为 450 ℃, 毛细管电压为 3 500 V。结果:山楂酸、科罗索酸、桦木酸、路路通酸、齐墩果酸、熊果酸检测质量浓度线性范围均为 0.025~6.4 μg/mL ( $r \geq 0.999 6$ ); 定量限分别为 5.11、4.78、4.42、4.22、4.29、4.51 ng/mL, 检测限分别为 1.42、1.27、1.30、1.28、1.16、1.22 ng/mL; 精密度的 RSD 均小于 5%, 稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2% (路路通酸未检出); 加样回收率分别为 97.90%~100.55% (RSD=1.00%,  $n=6$ )、97.95%~102.95% (RSD=1.74%,  $n=6$ )、96.00%~101.20% (RSD=2.00%,  $n=6$ )、93.25%~104.20% (RSD=4.25%,  $n=6$ )、92.20%~103.30% (RSD=3.58%,  $n=6$ )、97.80%~103.50% (RSD=2.03%,  $n=6$ )。结论:该方法准确、可靠, 专属性好, 可用于同时测定藏药悬钩木中 6 种三萜酸类成分的含量。

**关键词** 悬钩木; 三萜酸; 山楂酸; 科罗索酸; 桦木酸; 路路通酸; 齐墩果酸; 熊果酸; 柱前衍生化; 高效液相色谱-荧光检测/质谱联用; 含量测定

## Content Determination of 6 Kinds of Triterpene Acid in Tibetan Medicine *Rubus biflorus* by Pre-column Derivatization HPLC/FLD-APCI/MS

MA Zhiliang<sup>1, 2</sup>, SAI Sangjie<sup>1, 2</sup>, DUO Jie<sup>1, 2</sup> (1. State Key Laboratory of Tibetan Medicine Research and Development/Qinghai Province Key Laboratory of Tibetan Medicine Research and Development, Xining 810016, China; 2. Qinghai Tibetan Medicine Research Institute, Xining 810016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for content determination of 6 kinds of triterpene acids such as haw acid, corosolic acid, betula acid, betulonic acid, oleanolic acid and ursolic acid in Tibetan medicine *Rubus biflorus*. METHODS: Pre-column derivatization HPLC-FLD-APCI/MS method was adopted. 2-(7H-dibenzo[a, g]carbazol-7-yl) ethyl-4-methylbenzene-sulfonate was used as the pre-column derivatization reagent. Hypersil C<sub>18</sub> column was used with the mobile phase consisted of 5% acetonitrile water solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The excitation wavelength of fluorescence was 300 nm and the emission wavelength was 395 nm. The column temperature was 35 ℃, and sample size was 10 μL. Under atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) source in positive-ion mode, pressure was 60 psi, the drying gas flow rate was 9 L/min, the dry gas temperature was 350 ℃, the gasification temperature was 450 ℃, and the capillary voltage was 3 500 V. RESULTS: The linear range of haw acid, corosolic acid, betula acid, betulonic acid, oleanolic acid and ursolic acid were 0.025-6.4 μg/mL ( $r \geq 0.999 6$ ). The quantitative limits were 5.11, 4.78, 4.42, 4.22, 4.29, 4.51 ng/mL; and detection limits were 1.42, 1.27, 1.30, 1.28, 1.16, 1.22 ng/mL, respectively. RSD of precision test was less than 5%, stability and repeatability tests were all less than 2% (no betulonic acid detected). The recovery rates were 97.90%-100.55% (RSD=1.00%,  $n=6$ ), 97.95%-102.95% (RSD=1.74%,  $n=6$ ), 96.00%-101.20% (RSD=2.00%,  $n=6$ ), 93.25%-104.20% (RSD=4.25%,  $n=6$ ), 92.20%-103.30% (RSD=3.58%,  $n=6$ ), 97.80%-103.50% (RSD=2.03%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and exclusive, and can be used for simultaneous determination of 6 kinds of triterpene acids in Tibetan medicine *R. biflorus*.

<sup>Δ</sup> 基金项目:藏药新药开发国家重点实验室项目(No.2015DQ87-0717);青海省科技计划项目(No.2017-ZJ-Y15)

\* 助理研究员。研究方向:藏药质量标准研究。电话:0971-8271096。E-mail:mzl3205@126.com

# 通信作者:主任医师。研究方向:藏医药基础研究。电话:0971-8271096。E-mail:duojie0302@sina.com

**KEYWORDS** *Rubus biflorus*; Triterpene acid; Haw acid; Corosolic acid; Betula acid; Betulonic acid; Oleanolic acid; Ursolic acid; Pre-column derivation; HPLC-FLD-APCI/MS; Content determination

藏药悬钩木收载于《医学四续》<sup>[1]</sup>、《月王药诊》<sup>[2]</sup>和《晶珠本草》<sup>[3]</sup>等典籍中,为常用藏药之一,藏文译音为“干扎嘎日”,为蔷薇科悬钩子属植物粉枝莓(*Rubus biflorus* Buch.-Ham. ex Smith)的干燥、去皮茎或枝,分布于我国陕西、甘肃、四川、青海、西藏等地<sup>[4-5]</sup>。《晶珠本草》中记载:“悬钩木根苦,茎微甘苦,皮微辛,叶苦涩,果实甜如蜜,根、茎、叶、果治隆热病和痰病,尤其对肺病特效,也治热性时疫,叶子可清胆病”<sup>[3]</sup>。有研究发现,悬钩木中含有多种生物活性成分,如黄酮类、二萜类、三萜及三萜酸类、鞣质类等成分<sup>[6-8]</sup>,具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗过敏及保肝等作用<sup>[9-10]</sup>。三萜酸类成分为其特征成分,具有抗人类免疫缺陷病毒、抗肿瘤、降血脂、抗氧化和抗菌等作用<sup>[11-12]</sup>。然而,目前对于悬钩木的质量控制存在一定的局限性,如《藏药标准》中仅有其性状鉴别,未见有其他相关规定<sup>[13]</sup>;《青海省藏药标准》中也未设有含量测定项或理化鉴别项<sup>[14]</sup>。因悬钩木中的三萜酸类成分不具有荧光性,采用衍生化可以使三萜酸类成分与衍生化试剂的荧光团结合,以提高检测灵敏度,故为更好地控制悬钩木的质量,本研究参考相关文献<sup>[15]</sup>,采用柱前衍生高效液相色谱-荧光检测/质谱联用法(HPLC/FLD-APCI/MS)同时测定了藏药悬钩木中山楂酸、科罗素酸、桦木酸、路路通酸、齐墩果酸、熊果酸等6种三萜酸类成分的含量,旨在为完善其质量标准提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型离子阱液相色谱-质谱联用仪,包括G1311A型四元梯度泵、G1322A型在线真空脱气机、G1321A型荧光检测器、G1316A型自动进样器(美国Agilent公司);MS204TS型、MS403TS型电子分析天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

齐墩果酸对照品(批号:110709-201808,纯度:91.1%)、熊果酸对照品(批号:110742-201823,纯度:99.9%)、路路通酸对照品(批号:111735-201602,纯度:96.8%)均购自中国食品药品检定研究院;山楂酸对照品(批号:4373-41-5,纯度:>98%)、科罗素酸对照品(批号:4547-24-4,纯度:>98%)、桦木酸对照品(批号:472-15-1,纯度:>98%)均购自北京万佳首化生物科技有限公司;2-(7H-二苯并[a,g]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯(DBCETS,衍生化试剂,曲阜师范大学生命有机分析重点实验室自制);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

### 1.3 药材

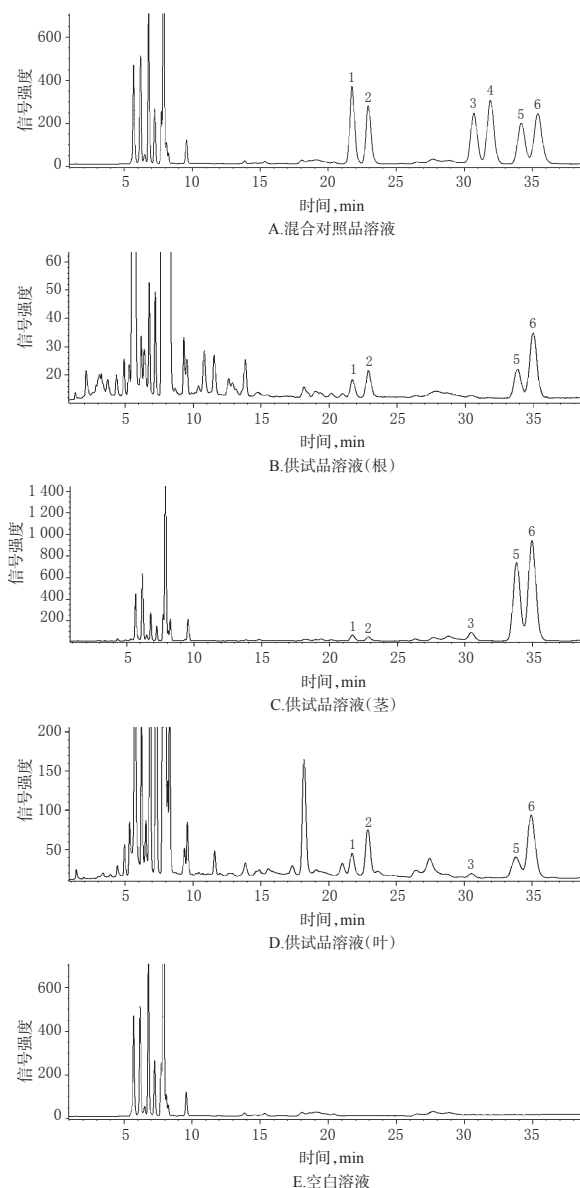
悬钩木药材采自青海、甘肃和西藏等地(批号:20170801、20170802、20170803、20170804、20170805、20170806),经青海省藏医药研究院多杰研究员鉴定为蔷薇科植物粉枝莓(*Rubus biflorus* Buch.-Ham. ex Smith)。

取药材将其根、茎、叶分离后晾干,分别粉碎后过40目筛,室温贮存,备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:5%乙腈水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~15 min, 60% B→75% B; 15~30 min, 75% B→90% B; 30~35 min, 90% B→100% B),洗脱时间40 min;流速:1.0 mL/min;荧光激发波长:300 nm,发射波长:395 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μL。在该色谱条件下,所有待测成分理论板数均不低于3 000,分离度均大于1.5,空白溶液对测定无干扰,详见图1。



注:1.山楂酸;2.科罗素酸;3.桦木酸;4.路路通酸;5.齐墩果酸;6.熊果酸

Note: 1. haw acid; 2. corosolic acid; 3. betula acid; 4. betulonic acid; 5. oleanolic acid; 6. ursolic acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.2 质谱条件 大气压化学电离源(APCI),正离子模式;喷雾压力:60 psi;干燥气流量:9 L/min;干燥气温度:350 ℃;气化温度:450 ℃;毛细管电压:3 500 V。在该质谱条件下,三萜酸类成分(以齐墩果酸为例)衍生物的一、二级质谱图及相关裂解模式见图2。

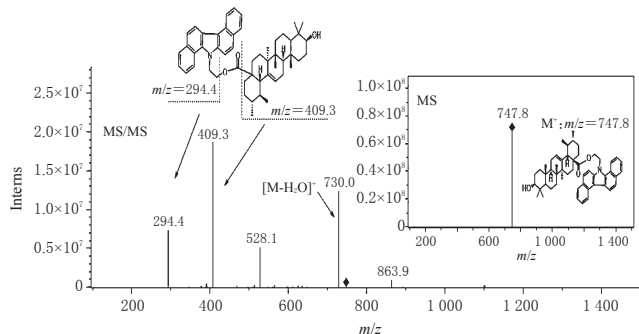


图2 齐墩果酸衍生物的MS/MS图谱及裂解模式

Fig 2 MS/MS spectrum and pyrolysis model of oleonolic acid derivative

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取山楂酸、科罗素酸、桦木酸、路路通酸、齐墩果酸、熊果酸对照品各适量,分别置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,制成质量浓度均为2.0 mg/mL的单一对照品贮备液。分别精密吸取上述单一对照品贮备液各1 mL,置于100 mL量瓶中,加乙腈定容,摇匀,制得质量浓度均为20 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品(茎)40 mg,置于10 mL玻璃试管中,加乙醇5 mL,水浴超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理30 min,以3 000 r/min离心5 min;取下层残渣,加乙醇2 mL,水浴超声;合并2次超声提取液,置于10 mL玻璃试管中,氮气流下吹干后,加乙腈1 mL复溶,即得供试品溶液。

2.2.3 空白溶液 以乙腈为空白溶液。

2.2.4 衍生化试剂 精密称取DBCETS 23.25 mg,置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,制得浓度为 $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L的DBCETS溶液,于4 ℃保存,备用。

## 2.3 衍生化处理

取“2.2.1”项下混合对照品溶液50 μL,置于2 mL安瓿瓶中,加入干燥催化剂( $K_2CO_3$ )30 mg、“2.2.4”项下衍生化试剂150 μL、二甲基甲酰胺100 μL,封口后于90 ℃水浴反应30 min;待反应结束后,加乙腈300 μL稀释,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.1”项下试验条件进行测定。DBCETS与三萜酸类成分(以桦木酸为例)的衍生反应见图3。

## 2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加乙腈稀释,制得质量浓度为0.025、0.1、0.4、1.6、6.4 μg/mL的系列线性关系工作溶液,按“2.3”项下方法进行衍生化处理,再

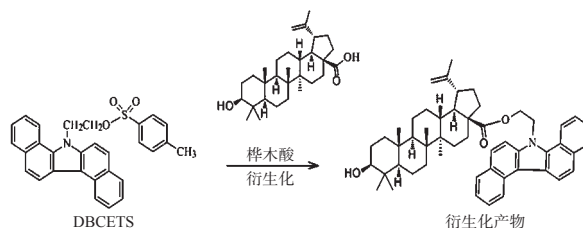


图3 DBCETS与桦木酸的衍生反应

Fig 3 Derivatization reaction of DBCETS with betulinic acid

按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度( $x$ , μg/mL)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	线性范围, μg/mL	$r$
山楂酸	$y=25.72x-0.49$	0.025~6.4	0.999 6
科罗素酸	$y=25.27x-13.49$	0.025~6.4	0.999 8
桦木酸	$y=34.52x-1.96$	0.025~6.4	0.999 8
路路通酸	$y=27.53x-4.95$	0.025~6.4	0.999 7
齐墩果酸	$y=26.36x-4.59$	0.025~6.4	0.999 9
熊果酸	$y=30.38x-0.89$	0.025~6.4	0.999 8

## 2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,用乙腈倍比稀释,按“2.3”项下方法进行衍生化处理,再按“2.1”项下试验条件进行测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,山楂酸、科罗素酸、桦木酸、路路通酸、齐墩果酸、熊果酸的定量限分别为5.11、4.78、4.42、4.22、4.29、4.51 ng/mL,检测限分别为1.42、1.27、1.30、1.28、1.16、1.22 ng/mL。

## 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.3”项下方法进行衍生化处理,再按“2.1”项下试验条件连续测定6次,记录峰面积。结果,山楂酸、科罗素酸、桦木酸、路路通酸、齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为2.55%、3.20%、2.72%、4.30%、2.10%、3.30% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(茎,批号:20170801)适量,按“2.3”项下方法进行衍生化处理,分别于室温下放置0、3、6、9、12 h时按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积。结果,山楂酸、科罗素酸、桦木酸、齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为1.48%、1.01%、1.43%、1.11%、1.72% ( $n=5$ ),路路通酸未检出,表明供试品溶液于室温下放置12 h内稳定性良好。

## 2.8 重复性试验

取药材样品(茎,批号:20170801)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法进行衍生化处理,再按“2.1”项下试验条件进行测定,记录峰面积并按外标法计算样品中6种成分的含量。结果,山

楂酸、科罗素酸、桦木酸、齐墩果酸、熊果酸的平均含量分别为106.9、112.0、236.4、2 513.5、2 572.6  $\mu\text{g/g}$ , RSD分别为1.65%、1.59%、1.53%、1.22%、1.43% ( $n=6$ ), 路路通酸未检出, 表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取药材样品(茎, 批号: 20170801)约0.04 g, 共6份, 分别加入一定量的混合对照品溶液适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下方法进行衍生化处理, 再按“2.1”项下试验条件进行测定, 记录峰面积并按外标法计算含量及加样回收率, 结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery tests( $n=6$ )

待测成分	取样量, g	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
山楂酸	0.038	3.998	2.0	5.983	99.25	99.28	1.00
	0.039	4.103	2.0	6.072	98.45		
	0.041	4.313	2.0	6.324	100.55		
	0.040	4.208	2.0	6.211	100.15		
	0.042	4.418	2.0	6.376	97.90		
科罗素酸	0.038	3.998	2.0	5.985	99.35	99.79	1.74
	0.038	4.184	2.0	6.167	99.15		
	0.039	4.294	2.0	6.268	98.70		
	0.041	4.514	2.0	6.520	100.30		
	0.040	4.404	2.0	6.398	99.70		
桦木酸	0.042	4.624	2.0	6.683	102.95	98.71	2.00
	0.038	4.184	2.0	6.143	97.95		
	0.038	8.900	2.0	10.820	96.00		
	0.039	9.134	2.0	11.139	100.25		
	0.041	9.602	2.0	11.586	99.20		
路路通酸	0.040	9.368	2.0	11.392	101.20	99.20	4.25
	0.042	9.836	2.0	11.811	98.75		
	0.038	8.900	2.0	10.837	96.85		
	0.038	0	2.0	1.936	96.80		
	0.039	0	2.0	1.985	99.25		
齐墩果酸	0.041	0	2.0	2.078	103.90	98.24	3.58
	0.040	0	2.0	1.865	93.25		
	0.042	0	2.0	2.084	104.20		
	0.038	0	2.0	1.956	97.80		
	0.038	95.483	2.0	97.435	97.60		
熊果酸	0.039	97.995	2.0	99.982	99.35	99.70	2.03
	0.041	103.021	2.0	104.983	98.10		
	0.040	100.508	2.0	102.352	92.20		
	0.042	105.533	2.0	107.599	103.30		
	0.038	95.483	2.0	97.461	98.90		

## 2.10 耐用性试验

取药材样品(茎, 批号: 20170801)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下方法进行衍生化处理, 再按“2.1”项下试验条件[分别改变不同色谱柱(Agilent Hypersil C<sub>18</sub>、Agilent Hypersil BDS C<sub>8</sub>、Agilent Hypersil BDS C<sub>18</sub>)、流速(0.9、1.0、1.1 mL/min)、柱温(30、35、

40  $^{\circ}\text{C}$ )等条件]进行测定, 记录峰面积并计算样品中各成分的含量。结果表明, 各成分含量的RSD均小于3%, 本方法可满足试验要求, 耐用性良好。

## 2.11 样品含量测定

取各批药材样品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下方法进行衍生化处理, 再按“2.1”项下试验条件进行测定, 记录峰面积并按外标法计算样品中6种成分的含量, 结果见表3。

表3 样品含量测定结果( $n=6, \mu\text{g/g}$ )

Tab 3 Results of content determination of samples ( $n=6, \mu\text{g/g}$ )

批号	部位	山楂酸	科罗素酸	桦木酸	路路通酸	齐墩果酸	熊果酸
20170801	根	11.3	23.1	未检出	未检出	40.9	66.3
	茎	105.2	110.0	234.2	未检出	2 512.7	2 574.7
	叶	46.2	129.5	11.9	未检出	100.3	226.7
20170802	根	9.3	26.5	未检出	未检出	34.2	60.7
	茎	112.8	101.5	203.4	未检出	2 420.7	2 378.6
	叶	35.1	138.3	5.2	未检出	102.3	253.1
20170803	根	13.2	35.1	未检出	未检出	55.4	80.7
	茎	132.7	111.2	261.8	未检出	2 106.3	2 369.4
	叶	46.1	130.1	11.8	未检出	101.7	325.7
20170804	根	12.4	20.8	未检出	未检出	37.3	52.8
	茎	142.3	130.4	262.7	未检出	2 732.5	2 598.3
	叶	52.2	128.8	14.1	未检出	98.7	212.6
20170805	根	18.2	35.6	未检出	未检出	54.2	80.9
	茎	104.6	109.5	231.7	未检出	2 548.3	2 231.3
	叶	68.5	112.9	50.8	未检出	145.3	226.3
20170806	根	22.3	36.1	未检出	未检出	45.3	70.2
	茎	106.3	111.2	236.5	未检出	1 943.2	2 365.6
	叶	66.3	148.1	11.7	未检出	100.5	256.7

## 3 讨论

有研究认为, 三萜酸类成分本身并无共轭体系, 因此采用紫外-分光光度法很难准确地测定其含量<sup>[15-16]</sup>。此外, 由于熊果酸与齐墩果酸、山楂酸与科罗素酸互为同分异构体, 采用液相、气相等色谱法很难将这两对同分异构体分离。而有研究发现, 采用柱前衍生荧光标记技术可增大同分异构体间的差异, 从而实现其在液相色谱上的分离<sup>[5]</sup>。为此, 本研究参考上述文献, 采用HPLC/FLD-APCI/MS法对悬钩木中6种三萜酸类成分进行测定, 结果表明, 该方法灵敏度高、选择性强。

本研究考察了不同色谱柱(Agilent Hypersil C<sub>18</sub>、Agilent Hypersil BDS C<sub>8</sub>、Agilent Hypersil BDS C<sub>18</sub>、Agilent Spherisorb C<sub>18</sub>)的分离效果, 结果显示, 以Agilent Hypersil C<sub>18</sub>为色谱柱时的分离度最好。同时, 对甲醇-水、乙腈-水等不同流动相体系进行了比较, 结果发现, 以甲醇为流动相时柱压较高、基线偏移较大, 而以5%乙腈水溶液-乙腈洗脱效果最好、基线平稳, 因此选择5%乙腈水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱。

含量测定结果显示, 悬钩木各部位中三萜酸类成分含量存在明显差异, 悬钩木茎中齐墩果酸和熊果酸含量较高, 分别为2 732.5、2 598.3  $\mu\text{g/g}$ , 其次为悬钩木叶, 而悬钩木根中含量最低; 悬钩木茎中的山楂酸、桦木酸和

# 女贞子提取物对破骨细胞分化及成骨细胞增殖的影响<sup>Δ</sup>

雷丽娟<sup>1,2,3\*</sup>, 杨晓琴<sup>1,2,3</sup>, 周英<sup>2,3,4</sup>, 王慧娟<sup>2,3</sup>, 陈丽珍<sup>2,3</sup>, 俸婷婷<sup>2,3,4#</sup> (1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省药食同源植物资源开发工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵州省药食两用资源应用开发工程实验室, 贵阳 550025; 4. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2247-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.17

**摘要** 目的: 探讨女贞子提取物对破骨细胞分化及成骨细胞增殖的影响。方法: 以 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 $D_3$ 诱导原代骨髓细胞获取破骨细胞, 经女贞子醇提物和水煎物低、中、高剂量(均为2、20、200 mg/L)处理后, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性测定法检测各组细胞裂解液中TRACP活性及细胞中TRACP阳性细胞数, 采用甲苯胺蓝染色法检测各组细胞骨吸收陷窝数量及骨陷窝面积百分率。以 $L$ -抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松诱导小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆14细胞获取成骨细胞, 采用MTT法检测各组细胞的相对增殖率, 采用碱性磷酸酶(APK)活性测定法检测各组细胞中APK活性。结果: 经不同剂量女贞子提取物处理后, TRACP阳性细胞数、骨吸收陷窝数量及其面积均有不同程度的改变, 其中女贞子醇提物各剂量组和水煎物高剂量组TRACP活性及阳性细胞数、骨吸收陷窝数量及面积百分率, 以及女贞子水煎物中剂量组TRACP活性及阳性细胞数、骨陷窝面积百分率均显著降低或减少, 而水煎物低剂量组细胞的骨吸收陷窝数量显著增多( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 女贞子提取物低、中剂量组细胞的相对增殖率以及提取物各剂量组细胞的APK活性均显著升高, 而女贞子提取物高剂量组细胞的相对增殖率均显著降低( $P < 0.01$ )。结论: 女贞子提取物可抑制破骨细胞的TRACP活性, 改变破骨细胞的骨吸收功能和成骨细胞的增殖行为, 并增加成骨细胞的APK活性。

**关键词** 女贞子; 醇提物; 水煎物; 破骨细胞; 成骨细胞; 骨吸收; 分化; 增殖

科罗素酸含量相对较高, 在101.5~262.7  $\mu\text{g/g}$ 之间。而路路通酸在悬钩木各部位中均未检出。这可能与所采集悬钩木药材的生长环境等因素有关<sup>[8]</sup>。

综上所述, 本研究方法准确、可靠, 专属性好, 可用于同时测定藏药悬钩木中6种三萜酸类成分的含量。

## 参考文献

[1] 宇妥·元丹衮波. 医学四续[M]. 马世林, 毛继祖, 罗尚达, 等, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 40.  
[2] 摩衍衍那. 月王药诊[M]. 毛继祖, 马世林, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 116.  
[3] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 毛继祖, 罗尚达, 王振华, 等, 编译. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 135.  
[4] 马志良, 多杰. 藏药悬钩木的质量标准研究[J]. 中国药房, 2018, 29(2): 179-182.  
[5] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 38.  
[6] 孟祥娟, 刘斌, 折改梅, 等. 悬钩子属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 767-775.  
[7] 甘露, 蒋凤池. 粗叶悬钩子化学成分的分离鉴定[J]. 北京

医科大学学报, 2000, 32(3): 226-228.

[8] 李维林, 贺善安, 顾姻. 中国悬钩子属植物的利用价值概述[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(3): 237-243.  
[9] 傅正生, 杨爱梅, 梁卫东, 等. 悬钩子属植物化学成分及生物活性研究新进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 86-91.  
[10] 孙长清, 邵小明, 王黎明, 等. 悬钩子属植物的开发利用概述[J]. 广西植物, 2004, 24(6): 578-582.  
[11] BAGLIN I, MITAINE-OFFER AC, NOUR M, et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3(6): 525-539.  
[12] ALLOUCHE Y, BELTRÁN G, GAFORIO JJ, et al. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclitriterpenic diacids and acids[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(10): 2885-2890.  
[13] 青海省卫生局, 西藏自治区卫生局, 四川省卫生局, 等. 藏药标准[S]. 西宁: 青海人民出版社, 1978: 93-94.  
[14] 青海省卫生厅. 青海省藏药标准[S]. 1992-06-30.  
[15] 张世娟. 基于新型荧光标记技术的羌活主要化学成分研究[D]. 西宁: 中国科学院西北高原生物研究所, 2014.  
[16] 蔡雪萍, 李振华, 华俊磊, 等. 一测多评法测定枇杷叶有效部位中三萜酸成分的含量[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3057-3062.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 贵州省科技计划课题(No. 黔科合G字[2015]4001号); 贵州省高层次创新型人才培养项目(No. 黔科合人才[2015]4032号)

\* 硕士研究生。研究方向: 天然药物、生化药学。E-mail: 18892308020@163.com

# 通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药与民族药药理、毒理学。E-mail: ftt0809@163.com

(收稿日期: 2019-03-19 修回日期: 2019-06-28)

(编辑: 陈宏)