

HPLC-DAD 同时测定清感穿心莲片中 3 种成分的含量

段营辉¹, 陈惠玲¹, 李诚铭², 李玲玲¹ (1.厦门市食品药品质量检验研究院, 福建 厦门 361012; 2.福建中医药大学, 福州 350122)

摘要: 目的 建立清感穿心莲片中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素 3 种成分的 HPLC 含量测定方法, 为清感穿心莲片的质量控制提供参考。方法 采用 HPLC-DAD 法, Agilent Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 225 nm(穿心莲内酯), 254 nm(脱水穿心莲内酯), 323 nm(异丹叶大黄素), 柱温 35 ℃, 流速 0.8 mL·min⁻¹。结果 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素分别在 8.395~335.790 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 5.948~237.924 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)和 0.854~25.607 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)内线性关系良好; 平均加样回收率分别为 97.2%, 102.1%和 98.2%, RSD 分别为 1.7%, 3.0%和 1.0%。对来自 2 个企业的 14 批次样品进行测定, 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素含量范围分别为每片 0.80~2.43, 0.59~2.71, 和 0.045~0.275 mg。结论 本方法准确可靠, 可用于清感穿心莲片的质量控制。

关键词: 清感穿心莲片; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯; 异丹叶大黄素; 多成分测定; 质量控制

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)09-1081-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.010

引用本文: 段营辉, 陈惠玲, 李诚铭, 等. HPLC-DAD 同时测定清感穿心莲片中 3 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1081-1084.

Simultaneous Determination of Three Components in Qinggan Chuanxinlian Tablet by HPLC-DAD

DUAN Yinghui¹, CHEN Huiling¹, LI Chengming², LI Lingling¹ (1.Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, China; 2.Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of andrographolide, dehydroandrographolide and isorhapontigenin in Qinggan Chuanxinlian tablet, and to provide the evidence for its quality control. **METHODS** The HPLC-DAD analysis was carried out by Agilent Extend C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile(A)-water solution(B) as the mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was 225 nm for andrographolide, 254 nm for dehydroandrographolide, and 323 nm for isorhapontigenin, respectively. In addition, the column temperature was 35 ℃, and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **RESULTS** The linear range was 8.395–335.790 μg·mL⁻¹ for andrographolide($r=0.999\ 9$), 5.948–237.924 μg·mL⁻¹ for dehydroandrographolide($r=0.999\ 9$) and 0.854–25.607 μg·mL⁻¹ for isorhapontigenin($r=0.999\ 9$); the average recoveries were 97.2%, 102.1% and 98.2%, and RSD were 1.7%, 3.0%, 1.0%, respectively. The contents of three components in 14 batches from 2 manufactories were 0.80–2.43, 0.59–2.71, and 0.045–0.275 mg per tablet. **CONCLUSION** This method is accurate and reliable, and it is suitable for the quality control of Qinggan Chuanxinlian tablet.

KEYWORDS: Qinggan Chuanxinlian tablet; andrographolide; dehydroandrographolide; isorhapontigenin; multicomponent determination; quality control

清感穿心莲片由穿心莲和买麻藤 2 味药材经提取加工精制而成, 具有清热利咽、止咳化痰的功效, 用于风热感冒, 咽喉肿痛, 支气管炎, 扁桃体炎等症^[1-2]。该制剂标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第十九册, 仅有穿心莲薄层色谱的鉴别及片剂通则检查, 未对另一主要组成药材买麻藤进行控制。

研究文献表明^[3-6], 穿心莲的化学成分主要为二萜内酯类、黄酮类等, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯是其中主要的二萜内酯类成分, 也是评价

穿心莲药材品质优劣的指标成分。买麻藤中主要含有芪类化合物, 即二苯乙烯类化合物及其低聚物, 如白藜芦醇、异丹叶大黄素等, 该类化合物具有多方面的生物活性, 如抗菌、抗病毒及抗炎等^[7-10]。本实验采用 HPLC-DAD 首次建立同时测定清感穿心莲片中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素含量的方法, 对来自 2 个企业的 14 批样品进行含量测定, 有利于更准确、全面地评价制剂的质量, 为清感穿心莲片的质量控制提供参考。

作者简介: 段营辉, 男, 博士, 副主任药师

Tel: (0592)5619842

E-mail: duanyh2005@163.com

1 仪器与试药

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津, 包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、LC Solution 色谱工作站)。XS105、XP26 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。超声波清洗器(厦门李氏和达超声波设备有限公司, 功率 120 W, 频率 40 kHz)。

穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110797-201609; 含量: 99.7%), 脱水穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110854-201710; 含量: 99.4%), 异丹叶大黄素(International Laboratory USA, 批号: 228579; 含量: 98.7%)。异丹叶大黄素含量由本实验室以 HPLC 面积归一化法测得。乙腈为色谱纯, 甲醇、乙醇为分析纯, 水为超纯水。试验用到的样品来自 2 家生产企业, 共 14 批次样品, 其中编号 A1~A12 购自厦门中药厂有限公司, 批号分别为 150101, 150102, 160201, 160406, 160512, 160518, 171101, 171102, 171103, 180404, 180405, 180406; 编号 B1~B2 购自广西邦琪药业有限公司, 批号分别为 161213, 170429。方法学考察所用供试品批号均为 160512。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~12 min, 12%→18% A; 12~20 min, 18%→25% A; 20~55 min, 25%→40% A; 55~

59 min, 40%→100% A), 检测波长 225 nm(穿心莲内酯), 254 nm(脱水穿心莲内酯), 323 nm(异丹叶大黄素), 柱温 35 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样量: 10 μL。理论板数均应≥2 000。

2.2 对照品溶液制备

取异丹叶大黄素对照品、穿心莲内酯对照品、脱水穿心莲内酯对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 含异丹叶大黄素 15 μg, 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯各 150 μg 的溶液, 置棕色瓶内避光保存, 即得。

2.3 供试品溶液制备

取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 取上清液滤过, 取续滤液, 置棕色瓶内避光保存, 即得。

2.4 阴性样品溶液制备

按处方比例和清感穿心莲片的制法分别制备缺穿心莲的阴性样品、缺买麻藤的阴性样品及缺两者的其他成分(蔗糖、滑石粉)的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和 3 种阴性样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定。样品中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素 3 个成分的色谱峰可以达到基线分离, 且阴性样品在相应的保留时间处无干扰。混合对照品、供试品和各阴性样品色谱图见图 1。

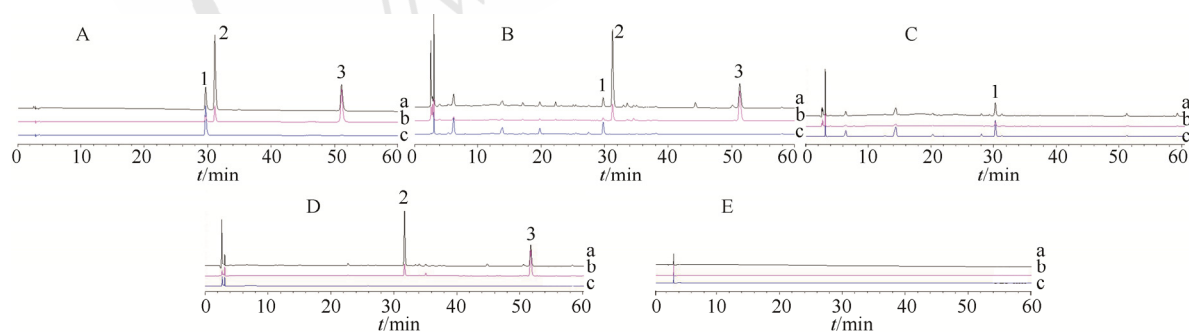


图 1 高效液相色谱图

A—混合对照品; B—供试品; C—缺穿心莲阴性样品; D—缺买麻藤阴性样品; E—缺穿心莲、买麻藤阴性样品; 1—异丹叶大黄素; 2—穿心莲内酯; 3—脱水穿心莲内酯; a—225 nm; b—254 nm; c—323 nm。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A—mixed standards; B—sample; C—negative sample without *Andrographis paniculata*; D—negative sample without *Gnetum montanum*; E—negative sample without *Andrographis paniculata* and *Gnetum montanum*; 1—isorhapontigenin; 2—andrographolide; 3—dehydroandrographolide; a—225 nm; b—254 nm; c—323 nm.

2.5.2 线性关系考察 精密称取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素对照品适量，加甲醇溶解制成浓度为 0.336, 0.238, 0.034 2 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。精密量取混合对照品溶液 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 7.5, 10 mL(异丹叶大黄素舍去 10 mL 时数值)，分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，进样测定。以浓度(X)为横坐标，峰面积(Y)为纵坐标，绘制标准曲线。穿心莲内酯对照品的回归方程为 $Y=26\,650X+21\,780$ ，相关系数 $r=0.999\,9$ ，线性范围为 8.395~335.790 μg·mL⁻¹。脱水穿心莲内酯对照品的回归方程为 $Y=17\,848X+9\,453$ ，相关系数 $r=0.999\,9$ ，线性范围为 5.948~237.924 μg·mL⁻¹。异丹叶大黄素对照品的回归方程为 $Y=74\,323X-3\,018$ ，相关系数 $r=0.999\,9$ ，线性范围为 0.854~25.607 μg·mL⁻¹。

2.5.3 仪器精密度试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液。连续进样测定 6 次，每次 10 μL，测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素的峰面积，计算 RSD 分别为 0.3%，0.5%和 0.4%。

2.5.4 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液。分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别注入高效液相色谱仪测定。测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素的峰面积，计算 RSD 分别为 0.7%，0.8%和 1.2%。

2.5.5 重复性试验 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素的平均含量分别为每片 2.34, 1.63 和 0.17 mg；RSD 分别为 1.1%，1.1%和 1.3%。

2.5.6 加样回收率试验 取供试品 6 份，每份 0.25 g，精密称定，置 25 mL 量瓶，精密加入穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素的对照品溶液 1 mL(精密称取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素对照品各 22.184, 12.304 和 2.101 mg，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度)，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，测定。回收率结果表 1。

2.6 样品测定

将各批次清感穿心莲片样品按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件检测，按外标法以所得峰面积计算样品中 3 个化合物的含量，测定结果见表 2。

表 1 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素回收率结果表(n=6)

Tab. 1 Recovery results of andrographolide, dehydroandrographolide and isorhapontigenin(n=6)

成分	称样量/ g	样品中 含量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
穿心莲内酯	0.249 9	2.353 1	2.212	4.521	98.03	97.22	1.7
	0.252 0	2.372 8	2.212	4.499	96.14		
	0.251 3	2.366 2	2.212	4.582	100.18		
	0.252 4	2.376 6	2.212	4.505	96.24		
	0.250 3	2.356 8	2.212	4.497	96.76		
	0.251 2	2.365 3	2.212	4.488	95.95		
脱水穿心莲内酯	0.249 9	1.637	1.223	2.914	104.42	102.09	3.0
	0.252 0	1.651	1.223	2.905	102.55		
	0.251 3	1.647	1.223	2.951	106.68		
	0.252 4	1.654	1.223	2.876	99.94		
	0.250 3	1.640	1.223	2.870	100.61		
	0.251 2	1.646	1.223	2.849	98.34		
异丹叶大黄素	0.249 9	0.170	0.207	0.373 2	97.96	98.23	1.0
	0.252 0	0.172	0.207	0.374 4	97.86		
	0.251 3	0.171	0.207	0.378 7	100.13		
	0.252 4	0.172	0.207	0.375 8	98.39		
	0.250 3	0.171	0.207	0.372 1	97.27		
	0.251 2	0.171	0.207	0.373 8	97.80		

表 2 14 批清感穿心莲片中 3 个成分的含量测定结果(n=2)

Tab. 2 Contents of three componets in 14 batches of Qinggan Chuanxinlian tablet(n=2)

编号	穿心莲内酯	脱水穿心莲内酯	总和	异丹叶大黄素
A1	1.38	0.59	1.97	0.124
A2	1.39	0.60	1.99	0.126
A3	1.21	0.59	1.80	0.135
A4	1.32	0.62	1.94	0.223
A5	2.34	1.63	3.97	0.170
A6	2.36	1.64	4.00	0.095
A7	2.43	1.68	4.11	0.115
A8	1.94	0.97	2.91	0.186
A9	1.91	0.80	2.71	0.275
A10	1.76	1.33	3.10	0.129
A11	2.27	1.54	3.82	0.143
A12	1.82	1.39	3.21	0.072
B1	0.80	1.79	2.59	0.045
B2	1.60	2.71	4.31	0.184

3 讨论

3.1 检测波长的选择

根据对照品的紫外吸收光谱，可知穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和异丹叶大黄素的吸收波长分别为 225, 254 和 323 nm，为了更准确地测定各个成分的含量，本实验采用 DAD 检测器，以

各待测成分的最大吸收波长作为检测波长。

3.2 含量限度的制订

中国药典 2015 年版一部中规定穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总和不得少于 0.8%。按照清感穿心莲片的工艺, 理论计算制剂中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总和应不低于每片 2 mg。其中有 4 批样品低于此限度, 均为 2015 年生产的产品, 已过保质期。买麻藤中异丹叶大黃素的含量暂没有文献报道, 测定的 14 批样品中含量为每片 0.045~0.275 mg, 相差较大, 含量限度暂不制订, 待进一步收集更多的样品和买麻藤药材, 再加以完善。

3.3 异丹叶大黃素稳定性的考察

试验过程中发现, 对照品溶液在室温(>25 ℃)条件下放置, 其含量随时间逐渐降低。在液相图谱上显示为异丹叶大黃素主峰面积逐渐降低, 在其之后有一杂质峰面积逐渐增加。两者的紫外光谱显示, 最大吸收波长发生了转移(主峰为 323 nm, 杂质峰为 291 nm)。有文献报道二苯乙烯苷类在光照条件下会发生顺反异构化, 由反式定量地转化为顺式结构, 且紫外最大吸收波长会发生紫移^[11-12]。利用液质联用技术分析, 杂质峰具有与主峰相同的相对分子质量, 提示两者互为同分异构体, 也进一步证明异丹叶大黃素在放置过程中由反式向顺式转化。因此, 在对照品和供试品制备中应尽量避免光、低温操作。

REFERENCES

- [1] HU M. Quality standards for Qinggan Chuanxinlian tablets [J]. Chin Med Mater(中药材), 2008, 31(7): 1077-1079.
- [2] ZHANG H, FANG Y S, QIU Y G, et al. Effect of

Andrographis paniculata extract on the expression of cytokines in oral ulcer guinea pigs [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(9): 1134-1137.

- [3] WANG Y H, WANG J B, HAO Q X, et al. Evaluation of chemical contents, fingerprint and antimicrobial activity of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) nees harvested in different regions [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(9): 77-82.
- [4] WANG J Y, LIU W Y. The reserch progress in classification detection methods and clinical applications of andrographolide sulfonates [J]. Pharm Today(今日药理学), 2018, 28(6): 426-432.
- [5] WANG L J, CHEN L W, HE Q, et al. Study on the synergistic antibacterial effect of andrographolide and the related mechanisms [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理学与临床), 2017, 33(6): 45-49.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2015: 1178.
- [7] DING Y S, HE L Y. Determination of six stilbenes in *Gnetum parvifolium* (Warb.) C. Y. Cheng by HPTLC fluorescent scanning [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2000, 35(6): 454-456.
- [8] WANG J W, LIANG J Y, LI L. Chemical constituents from *Gnetum parvifolium* [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2006, 4(6): 432-434.
- [9] YAO L L, DAI G H, ZHANG Y Y, et al. Antioxidant and antitumor effects of ethanol extracts from *Gnetum montanum* Markgr [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(4): 574-576.
- [10] YANG R C, ZHU X L, ZHANG H Q. Effects of resveratrol and SRT1720 on expression of podocyte slit diaphragm elements in diabetic nephropathy rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(2): 164-168.
- [11] WANG G F, REN X L, OUYANG H Z, et al. Stability study of stilbene glucoside by chemical kinetics under four illuminant using [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(3): 458-462.
- [12] DONG L H, GUO P P, GUO D, et al. Preparation and identification of cis-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside [J]. J Hebei Med Univ(河北医科大学学报), 2014, 35(2): 166-169.

收稿日期: 2018-08-13

(本文责编: 曹粤锋)