

The Extraction and Quantitative Analysis of Lupeol of *Elephantopus scaber* Linn. by RP-HPLC

Jianhua Liao, Yifei Wei

School of Pharmaceutical Sciences, Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi
Email: liaojianhua715@163.com

Received: Mar. 27th, 2018; accepted: Apr. 12th, 2018; published: Apr. 23rd, 2018

Abstract

The lupeol was extracted from *Elephantopus scaber* Linn. by the chemical extraction process and the content of lupeol in *Elephantopus scaber* Linn. was detected by the RP-HPLC method for the quantitative analysis of lupeol of *Elephantopus scaber* Linn. The chromatographic parathion was accomplished on a Wondasil C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) eluted with a mobile phase composed of methanol and water (9:1), and with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The RP-HPLC experiment was achieved at 30°C, and UV detection was set at 206 nm. The calibration curve was linear in the range of 0.25~5.0 μg·mL⁻¹ (r = 0.9998) for lupeol, with acceptable precision and accuracy. The established method was proved to be simple, reproducible, accurate, and can be used to evaluate the quality of *Elephantopus scaber* Linn.

Keywords

Extraction, Quantitative Analysis, *Elephantopus scaber* Linn., Lupeol, RP-HPLC

地胆草中羽扇豆醇的提取及采用反相 HPLC法测定其含量

廖建华, 魏一飞

赣南医学院药学院, 江西 赣州
Email: liaojianhua715@163.com

收稿日期: 2018年3月27日; 录用日期: 2018年4月12日; 发布日期: 2018年4月23日

摘要

我们采用化学提取法从地胆草中提取了羽扇豆醇, 并建立了反相-HPLC法测定地胆草中羽扇豆醇含量的方法, 为地胆草的质量分析和评价提供科学依据。采用了Wondasil C18柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温为30°C, 甲醇-水(9:1)为流动相, 在流速1.0 mL·min⁻¹和紫外检测波长206 nm下进样20 μL对地胆草石油醚提取物进行HPLC分析。结果发现: 羽扇豆醇在0.25~5.0 μg·mL⁻¹ (r = 0.9998)呈良好的线性关系, 平均加样回收率为98.1% (RSD 1.87%)。本方法简便, 重复性好, 为评价地胆草药材的质量提供科学依据。

关键词

提取, 定量分析, 地胆草, 羽扇豆醇, 液相色谱法

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

地胆草, 为菊科地胆草属植物, 主治感冒、扁桃体炎、眼结膜炎、黄疸、湿疹等症, 有清热、凉血、解毒、利湿之功效。据报道地胆草主要含倍半萜内酯、三萜、黄酮、甾醇等化合物[1]。其中倍半萜内酯具有一定的抑制肿瘤及细胞毒作用[2]。为了更好的科学合理利用中药地胆草的生物活性, 本研究提取分离了地胆草中的羽扇豆醇并采用反相液相色谱法对地胆草中羽扇豆醇的含量测定方法进行了研究。

2. 实验

2.1. 实验原料

羽扇豆醇对照品, 购于 Ark 公司, HPLC 检测其纯度 ≥ 98%。

甲醇(色谱纯, Alfa), 水为超纯水, 氯仿、醋酸乙酯(分析纯, 国药化学试剂公司)。地胆草, 药材于60°C干燥24 h, 粉碎, 过24目筛, 制成粗粉, 备用。

2.2. 表征方法

熔点测定使用 X-4 双目镜视显微熔点测定仪; 红外光谱用 Nicolet Impact 410 型红外光谱仪测定(美国 Thermo Nicolet 公司); 核磁共振用 BrukerDRX-400 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司, CD₃Cl 为氘代试剂, TMS 为内标); 质谱用赛默飞 ISQ™ LT, 单四极杆, GC-MS 系统测定。Wondasil C18 型高效液相色谱仪。

3. 方法与结果

3.1. 地胆草中羽扇豆醇的提取及纯化

3.1.1. 羽扇豆醇的提取与分离

地胆草干燥全草 10 kg, 用体积分数 80% 工业酒精回流提取, 减压浓缩至无醇味, 将浓缩液分别用石油醚, 乙酸乙酯, 饱和正丁醇萃取, 并萃取液浓缩, 得石油醚部分浸膏 65 g, 乙酸乙酯部分浸膏 500 g

及正丁醇部分浸膏 240 g。由于羽扇豆醇极性小, 其应存在于石油醚浸膏里, 因而对石油醚部分浸膏上硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 分离得到 A; 将 A 再经反复硅胶柱色谱, 分离得到化合物 Y1。

3.1.2. 结构鉴定

对所得粉末晶体进行紫外(UV)、红外(IR)、核磁共振谱(NMR)、质谱(MS)检测, 根据光谱表征, 进行波谱解析确定其组成与结构。结果表明: white microcrystalline powder; mp 213.0°C; $[\alpha]^{25}_D + 25.7$ (*c* 0.70 in CHCl₃); UV(CHCl₃) $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 228(60.1), 285(31.8) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3326, 2931, 1631, 1450, 1377, 1035, 874; EIMS *m/z* (%) 425(18) [M+H], 409(23) [M+OH] 218(68), 207-(60), and 189(100); ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.77, 0.80, 0.84, 0.95, 0.97, 1.03 and 1.70 (each 3H, s, H-23, 24, 25, 26 27, 28, and 30), 2.38 (1H, dt, *J* = 4.0 and 9.6 Hz, H-19), 3.19 (1H, dd, *J* = 4.8 and 11.6 Hz, H-3), 4.57 (1H, brs, H-29b), 4.68 (1H, brs, H-29a); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 39.1, 27.8, 79.3, 39.2, 55.6, 18.7, 34.6, 41.2, 50.7, 37.5, 21.3, 25.5, 38.4, 43.2, 27.8, 35.9, 43.4, 48.3, 48.6, 151.1, 30.2, 40.4, 28.4, 15.8, 16.5, 16.3, 14.9, 18.4, 109.6, 19.7 (C-1-C-30, respectively)。附图 1, 图 2。

3.2. 反相 HPLC 法测定地胆草中羽扇豆醇含量

3.2.1. 色谱条件

色谱柱 Wondasil C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(9:1), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 206 nm; 柱温为 30°C; 进样量 20 μL。通过对照空白样品, 在该液相色谱条件下, 羽扇豆醇对照品和地胆草样品的色谱图见图 3。

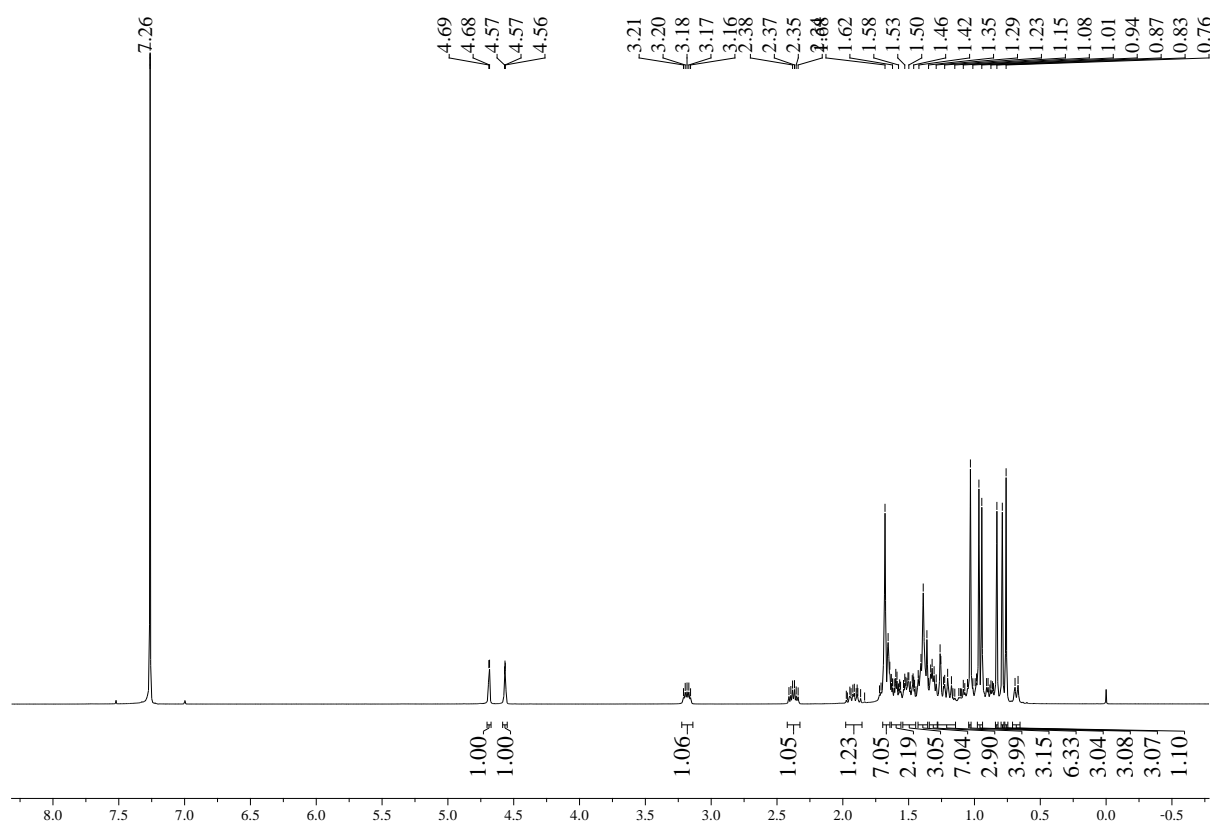


Figure 1. ¹H NMR spectra of lupeol

图 1. 羽扇豆醇的 ¹H NMR

3.2.2. 羽扇豆醇对照品溶液的制备

取羽扇豆醇对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并制成 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 即得。

3.2.3. 供试品溶液的制备

取地胆草样品粉末 2.0000 g , 精密称定, 置于 100 mL 具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 100 mL , 称定质量, 40°C 水浴温浸 15 h , 超声振荡提取 40 min , 冷却, 再称重, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀。经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取滤液, 即得供试品溶液。

3.2.4. 标准曲线的绘制

取羽扇豆醇对照品溶液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取滤液, 备用。分别精密吸取对照品溶液 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 1 、 2 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度线, 制成浓度为 0.25 、 0.50 、 1.0 、 2.5 、 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的羽扇豆醇对照品溶液, 分别进样 $20 \mu\text{L}$, 以所得色谱峰的峰面积为纵坐标(y), 羽扇豆醇的量(μg)为横坐标(x)进行线性回归, 回归方程为 $y = 456.9x + 15.09$ ($r = 0.9998$, $n = 6$), 线性范围 $0.25\sim 5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.2.5. 仪器精密度试验

取 $5.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 测得结果分别为 $5.010 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4.996 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5.001 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4.995 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5.011 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.15% 。结果表明仪器精密度高。

3.2.6. 稳定性试验

取供试品溶液, 分别在 2 , 4 , 8 , 12 , 24 , 48 , 72 h 内按上述色谱条件测定样品中羽扇豆醇含量分别为 0.021% , 0.025% , 0.023% , 0.020% , 0.024% , 0.022% , 0.023% 。结果表明, 羽扇豆醇含量的 RSD 为 5.94% 。因此, 样品溶液在 72 h 内稳定。

3.2.7. 重复性试验

取地胆草样品 2.0000 g , 共 5 份, 精密称定, 按 3.2.6 项下操作, 分别测定羽扇豆醇的含量。结果表明, 五份样品测得羽扇豆醇含量分别为: 0.0230% 、 0.0221% 、 0.0230% 、 0.0220% 、 0.0230% , 平均值为 0.0226% , RSD 为 2.31% , 结果表明该实验方法重复性良好。

3.2.8. 加样回收率试验

取已测得含量的地胆草样品(0.0226%)约 2.0 g , 精密称定, 分别加入一定量的羽扇豆醇对照品, 按供试品的制备及上述色谱条件测定, 计算回收率。结果表明平均回收率为 98.1% , RSD 为 1.87% , 见表 1。

Table 1. The recovery rate of lupeol in the extract of *Elephantopus scaber* Linn. ($n = 6$)

表 1. 地胆草提取物中羽扇豆醇的加样回收率($n = 6$)

样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.2251	0.2016	0.4166	95.0	98.1	1.87
0.2262	0.2016	0.4249	98.7		
0.2273	0.2016	0.4283	99.7		
0.2271	0.2016	0.4201	95.7		
0.2270	0.2016	0.4250	98.2		
0.2266	0.2016	0.4308	101.3		

3.2.9. 样品测定结果

按上述色谱条件进行反相-HPLC 分析, 按外标法计算地胆草中羽扇豆醇的百分含量, 结果测得为 0.0226%。

4. 结论

1) 本研究通过地胆草中羽扇豆醇的提取, 并在提取之后对比反相-HPLC 法测定地胆草中的羽扇豆醇含量, 建立 RP-HPLC 含量测定方法。通过精密度试验, 重复性试验以及加样回收率试验证实该方法简便易行, 准确性高, 可为地胆草药材的质量控制和评价提供方法。

2) 本研究考察了化学提取法分离提取地胆草中羽扇豆醇的含量, 与反相-HPLC 法所测含量相比, 含量更低, 这可能是由于在提取过程中反复的提取分离对产物有损失。

3) 采用反相-液相色谱法, 可有效的控制地胆草中羽扇豆醇的质量, 且该方法重复性好, 操作简便、灵敏、准确。

基金项目

江西省卫生厅科技计划项目(2013A043), 校级课题(YB201319)资助。

参考文献

- [1] But, P.P.H., Hon, P.M., Cao, H., *et al.* (1997) Sesquiterpene Lactones from *Elephantopus scaber*. *Phytochemistry*, **44**, 113-116. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00470-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00470-0)
- [2] 梁侨丽, 龚祝南, 绪广林, 等. 地胆草倍半萜内酯化合物体外抗肿瘤作用的研究[J]. 天然产物开发与研究, 2008, 20(3): 436-439.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-5231, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: jocr@hanspub.org