

反相高效液相色谱法测定款冬花中的款冬酮含量^{*}刘玉峰, 杨秀伟^{**}

(北京大学药学院天然药物学系 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 目的: 建立款冬花药材中款冬酮的高效液相色谱分析方法, 对来源于 8 个地区、9 个批次的商品款冬花药材和 1 个主产区款冬花药材中的款冬酮进行定量分析。方法: 款冬花经粉碎后用 95% 乙醇超声提取; 以 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-水 (85:15, v/v) 为流动相, 流速为 1 mL·min⁻¹, 分析时间为 15 min, 紫外检测波长为 220 nm, 进样体积为 20 μL; 以保留时间定性, 外标法定量。结果: 款冬酮的保留时间为 12.29 min, 款冬酮浓度在 26.5~212 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=0.9997$); 最低检测限为 0.54 μg·mL⁻¹, 最低定量限为 1.75 μg·mL⁻¹; 日内和日间 RSD 分别为 0.76% ($n=6$) 和 0.69% ($n=4$); 低、中、高 3 个浓度的加样回收率 ($n=6$) 分别为 99.35%, 106.4%, 95.88%, RSD 分别为 3.9%, 1.5%, 0.60%。结论: 本方法准确、快速、简便, 重复性好, 适用于款冬花样品中款冬酮的分析。

关键词: 反相高效液相色谱; 款冬花; 款冬酮

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0031-04

RP-HPLC determination of tussilagone in Flos Farfarae^{*}LIU Yu-feng YANG Xiu-wei^{**}

(Department of Natural Medicines and State Key Laboratory of Natural & Bioimetic Drugs

School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for the determination of tussilagone in the flower buds of *Tussilago farfara* L. (Flos Farfarae) from crude drug market of eight different areas, nine batches and crude drug of one main production area. **Methods** The crude drug was extracted by 95% ethanol after crush under ultrasonic extractor and then analysed. The chromatographic column Diamonsil™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with methanol-water (85:15, v/v) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, analytical time was 15 min, UV detection wavelength was set at 220 nm, and injection volume was 20 μL. The analyte was qualified by retention time and quantitated by peak area using external reference standard calibration curve. **Results** The retention time of tussilagone was 12.29 min. There were excellent linearity between peak area and concentration of analyte in the concentration range of 26.5~212 μg·mL⁻¹ for tussilagone, and the correlation coefficient was 0.9997. The limits of detection and quantification were 0.54 and 1.75 μg·mL⁻¹, respectively. The intra- and inter-day RSDs were 0.76% ($n=6$) and 0.69% ($n=4$), respectively. The added recoveries ($n=6$) were 99.35%, 106.4% and 95.88%, and RSDs were 3.9%, 1.5% and 0.60% at low, medium and high levels, respectively. **Conclusion** This method is accurate, quick, simple and reproducible and can be used to determine the content of tussilagone in Flos Farfarae.

Key words RP-HPLC; Flos Farfarae; tussilagone

传统中药款冬花为菊科植物 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 主产于山西、河南、陕西、甘肃等地, 系常用中药, 具有润肺下气、止咳化痰之功效, 用于

新久咳嗽、喘咳痰多和劳嗽咳血等^[1]。化学研究工作表明其主要含有倍半萜、三萜、绿原酸、黄酮、生物碱、苯二甲酸酯、脂肪酸及其酯和挥发性物质

* 国家“863”计划 (No. 2004AA2Z3730-07) 资助项目; 国家药典委员会基金项目 (No. YD-077)

** 通讯作者 Tel: (010) 82805106 E-mail: xwyang@bjnu.edu.cn

等^[2-5]; 药理学研究工作表明其含有的主要化学成分款冬酮(tussilagone)对血小板活化因子具有较强的抑制作用^[6], 对心血管和呼吸系统具有较强的刺激作用^[7]。在对国家中药材规范化种植基地中药质量评价的系统性研究中, 我们以山西“国家中药款冬花 GAP 基地”栽培的款冬花为实验材料, 对其化学成分进行了研究^[2-4]。本项研究工作选择款冬花有效成分之一的款冬酮^[6,7]为指标性成分, 采用反相高效液相色谱法定量测定了 8 个地区、9 个批次的商品款冬花药材和 1 个主产区款冬花药材中的款冬酮含量, 结果表明该方法具有准确、快速、简便以及重复性好等特点, 现将结果报道如下。

1 仪器和试剂

DDNEX 高效液相色谱仪系统 (DDNEX Co., München, 德国); DIONEX P680 型泵、UVD 170U 型检测器和 Chromeleon Version 6.50 数据处理工作站; KQ3200 超声仪 (昆山市超声仪器有限公司产品); 甲醇为色谱纯 (天津市西华特种试剂厂), 水为自制双蒸水, 其他试剂为分析纯。款冬酮 (化学结构见图 1) 对照品由本文作者从款冬花中提取分离^[4], 经上述仪器检测, 面积归一化法计算其纯度大于 98%。

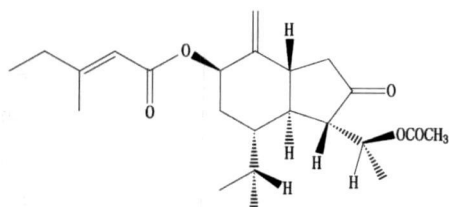


图 1 款冬酮的化学结构

Fig 1 Chemical structure of tussilagone

1 批次山西省大同市广灵县加斗乡“国家中药款冬花 GAP 基地”栽培的款冬花药材和 8 个省份 9 批次商品款冬花药材由北京大学药学院杨秀伟教授鉴定为菊科植物款冬花 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾。

2 溶液制备

2.1 供试品溶液 分别精确称取款冬花样品粉末 (过 40 目筛) 1 g 置具塞三角瓶中, 精密加入 95% 乙醇 20 mL, 密塞, 称重, 超声提取 (120 W, 50 kHz) 1 h, 称重, 加 95% 乙醇补足失重, 经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 对照品储备液 精密称取款冬酮 5.3 mg 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (85:15 v/v) 溶解, 并定容至 25 mL, 得 212 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

3 色谱条件与系统适用性试验

Dikma DionasilTM C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm,

5 μm), 偶联 Dikma EasyGuard C₁₈ 保护柱 (4.6 mm × 20 mm), 中国北京 Dikma 公司; 流动相: 甲醇-水 (85:15 v/v); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。在本实验色谱条件下, 对照品及基地栽培药材的色谱图见图 2。款冬酮的保留时间为 12.29 min, 理论塔板数为 6150。在上述色谱条件下对供试品溶液进行分析, 计算其与前后峰间的分离度为 1.68, 可对其进行定量分析。

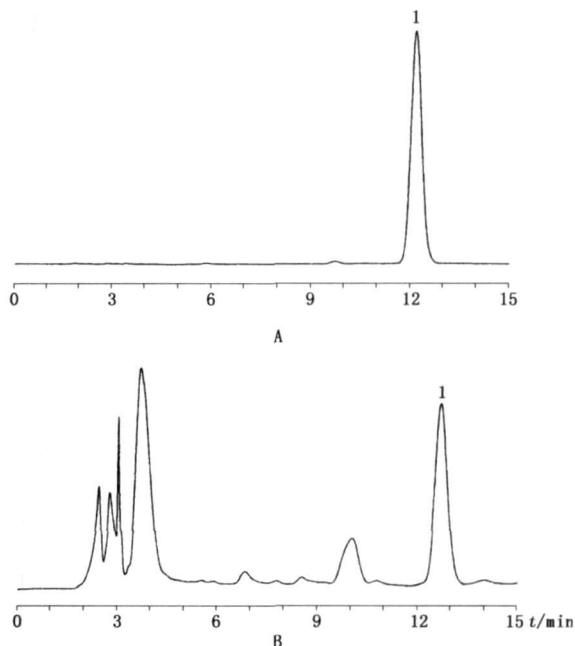


图 2 对照品 (A) 和山西大同基地栽培药材提取物 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC profile of standard tussilagone (A) and extract of *Tussilago farfara* from the China National GAP Base of Traditional Chinese Medicine in Datong city of Shanxi province (B)

1. 款冬酮 (tussilagone) 12.29 min

4 方法学考察

4.1 线性关系和检出限考察 分别精密吸取对照品储备液适量, 用甲醇-水 (85:15 v/v) 稀释, 制得梯度浓度系列对照品溶液: 212, 159, 106, 79.5, 53, 26.5 μg·mL⁻¹。精密吸取以上对照品溶液各 20 μL, 进样 HPLC 分析, 每个浓度进样 3 次。以浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行回归分析, 得标准曲线方程:

$$Y = 0.7949X + 0.9143 \quad r = 0.9997$$

款冬酮浓度在 26.5~212 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 该标准曲线可用于样品中款冬酮的含量计算。按信噪比 3:1 确定最低检测限为 0.54 μg·mL⁻¹; 按信噪比 10:1 确定最低定量限为 1.75 μg·mL⁻¹。

4.2 仪器精密性试验 按“2.1”项下处理方法得到的基地栽培药材的供试品溶液, 在相同条件下连

续进样 6 次, 用款冬酮峰的保留时间和峰面积的 RSD 值来评价精密度。结果保留时间的 RSD 为 0. 17%, 峰面积的 RSD 为 0. 81%。说明仪器操作过程中精密度良好。

4.3 重复性试验 取基地栽培药材粉末 1 g 按“2. 1”项下方法制备供试品溶液平行 6 份, 每个供试品溶液分别进样分析 2 次, 用款冬酮峰的保留时间和峰面积的 RSD 来评价重复性。结果保留时间的 RSD 为 1. 2%, 峰面积的 RSD 为 2. 7%。说明该方法有良好的重复性。

4.4 稳定性试验 新制备的基地栽培药材的供试品溶液, 室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 进样分析。用款冬酮峰的保留时间和峰面积的 RSD 来评价其稳定性。结果保留时间的 RSD 为 0. 69%, 峰面积的 RSD 为 1. 6%。说明款冬酮在供试品溶液中室温下放置 24 h 稳定性良好。

4.5 加样回收率试验 精密称取款冬酮对照品适量, 加甲醇溶解, 并配成 26. 5, 53. 0, 106. 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 种浓度。精密称取基地栽培药材粉末 1

g 平行操作 6 份, 分别精密加入低、中、高 3 种浓度的对照品溶液, 加入量分别为 0. 53, 1. 06, 2. 12 mg, 然后将甲醇减压蒸干, 按“2. 1”项下方法制成所需溶液, 并按上述色谱条件每份溶液进样测定 3 次, 计算款冬酮的含量, 求得加样回收率和 RSD。结果低、中、高 3 个浓度的加样回收率 ($n=6$) 分别为 99. 35%, 106. 4%, 95. 88%; RSD 分别为 3. 9%, 1. 3%, 0. 60%。

4.6 日内和日间精密度试验 取 79. 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液分别进行日内精密度 ($n=6$) 和日间精密度 ($n=4$) 测定, 日间精密度测定连续 4 d, 每天 4 次, 以计算峰面积的 RSD 来评价日内和日间精密度。结果日内和日间精密度的 RSD 分别为 0. 76% 和 0. 69%, 说明本方法精密度良好。

5 样品测定

取不同来源样品按“2. 1”项下方法制备供试品溶液, 进行 HPLC 分析测定, 每次进样 20 μL ($n=3$)。根据峰面积值从款冬酮标准曲线方程计算款冬花药材中款冬酮的含量, 结果见表 1。

表 1 不同商品或产地的款冬花药材

Tab 1 Sources of *Fbs Farfarae* samples

序号 (No.)	采集/收集地 (collected sample place)	采集/收集时间 (collected sample date)	含量 (content) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	基地栽培 (produced in the China National GAP Base of Traditional Chinese Material Medica)	2004 年 10 月 (Oct. 2004)	1. 44
2	济南市 (Jinan city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	1. 20
3	郑州市 (Zhengzhou city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	0. 84
4	南宁市 (Nanning city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	1. 30
5	乌鲁木齐市 (Urumchi city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	0. 70
6	西安市 (Xi'an city)	2005 年 10 月 (Oct. 2005)	1. 02
7	沈阳市 (Shenyang city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	0. 79
8	呼和浩特市 (Hohhot city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	1. 00
9	石家庄市 (Shijiazhuang city)	2005 年 10 月 (Oct. 2005)	0. 79
10	安国市 (Anguo city)	2005 年 12 月 (Dec. 2005)	0. 82

6 讨论

6.1 提取方法学考察

以 1 g 基地栽培药材粉末为考察对象, 采用四因素三水平 $L_9(3^4)$, 以款冬酮峰面积为考察指标进行

提取方法学评价。实验方案见表 2, 结果见表 3。根据极差值结果, 可以直观地看出对款冬酮提取率的影响因素为提取方式 > 提取溶剂 > 溶剂体积 > 提取时间。由表 4 的方差分析结果得到了进一步证实。

表 2 优化提取方法的主因素和水平表

Tab 2 Main factors and their level settings used for optimization of the extraction

水平 (level)	因素 (factors)			
	A[提取溶剂 (extraction solvents)]	B[提取时间 (extraction time) / h]	C[提取方法 (extraction method)]	D[溶剂体积 (volume of solvents) / mL]
1	甲醇 (methanol)	0. 5	超声 (ultrasonic)	20
2	95% 乙醇 (95% ethanol)	1. 0	回流 (reflux)	40
3	70% 乙醇 (70% ethanol)	1. 5	冷浸 (soaking at room temperature)	60

表 3 优化提取方法 $L_9(3^4)$ 矩阵表

Tab 3 $L_9(3^4)$ Matrix as the experimental design for optimization of the extraction

实验序号 (experimental number)	A	C	D	B	峰面积 (peak area) /mAU·min
1	1	1	1	1	76.5428
2	1	2	2	2	72.6296
3	1	3	3	3	38.8773
4	2	1	2	3	77.9346
5	2	2	3	1	77.3862
6	2	3	1	2	52.9809
7	3	1	3	2	75.0708
8	3	2	1	3	73.0166
9	3	3	2	1	40.7204
水平 1(Level1)	188.0497	229.5482	202.5403	194.6494	
水平 2(Level2)	208.3017	223.0324	191.2846	200.6813	
水平 3(Level3)	188.8078	132.5786	191.3343	189.8285	
X_1	62.683	76.516	67.513	64.883	
X_2	69.434	74.344	63.762	66.894	
X_3	62.936	44.193	63.778	63.276	
极差 (range)	6.751	32.323	3.751	3.618	
总和 (total summary)	585.1592	585.1592	585.1592	585.1592	

表 4 方差分析结果 ($\alpha=0.05$)

Tab 4 Results of variance analysis

因素 (factors)	偏差平方和 (sum of squares of deviations)	自由度 (degrees of freedom)	F (F critical value)	显著性 (significance)
A	87.859	2	4.457	19.000
C	1958.605	2	99.361	19.000
D	28.030	2	1.422	19.000
B(误差项) B(error item)	19.712	2		

* 因素 C 在实验中对款冬酮提取的影响显著 (Factor C was the significant factor to the extraction of tussilagone)

另补做了提取溶剂为 10 mL 的试验,其结果 (数据未给出)与 20 mL 的并无显著性差异,考虑到 20 mL 容易操作,故采用 20 mL 提取溶剂。

根据上述结果,认为最佳提取方法为:溶剂 (A) 为 95% 乙醇,时间 (B) 为 1 h 提取方式 (C) 为超声,溶剂体积 (D) 为 20 mL。具体操作如“2.1”项所述。

6.2 检测波长的选择 取款冬酮用甲醇-水 (85:15 v/v) 溶解,进行紫外全波长扫描,其最大吸收波长为 220 nm,因此,确定检测波长为 220 nm。

6.3 流动相的选择 用 RP-HPLC 方法定量测定款冬花药材中款冬酮的含量,未见文献报道;比较了多种流动相体系,如甲醇-水比例为 70:30、80:20、85:15 等。结果使用前两者,款冬酮峰的保留时间靠后;使用后者,款冬酮峰保留时间适中,分离效果好,且无干扰。

6.4 小结 从测定结果来看,基地栽培的款冬花药材中款冬酮含量最高,不同省份的商品款冬花药材中的款冬酮含量存在着一定的差异,有必要对其进行质量控制。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. VolI (一部): 232

2 LIU Yu-feng (刘玉峰), YANG Xu-wei (杨秀伟), WU Bin (武滨). Studies on chemical constituents in the buds of *Tussilago farfara* (款冬花化学成分的研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(22): 2378

3 Liu YF, Yang XW, Wu B. GC-MS analysis of essential oil constituents from buds of *Tussilago farfara* L. *J Chin Pharm Sci* (中国药科学 英文版), 2006, 15(1): 10

4 Liu YF, Yang XW, Wu B. Chemical constituents of the flower buds of *Tussilago farfara*. *J Chin Pharm Sci* (中国药科学 英文版), 2007, 16(4): 288

5 Shi W, Han GQ. Chemical constituents of *Tussilago farfara* L. *J Chin Pharm Sci* (中国药科学 英文版), 1996, 5(2): 63

6 HAN Gui-qiu (韩桂秋), YANG Yan-jun (杨燕军), LI Chang-ling (李长龄), et al The investigation of principles against platelet activating factor (PAF) from *Tussilago farfara* L. (款冬花抗血小板活化因子活性成分的研究). *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1987, 19(1): 33

7 Li YP, Wang YM. Evaluation of tussilagone: a cardiovascular- respiratory stimulant isolated from Chinese herbal medicine *Gen phamacol* 1988, 19(2): 261

(本文于 2007 年 12 月 19 日收到)