

# HPLC 法测定麻黄鱼腥草散中黄芩苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的含量

邱天宝

(河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008)

[收稿日期] 2016-08-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0034-06 [中图分类号] S853.76

**[摘要]** 为了建立 HPLC 法测定麻黄鱼腥草散中黄芩苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯含量的方法, 采用色谱柱 Waters XBrige™ C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 黄芩苷以甲醇-0.2% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C; 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯以甲醇-水 (50:50) 为流动相, 流速: 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C; 黄芩苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯检测波长分别为 276、225、254 nm。黄芩苷的线性范围为 0.0798 ~ 0.7975 μg ( $r = 1.0000$ ), 平均回收率为 94.3% ( $RSD = 0.8\%$ )。穿心莲内酯的线性范围为 0.0109 ~ 0.2175 μg ( $r = 1.0000$ ), 平均回收率为 92.9% ( $RSD = 0.7\%$ ); 脱水穿心莲内酯的线性范围为 0.0105 ~ 0.2105 μg ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 92.4% ( $RSD = 0.3\%$ )。本方法快速、简便、准确, 能有效测定麻黄鱼腥草散中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的含量。

**[关键词]** 麻黄鱼腥草散; 黄芩苷; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯; 含量测定; HPLC

## HPLC Determination of Baicalin, Andrographolide and Dehydroandrographolide in Mahuang Yuxingcao Powder

QIU Tian - bao

(Henan Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450008, China)

**Abstract:** A HPLC method had been established to determine the contents of baicalin, andrographolide and dehydroandrographolide in Mahuang Yuxingcao powder. The baicalin was analyzed on an XBrige™ C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using ultrapure methanol - 0.2% phosphoric acid solution as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C. The andrographolide and dehydroandrographolide were analyzed on an XBrige™ C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using methanol - ultrapure water (50:50) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelengths of Baicalin was set at 276 nm. The calibration curve was linear in the ranges of 0.0798 ~ 0.7975 μg ( $R = 1.0000$ ) for baicalin. The recovery of baicalin was 94.3% with  $RSD$  of 0.8%. Andrographolide and dehydroandrographolide were detected at 225 and 254 nm. The calibration curves were linear in the ranges of 0.0109 ~ 0.2175 μg ( $R = 1.0000$ ) and 0.0105 ~ 0.2105 μg (0.9999) for andrographolide and

dehydrographolide. The average recoveries were 92.9% for andrographolide ( $RSD = 0.7\%$ ,  $n = 6$ ) and 92.4% for dehydrographolide ( $RSD = 0.3\%$ ,  $n = 6$ ), respectively. This method is rapid, simple and accurate, which can be used for the determination of baicalin, andrographolide and dehydrographolide in Mahuang Yuxingcao powder.

**Key words:** Mahuang Yuxingcao powder; baicalin; andrographolide; dehydrographolide; determination; HPLC

麻黄鱼腥草散收载于《中国兽药典》2010年版二部,是兽药中常用中药散剂,由麻黄、黄芩、鱼腥草、穿心莲、板蓝根组成,具有宣泄肺热、平喘止咳的功效,主治肺热咳嗽,鸡支原体病<sup>[1]</sup>。组方中穿心莲为爵床科植物 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分,具有清热解毒,凉血,消肿等功效,用于感冒发热,咽喉肿痛,口舌生疮,顿咳劳嗽,泄泻痢疾,热淋涩痛,痈肿疮疡,蛇虫咬伤<sup>[2]</sup>。大量研究证明穿心莲内酯是穿心莲的主要有效成分,具有消炎、抗菌、抗病毒<sup>[3-5]</sup>、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、保肝、抗艾滋病等药理作用<sup>[6-8]</sup>。组方中黄芩具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效,为麻黄鱼腥草散中泻肺热之要药,黄芩质量直接影响其宣泄肺热的疗效,黄芩苷是黄芩中的主要活性成分之一,黄芩苷具有解热、抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[9-11]</sup>,可作为衡量黄芩品质的指标,通过对黄芩苷的含量测定,控制麻黄鱼腥草散中的黄芩质量。目前麻黄鱼腥草散的质量标准中仅有对黄芩、穿心莲的显微鉴别,不能很好地控制其质量。本文通过对黄芩苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定能有效地控制黄芩、穿心莲的质量,提升麻黄鱼腥草散的质量标准,为全面有效地控制其质量提供了技术参考。

## 1 材料

1.1 试剂与药品 黄芩苷对照品,含量 98.8%,批号:Z0271109,中国兽医药品监察所;穿心莲内酯对照品,含量 98.7%,批号:110797-201108,购于中国食品药品鉴定研究院;脱水穿心莲内酯对照品,含量 99.4%,批号:110854-201509 购于中国食品药品鉴定研究院;麻黄鱼腥草散及其相应阴性样品按《中国兽药典》二部组方自制,麻黄产地为内蒙古,鱼腥草、板蓝根产地为河南,穿心莲产地为广

东,黄芩产地为山西,甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪,2998 PDA 检测器(美国 Waters 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);METTLER-AE240 型电子分析天平。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[1]</sup>

2.1.1 黄芩苷 色谱柱 Waters XBrige™ C18 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),黄芩苷以甲醇为流动相 A,以 0.2% 磷酸溶液为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;柱温 30 ℃;检测波长 276 nm;流速 1.0 mL/min;进样体积 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0~5.0	10	90
5.1~7.0	30	70
7.1~15.0	48	52
15.1~20	85	15
20.1~25	10	90

2.1.2 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯 色谱柱 Waters XBrige™ C18 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以甲醇-水(50:50)为流动相;柱温 30 ℃;穿心莲内酯检测波长 225 nm,脱水穿心莲内酯检测波长为 254 nm;流速 1.0 mL/min;进样体积 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 取黄芩苷对照品约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液;精密吸取 5 mL 至 25 mL 的量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即黄芩苷得对照溶液(每 1 mL 含黄芩苷 39.8757 μg)。

取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯对照品约 10 mg,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液;分别精密吸取

5 mL 至 50 mL 的量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。(每 1 mL 含穿心莲内酯 10.877  $\mu\text{g}$ 、脱水穿心莲内酯 10.5265  $\mu\text{g}$ )。

### 2.3 供试品溶液制备

2.3.1 黄芩苷供试品制备 取样品 1 g,精密称定,置带塞锥形瓶中,精密加甲醇 50 mL,称定重量,超声处理 30 min,放至室温,用甲醇补足重量,滤过,精密量取续滤液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得。

### 2.3.2 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯供试品制备

取样品 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 40% 甲醇 50 mL,浸泡 1 h,称定重量,超声处理 30 min,放至室温,再称定重量,用 40% 甲醇补足重量,滤过,精密量取续滤液 10 mL 至中性氧化铝柱(200 ~ 300 目,5 g,内径 1.5 cm)上,用甲醇 20 mL 洗脱,收集洗脱液,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按麻黄鱼腥草散处方比例分别制备不含黄芩、穿心莲药材的阴性样品,然后称取适量,按 2.3 项下方法,制备相应的阴性对照溶液。

2.5 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,分别按上述各成份色谱条件测定,记录色谱图,主峰与其它峰分离良好,阴性无干扰,色谱见图 1 - 图 6。

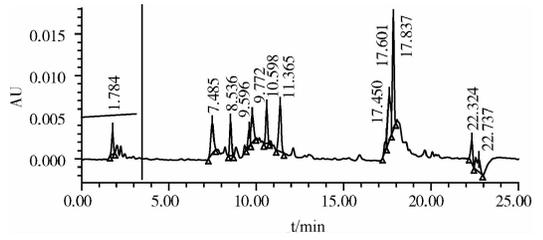
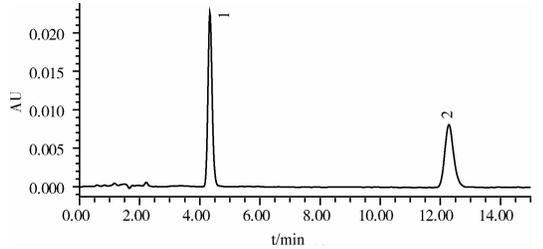
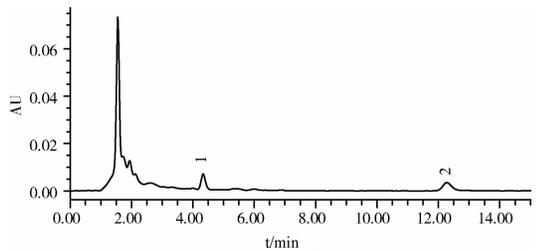


图 3 缺黄芩阴性对照色谱图



1 - 穿心莲内酯; 2 - 脱水穿心莲内酯

图 4 对照品色谱图



1 - 穿心莲内酯; 2 - 脱水穿心莲内酯

图 5 麻黄鱼腥草散色谱图

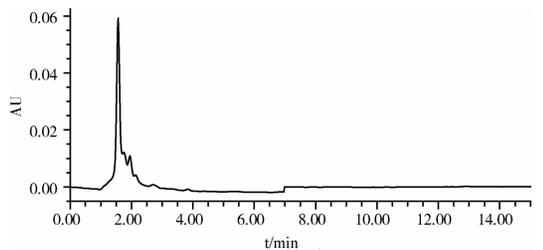


图 6 缺穿心莲阴性对照色谱图

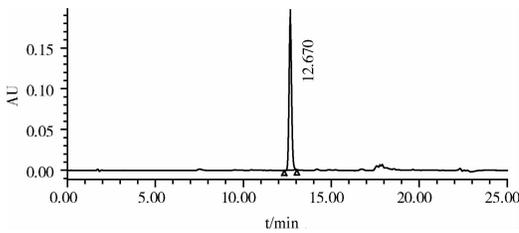


图 1 黄芩苷对照品色谱图

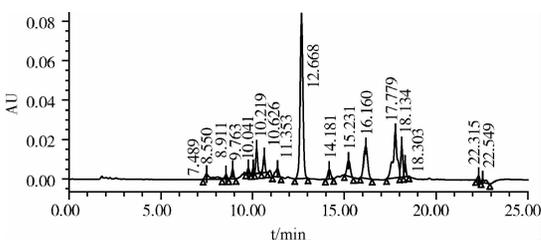


图 2 麻黄鱼腥草散色谱图

### 2.6 线性关系考察

2.6.1 黄芩苷线性关系 精密吸取黄芩苷对照品溶液 2.5、10、15、20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,照“2.1”项下色谱条件记录峰面积。以峰面积为纵坐标,对照品含量为横坐标进行线性回归,得黄芩苷的回归方程分别为:  $Y = 9E + 08x - 2076.7$  ( $R = 1.0000$ );线性范围为 0.0798 ~ 0.7975  $\mu\text{g}$ 。

### 2.6.2 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯线性关系

精密吸取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯混合对照品溶液 1、3、5、10、15、20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,照“2.1”项下色谱条件记录峰面积。以峰面积( $Y$ )为纵坐标,对照品含量( $X$ )为横坐标进行线性回归,得穿心莲内酯回归方程为  $Y = 2E + 06X - 7318.2$  ( $R = 1.0000$ ),线性范围为 0.0109 ~ 0.2175  $\mu\text{g}$ 、脱水穿心莲内酯的回归方程分别为: $Y = 2E + 06X - 8215.5$  ( $R = 0.9999$ );线性范围为 0.0105 ~ 0.2105  $\mu\text{g}$ 。

2.7 稳定性实验 取麻黄鱼腥草散 1.0 g,精密称定,按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、10、12 h 进样,每次 10  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,黄芩苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的  $RSD$  值分别为 0.8%、0.5% 和 0.6%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 精密度实验 取麻黄鱼腥草散 5 份,每份

1.0 g,精密称定,按照“2.3”项下方法分别制备黄芩苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10  $\mu\text{L}$  进样,测定峰面积并计算黄芩苷含量为 3.4791、3.4948、3.5024、3.4899、3.4974  $\text{mg/g}$ , $RSD$  值为 0.3%;穿心莲内酯含量为:0.7631、0.7563、0.7677、0.7655、0.7584  $\text{mg/g}$ , $RSD$  值为 0.6%;脱水穿心莲内酯含量为:1.0325、1.0269、1.0277、1.0364、1.0411  $\text{mg/g}$ , $RSD$  值为 0.6%,表明该方法重复性良好。

### 2.9 准确度实验

2.9.1 黄芩苷回收率 称取已知含量的样品 6 份,每份 0.5 g,分别精密加入对照品储备液 10.00 mL,再精密加入甲醇 40 mL,超声处理 30 min,放至室温,用甲醇补足重量,滤过,精密量取续滤液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别进样。计算平均加样回收率,结果见表 2。

表 2 黄芩苷加样回收率结果 ( $n = 6$ )

编号	样品取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	回收率平均值/%	$RSD$ /%
1	0.5063	1.768354	1.9938	1.8864	94.61	94.3	0.8
2	0.5515	1.926224	1.9938	1.8654	93.56		
3	0.5326	1.860212	1.9938	1.8765	94.12		
4	0.5414	1.890948	1.9938	1.8966	95.12		
5	0.5002	1.747049	1.9938	1.8595	93.26		
6	0.5211	1.820046	1.9938	1.8943	95.01		

2.9.2 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯回收率 称取已知含量的样品 6 份,每份 0.5 g,分别精密分别加称取已知含量的样品 6 份,每份 0.5 g,分别精密分别加入穿心莲内酯对照品储备液 3 mL,脱水穿心莲内酯对照品储备液 5 mL,再精密加入 40% 甲醇 42 mL,浸泡 1 h,称定重量,超声处理 30 min,放

至室温,再称定重量,用 40% 甲醇补足重量,滤过,精密量取续滤液 10 mL 至中性氧化铝柱(200 ~ 300 目,5 g,内径 1.5 cm)上,用甲醇 20 mL 洗脱,收集洗脱液,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。计算平均加样回收率,结果见表 3。

表 3 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯加样回收率结果 ( $n = 6$ )

编号	组分	样品取样量/g	组分含量/mg	对照品加入量/mg	组分测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	$RSD$ /%
1	穿心莲内酯	0.5121	0.3902	0.3263	0.3028	92.7980	92.9	0.7
2		0.5231	0.3986	0.3263	0.3011	92.2770		
3		0.5002	0.3812	0.3263	0.3071	94.1158		
4		0.5024	0.3828	0.3263	0.3022	92.6142		
5		0.5062	0.3857	0.3263	0.3034	92.9819		
6		0.5123	0.3904	0.3263	0.3026	92.7367		
1	脱水穿心莲内酯	0.5121	0.5289	0.5263	0.4856	92.2668	92.4	0.3
2		0.5231	0.5403	0.5263	0.4877	92.6658		
3		0.5002	0.5167	0.5263	0.4869	92.5138		
4		0.5024	0.5189	0.5263	0.4836	91.8868		
5		0.5062	0.5229	0.5263	0.4871	92.5518		
6		0.5123	0.5292	0.5263	0.4875	92.6278		

### 3 讨论

兽用中药散剂多为复方制剂,成份复杂,不易提取分离,本文采用 HPLC 梯度洗脱测定其黄芩苷的含量,使黄芩苷色谱峰达到基线分离,试验考察了该洗脱程序在不同色谱柱上的分离效果,分离度均能满足要求,为麻黄鱼腥草散中黄芩的定量控制提供了技术参考。

黄芩中含有内源酶,可降低黄芩苷的含量,尤其对于中药散剂,更容易使黄芩苷降解,因此黄芩药材预先通过炮制将内源酶灭活,减少黄芩苷的降解<sup>[12]</sup>,从而保证黄芩苷含量的稳定性,提高药物疗效。

黄芩苷的含量测定方法通常使用甲醇-磷酸溶液(50:50)为流动相进行等度洗脱,不同样品甲醇与磷酸溶液的比例略有差别,本实验采用梯度洗脱的方法测定麻黄鱼腥草散中的黄芩苷含量,主要为祛除杂质峰的干扰,使黄芩苷色谱峰达到良好的分离效果。梯度洗脱过程中黄芩苷实质上还是在甲醇-磷酸溶液(48:52)时被洗脱出来。黄芩苷出峰后,流动相甲醇比例增加,目的是将样品中其他杂质从色谱柱中迅速洗脱出来,对色谱柱具有良好的保护作用,减少其他杂质在色谱柱中的保留,避免在下一针的进样洗脱过程中出现干扰。

本试验考察了穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯在 Waters XBrige™ C18, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm 和 Agela Venusil XBP C18, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm 两种色谱柱的分离效果, XBrige™ C18 色谱柱较 Agela Venusil XBP C18 色谱柱出峰较快,分析时间短,节约流动相; Agela Venusil XBP C18 色谱柱出峰较晚一些,但分离效果较好,对于复杂成份的样品有较好效果。对于穿心莲的含量测定,由于经过氢氧化铝柱的净化,杂质较少,容易分离,因此本试验选用了 XBrige™ C18 色谱柱。

穿心莲中的成份具有热不稳定性,根据文献的报道<sup>[13]</sup>加热过程中穿心莲内酯容易脱水转化为脱水穿心莲内酯,以及内酯环结构的破坏,导致两者总量降低。因此,本试验在提取工艺中选择超声提取;此外,本试验参考了《中国兽药典》中穿心莲及其制剂穿心莲末的提取方法,提取后过氢氧化铝柱净化除杂,所得供试品溶液比较纯净,色谱峰分

离度好。

试验中分别试验了供试品提取液过氢氧化铝柱和不过氢氧化铝柱的差别,发现如果不经氢氧化铝净化,存在黄芩苷的干扰,净化后能有效祛除干扰,分离效果好。此外,对穿心莲药材也做了氢氧化铝净化试验,发现对于穿心莲药材经超声提取后,进行过氢氧化铝柱对比,杂质峰及含量无明显差异。

麻黄鱼腥草散对穿心莲的质量控制仅有显微鉴别,显微镜下寻找穿心莲叶表皮组织中的钟乳体细胞,实际工作中发现,该特征不易找到,主要原因为企业生产过程中,使用的穿心莲质量较差,穿心莲叶的含量较低,所以不易找到钟乳体细胞显微特征,此外穿心莲的质量会直接影响麻黄鱼腥草散的疗效,穿心莲在治疗治疗呼吸道感染<sup>[14]</sup>、急性菌痢<sup>[15]</sup>、肠胃炎等<sup>[16-17]</sup>疾病方面具有确切疗效,因此,控制穿心莲质量具有重要意义。不同厂家的产品质量参差不齐,穿心莲质量差别较大,本实验建立了穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定方法,为全面控制穿心莲质量保证麻黄鱼腥草散的的疗效提供技术参考。

《中国兽药典》2010年版二部以及《中国药典》2015年版均对穿心莲中叶的含量有具体要求,不得少于30%,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量不得少于0.80%。穿心莲叶的含量直接关系到穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量,影响其疗效,文献报道叶中含穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯总量为2.39%<sup>[18]</sup>,说明穿心莲叶的含量直接影响其有效成分的含量。实际生产中,穿心莲药材根据叶含量的不同,价格各不相同,现有的标准无法准确地控制组方中穿心莲的质量,本试验通过对穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定可有效控制麻黄鱼腥草散中穿心莲的质量,保证其疗效。

### 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版二部[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2015 年版一部[S].
- [3] 郭 蓓. 穿心莲的研究及临床开发[J]. 药学进展. 2004(12): 542-546.
- [4] 尹 青, 邓明明. 穿心莲内酯抗炎作用机制研究进展[J]. 广东

- 医学. 2014,35(5):786-788.
- [5] 严园园,施高翔,邵青,等. 穿心莲内酯及其衍生物抗感染研究近10年进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(22):3819-3821.
- [6] 陈倩倩,李清,齐会红,等. HPLC测定穿心莲配伍绵茵陈后2种内酯成分含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):64-67.
- [7] 徐铮奎. 穿心莲有望成为抗艾滋病新药[J]. 中国制药信息,2005,21(7):22-23.
- [8] 王雅琪,伍振峰,郑琴,等. 穿心莲药材不同提取方式的合理性评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(10):1-5.
- [9] 孙冬梅,邝枣园,李岩,等. 黄芩苷对耐药性金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J]. 吉林医学,2011,32(13):2587-2588.
- [10] 辛文好,宋俊科,何国荣,等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(6):647-653,659.
- [11] 洪铁,杨振,绳娟,等. 黄芩苷抗肿瘤作用及机制的研究[J]. 中国药理学通报,2008,24(12):1676-1678.
- [12] 李建华,王力生,邹节明. 水提工艺中黄芩内源酶降解黄芩苷的研究[J]. 中草药,2009,40(3):397-400.
- [13] 聂凌云,罗兴平. 穿心莲提取工艺的研究及热稳定性考察[J]. 解放军药学学报,2005,21(1):32-33,86.
- [14] 王艳辉,王伽伯,郝庆秀,等. 不同产地穿心莲的含量测定、化学指纹图谱及抑菌活性评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):78-82.
- [15] 管晨,李敏,任庆杰,等. 穿心莲内酯通过抗炎和调节免疫提高EV71感染小鼠的生存率[J]. 免疫学杂志,2013,29(9):737-741.
- [16] 程惠娟,刘江,张庚. 穿心莲内酯抗铜绿假单胞菌生物被膜及与阿奇霉素协同抗菌作用[J]. 中国微生态学杂志,2012,24(2):120-124.
- [17] 官妍,刘丽,李春,等. 亚抑菌浓度的穿心莲内酯及与红霉素联用影响表皮葡萄球菌生物膜形成的初步研究[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(7):766-769.
- [18] 张红星. 穿心莲叶含量对药材质量影响的研究[J]. 中国现代药物应用,2015,9(5):265-266.

(编辑:陈希)