

1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品的制备及其 在欧亚旋覆花中的含量测定

王云志, 石晓伟, 付焱, 程伟, 张嫡群, 查建蓬

(河北医科大学新药开发研究室, 河北 石家庄 050017)

摘要: 从欧亚旋覆花的氯仿提取物中分离制备了 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品, 经紫外光谱、红外光谱、核磁共振和质谱确定结构, 其相关数据与文献一致, 纯度为 99.5%, 符合中药化学对照品含量测定用要求。以所制备的 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯为对照品, 建立了用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)测定欧亚旋覆花中 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯含量的方法。色谱条件为 Hypersil ODS-2 色谱柱, 流动相为甲醇-水(体积比为 52:48), 流速为 1.0 mL/min。ELSD 的漂移管温度为 90 °C, 载气(空气)流速为 2.5 L/min。1-氧-乙酰大花旋覆花内酯在进样量为 1.37 ~ 8.21 μg 时与其峰面积的线性关系良好($r = 0.9998$)。平均加样回收率为 100.2%, 相对标准偏差(RSD)为 1.3% ($n = 6$)。该法准确、简单、省时、重复性好, 适用于欧亚旋覆花的质量控制。

关键词: 高效液相色谱; 蒸发光散射检测; 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯; 对照品; 欧亚旋覆花

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)06-0573-04

Preparation and Determination of 1-O-Acetylbritannilactone in *Inula Britannica* L.

WANG Yunzhi, SHI Xiaowei, FU Yan, CHENG Wei, ZHANG Diqun, ZHA Jianpeng

(Department of New Drug Development, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: To prepare reference substance for quality control of *Inula Britannica* L., 1-O-acetylbritannilactone was extracted and separated from chloroform extraction of *Inula Britannica* L. Chemical structure of the 1-O-acetylbritannilactone product was elucidated by ultraviolet spectrometry (UV), infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), and the results were in agreement with the reference. The purity of the 1-O-acetylbritannilactone product was 99.5%, which satisfies the need of reference substances of traditional Chinese medicines. A method of high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) is described for the determination of 1-O-acetylbritannilactone in *Inula Britannica* L. The chromatographic conditions include Hypersil ODS-2 column, a mixture of methanol-water (52:48, v/v) with the flow rate of 1.0 mL/min used as mobile phase. The temperature of drift tube of the ELSD was 90 °C. Flow rate of carrier gas was 2.5 L/min. Linear range of 1-O-acetylbritannilactone was 1.37 - 8.21 μg ($r = 0.9998$). The average recovery of 1-O-acetylbritannilactone was 100.2% with the relative standard deviation (RSD) of 1.3% ($n = 6$). The method is simple, accurate, time saving and reproducible.

Key words: high performance liquid chromatography; evaporative light scattering detection; 1-O-acetylbritannilactone; reference substance; *Inula Britannica* L.

欧亚旋覆花(*Inula Britannica* L.)是传统中药,多年来一直用于治疗消化不良、支气管炎,并具有抗炎作用^[1]。现代药理学研究证明,旋覆花的氯仿提取物具有免疫^[2]、肝保护^[3]和细胞毒作用^[4],1-氧-乙酰大花旋覆花内酯具有抗炎作用^[5],正丁醇提

取物有抗氧化作用^[6],1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的衍生物 1-β-二氧-二乙酰大花旋覆花内酯的细胞毒性比 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯强^[7]。但在 2005 年版《中国药典》^[1]的旋覆花质量标准中只有鉴别项,无含量测定项。我们从欧亚旋覆花中分离得到了

1-氧-乙酰大花旋覆花内酯(结构式见图1),经紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)和质谱(MS)分析,其相关数据与文献[7]所报道的数据一致,纯度为99.5%,符合中药化学对照品含量测定用要求^[8],因此可用作欧亚旋覆花质量控制的化学对照品。

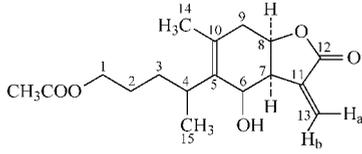


图1 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的化学结构

Fig.1 Chemical structure of 1-O-acetylbritannilactone

本文报道了从欧亚旋覆花中制备1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品的方法,并测定了欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的含量,该法准确、简单、省时、重复性好,适用于欧亚旋覆花的质量控制。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱(HPLC)系统:包括脱气机、K-1500溶剂组合器、K-1001泵、UV-K2501检测器(Knauer, Germany);Alltech 2000ES蒸发光检测器(ELSD)(USA);BF-2002色谱工作站(北京瑞利分析仪器有限公司);Laborota 4000旋转薄膜蒸发仪(Germany, Heidolph);BS210S电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

欧亚旋覆花样品采自于山西省运城地区,部分样品购自药材市场。药材经河北医科大学生药教研室聂凤教授鉴定为欧亚旋覆花。甲醇,乙腈(色谱纯,购自Scharlau Chemie S. A. Spain),其他试剂均为分析纯。1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品为自制(批号20030203)。

1.2 欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品的制备与纯度检查

1.2.1 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的分离和提取
取采自山西省运城地区的欧亚旋覆花2 kg,用10倍量的乙醇回流提取3次,每次1 h,过滤,合并滤液,回收乙醇得黑色粘稠膏状物约200 g。将膏状物悬浮于400 mL水中,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取。取氯仿萃取液减压浓缩回收溶剂,上硅胶柱,经反复分离,得1-氧-乙酰大花旋覆花内酯粗品,用乙醇重结晶得白色针状结晶,即为1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品。

1.2.2 供试品溶液与对照品溶液的制备 精密称取对照品适量,分别加入甲醇溶解,配制成每1 mL

中含1-氧-乙酰大花旋覆花内酯0.006 mg与0.6 mg的溶液,作为对照品溶液和供试品溶液,用于不加校正因子的主成分自身对照实验。

1.2.3 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm i. d. 5 μm);柱温:室温;流动相:乙腈-水(体积比为31:69);流速:1 mL/min;检测波长:208 nm。

1.2.4 不加校正因子的主成分自身对照法 在“1.2.3”节色谱条件下,精密量取1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照溶液10 μL,注入色谱仪,记录色谱图,调节检测灵敏度使主峰峰高约为满量程的20%;再取供试品溶液和对照品溶液各10 μL分别注入色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的2倍。

1.2.5 二极管阵列检测器(DAD)纯度检查法 该实验所用仪器为Agilent 1100色谱仪,DAD检测器和Agilent化学工作站。在“1.2.3”节色谱条件下,用DAD检测器记录色谱图,检查主成分峰的纯度。

1.3 欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯含量的测定

1.3.1 样品溶液的制备 取干燥旋覆花1.0 g,置于索氏提取器中,加氯仿45 mL,加热回流提取至溶液无色,将提取液蒸发至干,残渣加甲醇10 mL溶解,用0.45 μm微孔滤膜滤过,备用。

1.3.2 对照品溶液的制备 取105 °C干燥至恒重的1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品,精密称取约10.6 mg,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,过0.45 μm微孔滤膜,备用。

1.3.3 色谱条件 Hypersil ODS-2色谱柱(250 mm × 4.6 mm i. d. 5 μm);柱温:室温;流动相:甲醇-水(体积比为52:48);流速:1.0 mL/min;载气:空气2.5 L/min;ELSD的漂移管温度90 °C。

2 结果与讨论

2.1 对照品的纯度检查

用不加校正因子的主成分自身对照法测定1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品的纯度,色谱图见图2。结果表明,在供试品溶液的色谱图中,除溶剂峰外,各杂质峰面积总和小于对照品溶液主峰的面积(0.5%)。二极管阵列检测器的测定结果表明:主成分峰的纯度因子为999.954;五点光谱图完全重合,表明主成分峰为单一物质峰。

2.2 对照品的结构确证^[7]

熔点与定性鉴别 对照品的熔点(《中国药典》2005年版附录VI C)为124~126 °C。对照品与羟肟酸铁试液反应,反应液呈红棕色,表明对照品的结构为倍半萜内酯。

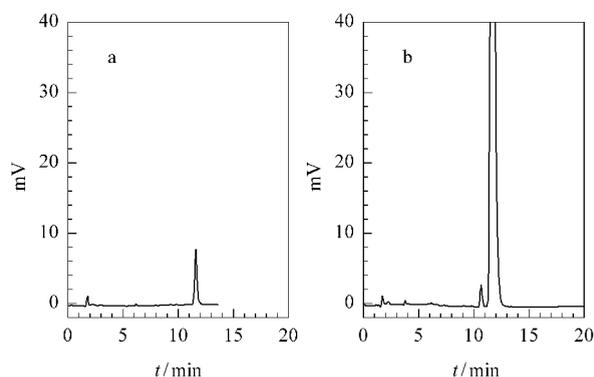


图 2 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的纯度测定色谱图

Fig.2 Chromatograms of purity test of 1-O-acetylbritannilactone

a. reference solution ; b. sample solution.

紫外光谱 对照品的甲醇溶液在 208 nm 处有最大吸收。

红外光谱 $\sigma_{\max}^{\text{KBr}}$ 3 499 cm^{-1} (OH), 3 098 cm^{-1} (C=C), 2 973 , 2 940 , 2 900 , 2 861 cm^{-1} (饱

和 C—H 伸缩振动), 1 742 cm^{-1} (C=O), 1 663 cm^{-1} (C=C), 1 466 , 1 374 cm^{-1} (CH₃), 1 268 cm^{-1} (C—O), 1 163 , 1 038 , 959 , 643 cm^{-1} 。

核磁共振 ¹H NMR 3. 76(m , 1a), 3. 76(m , 1b), 1. 05(m , 2a), 1. 26(m , 2b), 1. 15(m , 3a), 0. 87(m , 3b), 2. 58(m , 4) , 4. 01(d , 6) , 3. 36(m , 7) 4. 93(m , 8) , 2. 72(m , 9a) , 2. 26(m , 9b) , 6. 01 (d , 13a) , 5. 71(d , 13b) , 1. 61(s , 14) , 0. 94 (d , 15) , 1. 88(s , MeCOO)。

核磁共振 ¹³C NMR 65. 51 , 27. 82 , 32. 53 , 34. 2 (t) 4 , 131. 4 (t) 5 , 68. 7 (t) 6 , 47. 27 , 78. 48 , 34. 29 , 137. 410 , 138. 911 , 172. 412 , 124. 713 , 20. 514 , 19. 415 , 170. 3 MeCOO , 20. 8 MeCOO。

质谱 分子离子峰(m/z 308 [M]⁺) , 主要碎片离子峰为 m/z 290 , 248 , 233 , 230 , 215 , 207 , 202 , 189 , 179 , 161 , 符合裂解规律(见图 3)。

以上 UV , IR , NMR , MS 光谱数据与文献报道值一致 , 确证对照品为 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯。

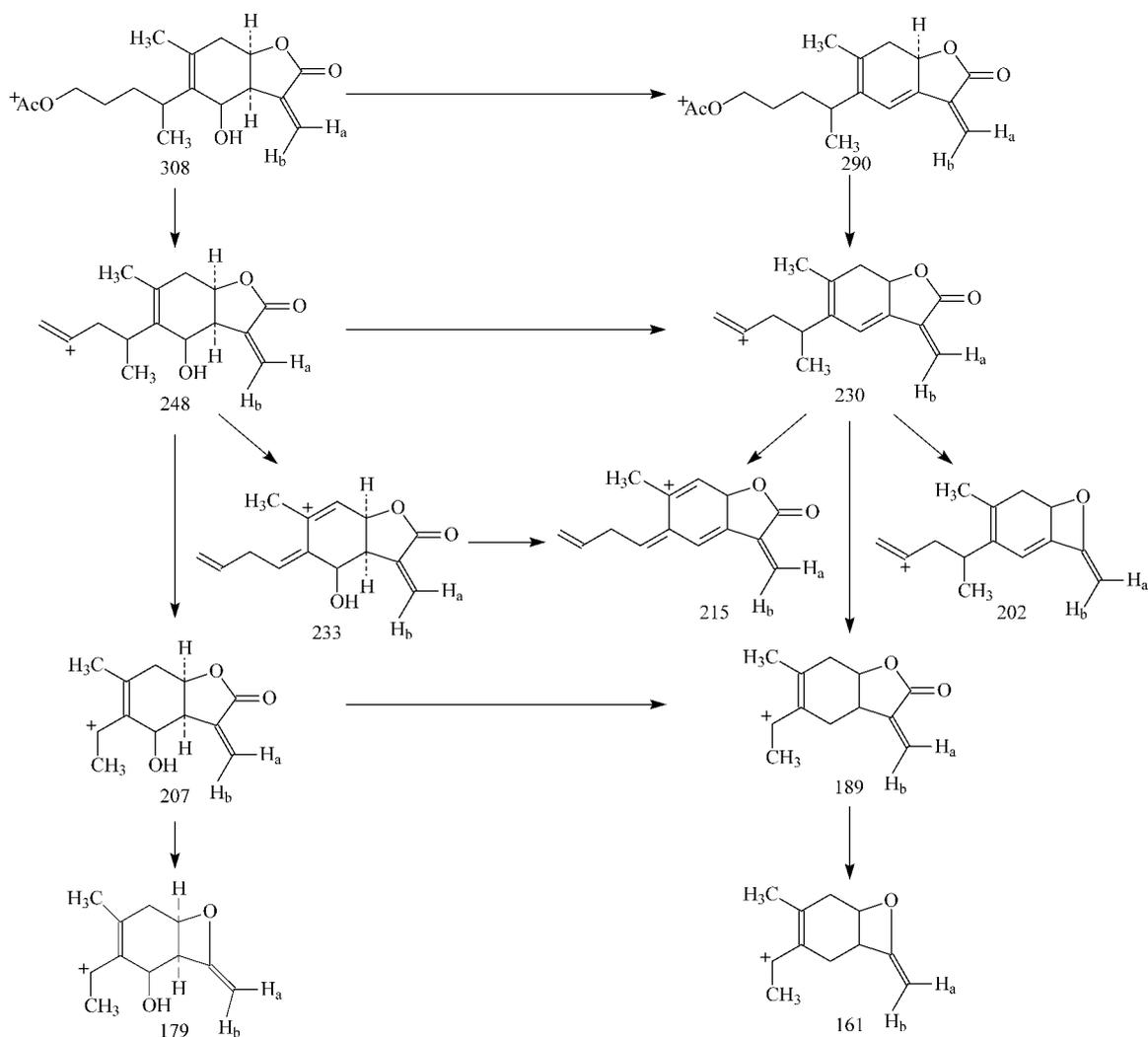


图 3 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的质谱裂解图式

Fig.3 Split pattern of mass spectra of 1-O-acetylbritannilactone

2.3 含量测定方法评价

在“1.3.3”节色谱条件下，“1.3”节所配制样品溶液和对照品溶液(下同)的色谱图见图4。1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的保留时间约为9.4 min,峰对称因子为1.02,理论塔板数为12 350,主峰与相邻色谱峰的分离度远远大于2。

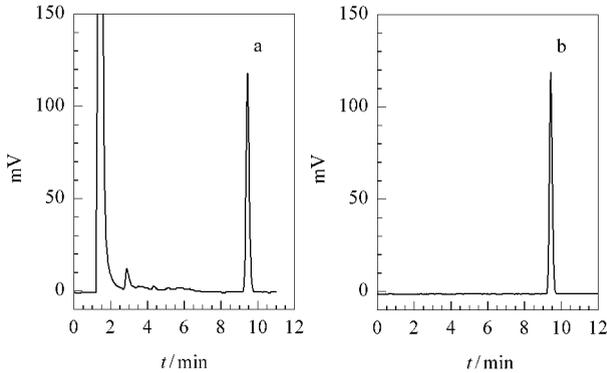


图4 欧亚旋覆花样品(a)和1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品(b)的色谱图

Fig.4 Chromatograms of the *I. Britannica L.* sample (a) and 1-*O*-acetylbritannilactone (b)

线性范围 分别吸取对照品溶液(0.456 g/L) 3, 6, 9, 12, 15, 18 μ L注入液相色谱仪,测定峰面积,以峰面积的对数对质量浓度的对数作图,得线性回归方程 $\log A = 4.7248 + 2.7006 \log C$ ($r = 0.9998$, $n = 6$),1-氧-乙酰大花旋覆花内酯在进样量为1.37~8.21 μ g时与峰面积呈良好线性关系。

稳定性 取欧亚旋覆花样品溶液,每隔1 h吸取10 μ L注入色谱仪,共测定8 h,峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.7%,样品溶液至少稳定8 h。

精密度 吸取同一样品溶液10 μ L,重复进样5次,其1-氧-乙酰大花旋覆花内酯含量的RSD为1.1%,表明方法精密度良好。

重复性 精密称取欧亚旋覆花干燥样品5份,每份1.0 g,按“1.3.1”方法制备样品溶液。分别吸取10 μ L,测定1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的含量,其RSD为0.5% ($n = 5$),表明方法的重复性良好。

回收率 精密称取6份已知含量的欧亚旋覆花干燥样品各0.5 g,分别加入对照品溶液5 mL,制备样品溶液。吸取该样品溶液10 μ L,注入液相色谱仪,记录峰面积,以外标两点法计算回收率,得平均回收率为100.2%,RSD为1.3%。

最低检测限 取1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品溶液,加甲醇逐步稀释,进样10 μ L,以峰高为噪声的2倍($S/N = 2$)计,1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的最低检测限为0.54 μ g。

2.4 实际样品测定

取不同产地的欧亚旋覆花干燥样品,制备样品溶液。吸取该样品溶液各10 μ L,“1.3.2”节对照品溶液8 μ L和12 μ L分别注入色谱仪,记录峰面积,以外标两点法计算含量,结果见表1。

表1 不同产地的欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的含量

Table 1 The content of 1-*O*-acetylbritannilactone in *I. Britannica L.* samples of different sources

Sample	Content/(mg/g)	RSD/%
Flower(Shanxi)	3.44	1.03
Stem(Shanxi)	2.47	1.26
Overground part(Shanxi)	2.62	1.37
Flower(Hebei)	1.38	1.14
Flower(Henan)	1.27	1.23

2.5 讨论

(1)欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的含量较高,具有一定的生物活性,从其氯仿提取物中容易制备,纯度较高。(2)欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的最大吸收波长为208 nm,使用紫外末端波长检测时,最低检测限为18 ng。虽然用紫外检测器末端波长测定1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的检测灵敏度比ELSD高,但由于中药所含成分复杂,许多成分都能出峰,常常需要使用梯度洗脱,耗时,结果重复性差。使用蒸发光检测器,由于漂移管温度较高,某些成分可能挥发掉,色谱峰数减少,可以使用等度洗脱测定欧亚旋覆花中1-氧-乙酰大花旋覆花内酯的含量,克服了紫外检测器的缺点。

参考文献:

[1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部. 北京:化学工业出版社),2005. 227

[2] Kobayashi T, Song Q H, Hong T, Kitamura H, Cyong J C. Phytotherapy Research, 2002, 16(4): 377

[3] Park E J, Kim J. Planta Med, 1998, 64(8): 752

[4] Iijima K, Kiyohara H, Tanaka M, Matsumoto T, Cyong J C, Yamada H. Planta Med, 1995, 61(1): 50

[5] Han M, Wen J K, Zheng B, Zhang D Q. Life Sciences, 2004, 75: 675

[6] Kim S R, Park M J, Lee M K, Sung S H, Park E J, Kim J, Kim S Y, Oh T H, Markelonis G J, Kim Y C. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 32(7): 596

[7] Zhou Bingnan, Bai Naisheng, Lin Longze, Cordell G A. Phytochemistry, 1993, 34(1): 249

[8] Xie Xiuqiong. The Development and Application for New Praeparatum of Chinese Medicinal Materials. Beijing: People's Medical Publishing House (谢秀琼. 中药新制剂开发与应用. 北京:人民卫生出版社),2000. 9