

HPLC法测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量^Δ

马立满*, 刘震, 尚明英#, 刘广学, 徐风, 蔡少青(北京大学药学院生药学研究室, 北京 100191)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0369-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.28

摘要 目的:建立测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax SB-C₁₈,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为25℃,检测波长为210 nm,进样量为10 μl。结果:旋覆花素和去乙酰旋覆花素的检测质量浓度线性范围分别为0.000 2~0.005、0.000 1~0.001 7 μg/ml($r=0.999 8$ 、 $0.999 4$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为99.63%~103.56%、95.98%~101.21%,RSD分别为1.26%、1.84%($n=9$)。结论:该方法操作简便,结果准确、可靠,可用于评价旋覆花药材的质量。

关键词 旋覆花;旋覆花素;去乙酰旋覆花素;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Inulicin and Deacetylinulicin in Inulae Flos by HPLC

MA Liman, LIU Zhen, SHANG Mingying, LIU Guangxue, XU Feng, CAI Shaoqing(Division of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of simultaneous determination of inulicin and deacetylinulicin in Inulae Flos. METHODS: HPLC was performed on the column of Zorbax SB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 25℃, the detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.000 2-0.005 μg/ml($r=0.999 8$) for inulicin and 0.000 1-0.001 7 μg/ml($r=0.999 4$) for deacetylinulicin; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 99.63%-103.56% (RSD=1.26%, $n=9$) and 95.98%-101.21% (RSD=1.84%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and can be used for the quality evaluation of Inulae Flos.

KEYWORDS Inulae Flos; Inulicin; Deacetylinulicin; Content determination; HPLC

旋覆花为菊科植物日本旋覆花(*Inula japonica* Thunb.)或欧亚旋覆花(*I. britannica* L.)的干燥头状花序,具有降气、消痰、止呕、行水的功效,主要用于风寒咳嗽、痰饮蓄结、喘咳痰多、心下痞硬等证^[1]。旋覆花素为旋覆花的特征性有效成分,具有明显的抗肿瘤、抗炎、抗溃疡、利尿、镇咳等作用^[2-9];另有文献报道,去乙酰旋覆花素也具有抗炎活性^[6]。欧亚旋覆花、湖北旋覆花、线叶旋覆花等旋覆花属植物中旋覆花素、槲皮素、1-β-羟基-土木香内酯等成分的含量测定已有研究^[7-13],然而旋覆花商品药材的质量评价仅见本课题组前期发表的一篇高效液相色谱(HPLC)指纹图谱研究^[14],未见其有效成分的含量测定报道。因此,笔者建立HPLC法测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量,旨在为旋覆花药材的质量评价提供更为合理、可靠的方法。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G1379A型在线真空脱气机、G1312A型二元梯度泵、G1313A型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1315B型二极管阵列检测器(美国Agilent公司);CP225D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);CP114型万分之一电子天平(美国Ohaus公司);KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RT-02A型小型粉碎机(北京弘荃翔和机械技术有限公司);Milli-Q型超纯水制备仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

收集全国范围内的旋覆花药材12批(批号:7178、7197、7204、7218、7219、7220、7221、7222、7223、7224、7367、7368,经尚明英副教授鉴定为菊科植物日本旋覆花的干燥头状花序),同批号样品保存在北京大学药学院生药学标本室。旋覆花素和去乙酰旋覆花素对照品为本课题组从日本旋覆花的干燥头状花序中分离得到,其结构通过核磁共振氢谱(¹H NMR)、核

碱的含量[J].中国药房,2014,25(19):1769.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第一册[S].北京:中国医药科技出版社,1995:85.

Δ基金项目:国家药品标准提高暨2015年版《中国药典》科研任务项目

*硕士研究生。研究方向:天然药物化学。E-mail:maliman88@163.com

#通信作者:副教授,博士。研究方向:生药学。电话:010-82802534。E-mail:myshang@bjmu.edu.cn

[6] 梁敬钰,薛姣,刘静涵,等.乌头属植物二萜生物碱研究进展[J].海峡药学,2009,21(2):1.

[7] 罗明,李春,林丽美,等.藏药榜嘎化学成分和药理作用的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,21(7):1644.

[8] 陈燕,易进海,刘云华,等.HPLC法测定藏药材铁棒锤、榜嘎中双酯型生物碱的含量[J].中国民族医药杂志,2009,11(6):47.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2015-11-20)

(编辑:张静)

磁共振碳谱(¹³C NMR)进行鉴定,纯度经二极管阵列检测器检测,并采用面积归一化法计算,均在98%以上。乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;柱温: 25 ℃;检测波长: 210 nm;进样量: 10 μl。在上述色谱条件下,旋覆花素和去乙酰旋覆花素的理论板数均>3 000,分离度均>1.5,各成分基线分离良好。色谱见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Procedures of gradient elution

t, min	A, %	B, %
0~15	15	85
15~16	30	70
16~60	30	70

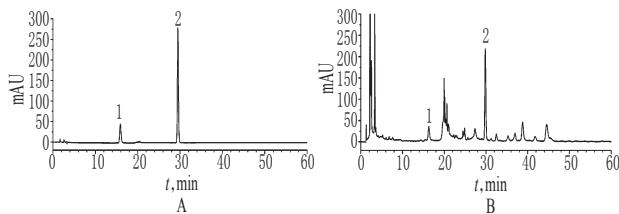


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品溶液; B.供试品溶液; 1.去乙酰旋覆花素; 2.旋覆花素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B.test sample; 1.deacetylinulicin; 2.inulicin

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取旋覆花素和去乙酰旋覆花素对照品各适量,分别置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得旋覆花素和去乙酰旋覆花素对照品贮备液。分别精密量取上述贮备液适量,置于同一25 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含旋覆花素0.200 mg、去乙酰旋覆花素0.066 0 mg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过40目筛)2.0 g,精密称定,置于50 ml具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,密塞,称定质量,冷浸1 h后,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)处理20 min,取出放冷后再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、3、5、7、10、13、15、17、20、25 μl,置于1 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成系列对照溶液。分别精密吸取上述对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以旋覆花素和去乙酰旋覆花素色谱峰峰面积为纵坐标(y)、质量浓度(x, μg/ml)为横坐标进行线性回归,得旋覆花素的回归方程为 $y=20\ 104.5x+67.195\ 1$ ($r=0.999\ 8$)、去乙酰旋覆花素的回归方程为 $y=24\ 586.6x+48.384\ 7$ ($r=0.999\ 4$)。结果表明,旋覆花素和去乙酰旋覆花素的检测质量浓度线性范围分别为0.000 2~0.005、0.000 1~0.001 7 μg/ml。

2.4 定量限与检测限

以信噪比10:1计算旋覆花素和去乙酰旋覆花素的定量限,以信噪比3:1计算旋覆花素和去乙酰旋覆花素的检测限。结果,旋覆花素和去乙酰旋覆花素的定量限分别为1.60、1.46 μg/ml,检测限分别为0.40、0.40 μg/ml。

2.5 精密度试验

取同一份供试品溶液(批号:7367)适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,旋覆花素和去乙酰旋覆花素峰面积的RSD分别为0.94%、1.70%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取样品(批号:7367)粉末适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,旋覆花素和去乙酰旋覆花素峰面积的RSD分别为0.65%、0.46%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:7367)粉末适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,旋覆花素和去乙酰旋覆花素峰面积的RSD分别为1.8%、4.4%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:7367)粉末适量,平行称取9份,每份2.0 g,精密称定,平均分为3组,按样品含量的80%、100%和120%分别精密加入旋覆花素(1.997、2.497、2.996 mg)和去乙酰旋覆花素(0.329 6、0.412 0、0.520 3 mg)对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算旋覆花素和去乙酰旋覆花素的加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery of inulicin and deacetylinulicin ($n=9$)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
旋覆花素	2.003	2.686 0	1.997 0	4.748	103.25	101.99	1.26
	2.004	2.687 0	1.997 0	4.755	103.56		
	2.001	2.683 0	1.997 0	4.741	103.05		
	2.005	2.689 0	2.497 0	5.250	102.56		
	1.997	2.678 0	2.497 0	5.194	100.76		
	1.998	2.679 0	2.497 0	5.218	101.68		
	2.006	2.690 0	2.996 0	5.675	99.63		
	1.999	2.681 0	2.996 0	5.717	101.34		
	1.998	2.679 0	2.996 0	5.737	102.07		
去乙酰旋覆花素	2.003	0.437 1	0.329 6	0.759 4	97.79	99.08	1.84
	2.004	0.437 3	0.329 6	0.762 4	98.63		
	2.001	0.436 6	0.329 6	0.768 4	100.68		
	2.005	0.437 5	0.412 0	0.846 4	99.25		
	1.997	0.435 7	0.412 0	0.836 5	97.28		
	1.998	0.436 0	0.412 0	0.852 8	101.17		
	2.006	0.437 7	0.520 3	0.937 1	95.98		
	1.999	0.436 2	0.520 3	0.962 8	101.21		
	1.998	0.436 0	0.520 3	0.955 2	99.08		

2.9 样品含量测定

称取不同来源的旋覆花样品粉末各2.0 g,精密称定,按

“2.2.2”项下方法平行制备3份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of determination of inulicin and deacetylinulicin (n=3)

批号	收集时间(年.月)	收集地/产地	旋覆花素,mg/g	去乙酰旋覆花素,mg/g	总含量,mg/g
7178	2012.06	广西玉林/湖北	1.367 0	0.114 9	1.481 9
7197	2013.04	河北安国/河南	1.578 0	0.181 0	1.759 0
7204	2013.06	安徽亳州/不详	1.396 0	0.252 0	1.648 0
7218	2013.02	安徽/安徽	1.937 0	0.338 7	2.275 7
7219	2013.02	安徽晋阳/安徽	0.619 9	0.128 7	0.748 6
7220	2013.02	河北安国/安徽	1.626 0	0.298 1	1.924 1
7221	2013.02	河南安阳/山东	2.439 0	0.482 8	2.921 8
7222	2013.02	河南安阳/河南	2.406 0	0.404 0	2.810 0
7223	2013.02	河南安阳/河南	0.255 2	0.074 9	0.330 1
7224	2013.02	湖北武汉/湖北	0.530 4	0.228 5	0.758 9
7367	2013.01	河北安国/河南	1.176 0	0.276 1	1.452 1
7368	2013.01	河北安国/不详	1.341 0	0.218 2	1.559 2
平均含量,mg/g			1.399 7	0.244 8	1.639 1

3 讨论

本研究测定12批不同产地的旋覆花药材样品,除7219、7223、7224这3批样品中旋覆花素和去乙酰旋覆花素两种成分的含量均较低外,其余9批样品中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量分别在1.176 0~2.439 0 mg/g和0.114 9~0.482 8 mg/g范围内。观察7219、7223、7224这3批样品的性状,发现其颜色暗黄,推测其可能存放时间过久,导致旋覆花素含量明显降低。提示在使用旋覆花药材时,应注意药材存放时间,以保证其药效。

综上所述,本方法操作简便,结果准确、可靠,可用于评价旋覆花药材的质量。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:305.
 [2] 成向荣.四种旋覆花属植物的化学成分及生物活性研究[D].上海:上海交通大学,2012.
 [3] 潭江江.四种旋覆花属药用植物中新型倍半萜的发现及生物活性研究[D].上海:上海交通大学,2011.

[4] Qin JJ, Jin HZ, Huang Y, *et al.* New sesquiterpenes from *Inula japonica* Thunb. with their inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages[J]. *Tetrahedron*, 2010, 66(48): 9 379.
 [5] 王建华,侯艳鹏,蔡少青,等.旋覆花素镇咳祛痰作用的实验研究[C]//中国国际医药博览会论文集.北京:中国评论学术出版社,2003.
 [6] 李睿,刘彬,郑斌,等.旋覆花内酯抑制炎症因子介导的内皮细胞与单核细胞的黏附[J].细胞生物学杂志,2008,30(6):755.
 [7] 郭伟琳,冷红琼,邓亮,等.UPLC法同时测定旋覆花属植物中2种倍半萜内酯成分的含量[J].昆明医科大学学报,2012(12):4.
 [8] 杨茜,刘慧,何雅君.HPLC法同时测定旋覆花属植物中5种倍半萜内酯成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2012,29(2):116.
 [9] 董政起,陈昕,高军,等.HPLC-ELSD法测定不同产地欧亚旋覆花中1-O-乙酰旋覆花内酯的含量[J].中国药师,2012,15(4):443.
 [10] 王维娜,王云志,张嫡群.旋覆花1-O-Acetylbritannilactone RP-HPLC含量测定方法的研究[J].药物分析杂志,2005,25(2):205.
 [11] Wei X, Zhang K, Xue N, *et al.* Differentiation of genuine *Inula britannica* L. and substitute specimens based on the determination of 15 components using LC-MS/MS and principal components analysis[J]. *Food Chem*, 2013, 141(4):4 019.
 [12] 耿红梅.RP-HPLC法同时测定欧亚旋覆花中4种黄酮的含量[J].中国药房,2009,20(27):2 122.
 [13] 何国云,李钢,耿红梅.旋覆花的研究进展[J].中国医学创新,2012,9(27):161.
 [14] 侯艳鹏,王建华,尚明英,等.旋覆花药材HPLC指纹图谱研究[J].中国药学杂志,2002,37(12):894.

(收稿日期:2015-06-13 修回日期:2015-10-24)

(编辑:刘柳)

国家卫生计生委副主任王国强赴科研院所和中国疾控中心妇幼中心调研

本刊讯 2015年12月17日,国家卫生计生委副主任王国强轻车简从,到国家卫生计生委科学技术研究所和中国疾病预防控制中心妇幼保健中心进行调研。王国强副主任深入到每个科室,详细了解部门情况,召开座谈会,全面听取科研院所和妇幼中心的工作汇报。

王国强充分肯定科研院所和妇幼中心的工作。他指出,科研院所和妇幼中心的工作要进一步服务于国家发展的大局,更加符合国家长期发展趋势和战略需求。科研院所和妇幼中心要进一步深入学习十八届三中、四中、五中全会精神,进一步深入学习习近平总书记的系列重要讲话精神,学习“四个全面”战略布局,学习“创新、协调、绿色、开放、共享”五大发展理念。要深入研究完善计划生育政策重大战略调整带来的机遇和挑战。要将政策转化为措施,措施转化为服务,为人民群众

切实带来实实在在的幸福感。

王国强强调,要深入学习研究健康中国战略,认真研究新时期新要求。妇幼健康和计划生育/生殖健康工作服务对象首先是健康人群,要以预防为主,重在预防,关口前移。在新时期,避孕节育的内在需求更加突出。科研院所和妇幼中心要根据社会发展的新形势,确定工作的新方向。

王国强要求,科研院所和妇幼中心工作要瞄准国际。人均期望寿命、孕产妇死亡率、五岁以下儿童死亡率是国际上衡量一个国家健康水平的主要指标,充分说明科研院所和妇幼中心工作的重要性。要学习国际先进经验,逐步理顺体制机制,构建预防、科研、保健、医疗、管理、服务于一体的体系,为提升出生人口素质和健康中国战略做出更大的贡献。