

· 研究报告 ·

HPLC 法测定条叶旋覆花不同部位中线叶旋覆花内酯 A 的含量

李玉斌, 叶 霖, 张卫东 (海军军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 利用 HPLC 法对 7 批不同产地金沸草基源植物之一条叶旋覆花的干燥地上部分中线叶旋覆花内酯 A 的含量进行测定, 并与其在头状花序中的含量比较, 为金沸草药材质量标准的制定及合理应用提供依据。方法 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 在柱温为 30 °C、流速为 1.2 ml/min 下以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 检测波长为 212 nm。结果 实验结果符合《中华人民共和国药典》(2015 版)方法学验证的要求, 金沸草基源条叶旋覆花的头状花序中线叶旋覆花内酯 A 的平均含量为 0.732%, 在干燥地上部分的平均含量为 0.125%, 仅为头状花序的 1/7, 差异显著。结论 建立的质量控制方法简单易行, 可为条叶旋覆花的质量控制及合理用药提供数据支持和科学依据。

[关键词] 条叶旋覆花; 干燥地上部分; 头状花序; 线叶旋覆花内酯 A; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)03-0245-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202001049

Determination of britanin content in different parts of *Inula linariifolia* Turcz by HPLC

LI Yubin, YE Ji, ZHANG Weidong (Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To determine and compare britanin content in dried aerial parts and capitulum of *Inula linariifolia* Turcz from 7 different origins by HPLC. **Methods** Analysis was performed on Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Acetonitrile and water were used as mobile phase for gradient elution at 1.2 ml/min. Column temperature was 30 °C and the detection wavelength at 212 nm. **Results** The results meet the requirements of the method validation in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. The average britanin content in dried aerial parts of *Inula linariifolia* Turcz is 0.125% vs 0.732% in capitulum, which is significantly different. **Conclusion** The established method is simple and convenient. It can be used for quality control of *Inula linariifolia* Turcz.

[Key words] *Inula linariifolia* Turcz.; dried aerial parts; capitulum; britanin; content determination

金沸草(*Inulae Herba*)为菊科(*Asteraceae*)植物条叶旋覆花(*Inula linariifolia* Turcz.)或旋覆花(*Inula japonica* Thunb.)的干燥地上部分, 被列入 2015 年版《中国药典》, 具有降气、消痰、行水的功效, 临床上应用广泛^[1]。金沸草的不同基源中, 已有多篇文献报道过旋覆花的含量测定, 而条叶旋覆花的含量测定目前尚未见报道^[2-6]。

前期研究发现线叶旋覆花内酯 A (britanin) 是

[基金项目] “长江学者奖励计划”项目; 国家自然科学基金项目(81520108030, 21472238); 上海市活性天然产物制备工程技术研究中心项目(16DZ2280200); 上海市科委中药现代化专项(13401900103, 13401900101); 国家重点研发计划(2017YFC1700200)

[作者简介] 李玉斌, 硕士研究生, 研究方向: 化学生物学, Email: chrislyb@163.com

[通讯作者] 张卫东, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础和创新药物, Tel: (021)81871244, Email: wdzhangy@Hotmail.com

从条叶旋覆花中分离得到的含量较高且抗炎活性显著的一个倍半萜内酯, 其结构式如图 1 所示。据文献报道, 线叶旋覆花内酯 A 可应用于慢性阻塞性肺疾病^[7]及心肌炎^[8]的预防和治疗, 具有神经保护^[9]功能, 能够通过抑制 NF-κB 和 MAPK 信号通路降低脂多糖(LPS)诱导的一氧化氮(NO)、前列腺素和炎性细胞因子的分泌水平^[10]。这些功能与金沸草治疗“外感风寒, 痰饮蓄结, 胸膈脾满”相对应, 因此可将其作为条叶旋覆花的重要质量标志物^[1]。本研究优化了线叶旋覆花内酯 A 的提取方法和色谱条件, 并开展系统适应性试验, 建立了 HPLC-UV 法测定条叶旋覆花的干燥地上部位和头状花序中线叶旋覆花内酯 A 的含量测定方法, 确定了含量较高的部位, 有助于药材的合理应用。该方法操作简单, 方便快捷, 可为金沸草的基源药材条叶旋覆花的质量标准制定提供数据支持和科学依据。

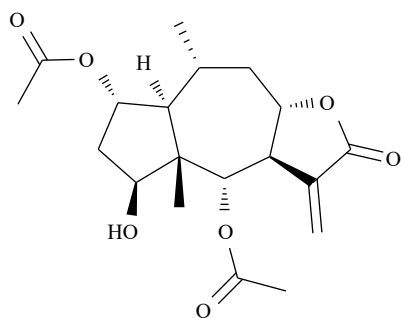


图1 线叶旋覆花内酯A的结构式

1 仪器与材料

1.1 仪器

HP-1100系列高效液相色谱仪(惠普,美国); G1311A四元泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1314A VWD可变波长检测器、G1315B DAD二极管阵列检测器(安捷伦,美国); Agilent Zorbax SB C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm; 安捷伦,美国); BP211D型电子天平(Sartorius, 德国)。

1.2 药材与试剂

7批条叶旋覆花的干燥地上部分购自不同地区,获得的头状花序部位经由海军军医大学药学院生药学教研室张汉明教授鉴定;线叶旋覆花内酯A对照品(britanin)为实验室自制,化学分子式为C₁₉H₂₆O₇,相对分子质量为366。经紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)和质谱(MS)分析,纯度≥98%,符合中药化学对照品的含量测定要求;乙腈为J.T Baker色谱纯,水为Milli-Q超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取条件

超声法提取,超声时间为40 min。溶剂:100%甲醇。溶剂体积倍数:40倍。

2.2 色谱条件

色谱柱为Agilent Zorbax SB C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 安捷伦,美国);初始流动相为乙腈-水(30:70),在20 min内升至乙腈-水(40:60)进行梯度洗脱,流速始终为1.2 ml/min;柱温为恒温30℃;检测波长212 nm。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取1.21 mg线叶旋覆花内酯A对照品,置于10 ml容量瓶中,用100%甲醇溶解后定容,摇匀,获得1 ml中含有线叶旋覆花内酯A 0.121 mg的对照品溶液(浓度为0.121 mg/ml),冷藏备用。

2.4 供试品溶液的制备

精密称定条叶旋覆花(头状花序)粉末(过3号筛)和条叶旋覆花(干燥地上部分)粉末(过3号筛)各1.0 g,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入40 ml 100%甲醇,密塞,称重,超声提取60 min后,静置放冷,再称重,加100%甲醇溶液补足失重,摇匀,过滤,取续滤液,在5 000 r/min条件下离心10 min,取上清液,即得条叶旋覆花头状花序和干燥地上部分的供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验

取“2.3”项下制备的对照品溶液(0.121 mg/ml)和“2.4”项下制备的两种供试品溶液,分别按“2.2”项下的色谱条件进样测定,采用二极管阵列检测器(DAD)进行全波长扫描,记录并查看保留时间为12.2 min处峰上5点的紫外吸收图。如图2所示,两种供试品溶液的最大吸收波长与对照品溶液的最大吸收波长一致,峰形均为单一峰,分离度达到规定的要求,该方法的专属性良好。

2.5.2 标准曲线的绘制

精密吸取“2.3”项下制备的浓度为0.121 mg/ml的线叶旋覆花内酯A对照品溶液各0.5、1、2、4、10、16、20、24 μl,根据“2.2”项下的条件进行色谱测定,记录峰面积积分值。以线叶旋覆花内酯A的进样量为横坐标(X,相当于μg数),峰面积积分值为纵坐标(Y),计算并绘制标准曲线。计算得线叶旋覆花内酯A含量测定的回归方程为 $Y = 1\,040.5X + 1.379$ ($r = 1.000\,0$),理论板数平均为25 554。结果显示线叶旋覆花内酯A在0.060~2.904 μg范围内呈现良好的线性关系。

2.5.3 精密度试验

精密吸取等量“2.3”项下制备的线叶旋覆花内酯A对照品溶液(0.121 mg/ml),根据“2.2”项下的条件进行色谱测定,记录线叶旋覆花内酯A的峰面积,连续测定6次。计算结果显示6份线叶旋覆花内酯A对照品溶液的峰面积RSD值为0.59%。表明仪器和方法具有较高的精密度,符合要求。

2.5.4 稳定性试验

取“2.4”项下制备的同一供试品,分别于提取后0、1、2、4、6、8、10、12 h按“2.2”项下的条件进行色谱测定,记录各谱图中线叶旋覆花内酯A的峰面积。结果显示,12 h内线叶旋覆花内酯A的峰面积的RSD为0.97%,具备良好的稳定性。

2.5.5 重现性试验

取样品批号为0003的条叶旋覆花5份,分别

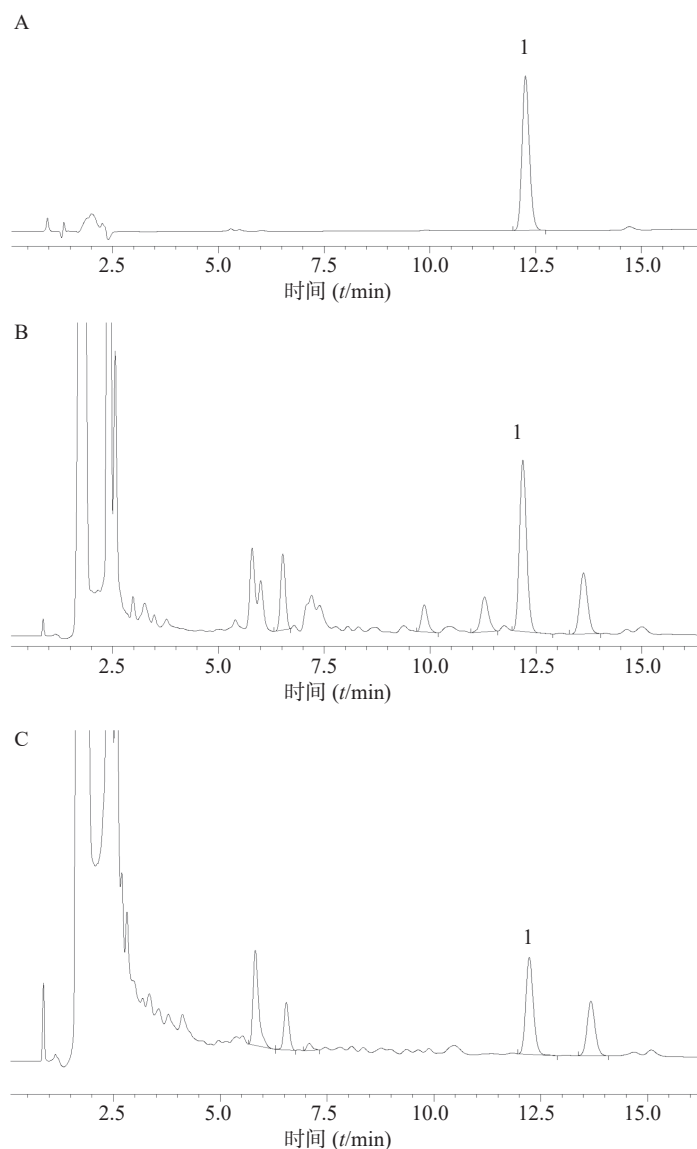


图2 对照品溶液和两种供试品溶液(批号0003)的HPLC图

A.对照品溶液;B.条叶旋覆花(头状花序)供试品溶液;C.条叶旋覆花(干燥地上部分)供试品溶液;1. 线叶旋覆花内酯A

精密称重,按照“2.2”项下的色谱条件,测定并计算线叶旋覆花内酯A的峰面积。根据结果计算得到其平均峰面积积分为399.9,平均峰面积积分值的RSD值为1.04%,表明该方法测定线叶旋覆花内酯A的含量重现性良好。

2.5.6 检测限和定量限

在“2.2”项下的色谱条件下,以100%的甲醇为溶剂对线叶旋覆花内酯A对照品溶液(0.121 mg/ml)进行倍比稀释,按信噪比为3测定最低检测限。结果表明,当线叶旋覆花内酯A对照品的浓度为1.51 $\mu\text{g/ml}$ 、进样量为1 μl 时,峰信号约为噪声的2~3倍,即最低检测限为1.51 ng。将线叶旋覆花内酯A对照品溶液稀释至浓度为0.453 $\mu\text{g/ml}$ 且信噪比约为10时,重复进样6次,计算得峰面积的RSD为1.96%,表明线叶旋覆花内酯A对照品的

定量限为0.453 $\mu\text{g/ml}$,即4.53 ng。

2.5.7 回收率试验

取同一批号的样品6份(批号为0003),分别精密加入与样品中线叶旋覆花内酯A含量相等的对照品,按“2.2”项下的色谱条件进行测定,计算线叶旋覆花内酯A的含量、回收率和RSD值。结果如表1所示,线叶旋覆花内酯A的平均回收率为95.77%,RSD为1.80%,表明该方法测定线叶旋覆花内酯A的加样回收率良好。

2.6 样品的含量测定

分别精密称取对照品与7个批次样品的头状花序和干燥地上部分,按“2.3”项下与“2.4”项下分别制备对照品溶液和供试品溶液,按“2.2”项下的条件进行色谱测定分析,每批样品平行3次,记录峰面积。根据上述标准曲线计算7批样品中线叶

表1 回收率试验结果

取样量(m/g)	样品中的含量(m/mg)	对照品加入量(m/mg)	测定量(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.505 0	0.803	0.770	1.555	97.8	95.77	1.80
0.524 2	0.834	0.770	1.557	94.3		
0.502 8	0.799	0.770	1.519	93.7		
0.509 1	0.809	0.770	1.562	97.8		
0.504 9	0.803	0.770	1.534	95.2		
0.509 6	0.810	0.770	1.546	95.8		

旋覆花内酯 A 的平均含量。结果如表 2 所示, 条叶旋覆花的头状花序中线叶旋覆花内酯 A 的平均含量为 0.732%, 干燥地上部分中线叶旋覆花内酯 A 的平均含量为 0.125%, 仅为头状花序的 1/7。

表2 条叶旋覆花的头状花序及地上干燥部分的含量测定结果

部位	编号	采集点	含量(%)	平均含量(%)
头状花序	0001	江苏省南京市玄武区	0.733	0.732
	0002	江苏省南京市溧水区	0.693	
	0003	安徽省马鞍山市含山县	0.936	
	0004	江苏省淮安市盱眙县	0.509	
	0005	安徽省滁州市明光市	0.709	
	0006	安徽省滁州市凤阳县	0.564	
	0007	安徽省六安市霍邱县	0.983	
干燥地上部分	0001	江苏省南京市玄武区	0.202	0.125
	0002	江苏省南京市溧水区	0.141	
	0003	安徽省马鞍山市含山县	0.158	
	0004	江苏省淮安市盱眙县	0.123	
	0005	安徽省滁州市明光市	0.059	
	0006	安徽省滁州市凤阳县	0.068	
	0007	安徽省六安市霍邱县	0.122	

3 讨论

提取方法和色谱条件是经过优化后选用的。本研究考察了超声、回流、浸渍 3 种提取方法, 其中冷浸法提取出的线叶旋覆花内酯 A 含量最高, 尽管提出率高, 但提取的杂质最多, 影响测定, 热回流法提出的含量最低。考虑提取方法的提出率及操作的可行性和便捷性, 选用超声法提取条叶旋覆花中的线叶旋覆花内酯 A。随后本研究考察了选择不同溶剂(水、不同浓度的乙醇或甲醇等)、不同溶剂倍数的溶剂体积(10、20、40、60 倍)及不同超声时间(10、20、40、60 min)等条件对线叶旋覆花内酯 A 的提取效果。结果显示, 当溶剂为 100% 甲醇、体积倍数为样品质量的 40 倍、超声时间为 40 min

时, 可以将条叶旋覆花中的线叶旋覆花内酯 A 充分提出。

通过比较 Inertsil ODS-3 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 岛津, 日本)、Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 瑞典)和 Agilent Zorbax SB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 安捷伦, 美国)3 种色谱柱, 发现 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱能更好地分离条叶旋覆花药材的化学成分, 而且线叶旋覆花内酯 A 峰峰形较好, 理论板数较高, 故选用该色谱柱分析。另外, 本研究考察了不同柱温(20、25、30 °C)、不同流动相系统(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水-甲酸等系统)、不同流速(0.8、1.0、1.2 ml/min)等条件对分离效果的影响, 结果表明柱温在 30 °C, 以乙腈-水为流动相在 1.2 ml/min 的流速下梯度洗脱时, 线叶旋覆花内酯 A 峰能较好地与其他峰达到基线分离。通过上述优化实验最终确定了方法部分所用的提取条件和色谱条件。

本文建立的以线叶旋覆花内酯 A 为标志物的金沸草的质量控制方法, 能够帮助研究人员在对金沸草的研究开发过程中, 对线叶旋覆花内酯 A 的含量进行质量控制, 区分伪劣及混淆药材, 选择质量合格的金沸草药材。另外, 本研究发现相对于条叶旋覆花的干燥地上部分, 线叶旋覆花内酯 A 在条叶旋覆花的头状花序中含量更高, 是更有效的用药部位, 为临床医师用药提供了参考。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 112.
- [2] 郭伟琳, 冷红琼, 邓亮, 等. UPLC法同时测定旋覆花属植物中2种倍半萜内酯成分的含量[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(12): 4-6, 10.
- [3] 马立满, 刘震, 尚明英, 等. HPLC法测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(3): 369-371.
- [4] 耿红梅, 张嫡群, 王云志, 等. 欧亚旋覆花中总黄酮的测定[J]. 中草药, 2006, 37(3): 450-451.

- [5] 杨茜, 刘慧, 何雅君, 等. HPLC法同时测定旋覆花属植物中5种倍半萜内酯成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(2): 116-120.
- [6] 万祺, 龙凌云, 裴月湖, 等. 旋覆花中鞣质的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2758-2759.
- [7] 张卫东, 杨保华, 游蓉丽, 等. 线叶旋覆花内酯A在制备预防/治疗慢性阻塞性肺疾病药物中的应用: 107998122A[P]. 2018-05-08.
- [8] 张卫东, 单磊, 金慧子, 等. 线叶旋覆花内酯A在制备治疗心肌炎药物中的应用: 102727486A[P]. 2012-10-17.
- [9] YANG T, ZHANG J, LU J H, et al. Risk factors influencing postoperative outcomes of major hepatic resection of hepatocellular carcinoma for patients with underlying liver diseases[J]. *World J Surg*, 2011, 35(9): 2073-2082.
- [10] PARK H H, KIM M J, LI Y, et al. Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and cytokine production via NF- κ B and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2): 296-302.
- [收稿日期] 2020-01-12 [修回日期] 2020-03-03
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 240 页)

3 讨论

HMS-01 在大鼠体内的药动学过程存在显著的性别差异。口服吸收的比较, 雌性大鼠的生物利用度远高于雄性, 体内的清除速率方面, 雌性比雄性慢, 与此同时, HMS-01 在雌性体内的半衰期也更长。存在性别差异的原因有待进一步深入研究。本实验采用的分析方法的特异性、灵敏性、准确性、精密度及稳定性均满足定量分析的要求。鉴于 HMS-01 在大鼠血浆中不稳定的情况, 在做动物实验时, 课题组将采取以下措施: 全血采集后立刻在 4 °C 下离心 2 min 获取血浆, 随即立刻取 50 μ l 血浆样品加入至 200 μ l 含内标的乙腈中, 从而阻断血浆中的水解酶对化合物进行水解。

【参考文献】

- [1] GANDEVIA S C. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(4): 1725-1789.
- [2] BAO L, CAI X X, WANG J B, et al. Anti-fatigue effects of small molecule oligopeptides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer in mice[J]. *Nutrients*, 2016, 8(12): E807.
- [3] VERMA S K, RAJEEVAN V, JAIN P, et al. Effect of garlic (*Alium sativum*) oil on exercise tolerance in patients with coronary artery disease[J]. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2005, 49(1): 115-118.
- [4] ØRTENBLAD N, WESTERBLAD H, NIELSEN J. Muscle glycogen stores and fatigue[J]. *J Physiol*, 2013, 591(18): 4405-4413.
- [5] 赵妍, 张梅, 任爱农, 等. LC-MS/MS分析大鼠口服清颗粒后血浆中9种成分的药代动力学[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(1): 85-90.
- [6] 吴晓霞, 彭娟, 范斌, 等. LC-MS-MS测定黄连解毒汤中3种生物碱在大鼠血清的含量及其药代动力学研究[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(10): 1276-1280.
- [收稿日期] 2019-07-09 [修回日期] 2020-05-06
[本文编辑] 陈盛新