

溶剂浮选-HPLC 法测定穿心莲片中脱水穿心莲内酯

唐睿, 张红武, 严志红, 王坤锐, 赵秋明, 温金莲*

广东药学院药科学院, 广东 广州 510006

摘要:目的 建立穿心莲片中脱水穿心莲内酯的溶剂浮选-HPLC 测定方法。方法 以脱水穿心莲内酯浮选效率为指标, 单因素考察样品溶液 pH、相比、氮气体积流量、浮选时间等因素对浮选效果的影响, 在最优条件下对穿心莲片中的脱水穿心莲内酯进行测定, 并与中性氧化铝柱色谱法进行对比。结果 最佳浮选条件: 浮选溶剂为醋酸乙酯, 溶液 pH 7, 浮选时间 20 min, 气体体积流量 100 mL/min, 相比 10:8。浮选法测定的平均回收率为 98.1%, RSD 为 3.2%, 与柱色谱法测定结果未见显著差异。结论 溶剂浮选处理样品耗时短、测定结果准确。所建立的方法可以快速分离、准确测定穿心莲片中的脱水穿心莲内酯。

关键词: 溶剂浮选; 穿心莲片; 脱水穿心莲内酯; 高效液相色谱; 中性氧化铝柱色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)09-1747-04

Determination of dehydroandrographolide in Chuanxinlian Tablets by solvent flotation-HPLC

TANG Rui, ZHANG Hong-wu, YAN Zhi-hong, WANG Kun-rui, ZHAO Qiu-ming, WEN Jin-lian

College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Key words: solvent flotation; Chuanxinlian Tablets; dehydroandrographolide; HPLC; neutral alumina column chromatography

穿心莲片为穿心莲药材经过加工制成的片剂, 具有清热解毒、凉血消肿等功效, 为常用中成药。主要活性成分为脱水穿心莲内酯, 研究表明其具有抗菌消炎, 促进人外围血液淋巴细胞增殖, 调节免疫力等功效, 用量增大时并未显示出细胞毒性^[1], 脱水穿心莲内酯琥珀酸单酯还体现出一定的抗病毒作用^[2]。此外脱水穿心莲内酯也是穿心莲制剂质量控制的指标之一, 因此研究制剂中脱水穿心莲内酯的分离测定方法具有重要意义。已报道的穿心莲有效成分测定方法主要有薄层扫描法^[3]、胶束电动色谱法^[4]、HPLC 法^[5-6]等, 其中 HPLC 法用于定量较为多见。由于制剂含有对色谱柱有污染的成分, 常用中性氧化铝柱色谱除去杂质^[7], 但柱色谱存在处理速度慢等缺点。溶剂浮选法利用待分离组分在气泡表面的吸附作用使其从水相进入上层有机相从而达到分离富集的目的, 近年开始用于天然产物有效成分分离, 取得了良好的效果^[8-9]。本实验利用脱水

穿心莲内酯具有的疏水亲气特性进行溶剂浮选, 探讨了溶剂浮选分离的最佳条件, 并以溶剂浮选-HPLC 法测定穿心莲片中脱水穿心莲内酯的量, 结果表明此方法简便快捷, 测定结果准确可靠, 值得推广。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津公司)由 LC—10ATvp 高压泵、CTO—10ASvp 柱箱、SPD—10Avp 紫外检测器和 LC Solution V1.03 工作站组成, AUW220D 电子天平(日本岛津公司), pH5—25 数显酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司), TU1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), 浮选柱(自制, 4 cm 直径, G5 烧结板)。

脱水穿心莲内酯(批号 110854-200306)对照品购于中国药品生物制品检定所, 甲醇为色谱纯, 氮气(质量分数为 99.5%, 广州气体厂有限公司), 高效液相色谱用水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073045)

作者简介: 唐睿(1974—), 男, 讲师, 研究方向为天然产物分离。Tel: (020)39352135 13580441839 E-mail: dripik@163.com

*通讯作者 温金莲 Tel: 13424125709 E-mail: Jinlianwen@126.com

析纯。穿心莲片(批号 G7A001、I7A001、F8A001, 广州白云山和记黄埔中药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为甲醇(A)-水(B);

体积流量 0.6 mL/min; 梯度洗脱: 0~10 min: 47% A, 10~20 min: 47%~65% A, 20 min 后: 65% A; 检测波长 0~18 min: 225 nm, 18.5 min 后 254 nm; 柱温 30 °C; 定量环体积 20 μL。在该色谱条件下脱水穿心内酯保留时间约 27.2 min, 理论塔板数不少于 10 000。色谱图见图 1。

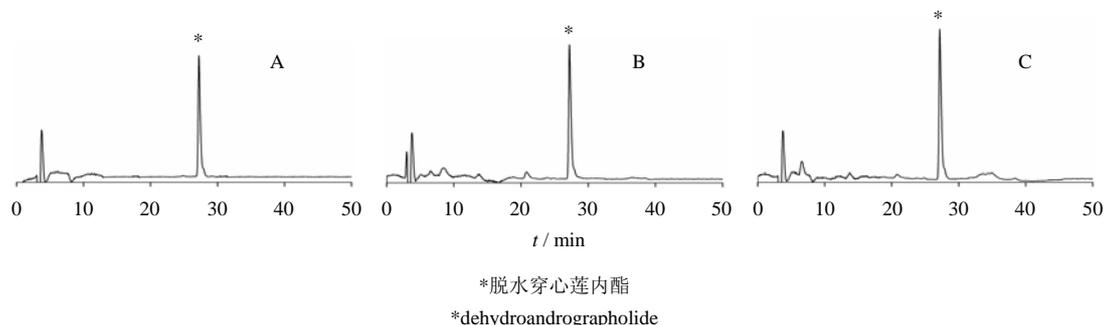


图 1 对照品(A)、柱色谱法处理后样品(B)、浮选法处理后样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample processed by column chromatography (B), and sample processed by solvent flotation (C)

2.2 对照品储备液的制备

精密称取脱水穿心莲内酯对照品 19.58 mg 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 即得 783.2 μg/mL 的脱水穿心莲内酯对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取穿心莲片 20 片, 除去包衣, 研细, 取内容物约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 精密称定, 浸泡 1 h, 超声 30 min, 以 70% 乙醇补足减失的质量, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 5 mL 定容至 100 mL, 以溶剂浮选或柱色谱处理, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.4 溶剂浮选处理

2.4.1 溶剂浮选步骤 蒸馏水 50 mL 转入浮选柱中, 加入无水乙醇 3 mL, 通入氮气, 再精密移入 1 mL 的样品溶液, 沿壁缓慢加入醋酸乙酯 40 mL, 调节气体体积流量为 100 mL/min, 浮选 20 min 后将有机相取出, 至旋转蒸发仪减压蒸干, 残渣以 50% 乙醇定容于 10 mL 量瓶, 待测。

2.4.2 浮选效率的紫外-可见分光光度法测定 扫描 200~400 nm 波长脱水穿心莲内酯的 UV 谱图, 可知脱水穿心莲内酯最大吸收波长为 253 nm。溶剂浮选条件考察时, 对照品浮选后有机相均取出旋干后定容至 10 mL, 因此直接以该处溶液的吸光度衡量浮选效率。

2.4.3 溶剂浮选条件的考察 对浮选溶剂、溶液 pH、相比、气体体积流量、浮选时间以及乙醇和电解质加入量等影响浮选效率的因素进行考察。按“2.4.1”项方法, 在水相中加入脱水穿心莲内酯对照品溶液进行浮选-紫外测定, 以有机相旋干定容至 10 mL 后在 253 nm 处的吸光度值为指标, 探讨各因素对脱水穿心莲内酯浮选效率的影响。

浮选溶剂: 分别以石油醚、乙醚、醋酸乙酯和正丁醇为浮选溶剂, 结果表明采用醋酸乙酯的效果最好, 正丁醇次之。故选择有机层均为醋酸乙酯。

溶液 pH 值: 当溶液 pH 值为 1、3、5、6、7、8、9、11 时, 吸光度值分别为 0.310、0.402、0.444、0.501、0.505、0.381、0.342、0.304, 表明脱水穿心莲内酯在近中性条件下 (pH 6~7) 浮选效率较高。当溶液 pH 值为 7 时, 浮选效率最高, 因此溶液的 pH 值选定为 7。

浮选时间: 当浮选时间为 5、10、15、20、30 min 时, 吸光度值分别为 0.310、0.422、0.497、0.503、0.496, 表明当浮选时间为 15 min 后, 浮选即已达到平衡, 若继续增加浮选时间, 浮选效率增加不大。因此浮选时间选定为 20 min。

气体体积流量: 当气体体积流量为 20、40、60、80、100、120、140、160 mL/min 时, 吸光度值分别为 0.204、0.357、0.370、0.467、0.493、0.398、0.243、0.222, 表明浮选效率在一定范围内随氮气体

积流量的增加而增大,但两者不成线性关系,体积流量过高浮选效率反而下降。氮气体积流量在 80~120 mL/min 浮选效率均较高,故选用体积流量为 100 mL/min。

相比:水相体积与有机相体积之比定义为相比,当相比为 10:8、10:6、10:4、10:3、10:2 时,吸光度值分别为 0.490、0.454、0.351、0.331、0.189,表明浮选效率随着相比的增加而减小。故相比选择为 10:8。

乙醇加入量:乙醇加入量为 0%、2%、4%、6%、8% 时,吸光度值分别为 0.484、0.487、0.499、0.504、0.432,表明乙醇加入量为 6% 时脱水穿心莲内酯的浮选效率有少许增加。故选择乙醇加入量为 6%。

电解质加入量:电解质加入量为 0%、2%、6%、10%、14% 时,吸光度值分别为 0.493、0.501、0.496、0.471、0.479,表明电解质(仅 NaCl)的加入对脱水穿心莲内酯的浮选无明显的促进作用。

2.5 柱色谱分离

样品溶液 1 mL 置中性氧化铝柱(200~300 目,5 g,内径 1.5 cm)上,以甲醇 20 mL 洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发至干,残渣以 50% 乙醇定容于 10 mL 量瓶中,测定,结果见表 1。

2.6 线性关系考察

精密移取 4 mL 脱水穿心莲内酯储备液,定容于 50 mL 量瓶,即得脱水穿心莲内酯 62.656 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。逐级稀释后得到脱水穿心莲内酯 31.328、15.664、7.832、3.916、1.958、0.979 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液,分别进样测定,记录色谱峰,以峰面积积分值对质量浓度进行线性回归,得回归方程:脱水穿心莲内酯 $Y=124\ 37+1.099\ 89\times 10^8 X$, $r=0.999\ 84$;表明脱水穿心莲内酯在 0.979~62.656 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验

取脱水穿心莲内酯 1.958 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液重复进样 6 次,计算得脱水穿心莲内酯保留时间的 RSD 为 0.5%,峰面积的 RSD 为 1.1%。

2.8 稳定性试验

取同一批(批号 G7A001)样品,溶剂浮选制备供试品溶液,于 0、2、4、6、8、12、24 h 分别测定,结果脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 为 1.9%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重现性试验

取同一批(批号 G7A001)样品,溶剂浮选分

别平行制备 6 份供试品溶液,结果 6 份样品中脱水穿心莲内酯质量分数的 RSD 为 2.3%。

2.10 加样回收率试验

取同一批(批号 G7A001)样品 6 份,各约 1 g,精密称定,按“2.3”项下以溶剂浮选制备供试品溶液,精密移取 1 mL,精密加入对照品溶液(取脱水穿心莲内酯储备液 0.60 mL 定容于 10 mL 量瓶) 1 mL,制备供试品溶液,测定,计算加样回收率,结果加样回收率为 98.1%,RSD 为 3.2%。

2.11 样品测定

穿心莲片经过浮选或柱色谱处理后 HPLC 测定,以保留时间定性,峰面积外标法定量。结果见表 1。

表 1 溶剂浮选-HPLC 与柱色谱-HPLC 测定穿心莲片中脱水穿心莲内酯结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of dehydroandrographolide in Chuanxinlian Tablets by solvent flotation-HPLC and column-HPLC ($n=3$)

批号	溶剂浮选-HPLC		柱色谱-HPLC	
	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%
G7A001*	45.51	2.3	46.23	1.5
I7A001	46.32	2.0	46.54	1.7
F8A001	48.18	2.7	49.02	1.1

*本批样品两种前处理方法均测定 6 次

*Determining this sample for six times by above two methods, respectively

3 讨论

3.1 浮选条件选择

由于脱水穿心莲内酯为二萜类内酯,极性中等,醋酸乙酯的极性与其类似,按照“相似相溶”的原则,对其溶解较好。此外醋酸乙酯的黏度也较低,气泡易于穿过而在有机相上破裂,因此表现出醋酸乙酯浮选效果最好。

改变溶液的 pH 值将改变待浮选物质的存在状态。脱水穿心莲内酯在碱性和酸性较强的溶液中均不稳定,开环后的产物极性基团数目增加,水溶性增强不利于浮选,因此表现出在近中性环境中其浮选效率高。即在 pH 6~7 的环境中,浮选效率均较高,考虑到空气中蒸馏水 pH 一般即为 6~7,因此可直接使用蒸馏水无需加入缓冲溶液。

氮气体积流量较低时,产生气泡较少,携带能力有限,因此适当增加气体体积流量有利于浮选效

率增加,但是体积流量过大气泡在溶液中停留时间减少,待浮选物易于从气泡上脱落,此外过高的体积流量使得溶液搅动剧烈,两相界面被破坏,形成类似于液液萃取的分配,使得浮选效率下降。

有机溶剂的用量大,目标物在有机相中的不饱和度也随之增大,从而提高浮选效率。此外发现增加有机相液层高度,在较高的氮气体积流量下也能保持两相界面的相对平稳,利于浮选。

一般浮选效率随浮选时间增加而增加,但浮选达到平衡后继续通气将导致有机溶剂挥发较为严重,同时消耗气体,造成浪费。通过与前期实验对比^[10],发现采用小孔径的烧结板能在较短的时间内达到浮选平衡。

在浮选过程加入少量的乙醇,可以减小气泡的体积,对浮选效率增加有一定的促进作用,但本实验采用 G5 烧结板,气泡体积较小,故加入乙醇后对浮选效率的提高不显著。

3.2 样品测定

实验中发现穿心莲片中穿心莲内酯的量极低,无法准确测定,因此对该片剂只进行了脱水穿心莲内酯的测定方法学考察。本研究同时以柱色谱分离进行样品前处理,对两种前处理方法的样品的测定结果进行的 F 检验和 t 检验表明,溶剂浮选-HPLC 测定穿心莲片中的脱水穿心莲内酯与柱色谱-HPLC 测定无显著差别。柱色谱处理样品时由于氧化铝颗粒小导致洗脱时间约 40 min 以上;而溶剂浮选处理样品溶液的时间仅需 20 min,处理时间明显缩短。溶剂浮选作为前处理方法此前常见于药材中有效成分的分离富集,用于制剂的有效成分分离较少,本

实验采用溶剂浮选作为药剂的前处理方法,耗时少,对待测组分的浮选效率高,精密度良好,方法准确可靠。

参考文献

- [1] Kumar R A, Sridevi K, Kumar N V, *et al.* Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 92(2/3): 291-295.
- [2] Ng T B, Huang B, Fong W P, *et al.* Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors [J]. *Life Sci*, 1997, 61(10): 933-949.
- [3] 莫善列, 思秀玲, 韦松. 薄层扫描法测定喉舒宁片中脱水穿心莲内酯的含量 [J]. *中成药*, 2005, 27(12): 1481-1482.
- [4] Cheung H Y, Cheung C S, Kong C K. Determination of bioactive diterpenoids from *Andrographis paniculata* by micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 930(1/2): 171-176.
- [5] 傅欣彤, 李琰, 祁进, 等. 穿心莲注射液质量标准研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(21): 1829-1831.
- [6] 韩光, 许笑笑, 杨松松. HPLC-ELSD 法测定穿心莲片中穿心莲内酯 [J]. *中草药*, 2005, 36(5): 705-705.
- [7] 蔡松涛, 陈向红, 马琳, 等. 影响穿心莲片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量测定的因素 [J]. *中成药*, 2005, 27(3): 361-362.
- [8] 刘西茜, 董慧茹. 溶剂浮选法分离富集茵陈中总香豆素的研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(5): 689-692.
- [9] 刘西茜, 董慧茹. 溶剂浮选分离富集厚朴中总厚朴酚的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(10): 1217-1220.
- [10] 唐睿, 余英哲, 严志红, 等. 穿心莲内酯的溶剂浮选 [J]. *分析化学*, 2009, 37(4): 593-596.