

HPLC-ELSD测定穿心莲超分子提取物中三种穿心莲内酯的含量

韩光,许笑笑,刘蕾,许启泰 (河南大学天然药物研究所,河南 开封 475004)

摘要:目的 建立穿心莲超分子提取物中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯的含量测定方法。方法 HPLC-ELSD;色谱柱:Agilent ZORBAX Extent-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);检测器:蒸发光散射检测器(ELSD);流动相:乙腈-水,线性梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温:40℃。结果 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯线性范围分别为 0.920 ~ 9.200 μg($r=0.9996$), 0.397 ~ 3.952 μg($r=0.9993$)和 0.395 ~ 3.936 μg($r=0.9993$);三者的回收率分别为 98.9%、97.8%和 98.4%,RSD分别为 1.1%、2.2%和 2.1%($n=6$)。结论 本法简便、快捷,结果真实可靠,可用于穿心莲超分子提取物穿心莲内酯等有效成分的含量测定。

关键词: HPLC-ELSD;穿心莲内酯;脱水穿心莲内酯;14-去氧穿心莲内酯

中图分类号:R917.101;R286 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2008)04-0345-03

Determination of Three Andrographolides in Andrographis Paniculata (Burm. f.) Nees. Supramolecular Extract by HPLC-ELSD

HAN Guang, XU Xiao-xiao, LIU Lei, XU Qi-tai (Institute of Natural Products, Henan University, Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC-ELSD for the determination of andrographolide, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide, 14-deoxyandrographolide in Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees. supramolecule extract **METHODS** The optimal conditions of separation and detection were on a C₁₈ analytical column with a linear gradient of acetonitrile-water at the flow-rate of 0.8 mL·min⁻¹. The temperature of column was 40℃. **RESULTS** The linear ranges of andrographolide, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide, 14-deoxyandrographolide were 0.920 - 9.200 μg($r=0.9996$), 0.397 - 3.952 μg($r=0.9993$) and

作者简介:韩光,女,博士,教授 Tel: (0378) 3880680 E-mail: hang@henu.edu.cn

0.395~3.936 μg ($r=0.9993$); The average recoveries were 98.9%, 97.8% and 98.4% with RSDs 1.1%, 2.2% and 2.1% ($n=6$). **CONCLUSION** The developed method is simple, rapid, accurate, and can be used to estimate the quality of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees supramolecular extract.

KEY WORDS HPLC-ELSD; andrographolide; 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide; 14-deoxyandrographolide

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, 临床用于感冒发热、咽喉肿痛、口舌生疮等症^[1]。其活性成分主要是以穿心莲内酯为代表的二萜内酯类化合物及其葡萄糖衍生物^[2], 我们采用超分子法对穿心莲乙醇提取物进行了有效成分的富集, 得到穿心莲有效部位^[3], 并采用 HPLC-ELSD 同时测定了三种穿心莲内酯类有效成分的含量。目前测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的方法较多采用 HPLC-UV^[4,5], 其他测定方法还有薄层扫描法、薄层紫外分光光度法、HPLC-ELSD 及胶束电动毛细管色谱法^[6-8]等。有关 14-去氧穿心莲内酯含量测定的研究较少, 因其在紫外区仅有末端吸收, HPLC-UV 法不是理想的 14-去氧穿心莲内酯的含量测定方法。本实验采用 HPLC-ELSD 测定了穿心莲超分子提取物中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯含量。该法简便、快捷、结果真实可靠。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-2010 高效液相色谱仪、SEDEX 蒸发光散射检测器、岛津 CLASS-VP 色谱工作站、WYK-2 型无音无油空压机、岛津 SCL-10A VP 控制器、岛津 SPD-M10A VP 二极管

阵列检测器。

穿心莲内酯对照品、脱水穿心莲内酯对照品由中国药品生物制品检定所提供, 14-去氧穿心莲内酯由本实验室合成, 结构经 IR、UV、MS、¹H-NMR 光谱确证; 经 HPLC-PDA-ELSD 测定, 按面积归一化法计算, 含量在 99.6% 以上; 穿心莲超分子提取物由本实验室自制。

甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水。

2 实验方法和结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: A 为水, B 为乙腈, 线性梯度洗脱: 0 min 10% B, 50 min 60% B, 体积流量 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 理论塔板数以穿心莲内酯计算不低于 4 000, 拖尾因子以穿心莲内酯计算为 1.03, 穿心莲内酯峰与其相邻峰的分离度不小于 2.5, 脱水穿心莲内酯峰与去氧穿心莲内酯峰的分离度不小于 1.5。在相同色谱条件下进行 HPLC-PDA 分析, 用 CLASS-VP 中 PDA 计算软件对色谱图中各色谱峰进行纯度分析, 结果均能达到一级纯度检验。对照品溶液和样品溶液色谱图见图 1。

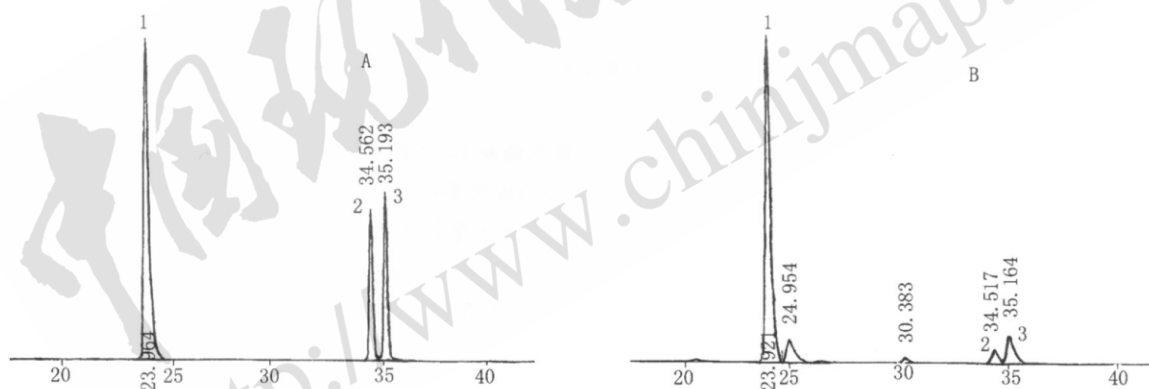


图 1 对照品和样品溶液 HPLC-ELSD 色谱图

A-对照品; B-样品; 1-穿心莲内酯; 2-14-去氧穿心莲内酯; 3-脱水穿心莲内酯

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms of stand substance and unknown

A-reference substances; B-unknown samples; 1-andrographolide; 2-14-deoxyandrographolide; 3-14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide

2.2 对照品溶液的制备

精密称定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯对照品, 用甲醇配制成为每 1 mL 含穿心莲内酯 0.46 mg、脱水穿心莲内酯 0.1986 mg、14-去氧穿心莲内酯 0.1976 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称定穿心莲超分子提取物约 10 mg 用甲醇配制成 10 mL 溶液。

2.4 线性关系

取“2.2”项下对照品溶液, 分别进样 2.5, 10, 15, 20 μL 。

记录穿心莲内酯峰面积、脱水穿心莲内酯峰面积和 14-去氧穿心莲内酯峰面积, 以峰面积自然对数为横坐标, 以进样量的自然对数为纵坐标, 作标准曲线, 得回归方程分别为: 穿心莲内酯: $Y=0.7271X-9.6495$ ($r=0.9996$); 脱水穿心莲内酯: $Y=0.7350X-9.4976$ ($r=0.9993$); 14-去氧穿心莲内酯: $Y=0.6839X-8.8788$ ($r=0.9993$)。

结果表明: 穿心莲内酯在 0.920~9.200 μg 、脱水穿心莲内酯在 0.397~3.952 μg 、14-去氧穿心莲内酯在 0.395~3.936 μg 范围内线性关系良好。

2.5 重复进样精密度实验

取“2.2”项下对照品溶液进样 10 μL,连续进样 6 次,分别记录穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯峰面积,以峰面积计算,RSD 分别为 1.1%,1.3%,2.0%。

2.6 稳定性实验

取“2.3”项下供试品溶液分别于 0,1,2,4,8,12,24 h 进样 10 μL,记录穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯峰面积,以峰面积计算,RSD 分别为 1.3%,1.8%,2.3%。

2.7 重复性实验

取同一批穿心莲超分子提取物,按照供试品溶液制备方法制备供试品溶液 5 份,分别进样 10 μL 进行含量测定,测得穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯的平均含量分别为 36.83%,10.56%,5.36%,RSD 值分别为:1.6%,1.8%,2.2%。

2.8 回收率实验

取已测知含量的穿心莲超分子提取物,精密称定 6 份,分别加入一定浓度的穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯溶液适量,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,并分别进样测定,穿心莲内酯的平均回收率是 98.9%,RSD 为 1.1%;脱水穿心莲内酯的平均回收率为 97.8%,RSD 为 2.2%;14-去氧穿心莲内酯的平均回收率为 98.4%,RSD 为 2.1%。结果见表 1。

表 1 加样回收率

Tab 1 Recovery test						
测定成分	取样含 量 /mg	加入 量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
穿心莲 内酯	2.00	2.300	4.249	97.8	98.9	1.1
	2.02	2.300	4.290	98.7		
	1.96	2.300	4.239	99.1		
	1.94	2.300	4.252	100.5		
	2.07	2.300	4.359	99.5		
	1.89	2.300	4.179	97.6		
脱水穿心 莲内酯	0.57	0.539	1.091	96.6	97.8	2.2
	0.58	0.539	1.110	98.3		
	0.56	0.539	1.103	100.7		
	0.56	0.539	1.098	99.8		
	0.59	0.539	1.104	95.4		
	0.54	0.539	1.058	96.1		
去氧穿心 莲内酯	0.29	0.394	0.684	99.9	98.4	2.1
	0.29	0.394	0.671	96.8		
	0.28	0.394	0.655	95.2		
	0.28	0.394	0.671	99.3		
	0.30	0.394	0.697	100.8		
	0.28	0.394	0.667	98.2		

2.9 样品测定

取 3 批自制的穿心莲超分子提取物,按上述方法测定,结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测器的选择

ELSD 检测器为质量通用型检测器,可用于检测任何挥发性低于流动相的化合物,特别适用于没有紫外吸收,或仅有弱紫外末端吸收的化合物。该检测器可方便地测定多种化合物,且各化合物的响应值接近,同时灵敏度和稳定性亦能符合检测要求。

表 2 穿心莲超分子提取物中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯及 14-去氧穿心莲内酯含量 (n=3)

Tab 2 Contents of andrographolide, deoxyandrographolide, and 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide in andrographis supramolecular extract (n=3)

批号	穿心莲 内酯 /%	RSD /%	脱水穿心 莲内酯 /%	RSD /%	去氧穿心 莲内酯 /%	RSD /%
20060301	36.83	1.6	10.56	1.8	5.36	2.2
20060306	40.56	1.8	10.89	1.7	5.83	1.6
20060312	39.90	1.2	11.63	1.8	5.62	2.1

3.2 流动相的选择

以不同比例的甲醇-水、乙腈-水为流动相,均不能将脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯分开。实验采用乙腈-水线性梯度洗脱,可使脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯色谱峰分离度达到 1.55 以上。

3.3 系统适用性考察

本实验考察了在所采用流动相条件下,不同型号的柱子:Shim-pack ODS VP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Diamonsil C₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 和 Agilent ZORBAX Extent-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),理论塔板数按穿心莲内酯计算均不低于 2 000,脱水穿心莲内酯和 14-去氧穿心莲内酯色谱峰的分度在 1.5 以上,因此该色谱条件具有普遍适用性。

REFERENCES

[1] Ch. P (2005) VolII (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 189.

[2] MADAR S, TRIPATHI H, TANDAN C, *et al.* Antipyretic and antiallergenic effects of andrographolide[J]. Indian J Pham Sci, 1995, 57(3): 121-125.

[3] HANG G, XU Q T, LIU L, *et al.* Supramolecular extractive of creat, preparation method and application: china, 1695702 [P]. 2005-11-16.

[4] XU X Q, HU G L, SHEN J C, *et al.* Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in Andrographis paniculata Nees Materials and Related Patent Medicines by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography[J]. Chin J Chamatog(色谱) 2002, 20(5): 446-448.

[5] WU F H, LI G X, LIANG H M, *et al.* Determination of andrographolide and 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide in Compound Chuanxinlian tablets by HPLC [J]. West China J Pham Sci(华西药科学杂志), 2004, 19(2): 133-135.

[6] YAN Y Z, XIE P S. Re-evaluation of Quality Control of *Andrographis paniculata* [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 1998, 9(4): 204-206.

[7] HAN G, XU X X, YANG S S. Determination of andrographolides in Andrographis Tablets by HPLC-ELSD[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(5): 705-796.

[8] LI Q, HU G L, XU X Q, *et al.* Determination of andrographolide and dehydroandrographolide in andrographis paniculata ness by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. Chin J Anal Chem(分析化学) 2003, 31(4): 451-454.

收稿日期: 2007-05-10