

# RP-HPLC测定藏木香中土木香内酯和异土木香内酯含量

肖远灿<sup>1,2</sup>, 胡凤祖<sup>1\*</sup> (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**目的 建立了反相高效液相色谱法同时测定藏木香中土木香内酯和异土木香内酯的方法。方法 采用 Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm); 流动相为乙腈-0.04%磷酸溶液 (50:50); 检测波长: 194 nm; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。结果 异构体土木香内酯和异土木香内酯达到基线分离, 含量测定的线性良好, 线性范围和相关系数分别为 0.07 ~ 4.80 μg · L<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$ ), 0.07 ~ 4.85 μg · L<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$ ); 回收率分别为 97.5% 和 102.1%; 方法精密度良好, RSD 分别为 1.56% 和 1.87% ( $n=5$ ); 方法重现性良好, RSD 分别为 1.67% 和 0.92% ( $n=5$ )。结论 所建立的方法简便、快捷、准确, 重现性好, 可用于藏木香药材及其制剂的质量控制。

**关键词:**反相高效液相色谱法; 藏木香; 土木香内酯; 异土木香内酯; 含量测定

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2007)07-0491-003

## Determination of Alantolactone and Isoalantolactone in Herb *Inula racemosa* Hook. f. by RP-HPLC

XIAO Yuan-can<sup>1,2</sup>, HU Feng-zu<sup>1\*</sup> (1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a quantitative RP-HPLC method for the simultaneous determination of alantolactone and isoalantolactone in herb *Inula racemosa* Hook. f. **METHODS** A column of Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.04% phosphate (50:50). The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> with UV detection wavelength at 194 nm. **RESULTS** Isomer alantolactone and isoalantolactone showed good separable degree. A good linearity was obtained with the correlation coefficients ranged of 0.07 ~ 4.80 μg · L<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$ ) and 0.07 ~ 4.85 μg · L<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$ ). The average recoveries were 97.5% and 102.1%. The precision and accuracy of the assay were 1.56% and 1.87% ( $n=5$ ). **CONCLUSION** The method is rapid, accurate, reliable and can be used to control the quality of herb *Inula racemosa* Hook. f. and its products.

**KEY WORDS:** RP-HPLC; *Inula racemosa* Hook. f.; alantolactone; isoalantolactone; determination

(C-5), 62.8 (C-6), 52.4 (COOMe)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道的 jasm inoside 一致, 故鉴定为 jasm inoside。

化合物 8: 白色针晶 (CH<sub>3</sub>OH), mp 191 ~ 192, 体积分数为 5% 的硫酸-乙醇溶液显蓝色。ESI-MS  $m/z$ : 395 [M + Na]<sup>+</sup>, 373 [M + 1]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.84 (6H, s, 3, 5-OMe), 4.35 (2H, dd,  $J=5.4, 1.4$  Hz, H-9), 6.21 (1H, dt,  $J=15.6, 5.4$  Hz, H-8), 6.44 (1H, dt,  $J=15.6, 1.4$  Hz, H-7), 6.73 (2H, s, H-2, 6), 4.83 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-1 Glc); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 134.1 (C-1), 153.6 (C-3, 5), 107.4 (C-2, 6), 135.7 (C-4), 128.6 (C-7), 130.3 (C-8), 105.3 (C-1), 75.4 (C-2), 77.4 (C-3), 71.1 (C-4), 78.4 (C-5), 62.6 (C-6), 56.5 (2, 6-COOMe)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道的丁香苷一致, 故鉴定为丁香苷 (syringin)。

化合物 2 和 6 与相应对照品对照, R<sub>f</sub> 值一致,

且混合熔点不下降, 分别鉴定为 谷甾醇, 胡萝卜苷。

## REFERENCES

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publisher, 1977: 1825-1826.
- [2] RDSM Y, SAL NA D, V LLARREAL M L, et al. Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3, 4-seco-olean-18-ene-3, 28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum* [J]. *Planta Med*, 2001, 67 (5): 443-446.
- [3] CHEN B, ZHU M, XING W X, et al. Studies on the chemical constituents from *Eucalyptus globulus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27 (8): 596-597.
- [4] CHEN W S, JIA X M. Chemical constituents of *Salvia przewalskii* Maxim [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, 38 (5): 354-357.
- [5] SAL MUZZAMAN S, FARRUKH H, SAB IRA B, et al. Olean-derd, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* [J]. *J Nat Prod*, 1988, 51 (2): 229-233.
- [6] SHEN Y C, LIN S L. New secoiridoid glucosides from *Jasminum lanceolarium* [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 515-518.
- [7] LI J, JIANG Y, TU P F, et al. Studies on chemical constituents from roots of *Polygala tricomis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31 (1): 45-47. (收稿日期: 2006-06-21)

作者简介: 肖远灿, 男, 硕士研究生 \* 通讯作者: 胡凤祖, 副研究员, 硕士生导师 Tel: (0971) 6132750 E-mail: hufz@nwpb.ac.cn

藏木香为菊科植物藏木香 (*Inula racemosa* Hook. f.)和 *Inula helenium* L. 的干燥根,具有健脾和胃,调气解郁,止痛安胎作用,用于胸肋、脘腹胀痛,呕吐泻痢,胸肋挫伤,岔气作痛,胎动不安等症<sup>[1-2]</sup>。现代研究表明,土木香内酯和异土木香内酯是藏木香的主要活性成分,具有显著的抗炎、保肝活性,可抑制感染人型结核杆菌,还能清除活性氧自由基<sup>[2-7]</sup>。目前,对土木香内酯和异土木香内酯的定量分析主要有毛细管电泳法<sup>[3]</sup>,气相色谱法<sup>[4-5]</sup>,薄层扫描法<sup>[6-7]</sup>,单扫示波极谱法<sup>[8]</sup>等,而对它们的高效液相色谱分析法报道较少。本实验建立了 HPLC-PAD 同时测定藏木香中土木香内酯和异土木香内酯含量的方法,为更好地控制藏木香药材及其制剂的质量和建立相关质量标准的建立提供了依据。

## 1 仪器和试剂

高效液相色谱仪: Waters 515 双泵、Waters 2996 PAD 二级管阵列检测器、Waters Empower 色谱工作站。

土木香内酯 (110760-200204)和异土木香内酯 (0761-200002)对照品 (中国药品生物制品检定所),藏木香药材 (*Inula racemosa* Hook. f.,青海金诃藏药药业股份有限公司),乙腈 (色谱纯),甲醇 (分析纯),磷酸 (分析纯),水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件和系统适应性实验

色谱柱: Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm ×250 mm, 5.0 μm)。流动相: 乙腈-0.04%磷酸溶液 (50:50)。检测波长 194 nm。流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。柱温: 30 ℃,进样量 10 μL。

在该色谱条件下测定土木香内酯和异土木香内酯对照品溶液,藏木香药材供试品溶液,色谱图见图 1。如图 1 所示,土木香内酯和异土木香内酯达到基线分离,理论塔板数分别为 3 235 和 3 619。

### 2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备

#### 2.2.1 对照品储备液的制备

精密称取土木香内酯 9.6 mg,异土木香内酯 9.7 mg 用甲醇分别溶于 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,得各自的对照品溶液。精密吸取各对照品溶液 5.0 mL,置于 10.0 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得土木香内酯 0.48 g · L<sup>-1</sup>,异土木香内酯 0.485 g · L<sup>-1</sup>的混合对照品储备液。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

取藏木香药材 100 g,粉碎,过 40 目筛,精确称取该粉末 0.200 g 于 100 mL 具塞三角瓶中,加甲醇 80 mL,超声 40 min,放

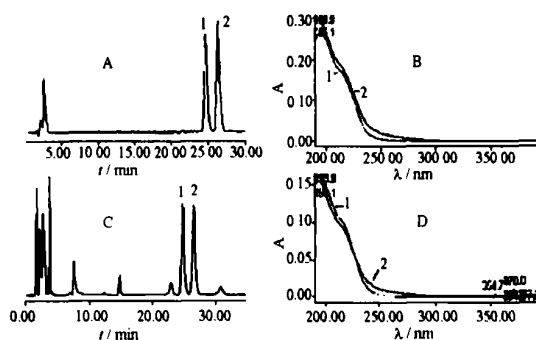


图 1 HPLC 色谱图对照品和藏木香药材的色谱图

A - 对照品 HPLC 色谱图; B - 对照品紫外光谱图; C - 藏木香制备液 HPLC 色谱图; D - 藏木香制备液相关物质紫外光谱图; 1 - 异土木香内酯; 2 - 土木香内酯

Fig 1 Chromatograms of reference and sample

A - HPLC of chemical reference substance; B - UV spectrum of reference substance; C - HPLC of sample; D - UV spectrum of related substance of sample; 1 - isoalantolactone; 2 - alantolactone

冷,过滤并定容于 100 mL 量瓶中,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 线性范围

取“2.2.1”中制备的对照品储备液 1.0 mL,采用倍比稀释法制成系列质量浓度的溶液,在“2.1”色谱条件下,取 10 μL 注入液相色谱仪分析并记录结果 (色谱峰面积)。以对照品进样量 ( $x, \mu\text{g}$ ) 为横坐标,峰面积  $A$  为纵坐标,进行线性回归,得土木香内酯和异土木香内酯回归方程及相关系数如下:

土木香内酯:  $A = 39\ 321x - 167\ 128$ ,  $r = 0.999\ 8$ ; 线性范围: 0.07 ~ 4.80 μg;

异土木香内酯:  $A = 32\ 234x - 82\ 248$ ,  $r = 0.999\ 8$ ; 线性范围: 0.07 ~ 4.85 μg。

### 2.4 精密度的实验

取混合对照品溶液 (土木香内酯 120.00 mg · L<sup>-1</sup>,异土木香内酯 121.25 mg · L<sup>-1</sup>),重复进样 5 次,每次 10 μL,记录色谱峰面积。结果,土木香内酯和异土木香内酯含量的 RSD 分别为 1.56% 和 1.87%。

### 2.5 重复性实验

取同一批藏木香药材,按“2.2.2”项下方法,重复 5 次取样制备供试品溶液,按“2.1”项下方法测定并计算含量,土木香内酯和异土木香内酯含量的 RSD 分别为 1.67% 和 0.92%。

### 2.6 回收率实验

取已测知含量的同一批藏木香药材 6 份,每份 0.100 g,其中 5 份按约等含量精密加入土木香内酯和异土木香内酯对照品,另一份不加对照品,然后按“2.2.2”项下方法处理并测定含量,求得土木香内

酯和异土木香内酯的回收率,结果见表 1。

表 1 回收率结果 .  $n = 5$

Tab 1 Recovery of the assay.  $n = 5$

Components	Background	Added	Detected	Recovery	Average recovery	RSD
	/mg	/mg	/mg	%	%	%
Alantolactone	2.31	2.25	4.50	97.3	98.2	2.43
	2.31	2.37	4.66	99.2		
	2.31	2.28	4.51	96.5		
	2.31	2.02	4.25	96.0		
	2.31	2.13	4.48	101.9		
Isoalantolactone	2.66	2.74	5.50	103.6	101.4	1.92
	2.66	2.63	5.33	101.5		
	2.66	2.69	5.38	101.1		
	2.66	2.52	5.14	98.4		
	2.66	2.43	5.15	102.5		

## 2.7 稳定性实验

称取藏木香样品 0.200 g,按“2.2.2 项下方法处理,得供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定土木香内酯和异土木香内酯,记录相应峰面积,计算 6 次进样相应物质峰面积的 RSD 值。土木香内酯和异土木香内酯峰面积的 RSD 分别为 1.43% 和 0.87%,表明供试品溶液在 10 h 内含量基本保持稳定。

## 2.8 样品测定

对青海金诃藏药药业股份有限公司提供的 3 批藏木香药材按“2.2.2 项下方法处理,在“2.1 色谱条件下进样。测定峰面积,按标准曲线法计算其中土木香内酯和异土木香内酯的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 .  $n = 4$

Tab 2 Results of determination of samples.  $n = 4$

Components	Lot No.	Content/mg · g <sup>-1</sup>
Alantolactone	050801	22.82
	050802	23.15
	050803	23.03
Isoalantolactone	050801	26.56
	050802	25.92
	050803	26.75

## 3 讨论

### 3.1 提取方法的考察

参考文献<sup>[3-7]</sup>中对土木香内酯和异土木香内酯的提取,分别采用氯仿冷浸提取 16 h 和甲醇超声提取的方法对同一批样品进行了提取和测定,比较了二者对目标物质土木香内酯和异土木香内酯的提取率,发现该两种方法的提取率差别不大。然而氯仿冷浸法耗时长,操作较繁琐,不利于快速、及时分析,故采用甲醇超声提取法处理样品。比较了超声处理时间对提取率的影响,发现超声 40 min 能较完全的提取药材中的土木香内酯和异土木香内酯,所以采用甲醇超声处理 40 min 为提取方法。

### 3.2 检测波长的选择

选择较高灵敏度的检测波长可以提高分析的精密密度,同时也可以降低最小检测量。本实验采用 PAD 检测器在 190 ~ 400 nm 内对对照品溶液和样品溶液进行了全波长扫描。由紫外扫描结果可知,土木香内酯和异土木香内酯分别在 193.9 和 195.1 nm 有最大吸收,故选择 194 nm 作为检测波长。

### 3.3 流动相的选择

分别采用乙腈-水,甲醇-水流动相体系进行实验,结果发现,乙腈-水体系有更好的色谱表现,对目标峰的干扰较小。经过对乙腈-水比例多次调整,在权衡分离度与分析时间后,选择了乙腈-水(50:50)作为流动相。另外,为了改善目标物质色谱峰峰形,在流动相体系中还加入的少量磷酸。

### 3.4 方法的优缺点

与目前土木香内酯和异土木香内酯等定量分析方法相比,本实验建立的反相高效液相色谱分析法较气相色谱法耗时较长,检测限较高,但重现性好;较薄层扫描法定量准确,简便;较毛细管电泳法和单扫示波极谱法更具通用性和实用性。

## 4 结论

本实验建立的同时测定藏木香药材中土木香内酯和异土木香内酯含量的方法,样品处理操作简便,精密度高,重复性好,选择性好,干扰较小,适合藏木香药材及其制剂中土木香内酯和异土木香内酯含量的分析,可以作为藏木香药材及其制剂质量控制的量化方法。

## REFERENCES

- [1] Ch. P (2005) Vol. 1 (中国药典 2005 年版·一部) [S]. 2005: 13.
- [2] LUO D S. *Tibetan Herbal of China* (中华藏本草) [M]. Beijing: Nationalities Publishing House (民族出版社), 1997: 254-255.
- [3] WANG K T, LU H T, ZHAO Y K, et al. Separation and determination of alantolactone and isoalantolactone in traditional Chinese herbs by capillary electrophoresis [J]. *Talanta*, 2000, (52): 1001-1005.
- [4] WANG X L, LUAN Y, LU Y J, et al. GC determination alantolactone in herb *Inula helenium* L [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin* (山东中医药大学学报), 2005, 29 (4): 322-323.
- [5] XIA J, JIS. Determination of isomers in Radix Inulae by GC [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40 (24): 1895-1896.
- [6] LI G L, WANG H L, LIAN R Q. Assay alantolactone in herb *Inula helenium* L. by thin layer scanning [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2002, 8 (6): 62-63.
- [7] YAN Z J, GAO L, WANG H Y, et al. Assay isoalantolactone in herb *Inula helenium* L. by thin layer scanning [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族医药杂志), 1999, 12 (5): 132.
- [8] YUAN Z B, ZOU H. On the electrochemical behavior of alantolactone [J]. *J Instum Anal* (分析测试学报), 1998, 17 (2): 47-49.

(收稿日期: 2006-06-20)