

## RP-HPLC 同时测定湖北旋覆花中 3 种倍半萜内酯的含量

王晓蕾<sup>1</sup>, 李香荷<sup>1</sup>, 郭毅<sup>2</sup>, 祁金龙<sup>1</sup>, 苏林飞<sup>1</sup>, 付焱<sup>1\*</sup>

(1. 河北医科大学 药学院 新药开发研究室, 河北 石家庄 050017;

2. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

**摘要** 目的: 建立 RP-HPLC 同时测定湖北旋覆花中锦菊素, 二氢锦菊素, 银胶菊素 3 种倍半萜内酯含量的方法。方法: Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水, 线性梯度洗脱, 测定波长 210 nm, 柱温 40 °C, 流速 1.2 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL。结果: 锦菊素, 二氢锦菊素, 银胶菊素的质量浓度分别在 0.017 92 ~ 0.179 2 g · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 9$ ), 0.042 4 ~ 0.424 0 g · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 6$ ), 0.044 8 ~ 0.448 0 g · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 6$ ) 时线性关系良好, 平均加样回收率依次为 98.5%, 98.2%, 98.4%, RSD 为 1.3%, 1.3%, 1.7%。不同品种旋覆花药材中 3 种倍半萜内酯的含量差异较大。结论: 该方法简便、快速、准确, 适合于同时测定湖北旋覆花中锦菊素, 二氢锦菊素, 银胶菊素的含量, 可用于湖北旋覆花的质量控制和旋覆花药材的真伪鉴定。

**关键词** RP-HPLC; 湖北旋覆花; 倍半萜内酯; 锦菊素; 二氢锦菊素; 银胶菊素

菊科旋覆花属 *Inula* 植物长期广泛入药, 药用历史悠久, 其花(又称旋覆花)具有健胃下气, 散结行水, 降逆止呕, 消痰, 消炎, 驱虫等功效。2010 年版《中国药典》规定旋覆花 *I. japonica* Thunb. 及欧亚旋覆花 *I. britannica* L. 的干燥头状花序作为正品药源。目前我国市场上旋覆花的使用资源呈现多源性<sup>[1]</sup>, 本课题组前期对国内市售旋覆花药材的氯仿部分化学成分进行研究, 已发现疑似旋覆花的伪品——湖北旋覆花 *I. hupehensis*<sup>[2]</sup>, 该药材氯仿部分化学成分色谱特性不同于中药旋覆花, 已鉴定的欧亚旋覆花中 6 个倍半萜内酯<sup>[3]</sup>均未检出。湖北旋覆花在湖北、湖南及四川部分地区使用已有几十年历史, 药用量也较大, 已经成为这些地区的主流旋覆花商品<sup>[4]</sup>。目前, 国内外对湖北旋覆花的报道很少<sup>[5-6]</sup>, 尤其是含量测定方面还是一个空白。为了实现根据化学成分将湖北旋覆花与现行药品标准规定种属的旋覆花相区别, 并对该植物进一步研究与开

发, 本研究采用系统分离法制备了有抗炎和抗癌活性的 3 种倍半萜内酯锦菊素, 二氢锦菊素, 银胶菊素<sup>[7-12]</sup>, 并以其为对照品(纯度均在 99.5% 以上), 建立了 RP-HPLC 同时测定湖北旋覆花中这 3 种倍半萜内酯含量的方法, 并应用于市售旋覆花药材的检测, 为建立湖北旋覆花的质量评价体系 and 采用现代技术鉴定旋覆花药材提供了科学依据。

### 1 材料

分析型 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 制备型 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), DHX-9023B 型电热恒温鼓风干燥箱(上海福玛实验设备有限公司), C 型星火玻璃仪器气流烘干器(郑州长城科工贸有限公司), KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), GR-202 型电子分析天平(A&D Company,  $d = 0.01\text{mg}$ ), SZ-93 自动双重纯水蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

旋覆花药材购自四川新荷花中药有限公司, 经河北省药品检验所段吉平主任药师鉴定为湖北旋覆花 *I. hupehensis*。锦菊素, 二氢锦菊素, 银胶菊素为本研究室分离纯化制备, 经质谱(MS)和核磁共振(<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR)确定结构, 其相关数据与文献[13-14]一致, RP-HPLC 归一法测定其纯度分别为 99.6%, 99.6%, 99.7%, 符合定量要求; 甲

稿件编号 20101216013

基金项目 河北省科技厅指令课题(09276418D-2); 河北省卫生厅重大科技攻关项目(08004)

通信作者 \* 付焱, Tel: (0311) 86266335, E-mail: fuyan616@hotmail.com

作者简介 王晓蕾, 硕士研究生, Tel: (0311) 86266335, E-mail: tianshanyoulan@163.com

醇,乙腈为色谱纯(B&J brand),其余试剂均为分析纯,水为本室自制重蒸水,使用前经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

## 2 方法与结果

**2.1 湖北旋覆花中3种倍半萜内酯的制备** 取自四川新荷花中药有限公司的湖北旋覆花(批号2007-06)2 kg,用5倍量的95%乙醇浸泡4 d,过滤,回收乙醇得黑色黏稠膏状物298 g。将膏状物悬浮于400 mL饱和NaCl水溶液中,依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取,取二氯甲烷萃取液减压浓缩回收溶剂,经硅胶柱色谱,得到6个部分,第1部分分离得到化合物银胶菊素,为黄色油状物,即为银胶菊素对照品。第2部分经过反复硅胶柱色谱和制备型高效液相得到化合物锦菊素,二氢锦菊素,均为白色针状结晶,即为锦菊素,二氢锦菊素对照品。

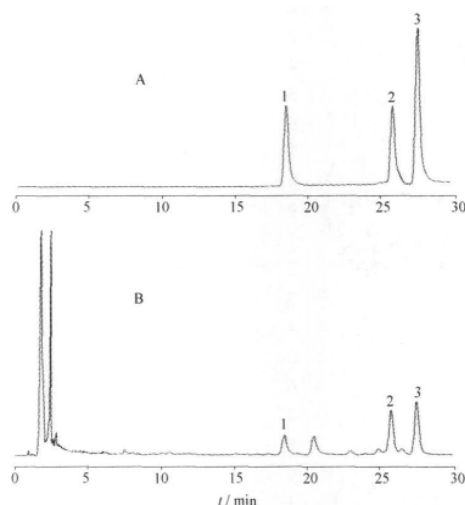
**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取真空干燥至恒重的锦菊素(4.48 mg),二氢锦菊素(10.60 mg),银胶菊素(11.20 mg)置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即得锦菊素质量浓度为 $0.1792\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,二氢锦菊素质量浓度为 $0.4240\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,银胶菊素质量浓度为 $0.4480\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取不同品种和产地旋覆花干燥花序,研细,过40目筛,精密称取0.5 g置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇20 mL,精密称定质量,超声45 min,取出放置至室温,用甲醇补足失重,摇匀,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液为供试品溶液。

**2.4 色谱条件** Agilent  $\text{C}_{18}$  色谱柱( $4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$ )。流动相 乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,0~12 min,72% B,12~30 min,62% B。流速 $1.2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量 $10\ \mu\text{L}$ ,测定波长210 nm,柱温 $40\ ^\circ\text{C}$ 。在此色谱条件下,3个化合物的保留时间在30 min以内,供试品溶液色谱中与各对照品对应的吸收峰的理论塔板数均不低于1万,对应的色谱峰的分度均大于1.5,分离度良好,见图1。

**2.5 线性关系考察** 分别精密量取1, 2, 4, 6, 8, 10 mL的混合对照品溶液置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度。精密量取上述溶液 $10\ \mu\text{L}$ 分别注入液相色谱仪,按2.4项中色谱条件,以峰面积 $Y$ 为纵坐标,对照品质量浓度 $X(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ 为横坐标,绘制标准曲线。化合物锦菊素,二氢锦菊素,银胶菊素的线性方程分别为 $Y = 20324X - 40.1$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y =$

$13203X - 185.62$  ( $r = 0.9996$ ),  $Y = 13583X + 22.317$  ( $r = 0.9996$ )。其线性范围分别为 $0.01792\sim 0.1792$ ,  $0.0424\sim 0.4240$ ,  $0.0448\sim 0.4480\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 锦菊素;  
2. 二氢锦菊素; 3. 银胶菊素。

图1 对照品及样品 HPLC 图

**2.6 精密度试验** 取锦菊素( $0.1792\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),二氢锦菊素( $0.4240\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),银胶菊素( $0.4480\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的混合对照品溶液重复进样5次,测定峰面积。上述3种倍半萜内酯峰面积的RSD依次为1.1%, 0.49%, 0.48%,表明仪器的精密度较好。

**2.7 重复性试验** 称取同一批湖北旋覆花药材样品(批号2007-06)5份,按2.3项操作,平行制备5份试液后进样,锦菊素,二氢锦菊素,银胶菊素平均分别为0.124%, 0.427%, 0.478%, RSD为0.94%, 0.44%, 0.77%,结果表明方法重复性良好。

**2.8 稳定性试验** 取同一批样品制备供试品溶液,室温分别放置0, 4, 8, 12, 16, 24 h后进行HPLC测定,锦菊素,二氢锦菊素,银胶菊素峰面积无明显变化,RSD分别为0.75%, 0.80%, 0.71%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.9 加样回收率试验** 取已知含量的湖北旋覆花样品9份,分别添加一定量的对照品溶液,按2.3项方法进行样品处理后,按2.4项色谱条件测定加样回收率。结果显示,锦菊素,二氢锦菊素,银胶菊素的平均加样回收率分别为98.5% (RSD 1.3%), 98.2% (RSD 1.3%), 98.4% (RSD 1.7%),见表1。

表 1 湖北旋覆花加样回收率(  $n = 6$  )

| 成分    | No | 样品中量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-------|----|----------|---------|---------|--------|----------|--------|
| 锦菊素   | 1  | 0.310 2  | 0.250 8 | 0.554 1 | 97.3   | 98.5     | 1.3    |
|       | 2  | 0.310 6  | 0.250 8 | 0.556 4 | 98.0   |          |        |
|       | 3  | 0.310 7  | 0.250 8 | 0.563 0 | 100.6  |          |        |
|       | 4  | 0.310 1  | 0.304 6 | 0.610 0 | 98.5   |          |        |
|       | 5  | 0.310 2  | 0.304 6 | 0.605 3 | 96.9   |          |        |
|       | 6  | 0.310 8  | 0.304 6 | 0.614 0 | 99.5   |          |        |
|       | 7  | 0.310 1  | 0.358 4 | 0.663 4 | 98.6   |          |        |
|       | 8  | 0.310 3  | 0.358 4 | 0.658 9 | 97.3   |          |        |
|       | 9  | 0.310 3  | 0.358 4 | 0.669 4 | 100.2  |          |        |
| 二氢锦菊素 | 1  | 1.068 3  | 0.848 0 | 1.891 7 | 97.1   | 98.2     | 1.3    |
|       | 2  | 1.069 6  | 0.848 0 | 1.891 9 | 96.9   |          |        |
|       | 3  | 1.070 0  | 0.848 0 | 1.915 9 | 99.7   |          |        |
|       | 4  | 1.067 9  | 1.060 0 | 2.093 3 | 96.7   |          |        |
|       | 5  | 1.068 3  | 1.060 0 | 2.121 8 | 99.4   |          |        |
|       | 6  | 1.070 4  | 1.060 0 | 2.099 6 | 97.1   |          |        |
|       | 7  | 1.067 9  | 1.272 0 | 2.341 2 | 100.1  |          |        |
|       | 8  | 1.068 7  | 1.272 0 | 2.311 4 | 97.7   |          |        |
|       | 9  | 1.068 7  | 1.272 0 | 2.319 5 | 98.3   |          |        |
| 银胶菊素  | 1  | 1.195 9  | 0.896 0 | 2.079 9 | 98.7   | 98.4     | 1.7    |
|       | 2  | 1.197 3  | 0.896 0 | 2.082 7 | 98.8   |          |        |
|       | 3  | 1.197 8  | 0.896 0 | 2.101 2 | 100.1  |          |        |
|       | 4  | 1.195 4  | 1.120 0 | 2.326 1 | 100.1  |          |        |
|       | 5  | 1.195 9  | 1.120 0 | 2.288 2 | 97.5   |          |        |
|       | 6  | 1.198 3  | 1.120 0 | 2.291 9 | 97.6   |          |        |
|       | 7  | 1.195 4  | 1.344 0 | 2.514 6 | 98.2   |          |        |
|       | 8  | 1.196 4  | 1.344 0 | 2.483 3 | 95.8   |          |        |
|       | 9  | 1.196 4  | 1.344 0 | 2.498 8 | 96.9   |          |        |

2.10 样品测定 按 2.3 项样品制备方法,分别制备旋覆花样品溶液,按 2.4 项方法测定旋覆花样品中 3 种倍半萜内酯的含量,结果见表 2。

表 2 不同旋覆花样品中锦菊素,二氢锦菊素,银胶菊素的含量(  $\bar{x} \pm s, n = 3$  ) %

| No. | 种名     | 产地 | 部位  | 批号      | 锦菊素           | 二氢锦菊素         | 银胶菊素          |
|-----|--------|----|-----|---------|---------------|---------------|---------------|
| 1   | 水朝阳旋覆花 | 云南 | 花序  | 2008-05 | 0.072 ± 0.001 | 0.398 ± 0.005 | 0.038 ± 0.000 |
| 2   | 湖北旋覆花  | 湖北 | 花序  | 2009-08 | 0.166 ± 0.003 | 0.497 ± 0.002 | 0.297 ± 0.002 |
| 3   | 湖北旋覆花  | 湖北 | 花序  | 2007-06 | 0.124 ± 0.001 | 0.427 ± 0.003 | 0.478 ± 0.005 |
| 4   | 湖北旋覆花  | 湖北 | 花序  | 2006-04 | 0.158 ± 0.003 | 0.416 ± 0.002 | 0.359 ± 0.002 |
| 5   | 湖北旋覆花  | 湖北 | 舌状花 | 2006-04 | 0.293 ± 0.002 | 0.732 ± 0.002 | 0.603 ± 0.003 |
| 6   | 湖北旋覆花  | 湖北 | 花序托 | 2006-04 | 0.106 ± 0.002 | 0.118 ± 0.001 | 0.188 ± 0.002 |
| 7   | 旋覆花    | 山西 | 花序  | 2008-08 | —             | —             | —             |
| 8   | 旋覆花    | 河北 | 花序  | 2005-06 | —             | —             | —             |
| 9   | 旋覆花    | 河南 | 花序  | 2005-06 | —             | —             | —             |
| 10  | 欧亚旋覆花  | 江苏 | 花序  | 2007-08 | —             | —             | —             |
| 11  | 欧亚旋覆花  | 浙江 | 花序  | 2008-06 | —             | —             | —             |
| 12  | 欧亚旋覆花  | 山西 | 花序  | 2008-05 | —             | —             | —             |
| 13  | 欧亚旋覆花  | 河北 | 花序  | 2009-07 | —             | —             | —             |

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择 本实验采用提取完全,耗时较短的超声提取法。考察了提取时间分别为 20, 30, 40, 45, 50, 60 min 对 3 种物质提取率的影响,结果表明在 45 min 时,提取率最高。

3.2 检测波长的选择 倍半萜内酯类化合物的紫

外吸收一般在 210 nm,采用 PDA 检测器在 210 ~ 400 nm 比较各波长下各组分吸收光谱的差异,经过紫外吸收光谱图显示:锦菊素在 214 nm 处有最大吸收,二氢锦菊素在 210 nm 处有最大吸收,银胶菊素在 202 nm 处有最大吸收,因此在本实验中选定检测波长为 210 nm。

**3.3 分析条件的确定** 实验中考察了不同的色谱条件,以甲醇-水为流动相时,图谱基线不够平稳,延长等度洗脱时间虽然可以达到分离度好的要求,但峰宽较大。以乙腈-水为流动相时,峰宽小,主成分色谱峰分离度较好,见图 1。因此确定湖北旋覆花多成分含量测定的流动相: A 相为乙腈, B 相为水,梯度洗脱,0 ~ 12 min,72% B,12 ~ 30 min,62% B。

### 3.4 对市售旋覆花样品检测

不同品种旋覆花中 3 种倍半萜内酯的含量差异较大,水朝阳旋覆花 *I. helianthus-aquatica* 中锦菊素,银胶菊素含量低,而二氢锦菊素含量较高;湖北旋覆花中 3 种倍半萜内酯的含量均高于水朝阳旋覆花,且不同批号的湖北旋覆花的 3 种倍半萜内酯的含量略有差异,药材的采摘时间以及储存时间可能是引起差异的主要因素;湖北旋覆花舌状花中 3 种倍半萜内酯的含量是最高的,分别是 0.293%,0.732%,0.603%,说明 3 个化合物主要分布在舌状花中,在花序托中含量很低;3 种倍半萜内酯在旋覆花和欧亚旋覆花中均未检出。

本研究所建立的同时测定湖北旋覆花中 3 种倍半萜内酯的 RP-HPLC 方法,可在 30 min 内将 3 种目标化合物完全分离,方法简单、快速,精确度和灵敏度高,能够满足实际样品检测的需要。锦菊素,二氢锦菊素和银胶菊素是在中药旋覆花伪品湖北旋覆花、水朝阳旋覆花中检出的 3 种倍半萜内酯,最近有报道锦菊素和银胶菊素也分别是中药旋覆花伪品显脉旋覆花<sup>[13]</sup>和线叶旋覆花<sup>[14]</sup>的化学成分之一。因此,在旋覆花原有药材形态学和薄层定性研究的基础上,这 3 种倍半萜内酯的 RP-HPLC 将为区分现行药品标准规定种属旋覆花和其他旋覆花品种提供了一个更直观、更准确的定性和定量技术手段,

该方法的广泛适用性是本课题进一步研究的方向。

### 参考文献

- [1] 张西国,戚秀萍. 旋覆花的药材鉴别 [J]. 时珍国医国药,2005,16(10):1016.
- [2] Shi X W, Qi J L, Wu Y B, et al. Simultaneous quantification of six sesquiterpene lactones in *Inula britannica* L. by RP-LC [J]. Chromatographia, 2008, 68(3/4): 281.
- [3] Qi J L, Fu Y, Shi X W, et al. Sesquiterpene lactones and their anti-tumor activity from the flowers of *Inula britannica* [J]. Lett Drug Des Discov, 2008, 5(7): 433.
- [4] 蔡崇高,李水福. 旋覆花的真伪优劣判定 [J]. 中草药,2003,35(6):697.
- [5] 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.
- [6] 陈声高. 细枝岩黄芩和湖北旋覆花化学成分研究 [D]. 兰州:兰州大学,2007.
- [7] Wang Q, Zhou B N, Zhang R W. Cytotoxicity and NMR spectral assignments of ergolide and bigelovin [J]. Planta Med, 1996, 62(2):166.
- [8] Han J W, Lee B G, Kim Y K, et al. Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula Britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF- $\kappa$ B [J]. Brit J Pharmacol, 2001, 133(4):503.
- [9] 张人伟,林咏月,戚育芳. 水朝阳草抗癌化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发,1997,10(1):31.
- [10] 梁明达,胡美英,梁红,等. 水朝阳草抗癌化学成分的筛选研究 [J]. 中国民族民间医药杂志,1998,35:23.
- [11] 张馨予,王喆星,单俊杰. 旋覆花属植物化学成分及生物活性的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志,2008,35(6):436.
- [12] Rozenblat S, Rossman S, Argalit B. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(3):369.
- [13] Lee H T, Yang S W, Kim K H, et al. Pseudoguaianolides isolated from *Inula britannica* var *chinensis* as inhibitory constituents against inducible nitric oxide synthase [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(2):151.
- [14] Kazuo I, Toshiyuki I. Seven sesquiterpene lactones from *Inula britannica* var. *chinensis* [J]. Phytochemistry, 1981, 20(1):271.
- [15] 严岚. 显脉旋覆花的化学成分研究 [D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [16] 聂利月. 线叶旋覆花的化学成分研究 [D]. 上海:上海交通大学,2010.

## Simultaneous determination of three sesquiterpene lactones in *Inula hupehensis* by RP-HPLC

WANG Xiaolei<sup>1</sup>, LI Xianghe<sup>1</sup>, GUO Yi<sup>2</sup>, QI Jinlong<sup>1</sup>, SU Linfei<sup>1</sup>, FU Yan<sup>1\*</sup>

(1. Department of Drug Discovery School of Pharmaceutical Science Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** A RP-HPLC method was developed for simultaneous determination of bigelovin, ergolide and tomentosin in *Inula hupehensis*. **Method:** An Agilent C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for separation at 40 °C. The mobile phase was acetonitrile-water, and the flow rate was 1.2 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 210 nm. **Result:** The method has good linearity in the ranges of 0.0179 2-0.179 2 g · L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ) for bigelovin, 0.042 4-0.424 0 g · L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 6$ ) for ergolide, and 0.044 8-0.448 0 g · L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 6$ ) for tomentosin. The average recoveries of bigelovin, ergolide, and tomentosin were 98.5%, 98.2%, 98.4%, with the RSD of 1.3%, 1.3%, 1.7%, respectively. The results demonstrated that there was a significant difference in the contents of three sesquiterpene lactones among the tested *Inulae* Flos. **Conclusion:** The results indicated that the present RP-HPLC method is simple, quick and accurate, and can be used for the quality control of *I. hupehensis*, especially for the authentication of *Inulae* Flos.

**[Key words]** RP-HPLC; *Inula hupehensis*; sesquiterpene lactones; bigelovin; ergolide; tomentosin

doi: 10.4268/cjcmm20111815

责任编辑 丁广治

### 本刊重要启事

本刊已开通在线支付功能,作者请登录本刊网站 [www.cjcmm.com.cn](http://www.cjcmm.com.cn) “作者中心”,点击在线充值,可以选择网上银行(没开通网银功能的帐户可以选择信用卡充值)和手机充值卡2种充值方式,充值成功后系统会显示您的账号余额。然后您可以根据稿件状态和编辑部邮件通知来缴纳相应的费用,如审稿费,发表费等。如有疑问请咨询周驰编辑:13810178861,21310385@qq.com。