

# 土木香药材 HPLC 指纹图谱研究及土木香内酯和异土木香内酯测定

张婊丽<sup>1</sup>, 霍长虹<sup>1</sup>, 刘 丽<sup>2</sup>, 李力更<sup>1</sup>, 王子方<sup>1</sup>, 史清文<sup>1\*</sup>

(1 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2 天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂, 天津 300112)

**摘要:**目的 建立土木香药材的指纹图谱, 测定主成分土木香内酯和异土木香内酯的量, 为土木香药材的鉴别及质量控制提供依据。方法 采用 HPLC-DAD 法。色谱条件: Hichrom C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长为 254 nm (指纹图谱), 220 nm。结果 建立了土木香药材的指纹图谱, 同时测定了 15 批药材中土木香内酯及异土木香内酯的量。结论 方法稳定可靠, 重现性和精密度良好, 可作为土木香药材的指纹图谱及主成分测定的方法, 为该药材的标准化种植及质量控制提供科学依据。

**关键词:** 土木香; 土木香内酯; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1539-04

## Studies on HPLC fingerprint and determination of alantolactone and isosalantolactone in *Inulae Radix*

ZHANG Man-li<sup>1</sup>, HUO Chang-hong<sup>1</sup>, LIU Li<sup>2</sup>, LI Li-geng<sup>1</sup>, WANG Yu-fang<sup>1</sup>, SHI Qing-wen<sup>1</sup>

(1 School of Pharmaceutical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2 Tianjin Lerentang Pharmaceutical Factory, Zhongxin Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300112, China)

**Abstract: Objective** To establish HPLC fingerprint of *Inulae Radix* and determine alantolactone and isosalantolactone simultaneously. **Methods** HPLC-DAD method was used and the separation was carried out on a Hichrom C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) with the mixture of acetonitrile and 0.1% formic acid as mobile phase in a gradient elution model (flow rate: 1.0 mL/min, detection wave: 254 nm for fingerprint and 220 nm for determination), and the column temperature was 25 °C. **Results** The fingerprint of *Inulae Radix* was established. Alantolactone and isosalantolactone in 15 batches of *Inulae Radix* were determined. **Conclusion** The method is sensitive, quick, and useful to actualize standardization planting. It can be used for the quality control for *Inulae Radix*.

**Key words:** *Inulae Radix*; alantolactone; HPLC; fingerprint

土木香为菊科植物土木香 *Inula helenium* L. 的干燥根。其味辛、苦, 性温, 归肝、脾经, 有健脾和胃、调气解郁、止痛安胎之功效, 主要用于胸胁、腕腹胀痛、呕吐泻痢、胸胁挫伤、岔气作痛、胎动不安<sup>[1]</sup>。土木香中主要的化学成分是倍半萜内酯类<sup>[2]</sup>, 包括土木香内酯、异土木香内酯、土木香醇、土木香酸、二氢土木香内酯等, 其中量较高的为土木香内酯和异土木香内酯。有文献报道土木香中的倍半萜类化合物具有抑制肿瘤细胞<sup>[3]</sup>、驱虫、抗菌、抑制平滑肌、降血糖和利胆等作用, 土木香的乙醇提取物还具有镇

痛作用<sup>[4]</sup>。此外, 因马兜铃酸的毒性作用, 国家食品药品监督管理局要求在成药处方中以土木香替代含马兜铃酸的青木香, 使得该药材的应用越来越广泛。因此, 明确土木香药材的化学成分, 建立全面的质量控制方法, 对该药材的合理开发利用具有重要意义。通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱已在中药材中广泛应用<sup>[5-15]</sup>。本实验首次建立了土木香药材的 HPLC 指纹特征图谱, 并建立了河北产土木香药材指纹图谱的共有模式, 同时测定了两个主成分土木香内酯和异土木香内酯的量, 为该药材的质量控制

\* 收稿日期: 2010-02-20

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (No. 08B032); 河北省留学回国人员科技活动项目 (No. 200602); 河北省卫生厅科研基金项目 (No. 05058, 08053)

作者简介: 张婊丽 (1978—), 女, 黑龙江省五常市人, 讲师, 博士在读, 主要从事中药及其化学成分研究。

Tel: (0311) 86265634 E-mail: zhang-manli@163.com

\* 通讯作者 史清文 Tel: (0311) 86265634 E-mail: shiqingwen@hebm.u.edu.cn

提供了更为可靠和准确的方法。

## 1 实验材料

1.1 仪器与试剂: 美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪(在线脱气, 四元泵, 自动进样器, DAD 检测器, 柱温箱); Agilent chem office 色谱工作站; 色谱柱: Whatman Partisil 10 ODS-2(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), Hichrom C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 甲醇、乙腈为色谱纯(美国迪马公司), 其他试剂均为分析纯。土木香内酯和异土木香内酯对照品自制, NMR 鉴定其结构(质量分数 > 98%, HPLC 归一化法)。土木香对照药材(中国药品生物制品检定所, 批号 1090-200001)。

1.2 药材: 由河北医科大学药学院天然药物室王建华教授鉴定为土木香 *Inula helenium* L. 的干燥根。1~10 号为河北产, 11 和 15 号四川产, 12 号甘肃产, 13 号河南产, 14 号内蒙古产。

## 2 方法与结果

### 2.1 土木香药材指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件: HICHROM C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 检测波长为 254 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样体积 10 μL。流动相为 A: 乙腈, B: 0.1% 甲酸水溶液。梯度洗脱方法: 0~5 min, A 为 5%~10%; 5~23 min, A 为 10%~20%; 23~50 min, A 为 20%~30%; 50~53 min, A 为 30%~65%; 53~56 min, A 为 65% 等度洗脱; 56~61 min, A 为 65%~55%; 61~66 min, A 为 55% 等度洗脱; 66~71 min, A 为 55%~80%; 71~76 min, A 为 80%~100%; 76~90 min, 纯乙腈洗脱。

2.1.2 供试品溶液的制备: 土木香药材细粉(过 40 目筛), 取该细粉约 0.5 g, 精密称定, 置于三角瓶中, 加甲醇 10.0 mL, 称质量, 超声提取 45 min, 放冷, 用甲醇补充减失的质量, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 取续滤液备用。

2.1.3 对照品溶液的制备: 精密称取土木香内酯和异土木香内酯对照品适量, 用甲醇配制成质量浓度分别为 90.70 和 122.4 μg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.1.4 精密度试验: 取 1 号土木香药材粉末 1 份, 制备供试品溶液, 进样, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.2%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.7%。同时考察各色谱峰的相似度, 用相似度软件计算, 相似度均小于 0.99, 符合指纹图谱要求。

2.1.5 重现性试验: 取 1 号土木香药材粉末 6 份, 制

备供试品溶液, 进样, 测定, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.2%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.8%。同时考察各色谱峰的相似度, 用相似度软件计算, 相似度均大于 0.99, 符合指纹图谱要求。

2.1.6 稳定性试验: 取 1 号土木香药材粉末 1 份, 制备供试品溶液, 进样, 测定, 分别在 0、2、4、8、24 h 进样分析, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.4%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.8%。同时考察各色谱峰的相似度, 用相似度软件计算, 相似度均大于 0.99, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 测定方法: 取对照品溶液和供试品溶液(1 号样品)各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 测定, 见图 1。以土木香内酯色谱峰的保留时间和峰面积为 1.0, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积比值。

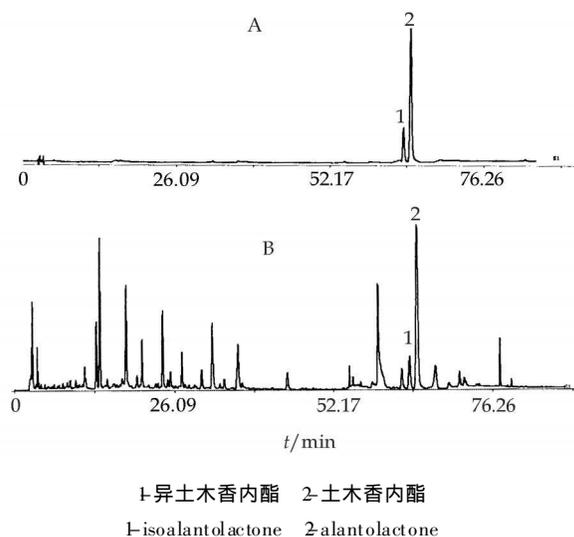
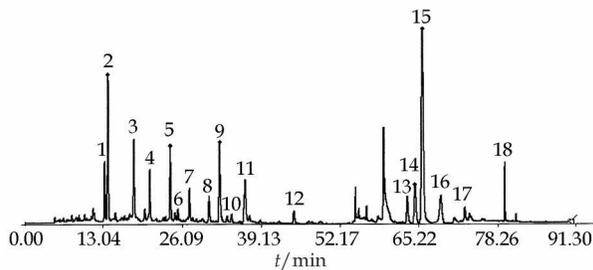


图 1 对照品(A)和样品(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.1.8 相似度评价: 取土木香药材(1~15 号), 制备供试品溶液, 进样, 测定, 得到 HPLC 指纹图谱, 确定了 18 个特征峰。指纹图谱见图 2(1 号样品)。将指纹图谱信号数据导入 2004A 版相似度评价软件, 15 批药材指纹图谱匹配结果(5 点校正, 中位数法)为: 1(0.989), 2(0.987), 3(0.988), 4(0.988), 5(0.989), 6(0.988), 7(0.985), 8(0.989), 9(0.979), 10(0.977), 11(0.917), 12(0.848), 13(0.919), 14(0.924), 15(0.947)。以 15 号峰即土木香内酯色谱峰为内参比峰, 由土木香相似度评价结果可以看出, 15 批土木香药材的相似度在 0.848~0.989。其中 10 批河北产土木香药材的相似度较好, 在 0.977~0.989; 而 5 批非河北产土木香药材的相似度在 0.848~0.947, 甘肃产土木香药材的相似度仅为



9-二咖啡酸酐 14-异土木香内酯 15-土木香内酯  
9-caffeic acid anhydride 14-isoalantolactone 15-alantolactone

图 2 土木香药材指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of *Inulae Radix*

0.848, 表明土木香因产地、气候、存方法等原因, 内在质量存在着一定的差异。

2.1.9 河北产土木香药材共有模式的建立: 10 批河北产土木香药材的指纹图谱及相似度评价, 指纹图谱匹配结果(5 点校正, 中位数法)为: 1(0.989), 2(0.989), 3(0.988), 4(0.989), 5(0.989), 6(0.989), 7(0.988), 8(0.986), 9(0.990), 10(0.979)。指纹图谱信号数据导入 2004A 版相似度评价软件, 生成色谱指纹图谱共有模式(图 3)。

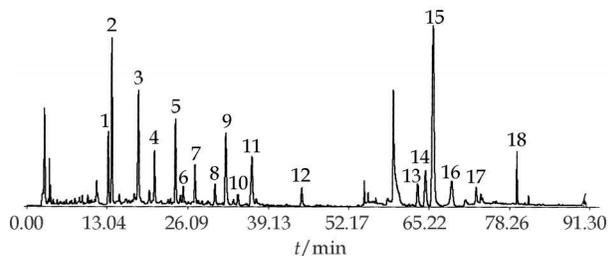


图 3 河北产土木香指纹图谱共有模式图

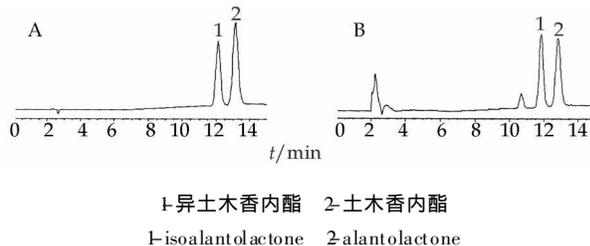
Fig. 3 Mutual pattern of HPLC fingerprint on *I. helenium* from Hebei Province

## 2.2 土木香内酯与异土木香内酯的测定

2.2.1 色谱条件和系统适应性试验: 色谱柱为 HI CHROM C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm)。流动相: 乙腈-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱, 运行时间 15 min, 0~3 min, 乙腈 65% 等度洗脱; 3~10 min 乙腈由 65% 线性梯度至 55%; 10~15 min 乙腈 55% 等度洗脱。检测波长 220 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 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、土木香药材供试品溶液, 色谱图见图 4。土木香内酯和异土木香内酯达到基线分离, 理论板数分别为 9 161 和 7 630, 分离度分别为 1.83 和 2.49。

### 2.2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备

对照品溶液的制备: 精密称取对照品土木香内酯 57.10 mg, 异土木香内酯 32.50 mg, 分别置于 10



1-异土木香内酯 2-土木香内酯  
1-isoalantolactone 2-alantolactone

图 4 对照品溶液(A)和供试品溶液(B) HPLC 色谱图

mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得二者的对照品储备液。精密吸取各对照品储备液 5.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得含土木香内酯 2.855 mg/mL, 异土木香内酯 1.625 mg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备: 取土木香药材细粉 100 g (过 40 目筛), 取该细粉约 0.3 g, 精密称定, 置于三角瓶中, 加甲醇 6.0 mL, 称质量, 超声提取 45 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 取续滤液备用。

2.2.3 线性范围考察: 取混合对照品溶液 1.0 mL, 采用倍比稀释法制成系列质量浓度的溶液, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 分析并记录结果。以对照品质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)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, 土木香内酯:  $Y = 1.00 \times 10^4 X - 8.16 \times 10^4$ ,  $r = 0.9999$ ; 异土木香内酯:  $Y = 1.18 \times 10^4 X - 4.97 \times 10^4$ ,  $r = 0.9998$ , 线性范围分别为: 0.571~2.86 μg/mL, 0.325~1.62 μg/mL。

2.2.4 精密度的试验: 取供试品约 0.3 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 重复进样 6 次, 每次 10 μL, 测定。土木香内酯和异土木香内酯量的 RSD 分别为 0.46% 和 1.13%。

2.2.5 重现性试验: 取同一批土木香药材, 重复 6 次取样制备供试品溶液, 测定, 土木香内酯和异土木香内酯量的 RSD 分别为 1.68% 和 0.85%。

2.2.6 稳定性试验: 取供试品约 0.3 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、24 h 测定土木香内酯和异土木香内酯, 记录各自的峰面积, 计算 6 次进样土木香内酯和异土木香内酯峰面积的 RSD 分别为 1.63% 和 1.05%。

2.2.7 回收率试验: 取已知量的同一批土木香药材 6 份, 每份约 0.15 g, 精密称定, 按约等量精密加入土木香内酯和异土木香内酯对照品, 测定, 计算平均

回收率,结果土木香内酯和异土木香内酯的平均回收率分别为 98.5% 和 99.4%,RSD 分别为 1.37% 和 1.00%。

2.2.8 样品测定:对不同产地的共 15 批土木香及土木香对照药材,测定,计算样品中土木香内酯和异土木香内酯的量,结果见表 1。

表 1 15 批土木香药材及对照药材中土木香内酯和异土木香内酯测定结果(n=3)

Table 1 Determination of alantolactone and isolantaloladone in 15 batches of samples and control herbs (n=3)

药材批次	土木香内酯/(mg·g <sup>-1</sup> )	异土木香内酯/(mg·g <sup>-1</sup> )
1号(河北)	28.72	18.02
2号(河北)	26.35	17.52
3号(河北)	28.26	17.75
4号(河北)	28.52	17.65
5号(河北)	27.53	21.53
6号(河北)	29.30	22.02
7号(河北)	24.85	16.03
8号(河北)	28.13	18.16
9号(河北)	38.52	22.50
10号(河北)	40.17	23.12
11号(四川)	72.34	55.67
12号(甘肃)	46.13	23.50
13号(河南)	48.00	37.67
14号(内蒙)	38.83	22.24
15号(四川)	44.01	31.94
对照药材	6.66	12.64

### 3 讨论

3.1 提取溶剂与方法的考察:比较了不同提取方法(索氏回流、连续加热回流和超声)、提取溶剂(50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、石油醚、二氯甲烷),以及不同超声提取时间(15、30、45、90 min)对提取效率的影响,结果表明甲醇超声提取 45 min 时各色谱峰的响应值不再增加,且方法稳定,重现性好。

3.2 色谱条件的优化:比较了 Whatman Partisil 10 ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), Hichrom C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 3 种色谱柱,结果表明色谱柱 Hichrom C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)能使土木香药材中最难分离的土木香内酯和异土木香内酯达到基线分离。

甲醇-水体系无法实现土木香内酯和异土木香内酯的基线分离,而采用乙腈-0.1% 甲酸水体系,通过调整梯度洗脱的时间和比例,则能使大多数成分达到良好分离。因仅测定了土木香内酯和异土木香内酯两个成分,考虑到测定方法的快速、简便以及实用性的要求,未采用与指纹图谱相同的流动相条件。

3.3 本实验对 15 批土木香药材进行了指纹图谱研

究,标定了 18 个共有峰。9 号峰为二咖啡酸酐,14 号峰为异土木香内酯,15 号峰为土木香内酯。本课题组还对土木香药材的化学成分进行了系统研究,共得分 19 个化合物,鉴定了其中的 11 个化合物,分别为土木香内酯、异土木香内酯、11,13-二氢异土木香内酯、1-羟基-11,13-二氢异土木香内酯、2-羟基-11,13-二氢异土木香内酯、3-羟基-11,13-二氢异土木香内酯、3-羟基-11,13-二氢土木香内酯、macrophyllilactone E、2-乙酰氧甲基-7(β-苯基)-2'-二氢吡啶)-2-二氢吡啶、乌苏烷-12-烯-18-α-氢-3-O-β-D-葡萄糖苷以及二咖啡酸酐<sup>[16]</sup>。以上单体均作为对照品进行指认,可能因部分化学成分在药材中的量较低而未能出现相应的对照品峰。

本研究确定了 10 批河北产土木香药材的特征指纹图谱,首次建立了河北产土木香药材的共有模式。对 10 批河北产药材进行的相似度评价及主成分的测定结果表明,10 批药材的相似度均在 0.9 以上,各样品间整体出峰相似,说明目前河北产土木香药材的化学组成一致性好,质量比较稳定。本研究从指纹图谱和指标性成分测定两方面同时对药材的质量进行控制,为该药材的全面开发和深入研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 许卉,杨小玲,刘生生,等. 土木香的倍半萜类化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2738-2740
- [3] [日]小西天二. 土木香中抑制肿瘤细胞增殖的成分[J]. 国外医学中医中药分册, 2003, 25(3): 174
- [4] 王良言. 土木香乙醇提取物的镇痛作用[J]. 国外医药·植物药分册, 2004, 19(6): 261
- [5] 黎阳,刘素香,张铁军,等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474
- [6] 马致洁,董红红,李振宇,等. 不同款冬花药材中槲皮素和山奈素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1305-1308
- [7] 易智彪,薄雯映,许冬瑾,等. 太子参 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1308-1310
- [8] 张军,张晓琦,汤毅,等. 广东土牛膝 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2009, 40(6): 964-967
- [9] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-998
- [10] 蔡鹰,陆晓和,魏群利,等. 回心草药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(1): 123-127
- [11] 江蔚新,钦浩,何文顺. 龙胆药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1563-1565
- [12] 罗文,刘斌,王伟,等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42
- [13] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F, et al. Fingerprint analysis of four variants of *Chrysanthemi Morifoli Flos* by RP-HPLC[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 153-156
- [14] 谷勇. 云木香、川木香及土木香鉴别[J]. 实用中医药杂志, 2009, 25(1): 44-45
- [15] 崔洋,王巧,张兰桐,等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-301
- [16] 赵永明,张婊丽,范桂敏,等. 土木香化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(4): 616-618