

HPLC-DAD 法测定不同产地欧亚旋覆花中 7 种活性成分

郭晓民, 瞿晶田, 柴士伟

天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: 目的 建立 HPLC-DAD 法同时测定欧亚旋覆花中绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素。方法 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%枸橼酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 360 nm; 进样量: 10 μL。结果 绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素分别在 0.118~2.360、0.261~5.220、0.030~0.600、0.052~0.140、0.081~0.162、0.041~0.820、0.030~0.600 μg 与峰面积呈良好的线性关系。平均回收率分别为 97.22%、97.43%、97.52%、99.48%、98.87%、98.76%、98.39%, RSD 值分别为 0.92%、1.16%、1.50%、1.56%、0.79%、0.76%、1.62% (n=6)。结论 该方法准确、简便、重复性好, 可用于欧亚旋覆花药材中成分的质量控制。

关键词: 欧亚旋覆花; 绿原酸; 1,5-二咖啡酰奎宁酸; 芦丁; 菠叶素; 槲皮素; 木犀草素; 6-甲氧基木犀草素; HPLC-DAD
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)11-1328-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.11.006

Determination of seven active constituents in *Inula britannica* from various habitats by HPLC-DAD

GUO Xiao-ming, QU Jing-tian, CHAI Shi-wei

The Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-DAD method for simultaneous determination of chlorogenic acid, 1,5-dicaffeoylquinic acid, rutin, spinacetin, quercetin, luteolin, and 6-methoxyluteolin in *Inula britannica* from various habitats. **Methods** The analysis was performed on Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 0.4% citric acid-acetonitrile as mobile phases for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 360 nm. The column temperature was 30 ℃ with injection volume of 10 μL. **Results** The calibration curves were linear in the ranges of 0.118 — 2.360, 0.261 — 5.220, 0.030 — 0.600, 0.052 — 0.140, 0.081 — 0.162, 0.041 — 0.820, and 0.030 — 0.600 μg for chlorogenic acid, 1,5-dicaffeoylquinic acid, rutin, spinacetin, quercetin, luteolin, and 6-methoxyluteolin, respectively. The average recoveries were 97.22%, 97.43%, 97.52%, 99.48%, 98.87%, 98.76%, and 98.39% with RSD values of 0.92%, 1.16%, 1.50%, 1.56%, 0.79%, 0.76%, and 1.62% (n = 6), respectively. **Conclusion** The method is accurate, convenient and reproducible for quality control for multicomponent in *I. britannica*.

Key words: *Inula britannica* L.; chlorogenic acid, 1,5-dicaffeoylquinic acid; rutin; spinacetin; quercetin; luteolin; 6-methoxyluteolin; HPLC-DAD

欧亚旋覆花为菊科旋覆花属植物欧亚旋覆花 *Inula britannica* L. 的干燥头状花序, 夏、秋二季花开放时采收, 具有降气、消痞、行水、止呕等功效, 临床常用于风寒咳嗽、胸膈痞闷、咳喘痰多等病症的治疗^[1]。据文献报道, 欧亚旋覆花主要含有倍半萜内酯类、黄酮类、酚酸类、甾醇及香豆素类等化学成分^[2-4], 具有抗菌、消炎、抗肿瘤、抗肝损伤等多种药理活性^[5]。光电二极管阵列检测器 (diode

array detector, DAD) 以光电二极管为检测元件, 可同时检测透过供试品溶液的所有波长的紫外光, 从而得到供试品的时间、波长和光强度的三维谱图, 与传统的紫外检测器相比具有灵敏度高、信息齐全、噪音低等优势, 目前已广泛应用于药物的高效液相色谱分析中。杨茜等^[6]建立了 HPLC 法测定旋覆花属植物中旋覆花次内酯等 5 种倍半萜内酯类成分; 董政起等^[7]采用 HPLC-ELSD 法测定了欧亚旋覆花

收稿日期: 2015-09-10

作者简介: 郭晓民 (1970—), 男, 主管药师, 主要从事药事管理和药物分析研究。E-mail: xiaomin986@126.com

*通信作者 柴士伟, 主管药师。Tel: (022) 27432768 E-mail: yaoxuebu2011@126.com

中 1-*O*-乙酰旋覆花内酯。除内酯类成分外,黄酮、酚酸类成分也是欧亚旋覆花抗菌、消炎的主要活性成分^[5],耿红梅等^[8]建立了 HPLC 法测定欧亚旋覆花中槲皮素等 4 种黄酮类成分,而文献报道大多集中于倍半萜内酯类成分,关于其黄酮及酚酸类成分,尤其是该类成分 4 种以上多指标同时测定的研究较少。为了体现传统中药多成分、多途径、多靶点的综合作用特点,本实验建立了 HPLC-DAD 法同时测定 8 批不同产地欧亚旋覆花药材中绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素 7 种活性成分,为进一步完善欧亚旋覆花药材的质量标准研究提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (UV6000 LP 二极管阵列检测器,赛默飞世尔科技有限公司); AS3120 型超声仪 (奥特宝恩斯仪器有限公司); AB204-N 型万分之一天平 (Mettler Toledo 公司); XMTB 型水浴锅 (巩义市予华仪器有限责任公司)。

欧亚旋覆花药材 (批号 01~08) 购自河北安国中药材市场,产地分别为河北、安徽、江苏及湖北,经湖北民族学院朱敏英教授鉴定为菊科旋覆花属植物欧亚旋覆花 *Inula britannica* L. 的干燥头状花序; 芦丁对照品为实验室自制,质量分数大于 98%; 绿原酸 (批号 0122-287111)、1,5-二咖啡酰奎宁酸 (批号 0335-223030)、菠叶素 (批号 181526-203123)、槲皮素 (批号 116151-201112)、木犀草素 (批号 128051-203112) 及 6-甲氧基木犀草素对照品 (批号 103021-303193) 购自中国食品药品检定研究院; 乙醇 (分析纯)、甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯) 购自天津康科德科技有限公司; 磷酸、枸橼酸 (色谱纯,天津市化学试剂三厂); 水为娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验

Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.4% 枸橼酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序见表 1; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 360 nm; 进样量: 10 μL。

在上述色谱条件下,绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于 1.5,理论塔板数均不低于 7 000。DAD 光谱显示样品谱图中的 7 种成分的色谱峰均为单一成分峰。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution conditions

t/min	A/%	B/%
0	8	92
9	12	88
25	25	75
45	35	65
65	58	42
70	70	30

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取经五氧化二磷干燥的绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素对照品 11.83、13.04、6.03、5.21、8.07、8.12、6.06 mg, 分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度,即得质量浓度分别为 1.183、1.304、0.603、0.521、0.807、0.812、0.606 mg/mL 对照品储备液。分别量取以上溶液 1.0、2.0、1.0、1.0、1.0、0.5、0.5 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度,即得含绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素 118.3、260.8、603.0、52.1、80.7、40.6、30.3 μg/mL 混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取 60 °C 条件下干燥至恒定质量的欧亚旋覆花药材样品置于研钵中,研匀,取 1.0 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,加入 70%乙醇 80 mL,回流提取 3 h,提取液滤过,用 70%乙醇 20 mL 分次洗涤,合并滤液及洗涤液,蒸干,加适量 50%甲醇使溶解,移至 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

取混合对照品溶液,分别精密吸取 1、2、4、8、16、20 μL,进样分析。以质量为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数,见表 2。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,计算绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素峰面积的 RSD 值,结果 7 种成分的 RSD 值分别为 1.23%、1.32%、1.42%、1.21%、1.06%、1.24%、0.79%。

表2 回归方程和相关系数

Table 2 Regression equation and correlation coefficients

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
绿原酸	$Y=76\,321\,X+11\,058.0$	0.999 5	0.118~2.360
1,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=30\,202\,X+3\,822.3$	0.999 6	0.261~5.220
芦丁	$Y=50\,120\,X+57\,931.0$	0.999 7	0.030~0.600
菠叶素	$Y=101\,832\,X+4\,093.2$	0.999 7	0.052~0.140
槲皮素	$Y=21\,343\,X+3\,221.5$	0.999 8	0.081~0.162
木犀草素	$Y=33\,013\,X+50\,211.0$	0.999 8	0.041~0.820
6-甲氧基木犀草素	$Y=62\,018\,X+21\,018$	0.999 7	0.030~0.600

2.6 重复性试验

取批号 01 欧亚旋覆花样品,平行制备 6 份供试品溶液,进样分析。以标准曲线法计算绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素质量分数,其 RSD 值分别为 1.11%、0.93%、1.42%、1.51%、1.72%、0.85%、1.80%。

2.7 稳定性试验

取批号 01 的欧亚旋覆花药材样品,制备供试品溶液,室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、10、24 h 进样分析。以标准曲线法计算绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素的质量分数,其 RSD 值分别为 1.26%、0.81%、1.21%、1.26%、1.02%、1.52%、1.61%。结果表明,供试品溶液室温下放置 24 h 稳定。

2.8 回收率试验

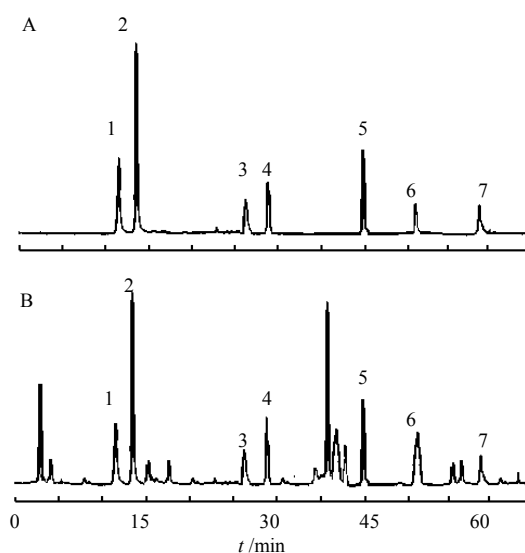
取批号 01 的欧亚旋覆花样品(绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素的质量分数分别为 1.220、2.862、0.386、0.545、0.916、0.455、0.321 mg/g) 6 份,每份 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,分别加入绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素对照品 603.33、1434.40、192.96、270.92、459.99、227.36、157.56 μg ,制备供试品溶液,进样测定,计算平均加样回收率,结果绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素的平均回收率分别为 97.22%、97.43%、97.52%、99.48%、98.87%、98.76%、98.39%,RSD 值分别为 0.92%、1.16%、1.50%、1.56%、0.79%、0.76%、1.62%。

2.9 样品测定

取各批欧亚旋覆花药材样品约 1.0 g,精密称定,制备供试品溶液,各吸取 10 μL 注入色谱仪,

记录色谱峰面积,以标准曲线法计算欧亚旋覆花样品中 7 种活性成分的质量分数,色谱图见图 1,结果见表 3。

通过对河北、安徽、江苏及湖北 4 个产地的欧亚旋覆花药材中酚酸、黄酮类成分测定可知,不同产地之间各成分质量分数存在显著差异。安徽产的欧亚旋覆花中绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸的量较其他产地高,且各产地酚酸类成分的量较黄酮类成分要高;河北产药材中菠叶素的量较其他产地要高;5 种黄酮类成分中,槲皮素、木犀草素的量较其他 3 种成分的量要高。



1-绿原酸 2-1,5-二咖啡酰奎宁酸 3-芦丁 4-菠叶素 5-槲皮素
6-木犀草素 7-6-甲氧基木犀草素
1-chlorogenic acid 2-1,5-dicaffeoylquinic acid 3-rutin 4-spinacetin
5-quercetin 6-luteolin 7-6-methoxyluteolin

图1 混合对照品(A)和欧亚旋覆花(B)的HPLC图谱
Fig.1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A) and *I. britannica* sample (B)

表3 不同产地欧亚旋覆花中7种活性成分的测定结果 (n=3)

Table 3 Determination of seven active constituents in *I. britannica* from various habitats (n=3)

批号 (产地)	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	绿原酸	1,5-二咖啡酰奎宁酸	芦丁	菠叶素	槲皮素	木犀草素	6-甲氧基木犀草素
01 (河北)	1.220	2.862	0.386	0.545	0.916	0.455	0.321
02 (河北)	1.021	2.035	0.232	0.403	0.832	0.621	0.341
03 (河北)	0.841	3.578	0.285	0.423	0.802	0.409	0.162
04 (安徽)	1.832	6.063	0.452	0.193	0.412	0.627	0.147
05 (安徽)	1.628	8.042	0.383	—	0.401	0.648	—
06 (江苏)	0.831	4.201	—	0.123	0.692	0.314	0.233
07 (江苏)	0.649	2.421	0.391	0.091	0.822	0.340	0.154
08 (湖北)	0.432	1.927	0.242	0.132	0.531	0.355	0.193

—未检测到

—not detected

3 讨论

3.1 检测波长的选择

应用二极管阵列检测器在 200~400 nm 进行全波长扫描, 绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸在 327 nm 处有最大吸收, 芦丁在 254 nm 处有最大吸收, 菠叶素在 210、360 nm 处有最大吸收, 槲皮素在 260、370 nm 处有最大吸收, 木犀草素在 210、360 nm 处有最大吸收, 6-甲氧基木犀草素在 327 nm 处有最大吸收。结合各成分色谱峰面积及基线平稳度等因素, 选择 360 nm 作为检测波长。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

在供试品溶液制备过程中, 首先对超声、加热回流两种提取方式进行考察, 结果表明加热回流可使成分提取更完全; 分别考察了水以及 60%、70%、80%乙醇溶液等提取溶剂, 结果表明 70%乙醇对 7 种成分的提取效果最好; 对回流时间进行考察, 分别考察了 30 min 以及 1、2、3 h, 结果表明回流提取 3 h 可提取完全。

3.3 流动相系统的选择

在流动相的选择中, 先后考察了甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.5%枸橼酸水溶液及乙腈-0.4%枸橼酸水溶液的不同梯度洗脱。结果表明, 使用乙腈-0.4%枸橼酸水溶液时, 供试品中 7 种成分均达到了基线分离, 且各成分色谱峰峰形较好。

不同产地欧亚旋覆花有着不同的生态环境, 从而对药材中有效成分的积累形成不同的影响, 且中

药材中有效成分的量与植物品种基因、采收季节、干燥和贮存条件等因素有关。

本实验建立了 HPLC-DAD 法同时测定欧亚旋覆花药材中绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、菠叶素、槲皮素、木犀草素、6-甲氧基木犀草素 7 种活性成分, 为旋覆花药材的质量控制研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 305.
- [2] 吴一兵, 张嫡群, 王云志. 欧亚旋覆花化学成分研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(3): 503-507.
- [3] Shao Y, Bai N, Zhou B. Kaurane glycosides from *Inula britannica* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(3): 783-786.
- [4] 吴一兵, 王云志, 查建蓬, 等. 欧亚旋覆花中三萜和甾体化合物的分离和结构鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 666-668.
- [5] Kim S R, Park M J, Lee M K, et al. Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(7): 596-604.
- [6] 杨茜, 刘慧, 何雅君, 等. 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.
- [7] 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): 443-445.
- [8] 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): 2122-2123.