

反相高效液相色谱法测定穿心莲药材及其制剂中的 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯

徐晓琴, 胡广林, 沈金灿, 李琦, 王小如

(厦门大学化学化工学院 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 发展了穿心莲药材及其中成药中两种主要成分穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的反相高效液相色谱测定方法。采用甲醇振荡提取法进行样品前处理, 在以乙腈-水为流动相作梯度洗脱、ODS柱、检测波长为225 nm的条件下, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯在15 min内可达到基线分离。两种内酯在10 mg/L~100 mg/L时其浓度与峰面积成良好的线性关系, 加标回收率为96%~104%。该法适用于穿心莲药材及其制剂的质量分析检验。

关键词: 高效液相色谱; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯; 穿心莲; 清感穿心莲片; 清火栀麦胶囊

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2002)05-0446-03

Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* Nees Materials and Related Patent Medicines by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

XU Xiao-qin, HU Guang-lin, SHEN Jin-can, LI Qi, WANG Xiao-ru

(The Key Laboratory of Analytical Sciences of Ministry of Education of China, College of
Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A simple and accurate method for the determination of andrographolide and dehydroandrographolide in *andrographis paniculata* Nees materials and patent medicines with high performance liquid chromatography (HPLC) has been developed. The two components were extracted from powdered samples by shaking with methanol. The resultant extracts were separated within 15 min on a BECKMAN C₁₈ column (4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm) and with a gradient elution of acetonitrile-water at a flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was 225 nm and the injection volume was 20 μL. In gradient elution program the volume fraction of acetonitrile in mobile phase was as follows: 0 min-1 min, 40%; 1 min-5 min, 40%-50%; 5 min-15 min, 50%-70%. Both andrographolide and dehydroandrographolide have good linearity in the range of 10 mg/L to 100 mg/L with the correlation coefficients of 0.9976 and 0.9986 respectively. This method has been successfully applied for the analysis of *andrographis paniculata* Nees materials and related patent medicines.

Key words: high performance liquid chromatography; andrographolide; dehydroandrographolide; *andrographis paniculata* Nees; Qinggan Chuanxinlian capsule; Qinghuo Zhimai capsule

穿心莲(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees)为爵床科植物穿心莲的干燥地上部分。它具有清热解毒、凉血、消肿的功效。主要用于感冒发热、咽喉肿痛、口舌生疮、顿咳劳嗽、泄泻痢疾、热淋涩痛、痈肿疮疡、毒蛇咬伤等症^[1]。穿心莲中主要有效成分为穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯、脱氧穿心莲内酯和高穿心莲内酯等二萜内酯类成分^[2]。2000年版中国药典以穿心莲内酯和脱

水穿心莲内酯作为穿心莲药材及其制剂的质量控制指标成分。过去人们对穿心莲中内酯类成分的分测定常采用薄层色谱法^[1,3,4],但薄层扫描色谱法定量的准确性尚不够理想,一般只用做半定量或限度实验。已有报道采用高效液相色谱法测定穿心莲药材^[5]和消炎利胆片^[6,7]中的内酯类成分,但未见穿心莲药材和制剂中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯同时测定的报道。

收稿日期: 2001-11-29

作者简介: 徐晓琴,女,1979年生,硕士生,研究方向为中药GAP质量控制研究。

通讯联系人: 胡广林, Tel(Fax): (0592)2186401, E-mail: glhu@jingxian.xmu.edu.cn.

基金项目: 科技部中药现代化重中之重项目(99-929-02-13)及福建省科技部中药质量控制重点项目(2000F001)。

本文采用甲醇提取法简便、有效地从穿心莲药材及两种含穿心莲的中成药清火栀麦胶囊和清感穿心莲片中提取出穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯, 然后采用高效液相色谱法对这两种内酯同时进行了测定。结果表明, 该法简便、准确、重现性好, 具有足够的灵敏度, 适用于穿心莲药材及其制剂中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的同时测定。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂、材料与标准液配制

HP 1100 二元泵(美国), Rheodyne 7725 进样器(美国), UV200II 紫外可变波长检测器(大连依利特科学仪器有限公司), HP ChemStation 色谱数据处理系统(美国)。国华 THZ-82 水浴恒温振荡器。HD-0208 超声波仪(厦门和达超声波仪器有限公司, 1000 W)。MilliQ 超纯水装置。C₁₈ 硅胶小柱(3 mL, Alltech)。

穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的化学对照品由中国药品生物制品检定所提供; 穿心莲药材由广州中医药大学提供; 清感穿心莲片和清火栀麦胶囊均为市售品。HPLC 级乙腈购自美国 Tedia 公司; 分析纯的甲醇、乙醇购自上海化学试剂公司。

分别称取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品, 用甲醇配制成质量浓度均为 200 mg/L 的对照品贮备液。由两种贮备液等量混合得到两种内酯质量浓度均为 100 mg/L 的混合对照品溶液, 逐级稀释得到工作标准溶液。

1.2 色谱条件

色谱柱为 BECKMAN C₁₈ 柱(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm, 美国); 检测波长 225 nm; 进样体积 20 μL; 流动相由乙腈和水组成, 流速 0.5 mL/min; 梯度洗脱程序为: 0 min~1 min, 乙腈的体积分数(下同)为 40%; 1 min~5 min, 乙腈由 40% 线性增至 50%; 5 min~15 min, 乙腈由 50% 线性增至 70%。

1.3 穿心莲药材及其制剂的提取

穿心莲药材: 取穿心莲粉末(过 60 目筛)约 0.1 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 20 mL, 密塞, 置于振荡器中, 控制温度 35 °C, 振荡 5 h, 静置 12 h, 滤过, 滤液于 25 mL 容量瓶中用甲醇定容, 摇匀后经 C₁₈ 硅胶小柱做净化处理, 即先用 3 mL 甲醇预淋洗 C₁₈ 硅胶小柱, 将样品提取液直接上柱, 弃去前 3 mL 初滤液后, 收集续滤液待测。

清感穿心莲片: 取 10 粒药片, 除去糖衣, 于玛瑙研钵中研细, 过 60 目筛, 按照与穿心莲药材同样的方法处理。

清火栀麦胶囊: 直接取出胶囊的内容物进行提

取, 每次取一粒, 每粒胶囊的内容物为 0.25 g, 按照与穿心莲药材同样的方法处理。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法的比较

采取了 4 种不同的方法对同一穿心莲样品进行提取, 如表 1 所示。药典法采用乙醇为提取剂, 收率较低, 这与文献[7]中乙醇对穿心莲中内酯类成分的提取效率低于甲醇的报道一致。后三种方法均有较高的提取效率, 但索氏提取法操作繁琐, 溶剂消耗量大; 超声波提取法和振荡提取法都是较为简便有效的提取方法。在本实验室条件下, 振荡法可同时处理几十份样品, 更为简便。因此, 选用以甲醇为溶剂的振荡法来提取穿心莲中的内酯类成分。

表 1 不同提取方法的比较

Table 1 Comparison of different extraction methods

Extraction method	Extraction process	Yield from extraction (mg/g)
Method from the Pharmacopoeia	solvent: 30 mL ethanol, soak for 30 min, extraction in ultrasonic extractor for 30 min	17.7
Soxhlet's extraction	solvent: 70 mL methanol, extraction in Soxhlet's extractor for 3.5 h	23.8
Ultrasonic extraction	solvent: 20 mL methanol, extraction in ultrasonic extractor for 1 h	24.0
Shaking extraction	solvent: 20 mL methanol, extraction by shaking at 35 °C for 5 h, soak for 12 h	26.2

2.2 色谱分离

分别对穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的对照品溶液做紫外波长扫描, 发现在 225 nm 处, 穿心莲内酯具有最大吸收, 而此时脱水穿心莲内酯也有较大的吸收, 因此选择 225 nm 作为穿心莲中这两种内酯成分的紫外检测波长。

随着流动相中乙腈体积分数的增加, 洗脱能力增强。在选定的分析条件下, 对穿心莲药材、清感穿心莲片和清火栀麦胶囊的提取液进行了分离(见图 1)。穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯在 15 min 内达到了基线分离。对穿心莲药材^[8]、清感穿心莲片及清火栀麦胶囊的色谱峰进行了质谱鉴定, 表明两种内酯都得到了良好的分离。

2.3 线性关系

以不同质量浓度的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯混合标准溶液各 20 μL 分别进样, 测定其峰面积。以峰面积 $Y(n=7)$ 对质量浓度 $X(\text{mg/L})$ 作图, 得到线性回归方程: 穿心莲内酯为 $Y = -416.47 +$

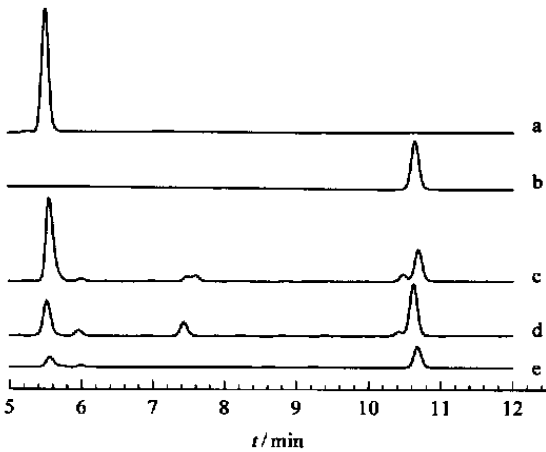


图 1 几种样品的色谱分离图

Fig. 1 Chromatograms of the samples

a. andrographolide standard; b. dehydroandrographolide standard; c. Qinggan Chuanxinlian capsule; d. Qinghuo Zhimai capsule; e. *Andrographis paniculata* Nees

217.59X, $r = 0.9976$; 脱水穿心莲内酯为 $Y = -341.18 + 142.58X$, $r = 0.9986$ 。由此可见两种内酯在 10 mg/L ~ 100 mg/L 时均具有较好的线性。

2.4 方法精密度与检测限

同一批穿心莲药材, 按样品制备方法平行制备 6 份, 依法测定, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的 RSD 分别为 9.7% 和 2.3%。本方法对两种内酯的检测限分别为 7.1 mg/L 和 6.1 mg/L。

2.5 回收率试验

准确称取已知含量的同一样品, 精密加入一定量的穿心莲内酯标准溶液和脱水穿心莲内酯标准溶液, 按照样品制备方法制备供试液, 依法测定, 测得回收率如表 2 所示。

表 2 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的回收率试验结果

Table 2 The recoveries of andrographolide and dehydroandrographolide

Sample	Recoveries (%)		RSD (%)	
	andrographolide	dehydroandrographolide	andrographolide	dehydroandrographolide
<i>Andrographis paniculata</i> Nees ¹⁾	100.8	98.1	9.0	9.1
Qinggan Chuanxinlian capsule ²⁾	101.6	103.8	6.1	8.4
Qinhua Zhimai capsule ²⁾	100.8	96.2	4.5	5.0

1) n = 5; 2) n = 3.

2.6 实际样品分析

用此法对穿心莲药材和清感穿心莲片及清火栀麦胶囊中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯进行了测定, 其质量分数示于表 3。结果表明, 本实验方法不仅适用于穿心莲药材的分析, 同样也适用于穿心莲制剂的分析。测得穿心莲全株中两种内酯的总含量达到 2.0%, 达到了 2000 年版药典中规定的两种内

酯总量不少于 0.8% 的要求。

表 3 实际样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的质量分数

Table 3 The mass fractions of andrographolide and dehydroandrographolide in samples

Sample	Test times	Mass fraction ± SD (%)	
		andrographolide	dehydroandrographolide
<i>Andrographis paniculata</i> Nees	6	1.41 ± 0.14	0.58 ± 0.01
Qinggan Chuanxinlian capsule	3	1.59 ± 0.08	1.16 ± 0.04
Qinghuo Zhimai capsule	3	0.39 ± 0.01	0.67 ± 0.01

参考文献:

[1] The Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of PRC. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 220
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2000. 220

[2] Jiangsu New Medical College. Comprehensive Dictionary on Traditional Chinese Medicines. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986. 1728
江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 1728

[3] CHEN De-chang, SHAO Ai-xin, CAI Ying-na, WANG Guo-rong. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 1986, 6(4): 232
陈德昌, 邵爱新, 蔡英娜, 王国荣. 药物分析杂志, 1986, 6(4): 232

[4] WANG Hai-long, ZHAO Qing-hua, ZHAO Yu. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2000, 16(4): 217
王海龙, 赵庆华, 赵玉. 解放军药学学报, 2000, 16(4): 217

[5] CHEN Min-wu, XU De-ran, WANG Zheng-tao, XU Luo-shan, XU Guo-jun. Journal of China Pharmaceutical University, 1999, 30(4): 291
陈敏武, 徐德然, 王峥涛, 徐珞珊, 徐国钧. 中国药科大学学报, 1999, 30(4): 291

[6] GUO Shi-ming. Hunan Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, 1997, 3(4): 42
郭世明. 湖南中医药导报, 1997, 3(4): 42

[7] WANG Yong-lin, TAO Ling, ZHOU Bao-zhu, LI Yong-jun. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2000, 20(1): 43
王永林, 陶玲, 周宝珠, 李勇军. 药物分析杂志, 2000, 20(1): 43

[8] HU Guang-lin, XU Xiao-qin, SHEN Jie-can, WANG Xiao-ru, Lee S C Frank. In: Proceedings of Beijing-Hong Kong Conference on TCMP. Hong Kong: Lin-Hu International Conference Centre of Hong Kong Baptist University, 2002. 95
胡广林, 徐晓琴, 沈金灿, 王小如, 黎先春. 见: 京港中医药研究学术交流会议文汇编. 香港: 香港浸会大学林护国际会议中心, 2002. 95