

文章编号 1006-8147(2021)01-0079-04

论 著

HPLC 法同时测定蓝桉果实中两种 marocarpal 型成分含量

于欢¹, 张冬丽¹, 李敏¹, 许嵘², 唐铖¹, 唐生安¹

(1.天津医科大学天然药物学系,天津市临床药物关键技术重点实验室,天津 300070;2.泉州医学高等专科学校药学院,泉州 362011)

摘要 目的:采用 HPLC 法建立同时测定蓝桉果实一口钟中两种 marocarpal 型成分 marocarpal A 和 marocarpal B 的含量。方法:采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈:水:甲酸(66:34:1%)为流动相;流速 1.0 mL/min;柱温为 35℃;检测波长为 280 nm;进样量 10 μL。结果:marocarpal A 在 0.125 6~2.512 0 μg 范围内,marocarpal B 在 0.101 4~2.028 0 μg 范围内呈现良好的线性关系,marocarpal A 的平均回收率为 97.61%,RSD 为 1.94%(n=9),marocarpal B 的平均回收率为 100.40%,RSD 为 1.91%(n=9)。结论:该方法专属性强,重复性好、稳定、可控,可为蓝桉果实一口钟药材的质量评价与控制提供参考。

关键词 蓝桉果实;HPLC;含量测定;marocarpal A;marocarpal B

中图分类号 R917

文献标志码 A

Simultaneous content determination of two marocarpal type components in the fruits of *Eucalyptus globulus* by HPLC

YU Huan¹, ZHANG Dong-li¹, LI Min¹, XU Rong², TANG Cheng¹, TANG Sheng-an¹

(1.Department of Natural Medicines, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. School of Pharmacy, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362011, China)

Abstract Objective: To establish a method for the simultaneous determination of the content of two active components of marocarpal A and marocarpal B in the fruits of *Eucalyptus globulus* Yikouzhong by HPLC. **Methods:** Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm) chromatographic column, with acetonitrile: water: formic acid (66:34:1%) as the mobile phase; flow rate 1.0 mL/min; column temperature 35℃; detection wave length 280 nm; injection volume 10 μL was used. **Results:** Marocarpal A in the range of 0.125 6~2.512 0 μg and marocarpal B in the range of 0.101 4~2.028 0 μg were showed a good linear relationship. The average recovery rate of marocarpal A was 97.61%, the RSD was 1.94%(n=9), and the average recovery rate of marocarpal B is 100.40%, the RSD was 1.91%(n=9). **Conclusion:** This method is highly specific, reproducible, stable and controllable, and can provide a reference for the quality evaluation and control of the fruits of *Eucalyptus globulus* Yikouzhong medicinal materials.

Key words fruits of *Eucalyptus globulus*; HPLC; content determination; marocarpal A; marocarpal B

蓝桉 *Eucalyptus globulus* Labill. 为桃金娘科 (Myrtaceae) 桉属 *Eucalyptus* L. Herit 植物, 蓝桉的成熟果实俗称“一口钟”^[1]。一口钟民间俗称扣子七、红喇叭花、胜利果等, 为我国西南民间常用中药^[2]。一口钟富含多种化学成分如: 挥发油^[3]、倍半萜^[4]、三萜^[5]、间苯三酚衍生物^[6]、氨基酸^[7]和鞣花酸^[8]等, 具有抗肿瘤^[9]、抗炎镇痛^[10]、抗菌^[11]、抗氧化^[12]、降血糖和预防心肌缺血^[13]等作用。Marocarpal 型杂萜类成分是一类具有异戊烯基间苯三酚连接倍半萜结构的化合物,

基金项目 天津市教委科研计划项目(2019ZD031); 天津市自然科学基金(18JCYBJC95100); 泉州市科技计划项目(2018N111S)

作者简介 于欢(1995-), 女, 硕士在读, 研究方向: 天然药物化学; 通信作者: 唐铖, E-mail: tangchengen@tmu.edu.cn, 唐生安, E-mail: tangshengan@tmu.edu.cn。

是一口钟的特征性成分。据报道, marocarpal A、marocarpal B 作为二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂, 可延长天然胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的半衰期, 恢复 2 型糖尿病(T2DM)患者的胰岛素分泌, 从而减轻高血糖症^[14]。王佳^[15]在低细胞毒剂量下研究了 marocarpal A、marocarpal B 对 RAW264.7 巨噬细胞释放一氧化氮(NO)的抑制活性, 抑制率分别为 20.39%、7.81%, 并且对肿瘤坏死因子(TNF)-α 的分泌具有较强的抑制作用, 在浓度为 1 μg/mL 时, 抑制率分别为 27.30%、31.58%, 证明了其具有抗炎和抗风湿的作用。这些结果表明, 这两种成分具有较高的药理活性和开发价值。

近年来, 对一口钟的化学成分研究及含量测定

报道较少,虽然刘玉明等^[16-18]对一口钟中的三萜酸和氨基酸建立了含量测定方法,但目前为止,未见一口钟中有关 marocarpal 类成分含量测定的文献报道。本课题组首次采用 HPLC 法^[19-20]同时对 marocarpal A、marocarpal B 进行含量测定,以期为今后提升一口钟的药材质量标准提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国);旋转蒸发器 RE-52AA 系列(上海亚荣生化仪器厂);ZDHB 调温电热套(北京中兴伟业世纪仪器有限公司);JP-150 高速多功能粉碎机(永康市久品工贸有限公司);KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BSA124S 型电子分析天平(德国 Sartorius)。

1.2 材料 marocarpal A(纯度>98%,批号:20181211)、marocarpal B(纯度>98%,批号:20181211),对照品为本实验室自制,通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 核磁共振谱、质谱分析以及文献对比确定结构,HPLC 峰面积归一化法测定其纯度;两种化学成分结构如图 1。3 批一口钟样品(编号分别为 S1、S2、S3)分别于 2016—2018 年购于河北安国药材批发市场,产地为广东省,经天津医科大学药学院唐生安博士鉴定为桉属植物蓝桉 *Eucalyptus globulus* Labill. 的干燥成熟果实。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

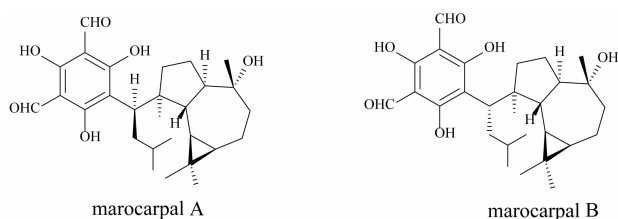


图 1 两种化学成分结构式

Fig 1 Structures of two chemical components

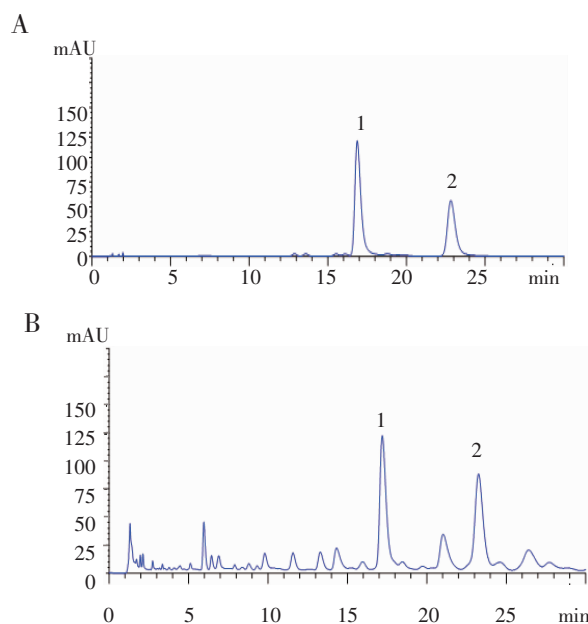
1.3 方法

1.3.1 对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的 marocarpal A、marocarpal B 标准品适量,置于 5 mL 容量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,制成浓度分别为 0.113 mg/mL、0.114 mg/mL 的标准品储备液。分别精密量取上述标准品储备溶液加乙腈制成每 1 mL 含 marocarpal A 0.062 8 mg,含 marocarpal B 0.050 7 mg 的混合标准品溶液。

1.3.2 供试品溶液的制备 取一口钟药材 10 g,粉碎,置圆底烧瓶中,加入 100 mL 甲醇,加热回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,得提取液。回收甲醇提取

液,浓缩,过滤,定容至 50 mL,备用。

1.3.3 色谱条件 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱;以乙腈:水:甲酸(66:34:1%)为流动相;检测波长为 280 nm,流速 1.0 mL/min。柱温:35℃;进样量 10 μL,在该色谱条件下,各待测成分的理论板数均大于 3 000,与其他色谱峰的分离度均大于 1.5,对照品溶液及一口钟样品溶液的 HPLC 色谱图见图 2。



注:1.marocarpal A,rt=17.084 min;2.Marocarpal B,rt=22.964 min

图 2 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference solution (A) and sample solution (B)

2 结果

2.1 线性关系考察 取混合对照品溶液 2、5、10、15、20、40 μL 按照“1.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,结果见表 1。两种成分在对应进样量范围与峰面积的线性关系良好。

表 1 一口钟中两种成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of two components in fruits of *Eucalyptus globulus*

成分	回归方程	r	线性范围(μg)
marocarpal A	$Y=5E+06x-40.559\ 0$	0.999 8	0.125 6~2.512 0
marocarpal B	$Y=4E+06x-7.246\ 8$	0.999 8	0.1014~2.028 0

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 分别精密吸取混合对照品溶液 10 μL,按“1.3.3”项下色谱条件连续重复进样 6 次,记录峰面积,计算得到 marocarpal A、marocarpal B 峰面积的 RSD 分别为 0.77%、0.30%,表明仪器精密度良好。

2.2.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,记录峰面积,计算得到 marocarpal A、marocarpal B 峰面积的 *RSD* 分别为 0.80%、0.99%,表明该方法稳定性良好。

2.2.3 重复性试验 取同一批(S1)一口钟样品,按“1.3.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算得到样品中 marocarpal A、marocarpal B 的平均含量分别为 14.268 mg/g、17.208 mg/g,*RSD* 分别为 1.57%、1.61%,表明该方法重现性良好。

2.2.4 加样回收率试验 精密称取已知成分含量的一口钟供试品 6 份,置于锥形瓶中,分别按照相当于供试品中各成分含量的 50%、100%、150%比例加入各对照品,按“1.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算平均加样回收率,结果见表 2。marocarpal A、marocarpal B 平均加样回收率分别为 97.61%、100.40%,*RSD* 分别为 1.94%、1.91%,表明该方法准确性良好。

表 2 一口钟中两个成分的加样回收率试验结果(*n*=9)

Tab 2 Recovery test results of two components in fruits of *Eucalyptus globulus* (*n*=9)

成分	含有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收 率(%)	平均加样 回收率(%)	<i>RSD</i> (%)
marocarpal A	0.098 5	0.048 0	0.145 8	98.54	97.61	1.94
	0.095 6	0.040 8	0.143 1	98.96		
	0.094 2	0.048 0	0.141 7	98.96		
	0.088 5	0.087 0	0.176 3	100.92		
	0.087 0	0.087 0	0.169 9	95.29		
	0.086 0	0.087 0	0.168 7	95.06		
	0.085 6	0.124 0	0.206 1	97.18		
	0.084 2	0.124 0	0.204 3	96.85		
	0.081 9	0.124 0	0.201 9	96.77		
marocarpal B	0.118 7	0.060 0	0.179 5	101.33	100.40	1.91
	0.115 3	0.060 0	0.177 8	104.17		
	0.113 6	0.060 0	0.173 7	100.17		
	0.106 7	0.105 0	0.209 8	98.19		
	0.105 0	0.105 0	0.210 0	100.00		
	0.103 8	0.105 0	0.206 7	98.00		
	0.103 2	0.152 0	0.255 5	100.20		
	0.101 5	0.152 0	0.252 8	99.54		
	0.100 0	0.152 0	0.255 1	102.04		

2.3 样品测定 取 3 批一口钟样品适量,按“1.3.2”项下方法制备样品溶液,按“1.3.3”项下色谱条件进样测定,计算样品中 marocarpal A、marocarpal B 的含量,结果见表 3。

表 3 3 批一口钟样品中 2 个成分的含量测定结果(mg/g,*n*=3)

Tab 3 Determination results of two components in three batches of fruits of *Eucalyptus globulus*(mg/g,*n*=3)

批号	marocarpal A	marocarpal B
S1	14.268	17.208
S2	14.664	17.152
S3	15.188	17.550

3 讨论

经查阅相关文献以及对两种化学成分理化性质的考察,选择甲醇作为提取溶剂,并分别考察了加热回流提取、超声提取对药材中 2 种成分的提取率,结果显示加热回流提取测得 marocarpal A、marocarpal B 含量分别为 0.22%、0.26%,而超声提取法测得含量分别为 0.15%、0.16%,表明加热回流法的提取率高于超声提取法,故选用回流提取法。

对检测波长选择时,由于一口钟的化学成分复杂,其主要有效成分的紫外吸收差异很大,试验中通过比较 210、230、254、280、330 nm 5 个波长下供试品中所测组分色谱峰的分离程度。发现在 280 nm 下两种成分的主峰与其他杂质峰分离良好,峰型好,检测灵敏度高,分离度适中。故选择 280 nm 作为检测波长。

为了尽可能获得较好的分离效果,对色谱条件进行了优化,考察不同组成的流动相,如乙腈-水、乙腈-甲酸水溶液系统。结果表明甲酸可以减少色谱峰的拖尾,使色谱峰达到较高的对称性,改善分离度。同时考察了乙腈:水:甲酸(58:42:1%)、乙腈:水:甲酸(70:30:1%)、乙腈:水:甲酸(66:34:1%) 3 种流动相系统下色谱的分离程度以及保留时间的长短,结果表明,采用乙腈:水:甲酸(66:34:1%)峰形对称性较好,无拖尾,保留时间适宜,基线平稳,分离度较好,所测化合物具有很好的灵敏度。故选择流动相为乙腈:水:甲酸(66:34:1%)。

本实验建立了同时测定一口钟中 marocarpal A、marocarpal B 含量的高效液相法,方法学考察结果符合要求,操作简单、稳定性高、重复性好,回收率高,可为一口钟药材的整体质量评价与控制提供依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第 53(1)卷[M]. 北京:科学出版社,1984
- [2] 谢宗万.全国中草药汇编(上册)[M]. 第 2 版.北京:人民卫生出版社,1996:897
- [3] 汤洪波,周欣,雷培海,等. 黔产蓝桉果实挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J].分析测试学报,2005,24(增刊):97
- [4] Yu Y, Gan L S, Yang S P, et al. Eucarobustols A-I, conjugates of

- sesquiterpenoids and acylphloroglucinols from *eucalyptus robusta*[J]. J Nat Prod, 2016, 79(5): 1365
- [5] 谈满良, 汪治, 周立刚, 等. 蓝桉果实中的五环三萜化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 232
- [6] Pham T, Hu X L, Huang X J, et al. Phloroglucinols with immuno-suppressive activities from the fruits of *eucalyptus globulus*[J]. J Nat Prod, 2019, 82(4): 859
- [7] 隋晓丽, 娄红祥. 一口钟化学成分及质量控制研究概况[J]. 中药材, 2011, 34(5): 823
- [8] 王佳, 许娇娇, 乔卫, 等. 蓝桉果实一口钟化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(24): 4336
- [9] Wang J, Zhai W Z, Zou Y K, et al. Eucalyptals D and E, new cytotoxic phloroglucinols from the fruits of *Eucalyptus globulus* and assignment of absolute configuration[J]. Tetrahedron Lett, 2012, 53(21): 2654
- [10] Rahman H, Eswaraiah C M, Vakati K, et al. In-vitro studies suggest probable mechanism of eucalyptus oil for anti-inflammatory and anti-arthritic activity[J]. Int J Phytopharmacy, 2012, 2(3): 81
- [11] Shang Z C, Han C, Xu J L, et al. Twelve formyl phloroglucinol meroterpenoids from the leaves of *Eucalyptus robusta*[J]. Phytochemistry, 2019, 163: 111
- [12] Chen Y, Wang J, Ou Y, et al. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from *Eucalyptus* leaves (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* GL9)[J]. J Funct Foods, 2014, 7(1): 737
- [13] 唐云, 李伟. 蓝桉的化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(6): 923
- [14] Kato E, Kawakami K, Kawabata J. Macrocyclic C isolated from *Eucalyptus globulus* inhibits dipeptidyl peptidase 4 in an aggregated form[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018, 33(1): 106
- [15] 王佳. 中药一口钟的抗炎活性成分研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2017
- [16] 刘玉明, 柴逸峰, 姜子洋, 等. 分光光度法测定蓝桉果实总三萜酸[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(1): 4
- [17] 刘玉明, 吴玉田, 柴逸峰, 等. RP-HPLC 法测定蓝桉果实总三萜酸中三种三萜酸[J]. 中草药, 2007, 38(4): 615
- [18] 刘玉明, 吴玉田, 柴逸峰, 等. 蓝桉果实中氨基酸成分的含量测定[J]. 中国药房, 2007, 18(12): 915
- [19] 龙丽, 张亚莉, 杨琴, 等. HPLC 法测定莨菪药材中黄酮类成分的含量[J]. 中药材, 2019, 42(12): 2874
- [20] 刘佩仪, 李春彦, 晏烽根, 等. HPLC 法同时测定连翘中 6 个成分的含量[J]. 中药材, 2020, 43(04): 934

(2020-07-30 收稿)

(上接第 78 页)

医疗服务发展模式开始转型^[12]。天津市和平区将以医联体建设为起点, 逐步建立起符合我国国情的分级诊疗制度。

参考文献:

- [1] 张立斌, 陈力, 肖明朝. 重庆市首家医联体“重医一院医联体”探索和思考[J]. 重庆医学, 2014, 43(32): 4394
- [2] 李洪涛. 我国医联体中双向转诊制度的实施现状及对策探讨[J]. 临床医药文献杂志, 2018(5): 180
- [3] 李舒曼, 杨越, 熊林平. 纵向整合医疗资源 推进完善医联体[J]. 中国医院统计, 2016, 23(1): 4
- [4] 陈爱如. 城市社区卫生服务发展机制的构建与运行——基于双向转诊的功能实现[J]. 中国卫生事业管理, 2011, 28(11): 811
- [5] 迟宁, 卢琪, 沈悦好, 等. 基于 SWOT 模型分析下天津市医联体模式实施现状及对策研究[J]. 中国卫生事业管理, 2020, 5(37): 337
- [6] 杨立成, 鲍琳辉, 田义娟, 等. 医联体模式下构建双向转诊机制的探讨[J]. 医院改革, 2015, 7(19): 33
- [7] 田浩然, 张祖平. 实施医院与社区卫生服务中心机构双向转诊的难点分析[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 24(1): 110
- [8] 梁思园, 何莉, 宋宿杭, 等. 我国医疗联合体发展和实践典型分析[J]. 卫生服务研究, 2016, 4(9): 42
- [9] 夏云, 袁青, 姜昌斌. 上海市“瑞金-卢湾医疗联合体”运行模式的现状调查和对策研究[J]. 社区卫生服务研究, 2012, 8(15): 2515
- [10] 王颖, 顾晓红, 吕军, 等. 从改变支付方式入手求得医改的突破(2)[J]. 中国卫生资源, 2011, 14(1): 13
- [11] 汤少梁, 李萍, 王华, 等. 医联体建设背景下分级诊疗制度的优化研究: 基于 SD 因果关系图[J]. 中国卫生经济, 2019, 10(38): 20
- [12] 张瑞华, 孙渤星, 何思长, 等. 成都市医联体实践探索与思考[J]. 现代医院管理, 2016, 6(14): 10

(2020-07-21 收稿)