

RP-HPLC 双波长法测定四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量

包爱情¹, 陆春波¹, 林仙军¹, 陈晓林¹, 蔡文金¹, 金香莲²

(1. 浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311101; 2. 上药凯仑医药股份有限公司, 杭州 310000)

[收稿日期] 2016-04-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 06-0056-05 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了反向高效液相色谱法检测四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的方法。试验采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.2%磷酸溶液梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 柱温30 ℃; 穿心莲内酯检测波长226 nm, 脱水穿心莲内酯检测波长252 nm; 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定范围分别为2.32~37.14 μg/mL ($r = 1.0000$), 2.00~31.94 μg/mL ($r = 1.0000$); 加样平均回收率分别为99.12%、98.84%; *RSD* 分别为0.60%、0.62%; 该方法方便、准确、可靠, 适用于测定四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。

[关键词] 四味穿心莲散; 高效液相法; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯;

Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San by Dual-wavelength RP-HPLC

BAQ Ai-qing¹, LU Chun-bo¹, LIN Xian-jun¹, CHEN Xiao-lin¹, CAI Wen-jin¹, JIN Xiang-lian²

(1. Zhejiang Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Hangzhou 311101, China;

2. Shangyao Kailun Pharmaceutical Co Ltd, Hangzhou 31000, China)

Abstract: To establish a RP-HPLC method for determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San, analysis was performed on a C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution mode of methanol-0.2% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min and a column temperature of 30 ℃. The determination wave length of andrographolide was 226 nm while dehydroandrographolide was 252 nm. The linear range was 2.32~37.14 μg/mL ($r = 1.0000$) and 2.00~31.94 μg/mL ($r = 1.0000$), and the average recovery was 99.12% and 98.84% with *RSD* of 0.60% and 0.62%, respectively. This method was convenient, accurate and reliable for the determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San.

Key words: Siwei Chuanxinlian San; HPLC; andrographolide; dehydroandrographolide

四味穿心莲散是以穿心莲、辣蓼、大青叶、葫芦茶四味药材加工制成的中兽药散剂,具有清热解毒,除湿化滞的功效,用于泻痢,积滞等。方中穿心莲清热解毒、消肿止痛,为君药;葫芦茶清热解暑、消积利湿、杀虫,辣蓼祛湿止泻、散瘀止痛、祛风杀虫,共为佐使药。诸药合用,共奏清热解毒、除湿化滞之功^[1]。穿心莲,又名春莲秋柳,一见喜,榄核莲、苦胆草、金香草、金耳钩、印度草、苦草等。其中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯为穿心莲的有效成份,具有祛热解毒,消炎止痛之功效。穿心莲内酯更是对细菌性与病毒性上呼吸道感染及痢疾有特殊疗效,被誉为天然抗生素药物^[2-3]。《中华人民共和国兽药典》二〇一〇版二部^[4]收录了四味穿心莲散,对穿心莲进行了薄层鉴别,未对其进行定量分析^[4]。本文采用反向高效液相色谱法对四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量测定进行了研究。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪,配 Waters 2996 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司; XS-205 电子天平,瑞士 METTLER TOLEDO 公司; KQ-500E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与材料 甲醇为色谱纯,Merck 公司,其余试剂均为分析纯;实验用水为 milli-Q 超纯水。穿心莲内酯对照品(来源:中国食品药品检定检验院,批号:110797-201108,含量:98.7%);脱水穿心莲内酯对照品(来源:中国食品药品检定检验院,批号:110854-201308,含量:99.7%)。四味穿心莲散供试品(批号分别为 20150901, 20150902, 20150903),由浙江 A 厂生产;四味穿心莲散供试品(批号分别为 20160101, 20160102, 20160103),由浙江 B 厂生产;四味穿心莲散供试品(批号为 20131001D),由河北 C 厂生产。自制样品:中药饮片购于上药凯仑医药股份有限公司,经浙江省兽药饲料监察所鉴定,按相应处方自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent C18 XDB(4.6 mm

× 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.2% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 梯度见表 1; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 225 nm, 252 nm 双波长检测。

表 1 梯度洗脱表

时间	甲醇/%	0.2% 磷酸/%
0	50	50
10	50	50
10.1	65	35
17	65	35
17.1	50	50
20	50	50

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取穿心莲内酯 11.76 mg 和脱水穿心莲对照品 10.01 mg, 分别置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取 20 mL 上述溶液于同一 50 mL 容量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品贮备液。精密量取混合对照品贮备液 6.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取四味穿心莲散 1 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加 40% 甲醇 25 mL, 超声提取(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例自配不含穿心莲的散剂, 按其工艺制成阴性对照样品, 再按 2.2.2 项方法制备成阴性对照溶液。

2.3 系统适应性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液注入液相色谱仪, 进行全波长扫描, 记录穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的光谱图(图 1 ~ 图 2); 同时记录混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液的色谱图(图 3 ~ 图 8)。该色谱条件下, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯分离度良好, 与其他峰分离良好, 理论塔板数均大于 6000。阴性样品在混合对照品色谱图相应的位置上无吸收峰, 表明处方中的其他成分对测定结果并无干扰, 满足定量检测需要。峰 1 为穿心莲内酯, 峰 2 为脱水穿心莲内酯。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围 精密量取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯混合对照品贮备溶液(46.4、

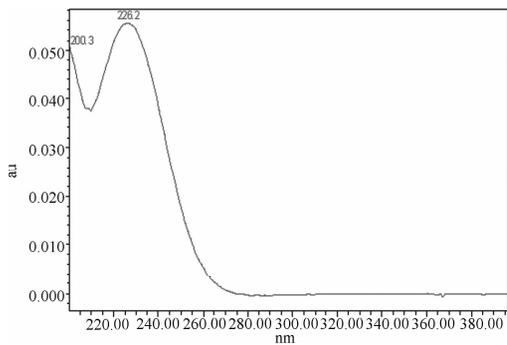


图1 穿心莲内酯光谱图

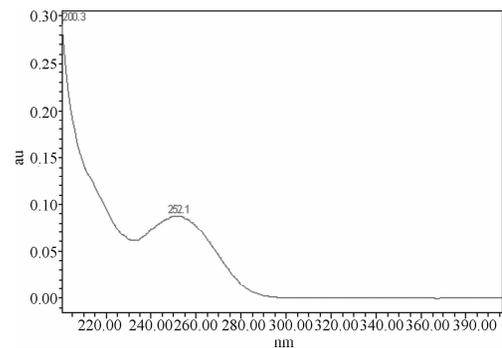


图2 脱水穿心莲内酯光谱图

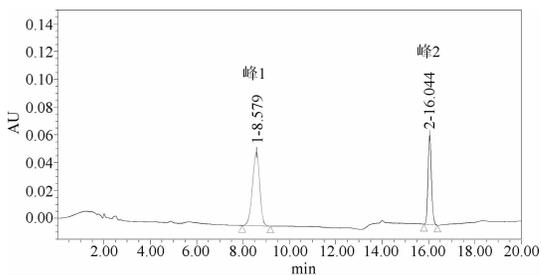


图3 混合对照品 226 nm 色谱图

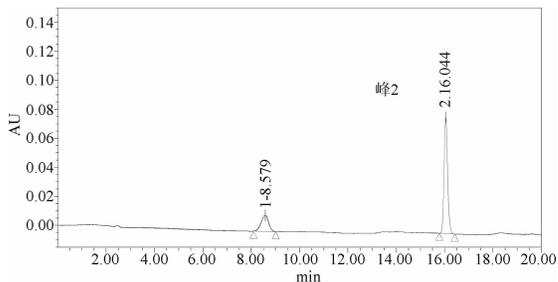


图4 混合对照品 252 nm 色谱图

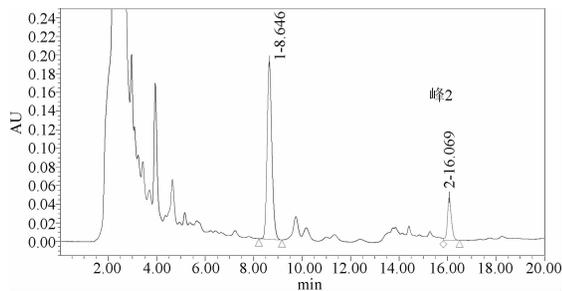


图5 自制阳性样品 226 nm 色谱图

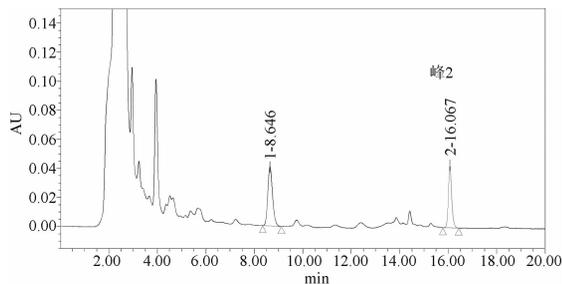


图6 自制阳性样品 252 nm 色谱图

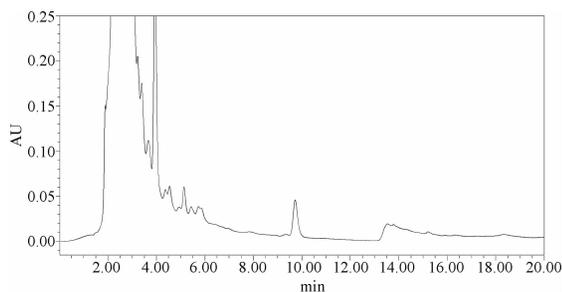


图7 自制阴性样品 226 nm 波长色谱图

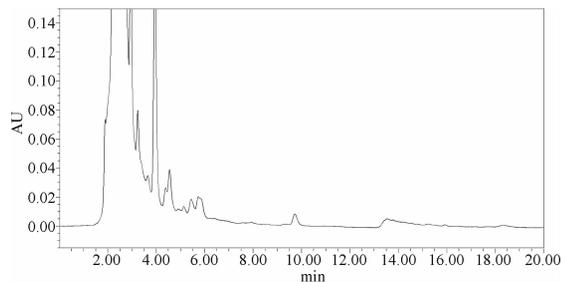


图8 自制阴性样品 252 nm 色谱图

峰面积,以峰面积积分值(Y)对浓度(X, μg/mL)进行线性回归计算,方程为:

穿心莲内酯: $Y = 41467.11X + 1698.00$

($r = 1.0000$),线性范围 2.32 ~ 37.14 μg/mL;

脱水穿心莲内酯: $Y = 33757.20X + 8960.78$

($r = 1.0000$),线性范围 2.00 ~ 31.94 μg/mL。

39.9 μg/mL)各 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL 分别置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件,精密量取 10 μL,记录色谱图,测定

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 按上述色谱条件, 连续重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算结果, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的 *RSD* 分别为 0.32%、0.42%。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(自制样品), 分别在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 进样 10 μL , 记录色谱峰面积, 计算穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的峰面积的 *RSD* 分别为 0.54%、0.78%。结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一批供试品(自制样品), 分别称取 6 份, 照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定供试品溶液中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。结果测得穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量分别为 515.3、514.5、515.7、521.0、

517.7、516.8 $\mu\text{g/g}$; 脱水穿心莲内酯的含量分别为 339.2、341.8、345.2、345.5、338.3、343.9 $\mu\text{g/g}$; *RSD* 分别为 0.45%、0.24%。结果表明此方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 准确称取已知含量的四味穿心莲散样品(自制样品) 0.5 g, 共 6 份, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加 25 mL 对照品溶液(称取穿心莲内酯 25.23 mg 和脱水穿心莲内酯 17.21 mg 于同一 100 mL 容量瓶, 甲醇溶解并稀释至刻度, 再精密量取 10 mL 于 250 mL 容量瓶中, 用 40% 甲醇稀释并定容到刻度), 其余按 2.2.2 项同法处理后, 测定并结算回收率, 结果见表 2。

表 2 四味穿心莲散回收率试验结果 ($n=6$)

	穿心莲内酯						脱水穿心莲内酯					
	已知含量/ μg	257.6	254.5	264.9	257.4	250.1	247.5	173.7	171.6	178.6	173.5	168.6
加入量/ μg	249.0						171.6					
测得量/ μg	498.2	500.3	503.2	500.2	498.2	496.3	341.3	341.9	342.6	340.1	336.9	335.7
回收率/%	98.50	99.48	98.44	98.89	99.52	99.90	98.84	99.62	97.83	98.55	99.03	99.17
平均回收率/%	99.12						98.84					
<i>RSD</i> /%	0.60						0.62					

2.5 样品测定 取不同批号的四味穿心莲散, 按 2.2.2 项下方法处理, 按上述色谱条件进行测定, 计算样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 ($\mu\text{g/g}$) $n=3$

厂家	批号	穿心莲内酯	脱水穿心莲内酯
A	20150901	250.3	191.2
A	20150902	265.1	179.3
A	20150903	260.1	178.6
B	20160101	1221.0	398.1
B	20160102	1206.3	390.5
B	20160103	1208.1	389.2
C	20131001D	894.7	356.2
自制样品	/	516.8	342.3

3 讨论与小结

3.1 波长的优化 在波长选择上, 通过二极管阵列检测器(PDA)在 200 ~ 400 nm 进行了全扫描, 结果显示穿心莲内酯在 226 nm 的波长处有最大吸

收, 脱水穿心莲内酯在 252 nm 的波长处有最大吸收波长, 因此本文采用双波长法, 使两者均有最大吸收。

3.2 提取方式的优化 在提取方式选择上, 比较了浸渍、超声和回流的提取效果, 研究表明浸渍的提取效果略低于超声与回流, 而超声与回流效果相当, 但超声操作比回流便捷, 因此本文采取超声作为提取方式。

3.3 提取溶剂的优化 在提取溶剂的选择上, 比较了 20% 甲醇、40% 甲醇和 60% 甲醇的提取效果, 研究表明当提取溶剂为 20% 甲醇时, 提取效率显著低于 40% 甲醇和 60% 甲醇; 当提取溶剂为 60% 甲醇时, 提取效果与 40% 甲醇无显著差异, 但杂质干扰严重, 表明以 60% 甲醇提取时会将散剂中的一些其他成分提取出来而增加干扰, 因此选用 40% 甲醇作为提取溶剂。

3.4 提取时间的优化 在提取时间的选择上, 比较了 15、30、45 min 的提取效果, 研究表明 15 min 的提取效果显著低于 30、45 min, 45 min 的提取效果与 30 min 相当, 因此本文选用 30 min 的提取时间。

本文参考文献^[5-6]选用不同的比例的甲醇-水,甲醇-0.2%磷酸为流动相进行梯度洗脱,结果表明,选用当前试验的流动相时,样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯分离效果好、无杂峰干扰且时间短。已报道的关于四味穿心莲散成分含量测定的只有汪艳秋^[7]等人开发的HPLC法测定四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。本文开发的方法所需时间大大缩短,单针时间从45 min减少为20 min,检测效率大幅提高,更节省溶剂同时减少对环境的污染,尤其适用于大批量检测,且本文对自制阳性样品以及多个厂家样品进行了测定,通过数据的比较反映出不同厂家样品的区别。

当前,我国中兽药散剂多数采取显微鉴别及薄层鉴别控制处方中各味药材,未对中药成分进行定量测定。中药材由于产地、气候等因素的影响,差异往往很大,如本文中七批企业样品,含量差异很大,究其原因,很可能是因为药材产地、气候等因素的影响,但也不能排除个别企业不按照处方进行制备。因此探索对中兽药散剂中各味中药的有效成分进行的定量分析研究,有利于提高中兽药散剂质量标准的控制,进一步提高产品质量。本文开发的方法,操作简便快捷,方法可行可靠,可为制定四味穿心莲散质量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版二部[S].
- [2] Jiun - Han C, George H, An - Rong L, *et al* . Andrographolide suppresses endothelial cell apoptosis via activation of phosphatidylinositol - 3 - kinase/Akt pathway [J]. *Biochemical pharmacology*, 2004,67(7): 1337 - 1345.
- [3] Yi - Feng X, Bu - Qing Y, Yi - Dan L, *et al* . Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF - kappa B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50 [J]. *Journal of immunology*, 2004,173(6): 4207 - 4217.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南二〇一〇年版中药卷[S].
- [5] 反任睿, 张园园. 反向高效液相色谱法测定喉舒宁片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. *中南药学*, 2011, 9(4): 271 - 273.
- [6] 马冬云, 姜文艳. 双波长 HPLC 法同时测定止痢宁片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. *中国药师*, 2012, 15(4): 497 - 499.
- [7] 汪艳秋, 楼步青, 汪芳, 等. 兽用中成药四味穿心莲散质量标准提高研究[J], *中国兽医医药杂志*, 2013, 6: 37 - 40.

(编辑:侯向辉)