

HPLC 同时测定穿心莲药材及其注射液中 3 种内酯类成分的含量

董海娟, 张尊建^{*}(中国药科大学分析测试中心, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要: 目的 利用 HPLC 同时测定穿心莲药材及其注射液中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯的含量。方法 色谱柱为 Shimadzu Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μ m), 以甲醇-水(53:47)洗脱, 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 225 nm 处检测穿心莲内酯, 检测波长 205 nm 处检测脱水穿心莲内酯与新穿心莲内酯。结果 穿心莲药材及其注射液中 3 种内酯类成分能达到很好分离, 线性关系良好($r \geq 0.9995$); 平均加样回收率为 99.6%~101.2%, RSD<3%。**结论** 本方法灵敏、准确、可靠、重复性好, 可用于穿心莲药材及其注射液的质量评价与 3 种内酯类成分的快速测定。**关键词:** 穿心莲; 内酯类成分; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)04-0349-04

Simultaneous Determination of 3 Components of Diterpenoids in *Andrographis Paniculata* and Chuanxinlian Injection by HPLC

DONG Haijuan, ZHANG Zunjian^{*} (Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a quantitative method for simultaneous determination of andrographolide,

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JKQ2009010)

作者简介: 董海娟, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (025)83271233 E-mail:donghaijuan0618@163.com ^{*}通信作者: 张尊建, 男, 博士, 教授 Tel: (025)83271454 E-mail: zzj@cpu.edu.cn

deoxyandrographolide and neoandrographolide in *Andrographis paniculata* and Chuanxinlian injection by HPLC. **METHODS** A Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used with CH₃OH and water(53 : 47) as mobile phase. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 25 °C, the detection wavelength of andrographolide was set at 225 nm and the detection wavelength of deoxyandrographolide and neoandrographolide was set at 205 nm. **RESULTS** The 3 active components of diterpenoids were in baseline separation. The linearity of this method was good ($r \geq 0.999\ 5$), and the average recoveries were 99.6%–101.2%, RSD<3%. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, reliable and repeatable, which can be used for quality evaluation of *Andrographis paniculata* and its injection, and for determination of 3 active components of diterpenoids quickly.

KEY WORDS: *Andrographis paniculata*; diterpenoids; HPLC

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees 的干燥地上部分, 具有清热解毒、凉血消肿的功效^[1], 用于感冒发热、咽喉肿痛及急性菌痢、胃肠炎等疾病的治疗^[2]。穿心莲有较高的药用和保健价值, 随着抗生素滥用及不良反应的增加, 开发具有良好抗菌效果中药的呼声越来越高, 穿心莲作为抗菌作用显著的中药, 越来越展现出广阔而深入的开发应用前景^[3]。穿心莲药材中的有效成分主要为二萜内酯类成分, 包括穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯等, 目前研究较多的是前 2 种内酯, 并将这 2 种成分含量作为穿心莲药材及其制剂的质量控制指标^[4-6]。本实验采用 HPLC-DAD 同时测定穿心莲药材及其注射液中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯的含量, 以期更好地控制穿心莲药材及其制剂的质量, 同时该方法也可准确快速测定穿心莲药材及其注射剂中 3 种二萜内酯类成分。

1 仪器与试药

Agilent 1100 LC/DAD 系统(美国 Agilent 公司, 含在线真空脱气机, 低压四元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器, HP Chemstation 色谱工作站); Sartorius BP 211D 电子天平。

甲醇(色谱纯, 德国 VWR 公司); 双蒸水(自制); 乙醇(分析纯, 南京化学试剂一厂); 穿心莲内酯(批号: 110797-200307, 供含量测定用)、脱水穿心莲内酯(批号: 110854-201007, 含量 99.7%)均购自中国药品生物制品检定所; 新穿心莲内酯(上海同田生物技术有限公司, 批号: 10110332, 含量>99%)。

穿心莲药材(3 批, 产地分别为山西、安徽、海南)购自药材市场, 经中国药科大学中药学院李萍教授鉴定为穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees; 穿心莲注射液(批号: 100501, 100502, 100503)由江西某中药生产厂家提供, 规

格: 每支 2 mL, 每盒 10 支。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Shimadzu Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(53 : 47); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 穿心莲内酯为 225 nm, 脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯为 205 nm; 进样量: 20 μL。按照上述色谱条件进行测定, 结果显示, 各待测组分得到很好的分离, 相邻组分分离度均>1.5, 各成分理论板数不低于 3 000。对照品、代表样品及空白样品的色谱图见图 1。

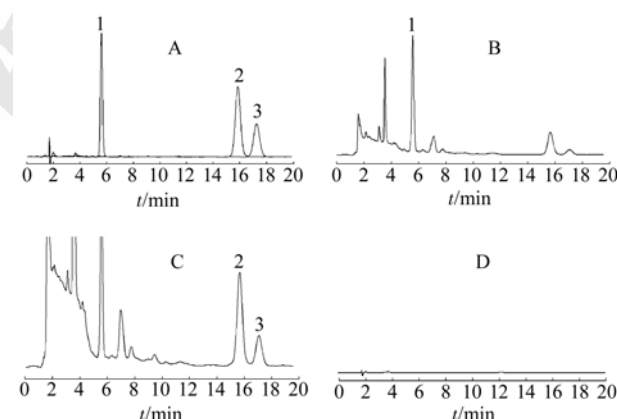


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品(225 nm); C-样品(205 nm); D-空白样品溶液;
1-穿心莲内酯; 2-脱水穿心莲内酯; 3-新穿心莲内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard; B-sample(225 nm); C-sample(205 nm); D-blank sample;
1-andrographolide; 2-deoxyandrographolide; 3-neoandrographolide

2.2 对照品溶液的制备

精密称取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加 60%甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含穿心莲内酯 200 μg, 脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯各 100 μg 的溶液作为对照品溶液。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 药材供试品溶液的制备

取干燥的穿心莲

药材粉末(40目)2.0 g, 用 40 mL 90%乙醇热浸 3 次, 每次 4 h(热浸温度 50 ℃), 过滤, 合并滤液, 取 3 mL 滤液, 挥干, 5 mL 60%甲醇涡旋 1 min 溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.2 注射液供试品溶液的制备 精密量取本品 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加 60%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

精密量取穿心莲内酯对照品溶液(200 μg·mL⁻¹) 适量置 10 mL 量瓶中, 加 60%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。分别精密量取脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯对照品溶液(100 μg·mL⁻¹) 适量置 10 mL 量瓶中, 加 60%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 5, 10, 20, 30, 50, 100 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。分别吸取上述 3 种对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 以色谱峰面积为纵坐标(Y), 对照品浓度为横坐标(X), 计算标准曲线回归方程, 见表 1。

表 1 线性范围、回归方程和相关系数

Tab 1 Linearity, regression equation and correlation coefficient

测定成分	线性范围/ μg·mL ⁻¹	回归方程	相关系数 r
穿心莲内酯	5~200	Y=40.10X-23.12	0.999 9
脱水穿心莲内酯	5~100	Y=57.82X-22.94	0.999 9
新穿心莲内酯	5~100	Y=31.63X+1.608	0.999 5

2.5 仪器精密度试验

精密量取注射液样品(批号: 100501), 按“2.3.2”项下方法制备样品供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 5 次, 记录色谱峰面积。穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 0.45%, 0.84%, 1.30%。试验表明, 方法的精密度良好。

2.6 重复性试验

精密量取注射液样品(批号: 100501), 按“2.3.2”方法重复制备样品供试品溶液 5 份, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进行测定, 记录色谱峰面积。穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 1.02%, 1.44%, 2.01%。试验表明, 方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密量取注射液样品(批号: 100501), 按

“2.3.2”项下方法制备样品供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定, 记录色谱峰面积。穿心莲内酯, 脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 1.68%, 0.82%, 1.96%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的穿心莲注射液样品 9 份, 每份 1 mL, 分别精密加入低、中、高 3 种浓度的对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法制备样品供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进行测定, 记录各色谱峰面积, 计算平均回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test (n=9)

测定成分	样品含 量/μg	加入 量/μg	测得 量/μg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
穿心莲 内酯	73.79	50.00	124.31	101.03	99.6	1.73
	73.79	50.00	123.46	99.34		
	73.79	50.00	124.97	102.35		
	73.79	75.00	147.29	98.00		
	73.79	75.00	147.89	98.80		
	73.79	75.00	146.80	97.35		
	73.79	100.00	171.78	97.99		
	73.79	100.00	175.14	101.35		
	73.79	100.00	173.55	99.76		
脱水穿心 莲内酯	63.45	30.00	93.13	98.95	100.0	1.87
	63.45	30.00	94.14	102.29		
	63.45	30.00	92.84	97.97		
	63.45	50.00	113.66	100.42		
	63.45	50.00	113.19	99.47		
	63.45	50.00	115.13	103.36		
	63.45	100.00	162.45	99.00		
	63.45	100.00	161.44	97.99		
	63.45	100.00	164.17	100.72		
新穿心 莲内酯	39.12	20.00	59.47	101.74	101.2	2.28
	39.12	20.00	59.09	99.84		
	39.12	20.00	59.97	104.27		
	39.12	30.00	68.46	97.79		
	39.12	30.00	70.56	104.80		
	39.12	30.00	69.50	101.27		
	39.12	50.00	89.52	100.80		
	39.12	50.00	90.01	101.78		
	39.12	50.00	88.51	98.78		

2.9 样品测定

按“2.3.2”项下方法制备样品供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 计算 3 批样品穿心莲药

材及 3 批注射液中 3 种内酯类成分的含量, 结果见表 3 和表 4。

表 3 穿心莲药材含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of content determination of *Andrographis paniculata*($n=3$)

样品名称	穿心莲内酯/ mg·g ⁻¹	脱水穿心莲 内酯/mg·g ⁻¹	新穿心莲 内酯/mg·g ⁻¹
药材 1(产地山西)	21.96	8.52	4.52
药材 2(产地安徽)	18.45	7.81	4.33
药材 3(产地海南)	27.13	10.27	7.86

表 4 穿心莲注射液含量测定结果($n=3$)

Tab 4 Results of content determination of Chuanxinlian injection($n=3$)

样品名称	穿心莲内酯/ mg·支 ⁻¹	脱水穿心莲 内酯/mg·支 ⁻¹	新穿心莲 内酯/mg·支 ⁻¹
注射液 100501	0.734	0.614	0.396
注射液 100502	0.715	0.634	0.412
注射液 100503	0.741	0.644	0.405

3 讨论

3.1 指标成分的选择

在笔者前述研究中^[7], 通过液相色谱质谱联用法的研究得知, 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯是穿心莲药材及其注射液中的主要的 3 种二萜内酯类成分, 同时也是穿心莲药材的专属性成分, 故本研究选取这 3 种主要成分进行含量测定研究, 以期更全面有效地评价穿心莲及其制剂的质量。

3.2 检测波长的选择

通过二极管阵列检测器(DAD)考察了 190~400 nm 波长色谱峰的出峰情况, 发现穿心莲内酯的最大吸收波长为 225 nm, 脱水穿心莲内酯的最

大吸收波长为 205 nm 和 250 nm, 新穿心莲内酯的最大吸收波长为 205 nm, 故实验最后确定在 225 nm 波长下检测穿心莲内酯, 在 205 nm 波长下检测脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯, 从而达到同时检测的目的。

3.3 流动相的选择

试验中考察了甲醇-水、乙腈-水系统, 由于乙腈-水系统洗脱较快, 穿心莲药材及其注射液中的成分不能得到合适的分离, 同时考虑到毒性及经济环保方面的因素, 选择甲醇-水系统。试验发现, 在甲醇-水为 53:47 的情况下, 脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯能达到基线分离, 且穿心莲内酯出峰不受其他杂质干扰。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010) Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 251.
[2] HE Z Y, YAN F, SHI Y Y, et al. Pharmacological progress of *Andrographis paniculata* [J]. Mod Agr Sci Technol(现代农业科技), 2009, (3): 21-22.
[3] LI X H, LI D X. Pharmacological progress of *Andrographis paniculata* [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2009, 28(8): 480-482.
[4] REN R, ZHANG Y Y. RP-HPLC determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Houshunng Pian [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2011, 9(4): 271-273.
[5] MEI Z N, SUN X M, LI X K. HPLC determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Xiaoyan Zhike Tablets [J]. Her Med(医药导报), 2007, 26(9): 1079-1080.
[6] XUE L H, LI W, LI J H, et al. HPLC determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Lianzhi Xiaoyan Tablets [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2008, 23(1): 14-16.
[7] ZHANG Z J, DONG H J, YU J. The fingerprints of *Andrographis paniculata* by HPLC/UV/MS [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2005, 3(6): 373-376.

收稿日期: 2011-09-10