

HPLC 法同时测定鞘蕊苏中三种劳丹烷型二萜类成分*

张 伟, 许云龙², 金歧端²

(1. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 法测定鞘蕊苏药材中异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林的含量。方法: 采用 luna C₈ 柱 (250mm × 4.6mm), 以乙腈-水梯度洗脱, 流速为 1.0mL/min, 紫外检测波长为 210nm, 进样量 20μL, 采集时间 40min。结果: 异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林的线性范围分别为 1.0 ~ 16.0μg ($r=0.9998$), 0.9 ~ 7.2μg ($r=0.9999$), 7.5 ~ 60μg ($r=0.9998$)。平均回收率 ($n=9$) 分别为 97.8%, 95.1%, 97.6%。结论: 本方法简便、准确, 可为评价不同产地的鞘蕊苏药材中异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林的含量提供依据。

[关键词] 鞘蕊苏; 劳丹烷型二萜; 异佛司可林; 1-乙酰基佛司可林; 1,6-二乙酰基佛司可林; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2010)02-0004-04

鞘蕊苏 (*Coleus forskohlin* (wild) Briq.) 系唇形科 (Labiataae) 鞘蕊花属植物, 国内主要分布在云南省东北部地区^[1], 国外主要分布在印度, 斯里兰卡和尼泊尔等地。上世纪 70 年代^[1], 从鞘蕊苏中分离得到作用于心血管系统的一类劳丹烷 (Labdane) 型二萜化合物—佛司可林 (Forskolin) 及其类似物, 由于这类化合物表现了明显的降压和强心活性, 在治疗心血管疾病, 充血性心力衰竭, 肿瘤转移, 支气管哮喘, 皮肤疾病等方面具有可能的开发前景而引起药学工作者极大的兴趣。有研究报道滇产鞘蕊苏中主要含有异佛司可林 (Isforskolin), 而印度产鞘蕊苏主要含佛司可林 (Forskolin), 两者具有类似的生物活性^[2-4]。云南产鞘蕊苏药材已经收载于云南省药品标准 (1987 - 1992

年版)。

据文献^[2-4]报道, 鞘蕊苏二萜成分以异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林等活性较高, 而异佛司可林的活性又要高于 1-乙酰基佛司可林和 6-二乙酰基佛司可林。目前, 鞘蕊苏中活性成分的含量测定仅对佛司可林或异佛司可林进行控制^[6-9], 尚无同时测定异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林的分析方法报道。

本论文研究并建立了同时测定鞘蕊苏中异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林 (见图 1) 的高效液相色谱方法, 可用于更加全面地控制鞘蕊苏药材质量。

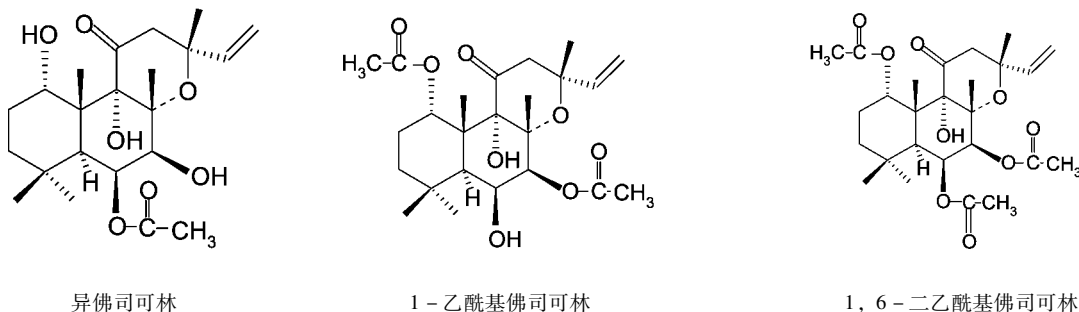


图 1 异佛司可林, 1-乙酰基佛司可林, 1,6-二乙酰基佛司可林的化学结构

* 收稿日期: 2010-02-25 修回日期: 2010-03-17

作者简介: 张伟 (1973 ~), 男, 云南昆明人, 高级工程师, 从事药物分析和新药研发工作。

1 仪器及试剂

日本岛津高效液相色谱仪,包括 Shimadzu LC-10AVP 泵,FCV-10ALVP+DGU-12A 组合成在线脱气装置,SIL-10ADVP 自动进样器,SPD-M10AVP 二级管阵列检测器,CTO-10ASVP 柱温箱,CLASS-VP 工作站);异佛司可林对照品(面积归一化法含量 98.5%)、1-乙酰基佛司可林对照品(面积归一化法含量 98%)、1,6-二乙酰基佛司可林对照品(面积归一化法含量 98%),均由中科院昆明植物研究所金歧端副研究员和许云龙研究员提供;不同产地的鞘蕊苏药材,均由中科院昆明植物研究所金歧端研究员、许云龙研究员提供。

2 色谱条件

色谱柱: luna C₈ (250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: 见表 1; 流速: 1mL · min⁻¹; 检测波长 210nm; 柱温 25℃, 进样量 20μL, 理论板数按异佛司可林峰计算应不低于 3 000。

表 1 流动相梯度洗脱表

时间	乙腈%	水%
0.00	50.0	50.0
30.0	35.0	65.0
40.0	50.0	50.0
45.0	50.0	50.0

3 试验方法

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液

精密称取异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林对照品适量,置 10mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释制成每 1mL 含异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林分别为 0.4, 0.2, 0.4mg 的溶液作为混合对照品溶液。

3.1.2 供试品溶液

称取 15g 鞘蕊苏药材于索氏提取器中,用 300mL 氯仿提取到无色,回收氯仿至干,残渣用丙酮溶解,于 5g 柱层析用中性氧化铝(200~300目)中拌样、挥干,采用内径约为 2cm 的玻璃柱,用 30g 中性氧化铝(200~300目),丙酮湿法装柱,加入拌样,用 300mL 的丙酮洗脱,回收丙酮,

残渣用甲醇溶解并转移到 25mL 的容量瓶中、稀释到刻度、摇匀,经 0.45μm 滤膜过滤即得到供试品溶液。

3.2 含量测定方法研究

3.2.1 线性关系考察

精密称取异佛司可林对照品适量,用甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中约含 0.4mg 的异佛司可林对照品溶液作为对照品贮备液 I。分别精密吸取对照品贮备液 I 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0μL, 按照规定的色谱条件进行 HPLC 分析,记录色谱图。以峰面积积分值 A 为纵坐标,进样量 m (μg) 为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程为

$$A = 1.5 \times 10^5 \times m - 6812.3 \quad r = 0.99984 \quad (n = 6)$$

结果表明,异佛司可林的进样量在 1.0 ~ 16.0μg 范围内有良好的线性关系。

精密称取 1-乙酰基佛司可林对照品适量,用甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中约含 0.36mg 的 1-乙酰基佛司可林对照品溶液作为对照品贮备液 II。分别精密吸取对照品贮备液 II 2.5, 5.0, 10.0, 13.5, 20.0μL, 按照规定的色谱条件进行 HPLC 分析,记录色谱图。以峰面积积分值 A 为纵坐标,进样量 m (μg) 为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程为

$$A = 1 \times 10^5 \times m + 8737.6 \quad r = 0.9999 \quad (n = 5)$$

结果表明,异佛司可林的进样浓度在 0.9 ~ 7.2μg 范围内有良好的线性关系。

精密称取 1,6-二乙酰基佛司可林对照品适量,用甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中约含 3.0mg 的 1,6-二乙酰基佛司可林对照品溶液作为对照品贮备液 III。分别精密吸取对照品贮备液 III 2.5, 5.0, 10.0, 13.5, 20.0μL, 按照规定的色谱条件进行 HPLC 分析,记录色谱图。以峰面积积分值 A 为纵坐标,进样量 M (μg) 为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程为

$$A = 2 \times 10^5 \times m + 550369 \quad r = 0.9998 \quad (n = 5)$$

结果表明,异佛司可林的进样浓度在 7.5 ~ 60μg 范围内有良好的线性关系。

3.2.2 专属性试验

从图 2,图 3 可知,异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林的保留时间分别约为: 8.0, 18.6, 25.2min, 并且它们的峰能与其他杂质成分的峰有效分离,所以本方法对于测定

该3个活性成分较为专属。

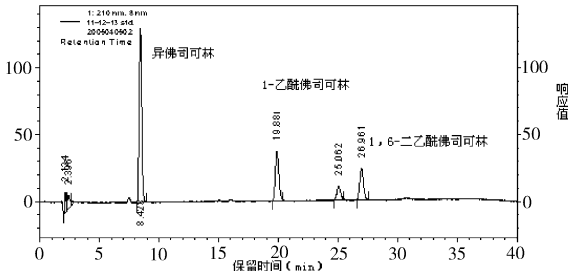


图2 对照品的HPLC色谱图 (C₈)

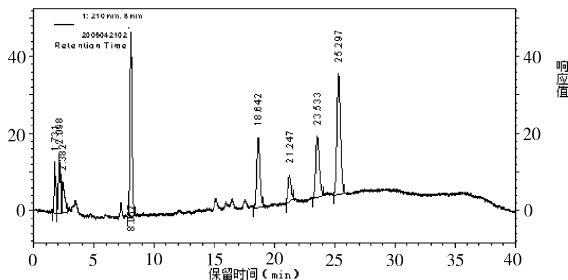


图3 供试品的HPLC色谱图 (C₈)

3.2.3 加样回收率试验

精密称取同一批滇产鞘蕊苏根药材12份,每份7.5g,其中,第1~3份不加对照品,第4~6份每份分别加异佛司可林对照品3.3mg、1-乙酰基佛司可林对照品2.2mg、1,6-二乙酰基佛司可林对照品23.1mg,第7~9份每份分别加异佛司可林对照品5.6mg、1-乙酰基佛司可林对照品3.5mg、1,6-二乙酰基佛司可林对照品38.6mg,第10~12份每份分别加异佛司可林对照品7.8mg、1-乙酰基佛司可林对照品4.8mg、1,6-二乙酰基佛司可林对照品54.0mg;随后,按照3.1.2供试品溶液制备项下从“用300mL的氯仿提取到无色,……”起操作,所得的供试品溶液分别进样20 μ L,HPLC分析,计算各活性成分的回收率。

回收率试验显示,异佛司可林,1-乙酰基佛司可林,1,6-二乙酰基佛司可林平均回收率分别为97.8%,95.1%,97.6%。

3.2.4 重复性试验

称取同一批鞘蕊苏药材5份,每份15g,按3.1.2供试品溶液制备项下方法进行制备,分别进样测定,异佛司可林,1-乙酰基佛司可林,1,6-二乙酰基佛司可林含量的RSD%分别为1.1%,1.1%,1.5%,结果表明重现性符合规定。

3.2.5 精密度试验

取上述同一份供试品溶液连续进样测定5次,异佛司可林,1-乙酰基佛司可林,1,6-二乙酰基佛司可林峰面积的RSD%分别为0.4%,0.7%,0.6%,结果表明精密度符合规定。

3.2.6 稳定性试验

取上述同一份供试品溶液,分别室温密封放置2,4,6,8,10,12,24h后,进样分析,异佛司可林,1-乙酰基佛司可林,1,6-二乙酰基佛司可林峰面积的RSD%分别为1.9%,0.8%,2.0%。结果表明供试品溶液在24h内是稳定。

4 不同产地及不同部位的鞘蕊苏药材的含量

称取不同产地的鞘蕊苏药材及不同的药材部位按前面所述的最佳提取方法进行提取,并经过最佳的HPLC色谱系统进行测定,结果见表2。

表2 不同产地的药材测定结果

批号	含量%		
	异佛司可林	1-乙酰基佛司可林	1,6-二乙酰基佛司可林
滇产-全草	0.060	0.007	0.224
滇产-叶	0.002	0.027	0.115
滇产-叶茎	0.003	0.006	0.070
滇产-茎	未检出	0.003	0.035
滇产-根	0.075	0.046	0.514
印度产-花	未检出	0.008	0.022
印度产-茎叶	未检出	未检出	0.009
印度产-叶	未检出	未检出	0.034

5 讨论

检测波长的选择,异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林的结构中无共轭体系,紫外扫描图谱只是在210nm处有末端吸收,所以选择检测波长210nm来测定。

流动相的选择,文献报道^[6-9]HPLC法测定鞘蕊苏药材中异佛司可林的流动相主要有:乙腈-0.1%三乙胺水溶液用磷酸调pH4.0(35:65)、水-乙腈梯度洗脱、正己烷-乙酸乙酯-氯仿(70:20:10)。经过大量的试验研究,认为采用乙腈-水梯度洗脱时,能较好的把异佛司可林,1-乙酰基佛司可林,1,6-二乙酰基佛司可林洗脱出来,并且与杂质能有效的分离开(图2,3)。

色谱柱的选择中,分别采用 C₈、C₁₈柱进行试验,发现用 C₈能在40min内将鞘蕊苏药材中的活性成分异佛司可林、1-乙酰基佛司可林、1,6-二乙酰基佛司可林洗脱出来,并且能有效分离。而使用 C₁₈时,洗脱时间较长,且1,6-二乙酰基佛司可林与杂质分离不好。

含量测定试验结果显示,滇产的鞘蕊苏中不含佛司可林或是含量很少,但含有异佛司可林,1-乙酰基佛司可林,1,6-二乙酰基佛司可林。滇产鞘蕊苏中三种活性成分在药材根部的含量最高,其中异佛司可林含量大于0.07%,1-乙酰基佛司可林含量大于0.04%,1,6-二乙酰基佛司可林含量大于0.5%。印度产鞘蕊苏中不含异佛司可林,均检出1,6-二乙酰基佛司可林,1-乙酰基佛司可含量很低。

[参考文献]

- [1] 王宗玉,吴大刚. 我国鞘蕊苏的发掘与研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7 (2): 73-75.
 [2] 张敏生. 毛喉鞘蕊花中具有生物活性二萜物质 Forskolin的化学 [J]. 中国药学杂志. 1990, 25 (7): 395-397.

- [3] 金歧端,谢显厚,木全章. 毛喉鞘蕊花的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1990, 2 (2): 6-9.
 [4] 沈云亨,姚春所,董旭俊,等. 毛喉鞘蕊花化学及生理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (3): 358-361.
 [5] 姚新生,天然药物化学(第三版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 211.
 [6] 徐雯明,陈蔚江,李捷,等. 鞘蕊苏有效成分的含量分析 [J]. 中国中药信息杂志, 2003, 10 (2): 38-39.
 [7] 杨艳芳,杨巧容,皱国安,等. RP-HPLC法测定鞘蕊苏药材中异佛司可林的含量 [J]. 中药材, 2004, 27 (4): 260-261.
 [8] Brian T. Schaneberg, Ikhias A. Khan. Quantitative analysis of forskolin in *Coleus forskohlii* (Lamiaceae) by reversed-phase liquid chromatography [J]. journal of AOAC international, 2003, 86 (3): 467-470.
 [9] P. K. Inamdar, P. V. Kanitkar, J. de Souza. et al Quantitative determination of forskolin by TLC and HPLC [J]. Planta Medica, 1984: 30-34.

(编辑:岳胜难)

Simultaneous HPLC Determination of 3 Labdane Diterpenoids in *Coleus forskohlii* (wild) Briq.

ZHANG Wei¹, XU Yun-long², JIN Qi-duan²

- (1. Institute of Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corp. Kunming Yunnan 650100, China;
 2. Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

[ABSTRACT] Objective: To establish a HPLC method for determination of three constituents: including isoforskolin, 1-actylforskolin and 1,6-diactylforskolin in *Coleus forskohlii* (wild) Briq. Methods: The reversed phase HPLC system consisted of a lunaC₈ column (250mm×4.6mm, 5μm), The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and H₂O (B). At a flow rate of 1.0 mL/min, the gradient elutions were 50A:50B to 35A:65B in 30 min, 35A:65B to 50A:50B in next 10 min, 50A:50B to 50A:50B in last 5 min. The detection wavelength was 210 nm, the injection volume was 20μL and the column temperature was maintained at 25°C. Results: The Labdane Diterpenoids were successfully separated. The linear ranges of the Labdane Diterpenoids were 1.0~16.0μg (r=0.9998), 0.9~7.2μg (r=0.9999), 7.5~60μg (r=0.9998) respectively; The average recoveries of Labdane Diterpenoids were 97.8%, 85.1%, 97.6% respectively. Conclusion: The contents of the Labdane Diterpenoids in root of *Coleus forskohlii* (wild) Briq collected from different regions were determined. This method is rapid and accurate.

[KEY WORDS] *Coleus Forskohlii* (wild) briq; isoforskolin; 1-actylforskolin; 1,6-diactylforskolin; labdane diterpenoids; HPLC