

高效液相色谱法测定柳兰 7 种化学成分含量变化规律研究*

张郝男^{1,2,3} 班玛杨措^{1,2,3} 刘玉仙^{1,2,3} 贺奇峰^{1,2,3} 林鹏程^{1,2,3}

(1. 青海民族大学药学院, 青海 西宁 810007; 2. 青海省青藏高原植物化学重点实验室, 青海 西宁 810007; 3. 国家民委青藏高原藏药资源保护与开发重点实验室, 青海 西宁 810007)

【摘要】 目的 采用高效液相色谱建立一种高效、快速、有效的方法可同时测定柳兰地上部位中 7 种抗肿瘤成分(月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷)含量的方法,并检测 7 种成分抗肿瘤活性。方法 采用 Cdc25A/B/C 磷酸蛋白酶试剂盒、PD-1、PD-L1 试剂盒进行柳兰中抗肿瘤活性成分检测,采用 Waters C₁₈ 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.3% 乙酸水为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 300 nm,柱温为 30 ℃。在 27 min 内,柳兰中 7 种成分完全分离,样品含量 X 与其对应峰面积 Y 呈现良好的线性关系($R^2=0.9991\sim0.9997$)。结果 应用该方法对不同采收时期(6~11 月)的柳兰中的 7 种成分进行了测定,测定结果表明,7 种成分总含量的综合评价指标 9 月柳兰叶中最高,7 月花次之,11 月茎中含量最低。结论 本研究建立的柳兰多成分 HPLC 测定方法适合用于柳兰多成分的定量分析和柳兰药材质量控制。以含量为指标,对青海省西宁市大通回族土族自治县地区 6~11 月的柳兰中 7 种成分含量动态累积情况进行分析研究,发现不同月份的柳兰中所含有的抗肿瘤成分有着显著的差异性,可为柳兰人工栽培确立最佳采收时期提供参考。

【关键词】 柳兰;不同月份;高效液相色谱;多成分含量测定

【中图分类号】 R284.1 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2026.01.008

Determination of 7 kinds of chemical constituents in *Epilobium angustifolium* L. by high performance liquid chromatography

ZHANG Haonan^{1,2,3}, BANMA Yangcuo^{1,2,3}, LIU Yuxian^{1,2,3}, HE Qifeng^{1,2,3}, LIN Pengcheng^{1,2,3}

(1. College of Pharmacy, Qinghai Minzu University, Xining 810007, China;

2. Qinghai Key Laboratory of Phytochemistry on Qinghai-Tibet Plateau, Xining 810007, China;

3. State Ethnic Affairs Commission Key Laboratory of Tibetan Medicine Resources Protection and Development on Qinghai-Tibet Plateau, Xining 810007, China)

【Abstract】 **Objective** To establish an efficient, rapid and effective method for the simultaneous determination of seven antitumor components (evening primrose B, ferulic acid, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, populin, protocatechuic acid, and chrysin) in the aboveground parts of *Epilobium angustifolium* L. by high performance liquid chromatography. The anti-tumor activities of the seven components were detected. **Methods** Cdc25A/B/C phosphoprotease kit, PD-1, PD-L1 kit were used for the determination of the antitumor active components in *Epilobium angustifolium* L. The separation was carried out on a Waters C₁₈ column (250×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.3% acetic acid in water as the mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength of 300 nm, and the column temperature was 30 ℃. Within 27 min, the seven components in *Epilobium angustifolium* L. were completely separated, and the sample content X and its corresponding peak area Y showed good linear relationship ($R^2=0.9991\sim0.9997$). **Results** The method was applied to determine the seven components in willow orchids from different harvesting periods (June-November), and the results showed that the comprehensive evaluation indexes of the total contents of the seven components were highest in the leaves of *Epilobium angustifolium* L. in September, followed by the flowers in July, and the lowest contents in the stems in November. **Conclusion** The HPLC method established in this study is suitable for

基金项目:青海省科技计划项目(2024-NK-P09)

通信作者:林鹏程,博士研究生导师,E-mail: qhlp@126.com

引用本文:张郝男,班玛杨措,刘玉仙,等.高效液相色谱法测定柳兰 7 种化学成分含量变化规律研究[J].西部医学,2026,38(1):45-52. DOI:10.

3969/j.issn.1672-3511.2026.01.008

the quantitative analysis and quality control of *Epilobium angustifolium* L. The dynamic accumulation of 7 components in Willows orchid from June to November in Datong Hui Tu Autonomous County, Xining City, Qinghai Province was studied. It was found that there were significant differences of anti-tumor components in different months of *Epilobium angustifolium* L, which can provide a reference for determining the best harvest time of *Epilobium angustifolium* L artificial cultivation.

【Key words】 *Epilobium angustifolium* L.; In different months; High performance liquid chromatography; Determination of multicomponent content

柳兰藏语中称为恰班曲孜,为柳叶菜科,柳叶菜属植物,其茎、叶、花为主要药用部位,为常见的民族药材之一^[1-5]。其主要分布于我国青海、西藏、云南、四川、新疆、甘肃、陕西等地,其中在青海省主要产于玉树、班玛、泽库、河南、同德、大通、湟中、平安、乐都、民和、互助、祁连等海拔 2 150~3 800 米林下、林缘、山沟、河滩处^[6-7]。Bray 等^[8]根据国际癌症研究机构的最新报道,2022 年有近 2 000 万新的癌症病例和近 1 000 万癌症死亡。基于人口统计学预测,到 2050 年癌症新病例数量将达到 3 500 万,比 2022 年水平增加 77%。这说明寻找有效的抗癌药物依然是研究热点,而柳兰主要具有抗癌、抗氧化等特性^[9]。目前,国内外学者已从柳兰中发现黄酮及其苷类、酚酸及其衍生物、鞣质类等化合物^[10-11]。其中抗肿瘤活性以黄酮酚酸类和鞣质类为主,例如柳兰中月见草素 B 是一种大环二聚体鞣花单宁,其具有良好的抗肿瘤、抗炎等作用^[12-14]。绿原酸为酚酸类化合物,可以通过阻滞细胞生长周期、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡等作用机制来阻止肿瘤的发生发展^[15]。阿魏酸通过抑制增殖和诱导细胞凋亡来达到抗肿瘤作用^[16]。杨梅素可以抑制肿瘤细胞的生长速度从而达到抗癌作用^[17]。金丝桃苷可以作用于胰腺癌细胞降低体内肿瘤细胞的迁移和增殖来达到抗肿瘤作用^[18]。目前对柳兰的研究主要集中在其化学成分分离及其药理活性等方面,但针对其抗肿瘤活性成分的含量研究甚少。包婷雯等^[19]通过实验发现柳兰、防风、荆芥等 11 种藏药材对 CDC25A 和 CDC25B 磷酸酶有明显的抑制效果。本研究在此基础上,通过 Cdc25A 磷酸蛋白酶、Cdc25B 磷酸蛋白酶进行验证,同时采用 PD-1、PD-L1 试剂盒检测柳兰中抗肿瘤活性。肿瘤免疫治疗,即通过重新启动并维持肿瘤-免疫循环,恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应,从而控制与清除肿瘤的一种治疗方法。包括单克隆抗体类免疫检查点抑制剂、治疗性抗体、癌症疫苗、细胞治疗和小分子抑制剂等。其关键途径是靶向免疫负调控,将治疗的抗体从靶向肿瘤转向靶向免疫负调控的检查点^[20-23]。近年来,肿瘤的免疫治疗发展迅速,研究出了许多新的靶点,其中研究最为深入的仍当属 PD-1、PD-L1。课题组在前期研究

中发现,柳兰的水溶性部位具有很好的抗 PD-1、PD-L1 及 CDC25A、CDC25B 磷酸酶的作用,因此,本研究在筛选肿瘤免疫治疗靶点时,将 PD-1、PD-L1 酶及 CDC25A、CDC25B 磷酸酶作为重要的研究对象进行了活性测试。尽管柳兰中以月见草素 B、阿魏酸、绿原酸等为代表的鞣质类、酚酸类化合物有良好的抗肿瘤活性,但目前对它们在柳兰中的实际分布或它们的个体间差异性知之甚少。本研究建立合适的高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)同时测定 6~11 月柳兰中 7 个抗肿瘤成分(月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷)的含量^[24-25]。对青海省西宁市大通回族土族自治县地区柳兰中 7 种成分含量变化进行分析研究,为柳兰抗肿瘤成分研究和人工栽培最佳采收期的确定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Shimadzu LC-20A;日本岛津公司);二级管阵列检测器(SPD-M20A;日本岛津公司);SHE-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);DLK-2007 型快速低温冷却循环机(宁波新芝生物科技股份有限公司);UPH-IV-10T 型优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司);KQ-50DA 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);超声清洗器(KQ 800E;昆山市洁力美超声仪器有限公司);全自动多功能酶标仪(POLAR star Omega;德国 BMG Labtech 公司);流式细胞仪(POLAR star Omega;德国 BMG Labtech 公司);万分之一分析天平(ME201/02;梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.2 材料 6~11 月份柳兰样品均采自青海省西宁市大通回族土族自治县(北纬 N 36°58'9",东经 E 101°49'56"),每月 15 号进行样品采集。经青海民族大学林鹏程教授鉴定为柳叶菜科(*Onagraceae*)柳叶菜属(*Epilobium*)植物柳兰(*Epilobium angustifolium* L.),阴干备用。

1.3 试药与试剂 乙腈为(色谱纯,山东禹王和天下新材料有限公司);水为超纯水;月见草素 B(批号 wkq 19012825);新绿原酸(批号 wkq19021413)、杨梅素(批号 wkq19040306)均购自四川维克奇生物科技有

限公司;原儿茶酸(批号 W10D10B104178)、绿原酸(批号: A22GB158496)、阿魏酸(批号 G13S11L124423)均购自上海源叶生物有限公司;金丝桃苷(批号: 18100910,成都曼斯特生物科技有限公司),以上对照品纯度均 $\geq 98\%$;甲醇(色谱纯,天津市富宇精细化工有限公司);乙醇(分析纯;天津市红岩化学试剂厂),二甲基亚砷(天津市凯通化学试剂有限公司);CDC25A 磷酸蛋白酶试剂盒、CDC25B 磷酸蛋白酶试剂盒、PD-1、PD-L1 试剂盒均购自法国 Cisbio 公司。

1.4 方法

1.4.1 PD-1/PD-L1 的筛选 设置对照组 1(加 PD1, 加 PD-L1, 不加拮抗分子)、对照组 2(不加 PD1 加抑制分子)和实验组(月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷)3 组反应,其中实验组样品用超纯水溶解为 5、10、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列浓度梯度,反应体系为 50 μL 。其中对照组 1 的反应体系为 Tag1-PD-L1、Tag2-PD1, Anti-Tag1 Eu Cryptate 试剂、Anti-Tag2 XL665 抗体, PPI Europium 检测缓冲液补充至 50 μL ;对照组 2 反应体系为 Anti-Tag1 Eu Cryptate 试剂、Anti-Tag2 XL665 抗体、拮抗分子、PPI Europium 检测缓冲液补充至 50 μL ;实验组为 Tag1-PD-L1、Tag2-PD1, Anti-Tag1 Eu Cryptate 试剂、Anti-Tag2 XL665 抗体、拮抗分子、PPI Europium 检测缓冲液补充至 50 μL 。将 3 组反应体系于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h,待反应完全,检测产物在 655 nm 和 620 nm 处的荧光强度的比值,按照(抑制率=1-试验组测定值-对照组 2 测定值/对照组 1 测定值-对照组 2 测定值 $\times 100\%$)计算实验组与对照组 1 的荧光强度比值,判断抑制效果。

1.4.2 Cdc25A/B 的筛选 设置对照组 1(加酶不加抑制分子)、对照组 2(不加酶加抑制分子)和实验组(月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷)3 组反应,其中实验组样品用超纯水溶解为 5、10、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列浓度梯度,反应体系为 50 μL 。其中对照组 1 的反应体系为 FDP, Cdc25 系列酶, FDP 缓冲液补充至 50 μL ;对照组 2 反应体系为 FDP, 抑制剂分子, FDP 缓冲液补充至 50 μL ;实验组为 FDP, Cdc25 系列酶, 抑制剂分子, FDP 缓冲液补充至 50 μL 。将 3 组反应体系于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h,待反应完全,检测产物在 520 nm 处的荧光强度,按照(酶活性存活效率=试验组测定值/对照组 1 的测定值 $\times 100\%$)计算实验组与对照组 1 的荧光强度比值,判断抑制效果。

1.5 溶液制备

1.5.1 混合对照品母液 精密称取各对照品适量,

加 50% 甲醇定容,配成每 1 mL 含有 0.15 mg 月见草素 B、0.080 1 mg 阿魏酸、0.080 1 mg 绿原酸、0.080 4 mg 新绿原酸、0.080 4 mg 杨梅素、0.088 4 mg 原儿茶酸、0.112 mg 金丝桃苷的混合溶液,即得。

1.5.2 供试品溶液 分别精确称取 6~11 月柳兰本品茎、叶粉末(过 3 号筛)1.0 g, 7~10 月柳兰花 1.0 g, 置于 100 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 50% 甲醇溶液超声 30 min 提取,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇定容至 50 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,续滤液即为供试品溶液。

1.6 色谱条件 采用 Waters C₁₈ 色谱柱(250 \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.3% 乙酸溶液(B),梯度洗脱,洗脱条件,见表 1。流速为 1.0 mL/min,波长为 300 nm,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 10 μL 。

表 1 柳兰含量测定流动相洗脱条件

Table 1 Conditions of mobile phase for the determination of *Epilobium angustifolium* L.

t/min	A/%	B/%
0	90	10
12	80	20
20	65	35
25	30	70
35	20	80
40	10	90

1.7 统计学分析 分析利用 Microsoft Excel 进行,包括了数据的录入、整理、统计学分析和可视化图形的绘制,并运用 ChiPlot 进行热图分析。所有试验均平行进行 3 次,试验结果以($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-1/PD-L1 的筛选结果 发现其酶存活率较低,表明柳兰中月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷对 PD-1/PD-L1 酶有很好的抑制效果,见表 2。随着样品浓度的增加,其活性基本上呈线性增加,浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时新绿原酸的活性最好,可达到阳性对照的一半;浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时月见草素 B 的活性最好,基本可达到阳性对照的一半。月见草素 B 在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的抑制率与阳性对照 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下相近,且月见草素 B 的整体活性较其他化合物最佳,其次为新绿原酸。虽然月见草素 B 的活性良好,但较阳性对照仍存在差距。

2.2 Cdc25A/B 的筛选结果 柳兰中月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷对 Cdc25A/B 酶存活率低,这表明有很好的抑制效果,见表 3、表 4。随着样品浓度的增加,其活性基本上呈

表 2 抑制 PD-1/PD-L1 酶活性的测试结果 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Test results for inhibition of PD-1/PD-L1 enzyme activity

化合物名称	浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	5	10	25	50	100
月见草素 B	19.89±2.19	30.26±2.18	40.39±4.13	48.56±3.31	64.95±3.84
阿魏酸	4.21±0.42	7.49±1.87	16.49±1.25	33.71±2.16	57.98±2.40
绿原酸	10.98±2.86	20.36±3.12	32.44±2.11	41.18±3.96	53.37±3.67
新绿原酸	25.47±3.18	29.85±2.62	38.25±3.25	43.97±4.06	61.99±5.17
杨梅素	2.17±0.23	7.02±1.26	13.38±2.17	22.57±3.43	50.98±4.22
原儿茶酸	5.53±0.26	10.99±1.32	22.02±3.98	36.37±5.45	52.11±6.28
金丝桃苷	4.95±1.34	11.18±2.11	20.13±3.57	32.76±2.19	50.21±3.09
阳性对照(对照组 1)	59.77±4.48	68.97±3.57	74.25±3.24	88.02±3.12	97.80±6.04

线性增加,其中月见草素 B 活性最好。Cdc 25A 酶活性的测试中在 5、10、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下金丝桃苷的活性均呈现最好,但较阳性对照相差较多,在 50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下月见草素 B 的活性最佳,与阳性

对照基本吻合。Cdc 25B 酶实验中,5、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下金丝桃苷的活性最好,但较阳性对照相差甚多,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下杨梅素活性最好,但与阳性对照相比,其活性并不理想。

表 3 抑制 Cdc 25A 酶活性的测试结果 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Test results for inhibition of Cdc 25A enzyme activity

化合物名称	浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	5	10	25	50	100
月见草素 B	6.42±1.32	13.98±2.28	32.02±1.97	56.32±4.71	85.12±3.27
阿魏酸	3.12±0.54	9.08±1.71	19.93±2.57	32.76±2.18	54.21±3.09
绿原酸	4.21±1.43	7.64±0.88	16.37±2.33	33.72±1.06	57.98±4.54
新绿原酸	3.68±0.61	8.08±1.34	14.43±1.84	29.96±3.79	55.06±4.23
杨梅素	5.17±1.23	14.02±3.06	33.38±3.17	52.57±6.42	75.09±6.22
原儿茶酸	5.42±1.93	9.82±2.17	19.19±2.31	33.97±4.09	54.21±6.24
金丝桃苷	7.18±1.18	14.17±1.20	36.11±5.19	43.17±8.31	55.95±6.82
阳性对照(对照组 1)	19.89±2.19	25.26±3.15	45.92±5.13	76.39±9.31	96.95±10.84

表 4 抑制 Cdc 25B 酶活性的测试结果 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Test results for inhibition of Cdc 25B enzyme activity

化合物名称	浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	5	10	25	50	100
月见草素 B	5.38±2.28	14.52±2.18	28.98±4.03	48.65±4.56	86.86±7.33
阿魏酸	4.21±2.26	10.02±2.99	20.07±4.63	33.84±6.13	52.91±5.07
绿原酸	3.89±1.37	7.38±2.02	15.43±3.27	28.88±5.09	58.02±6.61
新绿原酸	6.32±1.76	8.33±2.46	14.37±3.96	31.46±9.84	56.94±8.36
杨梅素	2.83±1.02	10.90±2.01	30.42±4.23	51.53±10.57	74.98±1.25
原儿茶酸	5.58±2.17	10.08±1.85	17.98±2.26	41.06±8.14	53.31±11.34
金丝桃苷	6.88±1.22	14.31±4.05	29.76±2.29	45.83±7.27	56.15±10.18
阳性对照(对照组 1)	19.89±2.19	25.26±3.15	45.92±5.13	76.39±9.3	96.95±10.84

2.3 色谱条件结果 在上述色谱条件下月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷可以得到较好的分离效果,混合对照品及同一批样品(8 月柳兰)供试品 HPLC 色谱图,见图 1,在此分离条件下,可以呈现较好的分离效果。

2.4 线性关系、检出限及定量限的考察 精密吸取“1.3.1”项下不同的体积进样(2、4、6、8、10、12 μL)注入液相色谱仪,以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归分析;取各单品对照品溶液,用甲醇

稀释,分别以信噪比 S/N=3 和 S/N=10 时对应的物质浓度为检出限(LOD)和定量限(LOQ)。结果显示,各成分在各自线性范围内均呈良好的线性关系,决定系数均大于 0.99。见表 5。

2.5 仪器精密度考察 取混合对照品溶液,按前文色谱条件连续进样 6 次,并记录 7 种成分的峰面积,计算得金丝桃苷、新绿原酸、月见草素 B、绿原酸、金丝桃苷、阿魏酸、杨梅素的 RSD 值分别为:1.24%、1.02%、1.07%、1.16%、2.62%、1.39%和 2.40%,各 RSD 值

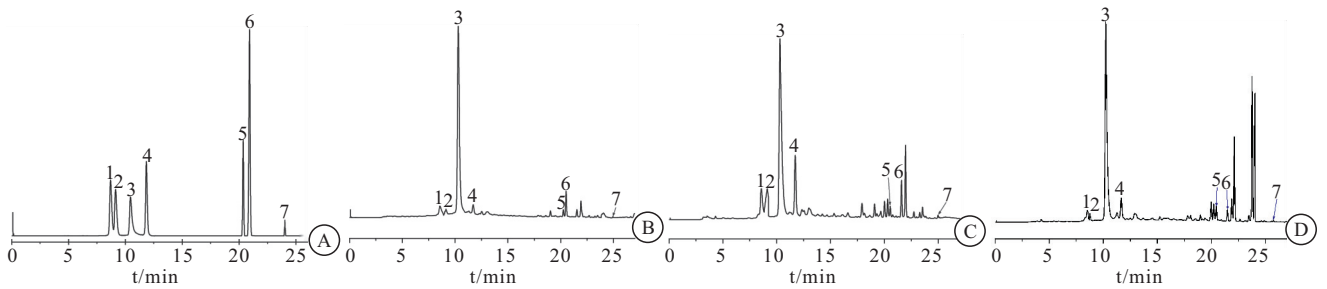


图 1 混合对照品(a)和 8 月柳兰茎(b)、叶(c)、花(d)的 HPLC 图

Figure 1 HPLC plots of mixed control (a) and August *Epilobium angustifolium* L. stems (b), leaves (c), flowers (d)

注:1. 原儿茶酸;2. 新绿原酸;3. 月见草素 B;4. 绿原酸;5. 金丝桃苷;6. 阿魏酸;7. 杨梅素。

表 5 7 种成分线性关系考察结果

Table 5 Results of the examination of the linear relationships of the seven components

对照品	回归方程	相关系数 (R^2)	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
原儿茶酸	$Y=38560X+2782.5$	0.9994	10~600	0.05	2.18
新绿原酸	$Y=48055X-35692$	0.9998	20~800	0.09	3.33
月见草素 B	$Y=20550X-52154$	0.9997	10~600	0.10	2.12
绿原酸	$Y=19838X-23494$	0.9996	20~800	0.12	2.09
金丝桃苷	$Y=76587X-22453$	0.9996	20~800	0.08	2.06
阿魏酸	$Y=7703.3X-133002$	0.9995	20~800	0.06	1.98
杨梅素	$Y=3578.9X-26886$	0.9996	20~800	0.09	1.78

均 $<3\%$,表明该方法精密密度良好。

2.6 重复性考察 称取柳兰 8 月茎 1.0 g 各 6 份,按

照 2.1 方法下配制供试品溶液,并按前文色谱条件进行含量测定,测得 8 月茎中 金丝桃苷、新绿原酸、月见草素 B、绿原酸、金丝桃苷、阿魏酸、杨梅素的峰面积平均值分别为: 69 157.17、34 539.00、1 328 501.17、48 541.33、22 939.17、1 340.17、7 159.33, RSD 分别为: 1.03%、1.80%、1.53%、1.38%、2.47%、2.73% 和 1.45%,各 RSD 均小于 3%,表明此实验重复性良好。
2.7 稳定性考察 取同一份药渣样品(8 月)柳兰的茎、叶、花供试品溶液,在室温下分别放置 0、2、4、6、8、10、12 h,按前文色谱条件进样测定,月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷的 RSD 值,见表 6。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

表 6 8 月柳兰供试品稳定性考察(%)

Table 6 Examination of the stability of august *Epilobium angustifolium* L. test material

时间(h)	部位	原儿茶酸 RSD	新绿原酸 RSD	月见草素 B RSD	绿原酸 RSD	金丝桃苷 RSD	阿魏酸 RSD	杨梅素 RSD
0	茎	1.03	1.80	1.53	1.38	2.47	2.73	1.45
	叶	1.89	2.04	1.46	1.77	1.03	2.08	1.33
	花	1.72	1.11	1.06	0.80	1.60	0.93	2.06
2	茎	1.21	1.73	1.55	0.47	1.73	2.33	1.51
	叶	2.26	1.22	1.46	2.16	1.35	2.90	1.18
	花	2.83	0.69	1.04	0.94	1.78	0.37	1.66
4	茎	1.16	1.76	0.58	1.23	1.56	1.09	0.07
	叶	1.89	0.59	1.58	1.82	1.35	1.13	0/73
	花	2.39	0.68	1.34	1.06	1.06	0.65	1.49
6	茎	1.42	1.55	1.50	1.38	1.32	1.56	1.49
	叶	2.59	1.22	2.94	1.60	1.93	0.54	1.17
	花	2.59	0.58	1.34	1.15	0.40	2.73	1.49
8	茎	1.30	2.07	2.61	2.51	2.40	1.55	1.69
	叶	1.29	0.64	0.80	2.83	0.84	0.77	1.17
	花	2.20	1.54	0.26	0.95	1.93	0.73	2.89
10	茎	1.46	2.47	1.72	2.48	2.96	1.56	1.32
	叶	2.95	2.82	1.37	2.31	1.25	1.83	1.11
	花	0.97	0.69	1.23	0.52	2.03	1.45	2.36
12	茎	1.00	2.04	1.46	1.77	1.03	2.08	1.33
	叶	2.94	2.49	2.08	1.99	1.93	0.93	0.93
	花	2.15	0.92	1.29	0.73	2.37	1.40	1.24

2.8 加样回收率试验 取同一份药渣样品(8 月)柳兰的叶供试品溶液样品 6 份,1.0 g/份,分别按药材含量的 50%、100%、150% 加入 7 种对照品母液溶液

1 mL,按照前文色谱条件,每份溶液进样 3 次,计算回收率。加样回收率,见表 7。结果表明该提取方法准确度好,符合试验要求。

表 7 8 月柳兰叶加样回收率试验

Table 7 Spiked sample recovery test of *Epilobium angustifolium* L. leaves in August

成分	含有量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	测得值 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	成分	含有量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	测得值 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	
原儿茶酸	6.70	3.35	10.00	97.00	99.19	2.71	金丝桃苷	13.30	6.65	19.84	98.27	99.25	1.3323	
	100.00	6.60	3.35	10.00				13.20	6.65	19.95	101.50			
	101.49	6.40	6.72	13.20				13.50	13.30	26.70	99.25			
	100.00	6.60	6.72	13.30				13.60	13.30	26.70	98.50			
	99.01	6.90	10.05	16.90				13.00	19.95	32.95	100.00			
	98.02	5.90	10.05	15.80				13.40	19.95	32.95	97.99			
新绿原酸	51.00	25.40	76.10	98.82	99.24	0.33	阿魏酸	1.90	0.90	2.80	100.00	100.31	2.96	
	50.90	25.40	76.00	98.88				1.60	0.90	2.50	100.00			
	50.80	50.80	101.20	99.22				1.70	1.80	3.50	100.00			
	50.90	50.80	101.40	99.41				1.60	1.80	3.50	105.56			
	50.60	76.20	126.50	99.61				1.90	2.70	4.60	100.00			
	50.80	76.20	126.60	99.48				2.00	2.70	4.60	96.30			
月见草素 B	2.30	1.15	3.50	100.00	98.57	3.6	杨梅素	14.00	7.00	21.00	100.00	99.72	0.95	
	2.00	1.15	3.20	100.00				14.10	7.00	21.00	98.57			
	2.40	2.30	4.60	95.66				14.40	14.20	28.50	99.30			
	2.00	2.30	4.40	104.35				14.20	14.20	28.60	101.41			
	2.50	3.45	5.80	94.29				14.10	21.30	35.30	99.53			
	2.20	3.45	5.60	97.14				14.20	21.30	35.40	99.53			
绿原酸	43.10	21.55	64.65	100.00	100.12	0.28								
	43.00	21.55	64.62	100.00										
	43.10	43.10	86.10	99.78										
	42.90	43.10	86.20	100.46										
	43.50	64.65	108.15	100.00										
43.20	64.65	108.15	100.46											

2.9 样品含量测定 取 6~11 月柳兰的茎、叶,以及 7~10 月柳兰的花各 2 份,1 g/份,按制得供试品溶液,

并按前文色谱条件进样分析,测得峰面积,计算样品中各成分含量,见表 8。

表 8 柳兰地上部位 7 种含量测定结果($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Table 8 Determination of the contents of seven species in the aboveground parts of *Epilobium angustifolium* L.

项目	原儿茶酸	新绿原酸	月见草素 B	绿原酸	金丝桃苷	阿魏酸	杨梅素	总含量
6 月茎	10.10	0.64	157.00	14.30	16.40	1.20	6.70	206.34
6 月叶	122.80	7.10	450.70	1.40	43.90	4.50	16.30	646.70
7 月茎	5.00	1.40	105.20	4.50	2.80	2.50	1.80	123.20
7 月叶	102.50	6.30	196.70	27.10	30.80	1.40	13.90	378.70
7 月花	8.40	2.91	183.90	1.10	19.40	2.50	566.50	784.71
8 月茎	2.50	1.40	20.70	1.50	0.80	0.20	1.50	28.60
8 月叶	6.70	50.80	2.30	43.10	13.40	1.80	14.20	132.30
8 月花	13.04	3.23	136.77	20.50	12.24	1.57	0.64	187.98
9 月茎	2.40	1.30	10.70	2.50	1.21	0.34	1.43	19.88
9 月叶	559.60	16.77	16.77	252.18	8.55	21.92	45.95	921.73
9 月花	14.00	4.60	97.20	10.20	12.40	1.20	0.64	140.24
10 月茎	2.41	1.36	0.23	3.19	1.36	0.58	0.96	10.10
10 月叶	11.42	4.83	3.32	56.94	20.73	3.39	38.94	139.56
10 月花	6.31	10.67	1.59	18.21	15.76	0.85	6.44	59.83
11 月茎	2.00	1.02	0.13	2.50	1.48	0.54	0.99	8.66
11 月叶	65.41	0.68	0.18	20.53	18.54	1.45	5.19	111.98

3 讨论

通过利用 CDC25A 磷酸蛋白酶试剂盒、CDC25B 磷酸蛋白酶试剂盒、PD-1、PD-L1 试剂盒进行柳兰中抗肿瘤活性检测,发现柳兰中月见草素 B、阿魏酸、绿

原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷有良好的抗肿瘤活性。其中即月见草素 B、阿魏酸在抗 PD-1、PD-L1 酶的活性测试中,随着样品浓度的增加,其活性基本上呈线性增加,但与阳性对照差距较大。月

见草素 B 在抗 CDC25A、CDC25B 酶的活性测试和 PD-1、PD-L1 活性测试中均呈现出较好的活性,在 CDC25A、CDC25B 酶的活性测试中尤为明显,在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时几乎可与阳性对照组活性接近。这也表明月见草素 B 有良好的抗肿瘤活性。阿魏酸、金丝桃苷在抗 CDC25A、CDC25B 酶的活性测试中,随着样品浓度的增加,其活性基本上呈线性增加,且增长率也有所提高,但与阳性对照差距较大。

在 9 月柳兰叶中 7 种成分总含量相比于其它样品最高,同时 9 月叶的原儿茶酸和绿原酸含量也较其它几个月高;8 月叶中新绿原酸含量明显高于其它几个月;6 月叶中月见草素 B 的含量最高,其次是 7 月叶,而后是 7 月花;9 月叶中绿原酸的含量最高;7 月花的金丝桃苷、杨梅素的含量高于其他月份;9 月叶的阿魏酸含量高于其它月份。

综合分析,柳兰中这 7 种成分总含量最高的是 9 月叶样品,比总含量最低的 11 月茎中高出 105.94 倍;原儿茶酸最高含量样品 9 月叶比最低样品 11 月茎高出 279.80 倍;新绿原酸最高含量样品 8 月叶比最低含量样品 6 月茎中高出 79.37 倍;月见草素 B 最高含量样品 6 月叶比最低含量样品 11 月茎多出 $450.57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;绿原酸最高含量样品 9 月叶比最低含量样品 7 月花多出 $251.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;金丝桃苷最高含量样品 6 月叶比最低样品 8 月茎含量高出 43.9 倍;阿魏酸最高含量样品 9 月叶比最低含量样品 8 月茎高出 109.5 倍;杨梅素最高含量样品 7 月花比最低含量样品 9 月花中多 $565.86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由此可见 6~11 月份柳兰地上部位中的 7 种成分含量差异显著。

通过测试柳兰中化学成分:月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷抗 PD-1、PD-L1 活性与抗 CDC25A、CDC25B 酶的活性,发现随着样品浓度的增加,其活性基本上呈线性增加,其中月见草素 B 与阳性对照相比差距稍小。

在实验初期通过比较流动相体系为乙腈-水、乙腈-0.3%乙酸时的峰型,发现虽然乙腈-水流动相体系下有较好的峰型,但是杨梅素响应值太低,流动相中加入乙酸可以使得色谱峰得到较好的改善,最终选用乙腈-0.3%乙酸作为流动相体系。经过尝试 295、320、350、300 nm 检测波长,由于绿原酸结构具有较多的-OH 和 C=O,在 290 nm 以下其紫外吸收响应较低,在 230~350 nm 波长范围内紫外吸收响应较低,发现在 300 nm 波长下 7 个色谱峰均有呈现。尝试柱温为 30 °C、35 °C、25 °C,发现在 35 °C 和 25 °C 下 7 个峰均不完全呈现,而在 30 °C 7 个峰均呈现。经过筛选最终确定实验条件为:流动相体系乙腈-0.3%乙

酸、柱温 30 °C、检测波长 300 nm,此条件下 7 个色谱峰可以呈现较好的分离效果,且对称性良好。

通过建立准确、简单、可行的高效液相色谱条件测定各有效成分含量(月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷),发现样品有效成分含量存在显著性差异,可作为质量评价的依据。结果显示青海省西宁市大通回族土族自治县柳兰样品中这 7 种成分总含量最高样品是 9 月叶,7 月花次之,11 月茎含量最低。

4 结论

不同月份柳兰中含有的抗肿瘤成分含量有显著的差异。中、藏药质量问题是限制其发展的根本原因,寻找适合评价其质量的中药“谱-效”关系研究方法尤为重要。本研究通过对月见草素 B、阿魏酸、绿原酸、新绿原酸、杨梅素、原儿茶酸、金丝桃苷七种抗肿瘤活性化合物活性筛选,并同时测定其含量,实验表明该方法重复性好。使用该方法确定柳兰最佳采收时间研究,从总含量出发可拟 7 月、9 月可作为该地区柳兰最佳采收时期,但通过活性筛选发现月见草素 B 的抗肿瘤活性较其它更为乐观,因而从单成分含量上看,可拟 6 月、7 月、8 月作为该地区柳兰最佳采收时期。

【参考文献】

- [1] 杜品. 青藏高原甘南藏药植物志[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社, 2006: 195-196.
- [2] AILUS J, SALEEM I, ISMAIL D M F. A Review of the Anti-Inflammatory Skincare Potential of *Epilobium angustifolium* (Fireweed) Inspired by Herbal Tradition[J]. *Cosmetics*, 2024, 11(5): 156-156.
- [3] KOZHANTAYEVA A, TURSINOVA N, KOLPEK A, *et al.* Phytochemical Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of Ethanol and Ethyl Acetate Extracts of *Chamaenerion latifolium* L[J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(8): 996-996.
- [4] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京:民族出版社, 1997: 165.
- [5] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志(第三卷)[M]. 北京:科学出版社, 1986: 363-364.
- [6] 噶玛群培. 甘露本草明镜[M]. 拉萨:西藏人民出版社, 1993: 471-472.
- [7] 中科院西北高原生物研究所. 青海植物志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1996: 372-373.
- [8] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2024, 74(3): 229-263.
- [9] MAGDALENA P, ANNA N, RADOSŁAW B, *et al.* Anticancer properties of bacterial cellulose membrane containing ethanolic extract of *Epilobium angustifolium* L[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 20(2): 111133345-1133345.
- [10] ANNA N, JOANNA Z, MAGDALENA P, *et al.* as a Potential

- Herbal Component of Topical Products for Skin Care and Treatment-A Review[J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3536-3536.
- [11] 刘延泽, 王彩芳, 张振中, 等. 柳兰化学成分研究 I. 柳兰中的黄酮类化合物[J]. *中草药*, 2002(4): 3-5.
- [12] HONEGR J, POSPÍŠILOVÁ M. Determination of phenolic acids in plant extracts using CZE with on-line transient isotachophoretic preconcentration[J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(4): 729-735.
- [13] 刘延泽, 王彩芳, 韩全斌, 等. 柳兰化学成分研究 II. 鞣质及多元酚类化合物[J]. *中草药*, 2003(11): 10-12.
- [14] KISS A, KOWALSKI J, MELZIG M F. Induction of neutral endopeptidase activity in PC-3 cells by an aqueous extract of *Epilobium angustifolium* L. and oenotherin B[J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(4): 284-289.
- [15] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. *药学学报*, 2020, 55(10): 2273-2280.
- [16] 殷华芳, 钱晓萍, 刘宝瑞. 阿魏酸抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(32): 4238-4240.
- [17] 夏文. 杨梅酚类化合物生物活性、生物利用度及其抑制乳腺癌细胞增殖的机理研究[D]. 广东: 华南理工大学, 2022.
- [18] 陈继荣, 王佳, 颀纾. 金丝桃苷通过作用人胰腺癌细胞对裸鼠体内肿瘤细胞的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(17): 4318-4322.
- [19] 包婷雯, 左明丽, 丁玉, 等. 45 种藏药材的 CDC25A/CDC25B 磷酸酶抑制活性筛选[J]. *中国民族医药杂志*, 2018, 24(03): 55-57.
- [20] 任艳玲, 杨泽锐, 李金贤, 等. 药物基因多态性对 PD-1/PD-L1 抑制剂抗癌疗效及不良反应影响的研究进展[J/OL]. *中国现代应用药学*, 1-8[2024-12-14].
- [21] 陈立基, 马红梅, 张士法, 等. PD-1/PD-L1 抑制剂在食管癌新辅助治疗中的研究进展[J/OL]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 1-8[2024-12-14].
- [22] 占想, 周风格, 冯阿磊, 等. 放疗调控肿瘤免疫及联合 PD-1/PD-L1 抑制剂: 从基础到临床[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2024, 31(20): 1276-1284.
- [23] ALRADWAN I, ZHI P, ZHANG T, *et al.* Nanoparticulate drug combination inhibits DNA damage repair and PD-L1 expression in BRCA-mutant and wild type triple-negative breast cancer[J]. *Journal of Controlled Release*, 2025, 377661-674.
- [24] 赵建军, 李启青, 李小辉. 野香橼花的化学成分研究[J]. *药学前沿*, 2025, 29(9): 1469-1481.
- [25] WANG X, JING Z, HUANG X, *et al.* PD-L1 antibody conjugated dihydrotanshinone I-loaded polymeric nanoparticle for targeted cancer immunotherapy combining PD-L1 blockade with immunogenic cell death[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 667(PB): 125004-125004.

(收稿日期: 2024-12-20; 修回日期: 2025-10-11; 编辑: 张翰林)

(上接第 44 页)

- [7] ZHAN S H, LUO D, GE W, *et al.* Clinicopathological predictors of occult lateral neck lymph node metastasis in papillary thyroid cancer: a meta-analysis[J]. *Head Neck*, 2019, 41(7): 2441-2449.
- [8] LU T X, ROTHENBERG M E. microRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [9] MOLLAEI H, SAFARALIZADEH R, ROSTAMI Z. microRNA replacement therapy in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12369-12384.
- [10] GON Y, SHIMIZU T, MIZUMURA K, *et al.* Molecular techniques for respiratory diseases: microRNA and extracellular vesicles[J]. *Respirology*, 2020, 25(2): 149-160.
- [11] CHEN L, LI Y X, LU J S. Identification of circulating miR-762 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820964222.
- [12] LI Y P, HUANG R X, WANG L, *et al.* microRNA-762 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by targeting IRF7 expression[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(6): 643-649.
- [13] HOU R, YANG Z, WANG S Z, *et al.* miR-762 can negatively regulate menin in ovarian cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 2127-2137.
- [14] 焦志凯, 冯宁宁, 张越山, 等. miR-762 在胰腺癌中的表达及对胰腺癌细胞生物学行为的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(11): 869-874.
- [15] NAKAZAWA M, MATSUBARA H, MATSUSHITA Y, *et al.* The human bcl-2 family member bcl-rambo localizes to mitochondria and induces apoptosis and morphological aberrations in *Drosophila*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157823.
- [16] CROCE C M, VAUX D, STRASSER A, *et al.* The BCL-2 protein family: from discovery to drug development[J]. *Cell Death Differ*, 2025, 32(8): 1369-1381.
- [17] HASHINO T, MATSUBARA H, XU J H, *et al.* PGAM5 interacts with Bcl-rambo and regulates apoptosis and mitophagy[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 420(1): 113342.
- [18] MENG F, SUN N T, LIU D Y, *et al.* BCL2L13: physiological and pathological meanings[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(6): 2419-2428.
- [19] XU J H, HASHINO T, TANAKA R, *et al.* The BCL-2 family protein BCL-RAMBO interacts and cooperates with GRP75 to promote its apoptosis signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 14041.
- [20] JACOBS J, IRANPOUR R, BEHROOZ A B, *et al.* The role of BCL2L13 in glioblastoma: turning a need into a target[J]. *Biochem Cell Biol*, 2024, 102(2): 127-134.

(收稿日期: 2025-04-10; 修回日期: 2025-10-27; 编辑: 张翰林)