

HPLC 法测定穿心莲叶中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量

★ 黄筱琴¹ 陈建华² 杨安金³ (1. 江西省南昌市第九医院 南昌 330002; 2. 南昌工程学院医院 南昌 330099; 3. 江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:测定不同产地的穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法,Merck-Lichrospher RP-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(60:40);检测波长:226 nm(用于检测穿心莲内酯),254 nm(用于检测脱水穿心莲内酯);流速:0.8 ml/min;柱温:35℃。结果:实验表明测定方法在4 h内是稳定的,穿心莲内酯线性范围0.050~1.500 μg,脱水穿心莲内酯线性范围0.048~1.440 μg,平均加样回收率分别为100.9%和98.2%,RSD分别为3.4%(n=6)和3.2%(n=6)。结论:用HPLC法测定穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量方法准确、灵敏、稳定,可作为控制穿心莲质量的方法。

关键词:穿心莲;穿心莲内酯;脱水穿心莲内酯;含量测定;HPLC

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

Determination of the Content of Andrographolide and Dehydro-andrographolide in *Hebra Andrographis* by HPLC Method

HUANG Xiao-qin¹, CHEN Jian-hua², YANG Jin-an³

1. The Ninth Hospital of Nanchang City, Jiangxi Province, Nanchang 330002

2. The Hospital of Nanchang Institute of Technology, Nanchang 330099

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To investigate the contents of andrographolide and dehydro-andrographolide in *Hebra andrographis*. Methods: HPLC was performed on Merck-Lichrospher RP-C₁₈ (250 mm×4.60 mm, 5 μm). The chromatographic conditions were as follows: Methanol-Water (60:40) as mobile phase, flow rate is 0.8 ml/min, detecting wave length at 226 nm (andrographolide) and 254 nm (dehydro-andrographolide), column temperature was 35℃. Results: A good linearity of andrographolide was shown in range of 0.050~1.500 μg ($r=0.9999$), and that of dehydro-andrographolide was 0.048~1.440 μg ($r=0.9999$), the average recovery rate were 100.9% (andrographolide) and 98.2% (dehydro-andrographolide), there RSD were 3.4% (andrographolide) and 3.2% (dehydro-andrographolide). Conclusion: this method can supply evidence for the equality evaluation of *Hebra andrographis*.

Key words: *Hebra andrographis*; Andrographolide; dehydro-andrographolide; Content Determination; HPLC

[4] Beier A, Konigstein RP, Samec V. Clinical experiences with a crataegus pentaerythrityl-tetranitrate combination drug in heart diseases due to coronary sclerosis in old age[J]. Wien Med Wochenschr, 1974, 124(24): 378-381.

[5] Taskov M. On the coronary and cardiotonic action of crataegon[J]. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 1977, 3(4): 53-57.

[6] Ammon HP, Handel M. Crataegus, toxicology and pharmacology. Part II: Pharmacodynamics[J]. Planta Med, 1981, 43(3): 209-239.

[7] 薛冬. 益心酮片的制备与临床观察[J]. 中成药, 1999, 21(8): 436.

[8] 元晓梅, 蒋明蔚, 胡正芝. 聚酰胺吸附-硝酸铝显色法测定山楂及山楂制品中总黄酮含量[J]. 食品与发酵工业, 1996, (4): 27-32.

[9] Rehwal A, Meier B, Sticher O. Qualitative and quantitative re-

versed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in Crataegus leaves and flowers [J]. Journal of Chromatography A, 1994, 677: 25-33.

[10] LIU Rong-Hua, YU Bo-Yang, QIU Sheng-Xiangs, et al. Comparative analysis of eight major polyphenolic components in leaves of Crataegus L. by HPLC[J]. Chin J Nat Med, 2005, 3(3): 162-167.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22.

[12] Lamaison, J. L.; Carnat, A. Content of principal flavonoids of the flowers and leaves of Crataegus monogyna Jacq. and Crataegus laevigata (Poir.) DC. (Rosaceae)[J]. Pharmaceutica Acta Helvetica, 1990, 65(11): 315-20.

(收稿日期: 2007-11-01)

穿心莲为常用中药,《中华人民共和国药典》2005版(一部)收载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、消肿等作用。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。穿心莲原产于印度,我国长江以南温暖地区多栽培。研究表明穿心莲的二萜内酯类成分,以穿心莲内酯(Andrographolide,穿心莲乙素)、脱水穿心莲内酯(14-Dexoy-11, 12- didehydro-andrographolide,穿心莲丁素)和新穿心莲内酯(Neoandrographolide,穿心莲丙素)等含量较高。本研究采用 RP-HPLC 法建立了该药材中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯含量测定法,并对不同产地穿心莲叶中上述两成分进行了含量比较。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HP1100 高效液相色谱仪,HP DAD-G1315A 检测器,HP G1316 柱温箱,HP G1322A 真空在线脱气机,色谱工作站(HPCHEMSTATION Version 6.0),电子天平(Sartorius BP110s,0.0001g)

1.2 试剂 穿心莲叶产地及收集年份详见表1。穿心莲内酯(批号为0797-9803)、脱水穿心莲内酯(批号为0854-9902)对照品购自中国药品生物制品检定所。液相测定用甲醇为色谱纯(Merck),水为去离子透析水(Minipore 纯水器);

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Merck-Lichrospher RP-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(60:40);检测波长:226 nm(用于检测穿心莲内酯),254 nm(用于检测脱水穿心莲内酯);流速:0.8 ml/min;柱温:35℃。理论塔板数按穿心莲内酯峰、脱水穿心莲内酯峰计算,分别不低于6 000和9 000。保留时间为:脱水穿心莲内酯4.8min,穿心莲内酯10.1min,样品峰分离度(R)大于1.5。

2.2 色谱峰纯度检测 应用 DAD 检测器对样品中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯进行峰纯度分析。纯度系数分别为穿心莲内酯99.9%、脱水穿心莲内酯99.5%。

2.3 色谱峰光谱一致性比较 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯对照品色谱峰与样品中的相应色谱峰在190~400 nm 进行光谱比较,分别在226、254 nm 波长处有最大吸收,表明样品色谱峰与对照品峰一致。

2.4 标准曲线的绘制 精密称取穿心莲内酯对照品5.0 mg,脱水穿心莲内酯4.8 mg,用甲醇溶解,制成穿心莲内酯0.05 μg/μl,脱水穿心莲内酯0.048 μg/μl 的对照品溶液。分别吸取对照品溶液1、5、10、15、20、25、30 μl,进样。按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标,计算回归方程。穿心莲内酯: $y = 2\,366.08x - 4.906\,05$, $r = 0.999\,9$,线性范围0.050~1.500 μg;脱水穿心莲内酯: $y = 2\,257.94x - 7.050\,28$, $r = 0.999\,9$,线性范围:0.048~1.440 μg。

2.5 供试样品的制备 精密称取生药粉末0.25 g(40目,置干燥器中干燥24 h以上),用甲醇50ml 超声提取45min,提取液用0.2 μm 微孔滤膜过滤后,即得样品,进样5 μl,按上述色谱条件进行分析。用上述色谱条件及处理方法得到

的样品色谱,分离度良好。

2.6 精密度试验 同一样品,相同体积,重复进样5次,穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯峰面积积分值的 RSD 分别为0.31%、0.24%。

2.7 重现性试验 同一批穿心莲叶药材,按样品制备方法平行制备6份,同法测得穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯平均含量分别为5.1433%、0.9423%,RSD 分别为1.38%、1.33%。

2.8 稳定性试验 同一样品,相同体积,分别在0、0.5、1、2、3、4 h 时进样,依法测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯含量,RSD 分别为0.32%、0.22%,表明样品在4 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 分别称取已知含量的穿心莲叶0.1 g,定量加入穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯对照品,余同“1.2.5 样品测定”项下,制备并测定,计算回收率,结果为穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯回收率平均值分别为100.9%、98.2%,RSD 分别为3.2%、3.4%($n = 6$)。

3.10 样品含量测定 见表1。

表1 穿心莲叶药材产地、收集年份及含量测定结果

序号	产地及年份	穿心莲内酯含量 (%)	脱水穿心莲内酯含量 (%)
1	饶平(2003年)	2.7606	0.9174
2	饶平(2004年)	2.7541	0.2186
3	湛江(2005年)	5.039	0.889
4	花都(2004年)	1.7892	0.9945
5	安徽(2003年)	1.5915	0.1478
6	化州(2004年)	0.4602	0.3299
7	临桂(2005年)	1.159	0.4362
8	梧州(2005年)	1.2314	0.5214
9	苍梧(2005年)	1.6242	0.8562
10	防城(2005年)	2.2673	0.4785

3 讨论

(1)所选的穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯为2005版药典中对穿心莲药材及其制剂进行含量测定的指标成分。研究表明,脱水穿心莲内酯因其结构除具有五元内酯环环内双键外,还具有环外双键,因而药理活性最为显著,所以一向作为穿心莲的质量标准评价指标为药典所采用。有研究认为脱水穿心莲内酯和脱氧穿心莲内酯(Deoxyandrographolide,穿心莲甲素)虽然在 HPLC 或 TLC 中较难分离,但脱水穿心莲内酯在250~260 nm 有最大吸收,而相反脱氧穿心莲内酯则在此范围内无吸收,因此可以利用其紫外最大吸收波长的差别,消除两化合物之间的干扰,测定脱水穿心莲内酯的含量。

(2)曾分别以甲醇(95%)、乙醇、无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿及甲醇与乙酸乙酯、甲醇与氯仿的混合溶剂为溶媒和分别以索氏提取、回流提取和超声提取等提取方法进行考察,并分别比较超声提取20、30、45 min 时的所测得的样品含量,结果表明,以甲醇为溶媒超声提取45 min 提取完全。本实验方法简单,重复性和稳定性好,色谱峰分离度良好,能有效地控制穿心莲药材的质量。

(收稿日期:2007-06-28)