

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

郭伟琳^{1,2)}, 冷红琼¹⁾, 邓亮¹⁾, 郭亚东¹⁾, 沈志强¹⁾

(1) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500; 2) 玉溪市人民医院, 云南玉溪 653100)

[摘要] **目的** 建立超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 快速测定旋覆花属植物中 2 种倍半萜内酯的含量. **方法** 仪器为 Waters ACQUITY Ultra Performance LC™ 超高效液相色谱仪, 带有二极管阵列检测器, 检测波长 205 nm, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.4 mL/min, 柱温:25℃. **结果** 2 种倍半萜内酯在 7 min 内完成测定. **结论** 该方法简单、准确可靠、重复性良好, 可用于旋覆花属植物中 2 种倍半萜内酯含量的快速测定.

[关键词] 旋覆花; 倍半萜内酯; 含量测定; 超高效液相色谱

[中图分类号] R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 12-0004-04

Determination of the Contents of Two Sesquiterpenes in Inula Plants with UPLC

GUO Wei-lin^{1,2)}, LENG Hong-qiong¹⁾, DENG Liang¹⁾, GUO Ya-dong¹⁾, SHEN Zhi-qiang¹⁾

(1) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) People's Hospital of Yuxi City, Yuxi Yunnan 653100, China)

[Abstract] **Objective** To determine the contents of two active sesquiterpenes in Inula plants with UPLC.

Methods The equipment was Waters ACQUITY Ultra Performance LCTM UPLC. Detection wavelength was 205 nm. The column was Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm 2.1 mm, 1.7 μm). Mobile phase: A was acetonitrile and B was water with gradient elution. Flow speed was 0.4 mL/min, and the temperature of column was 25℃. **Result** Two sesquiterpenes (inulicin and ivangustin) were separated at baseline within 7 min.

Conclusion The method was simple and accurate with good reproducibility, can be used to determine quickly the contents of two sesquiterpenes in Inula plants.

[Key words] Inula plant; Sesquiterpenes; Content determination; UPLC

菊科旋覆花属 (Inula L.) 植物全世界约有 100 种, 分布于欧洲、亚洲及非洲等地, 以地中海地区为主. 我国有 20 余种. 本属多种植物常供药用, 如土木香 (I. helenium) 可作为健胃、利尿、祛痰和驱虫药; 大花旋覆花 (I. britannica) 具有消痰、下气、软坚、行水等功效^[1]. 倍半萜类化学成分是本属植物的特征性成分^[2], 有文献报道倍半萜内酯类化合物对一氧化氮 (NO) 的产生有抑制作用^[3,4], 以及抗肿瘤作用^[5]. 杨茜等^[6]用 HPLC 对旋覆花属植

物中 5 种倍半萜内酯类化合物含量进行测定, 需要 55 min. 本文采用 UPLC 法快速测定旋覆花属植物中 2 种倍半萜内酯的含量, 7 min 内完成, 可以用于快速检测.

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

Waters ACQUITY Ultra Performance LC™ 超高效

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81160401)

[作者简介] 郭伟琳 (1980~), 女, 云南西双版纳州人, 在读硕士研究生, 主管药师, 主要从事医院药剂工作.

[通讯作者] 邓亮. E-mail:65113603@qq.com

液相色谱仪 (带有二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司). T6328B 型万分之一电子天平 (上海), 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司), Millipore Milli-Q 超纯水器 (美国 Millipore 公司).

乙腈为色谱纯 (TEDIA 公司), 乙醇为分析纯 (天津市风船化学试剂科技有限公司), 水为 Milli-Q 超纯水.

1.2 色谱条件

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱 (见表 1), 流速 0.4 mL/min, 柱温 25°C,

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution process

时 间 (min)	乙腈 (%)	水 (%)
0	20	80
5	30	70
10	50	50
12	90	10
18	20	80

检测波长 205 nm, 进样量 5 μL.

1.3 实验方法

1.3.1 对照品溶液配制 精密称取旋覆花次内酯 6.7 mg, ivangustin 5.5 mg, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用乙醇溶解并稀释至刻度, 制成质量浓度为 0.67, 0.55 mg/mL 的单一成分对照品储备液. 分别精密量取 1 mL 对照品储备液于 10 mL 容量瓶中, 用乙醇定溶即得每 1 mL 含旋覆花次内酯 0.067 mg 及 ivangustin 0.055 mg 的对照品混合溶液.

1.3.2 供试品溶液配制 取药材粉末约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 磨口锥形瓶中, 加入 60%乙醇 25 mL, 盖上磨口塞, 称定重量, 置于超声波清洗器中超声 45 min, 放冷, 用 60%乙醇补足重量, 摇匀后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液.

2 结果

在选定的色谱条件下, 混合对照品及样品色谱图见图 1.

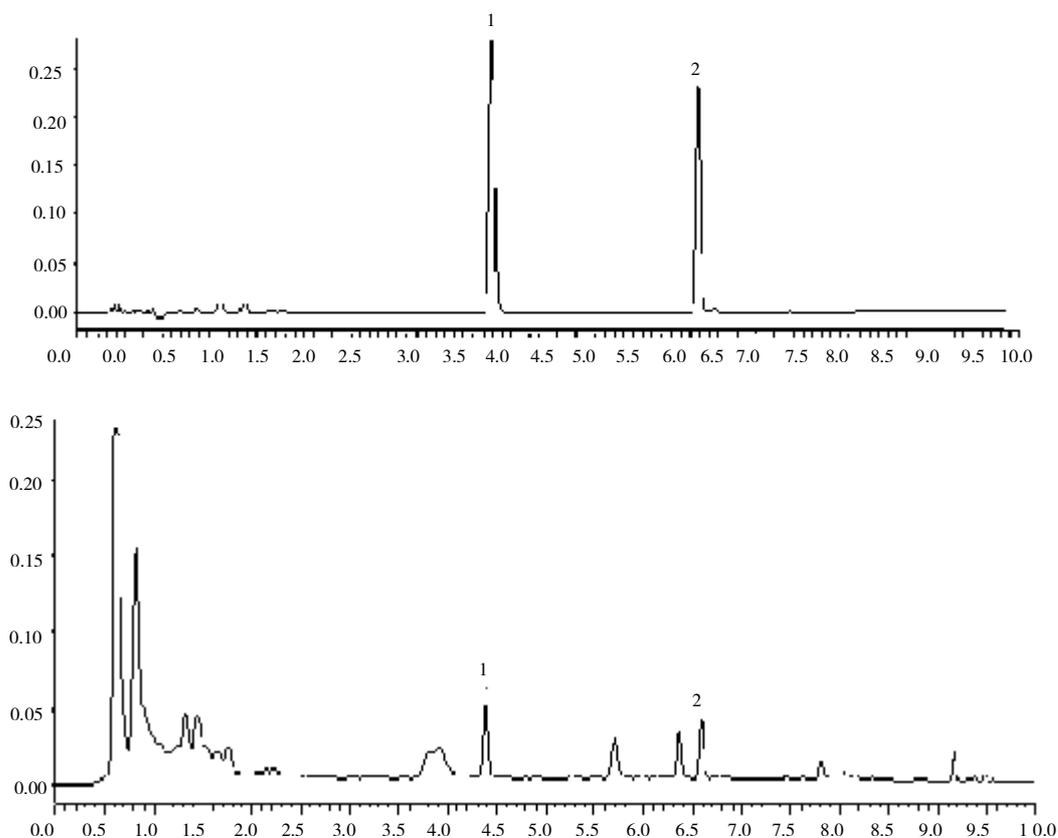


图 1 混合对照品 (A), 样品 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard and sample

1:旋覆花次内酯; 2:ivangustin.

2.1 工作曲线

精密吸取 1.3.1 项下的二级对照品溶液 1、3、5、8、10 μL ，进样，记录色谱图，测定其峰面

$$\text{旋覆花次内酯: } Y = 5\,765\,655.763X + 47\,278.545 \\ R^2 = 0.999\,4$$

结果表明旋覆花次内酯及 ivangustin 分别在 0.067 ~ 0.670 μg 和 0.055 ~ 0.550 μg 范围内线性关系良好。

2.2 回收率试验

取 3 份各 1.0 g 已知含量的样品，精密称重，分别在线性范围内低、中、高 3 个水平进行回收率实验，精确加入 0.67 mg/mL 旋覆花次内酯 1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL，0.55 mg/mL Ivangustin 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL。按实验方法 1.3.2 处理，进样量 5 μL ，考察方法的回收率，以实测量除以添加量计算回收率，见表 2。

2.3 精密度试验

取对照品溶液按上述色谱条件，重复进样 6 次，每次进样 5 μL ，记录峰面积，结果得出 RSD

积，以进样量为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，进行线性回归，其回归方程和相关系数分别为：

$$\text{Ivangustin: } Y = 4\,735\,631.647X + 31\,743.801 \\ R^2 = 0.999\,6$$

分别为旋覆花次内酯 1.37%、Ivangustin 0.98%。

2.4 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液进样 5 μL ，分别在 0、4、8、12、24 h 进样，测定其峰面积，结果显示旋覆花次内酯峰面积的 RSD 为 2.71%，Ivangustin 峰面积的 RSD 为 1.34%，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验

取同一样品 6 份，制备供试品溶液，每次进样 5 μL ，平行测定 6 份样品。旋覆花次内酯及 Ivangustin 峰面积的 RSD 分别为 2.56% 和 1.98%。

2.6 样品含量的测定

取不同产地的药材粉末各约 1 g，精密称定，按 1.3.2 处理后，进样 5 μL 测定，见表 3。

表 2 旋覆花次内酯及 Ivangustin 的回收率试验结果 (n = 3)

Tab. 2 Results of recovery of the 2 compounds (n = 3)

成分	样品质量(g)	本底值(mg)	添加量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD%
旋覆花次内酯	1.051 2	1.031 2	0.670 0	1.673 5	98.4	97.1	1.58
	1.043 1	1.023 2	1.005 0	1.976 9	97.5		
	1.098 5	1.077 6	1.340 0	2.305 7	95.4		
Ivangustin	1.030 6	1.267 0	0.550 0	1.765 8	97.2	97.8	0.83
	1.025 8	1.254 6	1.100 0	2.325 0	98.7		
	1.047 5	1.281 1	1.650 0	2.854 3	97.4		

表 3 不同样品中 2 种化合物的含量

Tab. 3 The results of the contents of 2 compounds in different samples

样品	旋覆花次内酯 (mg/g)	ivangustin (mg/g)
云南 1	1.63	1.31
湖北	2.23	0.80
河南	2.64	1.98
河北	0.98	1.22
广西	-	2.17
安徽 1	2.23	1.18
安徽 2	1.83	1.52
云南 2	1.60	1.60

3 讨论

3.1 提取条件的选择

选择供试品溶液制备方法时，分别采用 40%

甲醇、60%甲醇、80%甲醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇和水对药材进行超声提取，还比较了不同的料液比和超声时间对提取率的影响。结果以 60%乙醇提取液，料液比为 1:25，超声时间为 45 min 的提取率最大。

3.2 流动相的选择

实验过程中分别以甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.4%冰醋酸水溶液、乙腈-0.4%冰醋酸水溶液进行二元等度和梯度洗脱，结果表明：乙腈-水进行二元梯度洗脱时，得到的 UPLC 色谱图具有很好的分离度，峰形较好且保留时间合适。

3.3 检测波长的选择

分别以 200、205、210 和 220 nm 4 个波长进行检测，发现 205 nm 波长处有最大吸收；205 nm 波长检测效果最佳，色谱峰几乎不受溶剂以及杂

(下转第 10 页)

本实验中肝癌组 DLK1 蛋白阳性表达率与文献相符合, 而且在 AFP 阴性的肝癌组织中仍有 22.73% 的 DLK1 蛋白阳性表达, 故 AFP 联合 DLK1 蛋白检测可提高肝癌的检出率, DLK1 蛋白可作为肝癌诊断候选标志物. AFP 和 DLK1 在肝硬化组不表达而在癌周肝硬化组中有阳性表达, 说明癌周肝硬化不同于不伴癌的肝硬化, 更具有癌前病变性质.

[参考文献]

- [1] EL-SERAG H B, MASON A C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(10):745 - 750.
- [2] HUANG J, ZHANG X, ZHANG M, et al. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(5): 1 094 - 1 103.
- [3] FUKAZAWA R, HEATHCOTT RW, MORISON IM, et al. Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(2):145 - 150.
- [4] HUANG C C, CHUANG J H, HUANG L L, et al. The human Delta-like 1 homologue is implicated in the progres-

sion of liver fibrosis in biliary atresia [J]. *J Pathol*, 2004, 202(2):172 - 179.

- [5] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4):229 - 231.
- [6] SNOWBERGER N, CHINNAKOTLA S, LEPE R M, et al. Alpha fetoprotein, ultrasound, computerized tomography and magnetic resonance imaging for detection of hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 26(9):1 187-1 194.
- [7] 申丽娟, 邱建武, 余洁, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在顺铂诱导癌周肝硬化肝细胞株凋亡中的作用 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(12):931 - 935.
- [8] OKA H, TAMORI A, KRUIKI T, et al. Prospective study of α -fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 1994, 19(1):61.
- [9] SMAS C M, SUL H S. PREF-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation [J]. *Cell*, 1993, 73(4):725 - 734.
- [10] LUO J H, REN B, KERYANOV S. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):1 012 - 1 024.

(2012 - 09 - 14 收稿)

(上接第 6 页)

质的干扰, 故选择 205 nm 作为检测波长.

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 中国医药科技出版社, 2010:202 - 203.
- [2] 郭启雷, 杨峻山. 旋覆花属植物中倍半萜类成分及药理活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(6):804 - 809.
- [3] QIN J J, JIN H Z, ZHU J X, et al. New sesquiterpenes from *Inula japonica* Thunb. with their inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7

macrophages [J]. *Tetrahedron*, 2010, 66:9 379 - 9 388.

- [4] QIN J J, ZHU J X, ZHU Y, et al. Flavonoids from the aerial parts of *Inula japonica* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2010, 8(4):257 - 259.
- [5] 于峰, 王思明, 董玫, 等. 三种倍半萜类化合物体外抗肿瘤细胞增殖活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22:506 - 509.
- [6] 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 - 120.

(2012 - 09 - 12 收稿)