

HPLC 同时测定穿心莲药材及其制剂中的 6 种内酯类成分

林朝展, 邓贵华, 祝晨陈*

(广州中医药大学中药学院 广中尖峰天然产物共建实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 采用 HPLC 法同时测定穿心莲药材及其制剂中 6 种内酯类成分的含量。方法 采用 Kromasil RP - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 水, 采用二元梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 226 nm, 柱温 25 °C。结果 穿心莲内酯、异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和穿心莲宁的平均加样回收率分别为 100.5%、100.7%、99.3%、100.8%、100.9%、101.3%; 线性范围分别为 1.68 ~ 67.20 μg ($r=0.9970$)、0.40 ~ 16.60 μg ($r=0.9967$)、1.08 ~ 43.20 μg ($r=0.9964$)、1.08 ~ 43.20 μg ($r=0.9969$)、1.90 ~ 76.00 μg ($r=0.9965$)、0.31 ~ 12.40 μg ($r=0.9972$) ($n=6$)。结论 所建方法简便可行、重复性良好, 可用于穿心莲药材及含穿心莲制剂的质量监控。

关键词: 反相高效液相色谱; 穿心莲内酯类化合物; 穿心莲; 穿心莲片; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2011)01 - 0067 - 04

Simultaneous determination of six lactones in *Andrographis paniculata* materials and related preparations

LIN Chao - zhan, DENG Gui - hua, ZHU Chen - chen*

(College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhong Jianfeng Union Research Lab. for Natural Products, Guangzhou, Guangdong, 510006 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop an RP - HPLC method for simultaneous determination of andrographolide, dehydroandrographolide, deoxyandrographolide, neoandrographolide, ninandrographolide, homoandrographolide in *Andrographis paniculata* Nees materials and related preparations. **METHODS** The samples were separated on a Kromasil RP - C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the gradient elution of acetonitrile - water at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The wavelength was at 226 nm. The column temperature was 25 °C. **RESULTS** The standard calibration curves of andrographolide, homoandrographolide, neoandrographolide, deoxyandrographolide, dehydroandrographolide and ninandrographolide were linear in the range of 1.68 - 67.20 μg ($r=0.9970$), 0.40 - 16.60 μg ($r=0.9967$), 1.08 - 43.20 μg ($r=0.9964$), 1.08 - 43.20 μg ($r=0.9969$), 1.90 - 76.00 μg ($r=0.9965$), 0.31 - 12.40 μg ($r=0.9972$), respectively. The average recoveries of the method were 100.5%, 100.7%, 99.3%, 100.8%, 100.9%, 101.3%, respectively. **CONCLUSION** The method was successfully applied to determine the six lactones in *Andrographis paniculata* collected in different places. It is helpful to control the quality and technical improvement of *Andrographis paniculata* and its related preparations.

Key words: RP - HPLC; Diterpenoid lactones; *Herba Andrographis*; Chuanxinlian tablets; Assay

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2011)01 - 0067 - 04

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、消肿等功效, 常用于治疗感冒发热、咽喉肿痛等症^[1]。二萜内酯类是穿心莲药材的主要有效成分^[2], 多以穿心莲药材及其制剂中该类成分含量较大的穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯作为质量控制的指标成分^[3-4]。作者前期研究发现^[5-7]: 由于产地、采收期、贮藏时间与方法不同, 各成分含量差异较大, 且不同的二萜内酯类化合物具有不同的治疗作用^[8-9]。为确保药材应用的安全有效, 并全面控制质量, 首次采用 HPLC 同时检测了不同产地的穿心莲药材及其制剂中的穿心莲内酯、

脱水穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯、异穿心莲内酯和穿心莲宁含量。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

HP1100 Series 高效液相色谱仪系统(美国安捷伦)。穿心莲内酯、异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、穿心莲宁(自制, 经光谱学鉴定及色谱法检测, 纯度 > 98%); 穿心莲样品(鉴定为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* Burm. f. Nees.), 药材来源见表 1; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。

基金项目: 国家中医药管理局重大科技专项(国中医药科 2001ZDZX005); 广东省国际合作项目(2008A050200005)

作者简介: 林朝展(1979—), 男, 博士, 讲师, 主要从事中药活性成分分析及质量评价的工作。

* 通信作者(Correspondent author), Email: zhuchenchen@vip.sina.com

表1 穿心莲药材及穿心莲制剂的测试样品

Table 1 Samples of *Herba Andrographis* and its preparations

| No. | Collecting place or name | Plant part | Collecting time |
|-----|--|------------|----------------------------|
| 1 | Anhui <i>Andrographis</i> GAP base | stem, leaf | 2009.09 |
| 2 | Qingyuan <i>Andrographis</i> GAP base | stem, leaf | 2008.09 |
| 3 | Raoping <i>Andrographis</i> GAP base | stem, leaf | fruit period |
| 4 | Raoping <i>Andrographis</i> GAP base | stem, leaf | flowering period |
| 5 | Raoping <i>Andrographis</i> GAP base | stem, leaf | fruit and flowering period |
| 6 | Zhanjiang <i>Andrographis</i> GAP base | stem, leaf | 2008.09 |
| 7 | Zhanjiang <i>Andrographis</i> GAP base | pod | 2008.09 |
| 8 | Zhanjiang <i>Andrographis</i> GAP base | root | 2008.09 |
| 9 | Zhanjiang <i>Andrographis</i> GAP base | stem | 2008.09 |
| 10 | Zhanjiang <i>Andrographis</i> GAP base | leaf | 2008.09 |
| 11 | Guangzhou Er Tiantang drugstore | stem, leaf | 2008.08 |
| 12 | Guangzhou Ji Xiang drugstore | stem, leaf | 2007.08 |
| 13 | Guangzhou Xing Yuanchun drugstore | stem, leaf | 2007.08 |
| 14 | Chuanxinlian tablet | unknown | E6A002 |
| 15 | Fufang Chuanxinlian tablet | unknown | A6D009 |
| 16 | Jiajin Chuanxinlian tablet | unknown | 060904 |

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱用 Kromasil RP-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈(A)-水(B)系统梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0~10 min, A相为30%; 10~20 min, A相升至40%; 20~23 min, A相维持在40%; 23~40 min, A相升至50%; 40~70 min, A相升至65%, 流速1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为226 nm; 进样量为10 μL, 柱温25℃。在此色谱条件下, 对照品溶液与样品溶液的色谱图见图1。

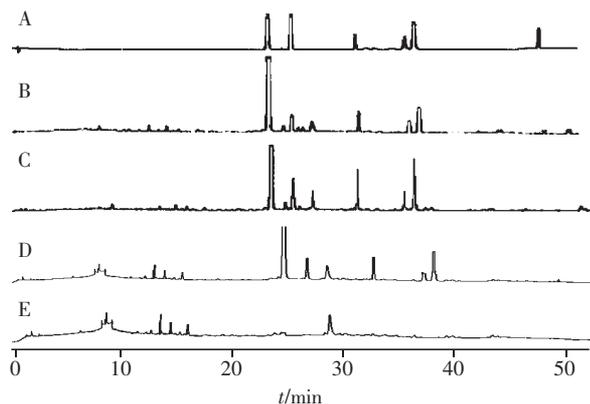


图1 对照品(A)、安徽穿心莲药材(B)、穿心莲药材(C, 不含穿心莲宁)、加劲穿心莲片(D)和阴性对照(E)的色谱图

Fig 1 Chromatograms of control solution (A), *andrographis paniculata* solution from Anhui province (B), *andrographis paniculata* solution without ninandrog-rapholide (C), Jiajin Chuanxinlian tablets solution (D) and negative sample solution (E)

1.2.2 溶液的制备 精密称取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲宁和异穿心莲内酯对照品适量, 加甲醇溶解并定容至10 mL, 分别制成1.68、1.90、1.08、1.08、0.31、

0.40 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。精密称取0.5 g穿心莲药材干燥粉末, 加50 mL甲醇, 索氏提取至馏出液为无色(约3.5 h), 提取液水浴蒸干, 残渣以甲醇溶解并定容至10 mL, 精密吸取上述药液1.0 mL, 加甲醇定容至2.0 mL, 以0.45 μm微孔滤膜过滤, 即得穿心莲药材溶液。取10粒药片, 除去糖衣或薄膜, 于研钵中研细, 同法制得穿心莲制剂溶液。按照穿心莲片制备工艺和前法操作, 制备穿心莲内酯、新穿心莲内酯、异穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和穿心莲宁的阴性样品溶液。

1.2.3 标准曲线的制备及线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液1、5、10、15、20、25、30、35、40 μL, 分别按“1.2.1”项下色谱条件测定, 以峰面积积分值对对照品进样量(μg)进行线性回归, 求得回归方程(表2)。

表2 直线回归方程与线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges

| Components | Regression equations | Linear range/μg | r |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------|--------|
| Aandrographolide | $Y = 2.26 \times 10^3 X - 53.01$ | 1.68 - 67.20 | 0.9970 |
| Homoandrographolide | $Y = 1.75 \times 10^3 X - 20.74$ | 0.40 - 16.60 | 0.9967 |
| Neoandrographolide | $Y = 497.5X - 7.16$ | 1.08 - 43.20 | 0.9964 |
| Deoxyandrographolide | $Y = 735.1X - 11.02$ | 1.08 - 43.20 | 0.9969 |
| Ddehydroandrographolide | $Y = 1.428 \times 10^3 X - 22.28$ | 1.90 - 76.00 | 0.9965 |
| Ninandrographolide | $Y = 729.1X + 13.69$ | 0.31 - 12.40 | 0.9972 |

1.2.4 稳定性试验 精密吸取10 μL样品溶液, 分别于0、1、2、4、8、12、24、48 h时进样测定。穿心莲内酯、异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯与穿心莲宁的RSD为0.90%~1.20%, 表明供试品溶液在48 h内均稳定。

1.2.5 精密度试验 精密吸取10 μL混合对照品溶液, 重复进样5次。穿心莲内酯、异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯与穿心莲宁的RSD为0.60%~0.95%, 表明仪器精密度良好。

1.2.6 重复性试验 取同一批样品5份, 按“1.2.2”“1.2.1”项方法制备供试品溶液并测定6种化合物的含量。6种内酯含量的RSD为2.17%~2.85%, 表明方法重复性良好。

1.2.7 加样回收率试验 称取已知含量的同一批穿心莲药材(安徽种植基地)粉末6份, 分别精密加入各对照品贮备液稀释制得的对照品液适量后, 按“1.2.2”项方法制备供试品溶液, 测定含量(表3)。

1.2.8 样品的测定 分别精密称定穿心莲药材、粉末(60℃干燥, 4号筛)0.5 g, 按“1.2.2”项方法制备供试品溶液。分别精密吸取10 μL, 按“1.2.1”项色谱条件测定6种内酯类化合物的含量(表4)。

表 3 加样回收率试验的结果($n=6$)Table 3 Results of recovery test($n=6$)

| Components | Content /mg | Added /mg | Detected /mg | Recovery /% | \bar{X} /% | RSD /% |
|------------------------|-------------|-----------|--------------|-------------|--------------|--------|
| Andrographolide | 1.810 | 1.760 | 3.530 | 97.7 | 100.5 | 2.3 |
| | 1.820 | 1.760 | 3.560 | 98.9 | | |
| | 1.813 | 1.760 | 3.583 | 100.7 | | |
| | 1.800 | 1.760 | 3.601 | 102.3 | | |
| | 1.791 | 1.760 | 3.612 | 103.2 | | |
| Homoandrographolide | 0.490 | 0.480 | 0.983 | 102.7 | 100.7 | 2.9 |
| | 0.493 | 0.480 | 0.982 | 101.9 | | |
| | 0.489 | 0.480 | 0.950 | 96.0 | | |
| | 0.487 | 0.480 | 0.966 | 99.8 | | |
| | 0.485 | 0.480 | 0.981 | 103.0 | | |
| Neoandrographolide | 0.430 | 0.420 | 0.841 | 97.7 | 99.3 | 2.1 |
| | 0.433 | 0.420 | 0.842 | 97.4 | | |
| | 0.430 | 0.420 | 0.860 | 102.4 | | |
| | 0.428 | 0.420 | 0.842 | 98.6 | | |
| | 0.427 | 0.420 | 0.848 | 100.3 | | |
| Deoxyandrographolide | 0.575 | 0.560 | 1.142 | 101.2 | 100.8 | 3.0 |
| | 0.579 | 0.560 | 1.123 | 96.6 | | |
| | 0.574 | 0.560 | 1.149 | 102.7 | | |
| | 0.560 | 0.560 | 1.114 | 98.9 | | |
| | 0.560 | 0.560 | 1.145 | 104.5 | | |
| Dehydroandrographolide | 0.248 | 0.240 | 0.479 | 96.2 | 100.9 | 3.0 |
| | 0.250 | 0.240 | 0.500 | 104.3 | | |
| | 0.248 | 0.240 | 0.490 | 100.9 | | |
| | 0.247 | 0.240 | 0.483 | 102.8 | | |
| | 0.246 | 0.240 | 0.476 | 100.9 | | |
| Ninandrographolide | 0.144 | 0.140 | 0.283 | 99.6 | 101.3 | 2.7 |
| | 0.144 | 0.140 | 0.292 | 105.3 | | |
| | 0.143 | 0.140 | 0.281 | 98.2 | | |
| | 0.143 | 0.140 | 0.284 | 100.8 | | |
| | 0.142 | 0.140 | 0.286 | 102.6 | | |

表 4 穿心莲药材中 6 种内酯类化合物含量测定结果($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)Table 4 Results of content determination of six kinds of lactone in samples of *Andrographis paniculata* Burm. f. Nees($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

| No. | Andrographolide | Homoandrographolide | Neoandrographolide | Deoxyandrographolide | Dehydroandrographolide | Ninandrographolide | Amount |
|-----|-----------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------|--------------------|--------|
| 1 | 7.02 | 1.90 | 1.67 | 2.23 | 0.96 | 0.55 | 14.33 |
| 2 | 8.36 | 0.99 | 4.13 | 1.47 | 8.51 | - | 23.46 |
| 3 | 1.24 | 0.84 | 2.91 | 1.89 | 8.12 | - | 15.00 |
| 4 | 4.10 | 1.89 | 4.90 | 5.85 | 14.70 | - | 31.44 |
| 5 | 2.66 | 1.28 | 3.78 | 3.55 | 11.57 | - | 22.84 |
| 6 | 6.08 | 1.04 | 2.56 | 2.45 | 8.46 | - | 20.59 |
| 7 | 4.17 | 0.52 | 1.59 | 0.81 | 4.52 | - | 11.61 |
| 8 | 0.79 | 0.42 | - | 0.31 | 1.26 | - | 2.78 |
| 10 | 12.70 | 1.16 | 4.06 | 7.66 | 11.77 | - | 37.35 |
| 11 | 1.60 | 0.28 | 0.66 | 0.40 | 2.10 | - | 5.04 |
| 12 | 2.68 | 0.32 | 2.01 | 0.99 | 3.06 | - | 9.06 |
| 13 | 2.58 | 0.23 | 1.28 | 0.70 | 3.16 | - | 7.95 |
| 14 | 0.16 | 0.05 | 0.31 | 0.24 | 0.87 | - | 1.63 |
| 15 | 0.28 | - | 0.20 | 0.12 | 0.22 | 0.06 | 0.88 |
| 16 | 2.75 | 0.16 | 0.64 | 0.29 | 1.16 | 0.09 | 5.09 |

2 讨论

不同产地穿心莲中 6 种内酯类成分的含量都存在较大差别,安徽、清远、饶平、湛江种植基地的穿心莲药材中(除根与茎外)所含总内酯量均高于市售商品药材,其中,以饶平种植基地(开花期)的含量最高。2010 年版《中国药典》中规定穿心莲内酯与

脱水穿心莲内酯的总量不得少于 0.8%。实验中收集的 13 批穿心莲药材中,安徽、饶平、清远、湛江(除根与茎)种植基地的穿心莲药材符合要求,药店售卖的药材不符合要求。随贮藏时间延长,穿心莲内酯的含量下降 50% 以上,而脱水穿心莲内酯却提高了 3 倍以上^[8]。但除了安徽种植基地以外,其余产地的穿心莲药材中脱水穿心莲内酯高于穿心莲内

酯的含量,且均未能检出穿心莲宁。

穿心莲药材及其制剂的质量控制和评价多以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量为指标,未将异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯与穿心莲宁纳入质量控制标准。文中所测 13 批穿心莲药材中异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和穿心莲宁的含量分别为 0.23 ~ 1.90、0.66 ~ 4.90、0.31 ~ 7.66、ND ~ 0.55 mg • g⁻¹,表明不同产地穿心莲药材中四者含量变化较大,特别是穿心莲宁,只有在新鲜采集的穿心莲药材中才能测到,因此,仅用穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯来控制 and 评价穿心莲药材及其制剂的质量,难以全面反映其优劣。建议将异穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲宁和去氧穿心莲内酯含量的测定也纳入质量标准。

采于湛江的穿心莲不同部位中 6 种内酯类化合物在叶中含量最高,其次为穿心莲药材(茎、叶自然混合)、荚果、茎,根中检测不出内酯类成分。由此验证了传统上以穿心莲地上部位作为主要药用部位的科学性,并且建议以穿心莲叶为主要入药部位。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:

化学工业出版社,2010: 251 - 252.

- [2] 王林丽. 穿心莲及其制剂的药理作用及其临床应用研究[J]. 中药材,2003,26(2): 135 - 137.
- [3] Nanthanit P, Nuchanart R, Sanit T, et al. Determination and variation of three active diterpenoids in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees [J]. *Phytochem Ana*, 2004, (15): 365 - 371.
- [4] Zhao YF, Luo XP, Zhai ZD, et al. Simultaneous determination of andrographolide and dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* and Chinese medicinal by microemulsion electrokinetic chromatography [J]. *J Pharm Biome Ana*, 2006, (40): 157 - 161.
- [5] 毋福海, 李光喜, 梁汉明, 等. HPLC 测定复方穿心莲片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量 [J]. 华西药学期刊, 2004, 19(2): 133 - 135.
- [6] 莫建霞, 祝晨霞, 张晓君, 等. 不同生长期穿心莲中穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量的动态研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(2): 134 - 136.
- [7] 祝晨霞, 莫建霞. 规范化种植穿心莲药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药学期刊, 2004, 39(10): 373 - 379.
- [8] Piengpen T, Nuchanart R, Nanthanit P, et al. Inhibitory effect of *Andrographis paniculata* extract and its active diterpenoids on platelet aggregation [J]. *Euro J Pharma*, 2006, (553): 39 - 45.
- [9] 王琳, 杨静伟, 宋凤平. 穿心莲的药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2003, 20(6): 27 - 29.

收稿日期: 2010 - 04 - 03

藏药二十五味马宝丸中药材的鉴别与丁香酚的测定

王冬冬¹, 阿萍², 王曙^{1*}, 叶本贵¹, 次旦多吉², 潘多²

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 西藏自治区药检所, 西藏 拉萨 810000)

摘要: 目的 建立藏药二十五味马宝丸中药材的鉴别和丁香酚含量测定的方法。方法 采用薄层色谱法和 HPLC 法。结果 薄层色谱法鉴别了二十五味马宝丸中的丁香、木香、冬葵等药材和没食子酸, 并测定了丁香酚的含量。结论 所建方法简便、准确, 可用于二十五味马宝丸的质量控制。

关键词: 藏药; 二十五味马宝丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 丁香酚

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2011) 01 - 0070 - 03

Identification of medicinal materials and determination of eugenol in Ershiwuwei Mabaowan pills

WANG Dong - dong¹, A Ping², WANG Shu^{1*}, YE Ben - gui¹, CIDAN Duo - ji², PAN Duo²

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China; 2. Institute for Drug Control of Tibet, Lasa, Tibet, 81000 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish a TLC identification and an HPLC determination methods for Ershiwuwei Mabaowan pills. **METHODS** A TLC method and an HPLC method were applied. **RESULTS** *Flos caryophyllata*, *Radix Aucklandiae*, *Malva crispa* Linn. and gallic acid were identified by TLC. The content of eugenol was detected by HPLC. **CONCLUSION** These methods are sim-

基金项目: 十一五国家科技支撑计划资助项目(项目编号: 2007BAI31B02)

作者简介: 王冬冬, 男, 正攻读生药学专业的硕士学位。Email: wddong1988@163.com

* 通信作者(Correspondent author), Email: suwang571@126.com