

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.04.06

HPLC 双波长法测定四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量

石慧慧,刘建晖,熊玥,周杨,汪云花,孙瑶

(江苏省畜产品质量检验测试中心,南京 210036)

[收稿日期] 2023-04-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 04-0043-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立 HPLC 双波长法同时测定四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。采用 XBridge C 18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以甲醇-水(52:48)为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL, 检测波长分别为 225 nm(穿心莲内酯)和 254 nm(脱水穿心莲内酯)。穿心莲内酯浓度在 12.7375 μg · mL⁻¹ ~ 509.5 μg · mL⁻¹ 范围内, 线性良好($r^2 = 0.9996$); 脱水穿心莲内酯浓度在 3.4 μg · mL⁻¹ ~ 136 μg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好($r^2 = 0.9997$)。穿心莲内酯加样回收率平均为 98.8%, RSD 为 1.0%; 脱水穿心莲内酯回收率平均为 99.9%, RSD 为 0.8%。该方法快捷、灵敏、准确、可靠, 可用于四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯 2 个有效成分的同时测定, 为四味穿心莲散的质量控制和评价提供科学依据。

[关键词] HPLC 双波长法; 四味穿心莲散; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯

Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San by HPLC with Dual - wavelength

SHI Hui - hui, LIU Jian - hui, XING Yue, ZHOU Yang, WANG Yun - hua, SUN Yao

(Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products, Nanjing 210036, China)

Abstract: To establish a Dual - wavelength HPLC method for determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San. Xbridge C 18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used with methanol - water (52:48) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and a column temperature 25 °C. The determination wave length of andrographolide was 225 nm while dehydroandrographolide was 254 nm. The linear range was 12.7375 μg · mL⁻¹ to 509.5 μg · mL⁻¹ ($r^2 = 0.9994$) and 3.4 to 136 μg · mL⁻¹ ($r^2 = 0.9995$), and the average recovery was 98.8% and 99.9% with RSD of 1.0% and 0.8%, respectively. The method is rapid, accurate and sensitive, which provides a rapid and accurate technical means for the determination of andrographolide and dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San.

Key words: Dual - wavelength HPLC; Siwei Chuanxinlian San; Andrographolide; Dehydroandrographolide

四味穿心莲散质量标准现收载于《中华人民共和国兽药典》2020 年版二部^[1],由穿心莲、辣蓼、大青叶、葫芦茶四味药材组成。方中穿心莲为君药,大青叶为臣药,四味药材君、臣、佐、使相辅,共奏清热解毒,除湿化滞之功。在质量标准中只采用薄层色谱法对穿心莲和大青叶进行定性分析,不能全面反映该制剂的整体质量水平,缺乏对主要药效成分的定量测定,不利于产品质量的控制和评价。

为进一步优化四味穿心莲散的质量控制标准,选择方中君药穿心莲的活性成分穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯为指标,建立双波长同时测定两者含量的高效液相色谱方法,对四味穿心莲散进行定量检测,为四味穿心莲散质量标准的完善和质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters Arc 高效液相色谱仪配 2998 PDA 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司), ATX224 型十万分之一和 XA105DU 型百万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-300DV 超声波振荡器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药与试剂

1.2.1 试药 穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110797-201609,含量:99.7%);脱水穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110854-201710,含量:99.4%)。

1.2.2 试剂 甲醇为色谱纯(美国 Merck 公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。阴性对照由江苏省兽药饲料质量检验所自制。

2 方法与结果

2.1 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定

2.1.1 色谱条件 XBridge C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-水(55:45)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C。进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取穿心莲内

酯和脱水穿心莲内酯对照品适量,加甲醇分别制成 1 mL 各含 1.019 mg 和 0.272 mg 的对照品储备液,于 4 °C 低温保存。分别精密吸取上述两种储备液 1 mL 和 5 mL,置于 20 mL 量瓶中,得到浓度约为 0.05 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 25 mL,称重,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 分钟,冷却至室温,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按穿心莲 450 g、辣蓼 150 g、大青叶 200 g、葫芦茶 200 g 的处方比例制备缺穿心莲的阴性对照样品,并按“2.2.2”项下方法,制备缺穿心莲的阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 分别精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,记录色谱图。结果显示,供试品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯与相应的对照品色谱峰的保留时间均一致;空白溶剂和阴性对照溶液色谱图中,在穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯出峰处均没有干扰,表明其他成分对二者的测定均不会造成影响,专属性良好。结果见图 1~图 8。

2.4 线性与范围考察 精密量取 2.2.1 项下的对照品储备液适量,置量瓶中,加甲醇定容至刻度,分别配制成穿心莲内酯浓度为 509.5、254.75、127.375、50.95、25.475、12.7375 μg · mL⁻¹,脱水穿心莲内酯浓度为 136、68、34、13.6、6.8、3.4 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液,滤过,精密量取 10 μL,照“2.1.1”项下色谱条件进行测定。以对照品溶液浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),分别绘制标准曲线,得穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯线性方程分别为($n=6$); $Y=21908x-74351, r^2=0.9996$; $Y=13708x-12939, r^2=0.9997$ 。结果表明,穿心莲内酯浓度在 12.7375 μg · mL⁻¹ ~ 509.5 μg · mL⁻¹,脱水穿心莲内酯浓度在 3.4 μg · mL⁻¹ ~ 136 μg · mL⁻¹ 范围内,线性关系良好,结果见表 1。

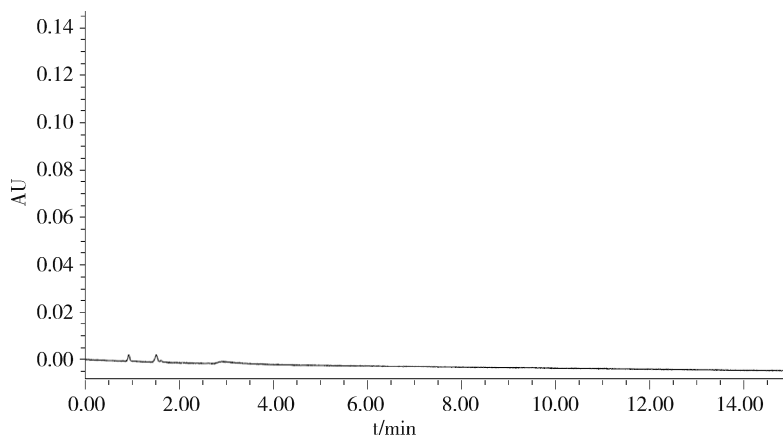


图 1 空白溶剂 225 nm 波长色谱图

Fig 1 225 nm chromatogram of blank solvent

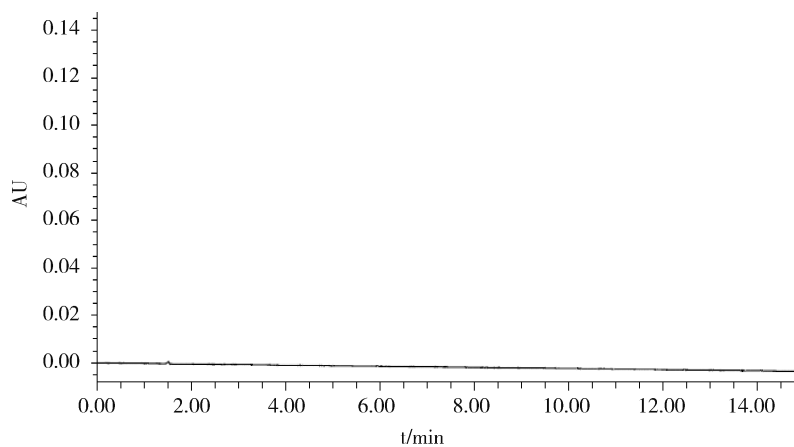
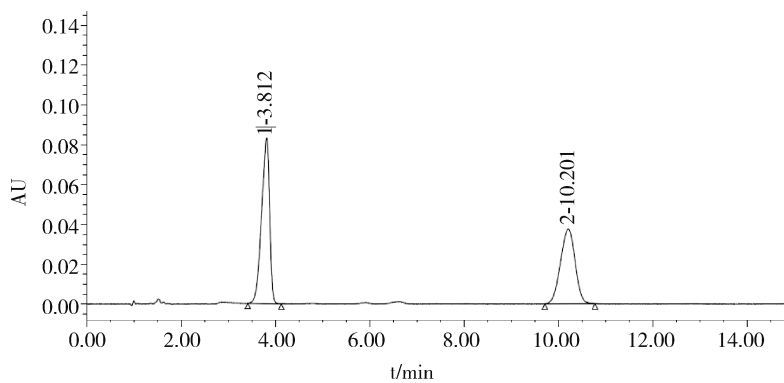


图 2 空白溶剂 254 nm 波长色谱图

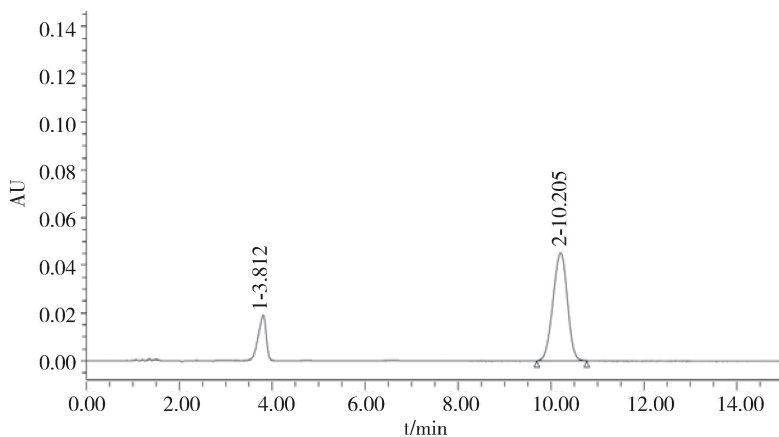
Fig 2 254 nm chromatogram of blank solvent



1. 穿心莲内酯 2. 脱水穿心莲内酯

图 3 混合对照品 225 nm 波长色谱图

Fig 3 225 nm chromatogram of mixed reference



1. 穿心莲内酯 2. 脱水穿心莲内酯

图 4 混合对照品 254 nm 波长色谱图

Fig 4 254 nm chromatogram of mixed reference

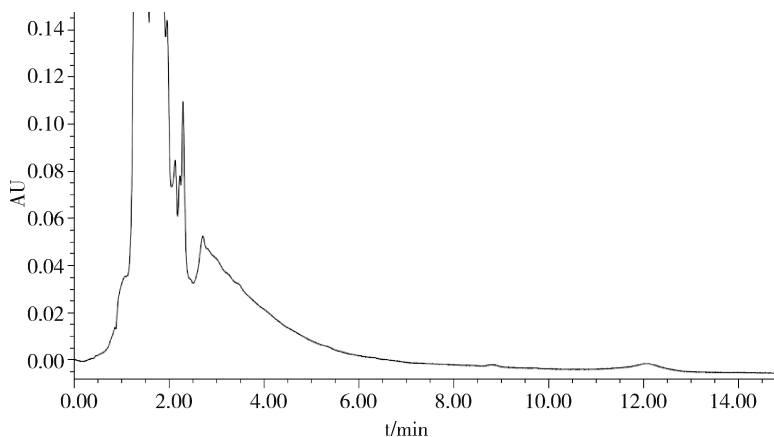


图 5 阴性对照 225 nm 波长色谱图

Fig 5 225 nm chromatogram of negative solution

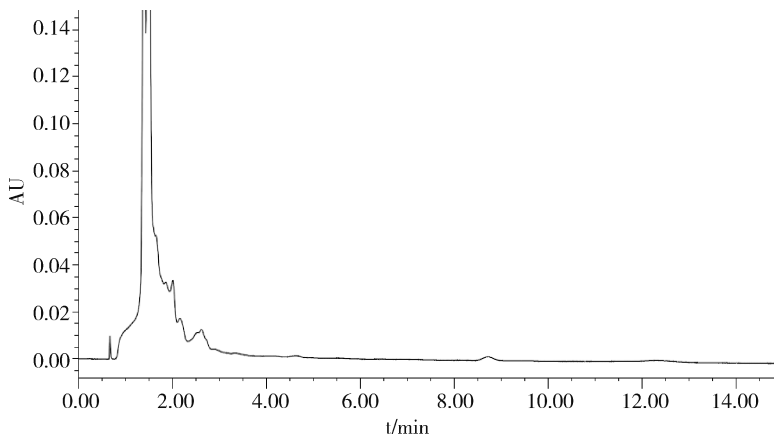
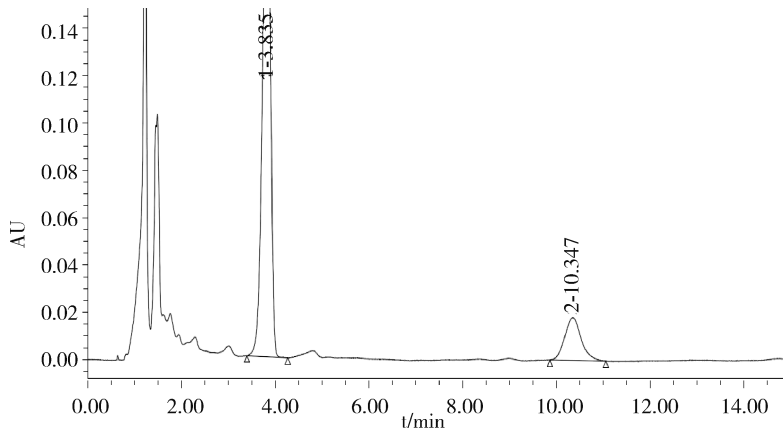


图 6 阴性对照 254 nm 波长色谱图

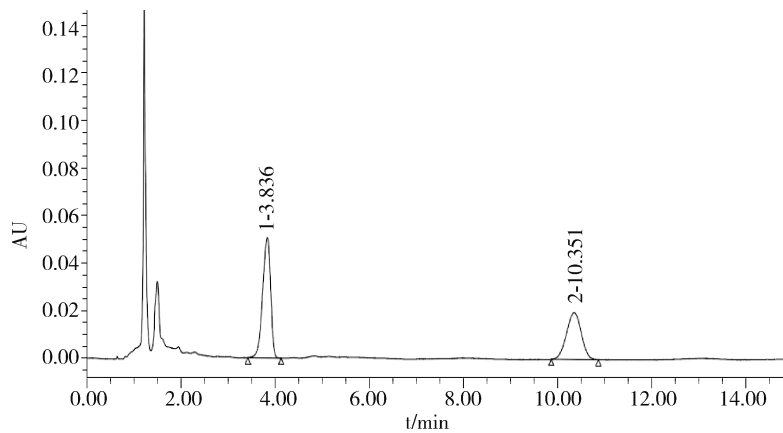
Fig 6 254 nm chromatogram of negative solution



1. 穿心莲内酯 2. 脱水穿心莲内酯

图 7 供试品 225 nm 波长色谱图

Fig 7 225 nm chromatogram of test solution



1. 穿心莲内酯 2. 脱水穿心莲内酯

图 8 供试品 254 nm 波长色谱图

Fig 8 254 nm chromatogram of test solution

表 1 线性关系考察

Tab 1 Investigation of linear relation

| 成分 | 标准曲线 | R ² | 线性范围/ (μg · mL ⁻¹) |
|---------|--------------------|----------------|-----------------------------------|
| 穿心莲内酯 | Y = 21908x - 74351 | 0.9996 | 12.7375 ~ 509.5 |
| 脱水穿心莲内酯 | Y = 13708x - 12939 | 0.9997 | 3.4 ~ 136 |

2.5 精密度试验 精密量取混合对照品溶液 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.49%, 表明该方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按 2.1.1

项下色谱条件, 分别于 0、2、6、12、24 h, 各进样 10 μL, 计算穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 0.9%、1.0%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一供试品, 按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 计算穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量, 结果穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯平均含量分别为 4.1 mg · g⁻¹、1.4 mg · g⁻¹, 含量 RSD 分别为 1.1%、1.0%, 表明该方法重复性良好, 结果见表 2。

表 2 重复性试验

Tab 2 Repeatability test

| 取样量/(g) | 穿心莲内酯峰面积 | 穿心莲内酯含量/ (mg · g ⁻¹) | 脱水穿心莲内酯峰面积 | 脱水穿心莲内酯含量 (mg · g ⁻¹) |
|-----------------------------|----------|-------------------------------------|------------|--------------------------------------|
| 0.4886 | 1665916 | 4.42 | 564906 | 1.39 |
| 0.5029 | 1738266 | 4.48 | 589648 | 1.41 |
| 0.5039 | 1728461 | 4.44 | 592480 | 1.41 |
| 0.5071 | 1759083 | 4.50 | 596083 | 1.41 |
| 0.5293 | 1835335 | 4.49 | 622628 | 1.41 |
| 0.5012 | 1699096 | 4.39 | 575690 | 1.38 |
| 平均含量(mg · g ⁻¹) | - | 4.45 | - | 1.40 |
| 含量 RSD/% | - | 0.9 | - | 1.03 |

2.8 加样回收率试验 取已知穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的 6 份供试品,各精密加入穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品适量,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率。结果显示,穿心莲内酯回收

率在 98.0% ~ 100.6% 之间,平均回收率 98.8%, RSD 为 1.0%;脱水穿心莲内酯回收率在 99.3% ~ 101.4% 之间,平均回收率 99.9%, RSD 为 0.8%,表明该方法回收率良好,准确可靠,结果见表 3 ~ 表 4。

表 3 加样回收率试验 1

Tab 3 Recovery test 1

| 取样量 (g) | 供试品中所含穿心莲 内酯的量(mg) | 加入的穿心莲 内酯对照品的量(mg) | 测定值 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收 率(%) | RSD (%) |
|------------|-----------------------|-----------------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 0.4958 | 1.615 | 1.73 | 3.355 | 100.56 | | |
| 0.5036 | 1.640 | 1.73 | 3.338 | 98.08 | | |
| 0.5021 | 1.632 | 1.73 | 3.328 | 98.04 | 98.84 | 1.0 |
| 0.5049 | 1.620 | 1.73 | 3.324 | 98.49 | | |
| 0.5052 | 1.632 | 1.73 | 3.348 | 99.17 | | |
| 0.5011 | 1.658 | 1.73 | 3.365 | 98.69 | | |

表 4 加样回收率试验 2

Tab 4 Recovery test 2

| 取样量 (g) | 供试品中所含脱水 穿心莲内酯的量(mg) | 加入的脱水穿心莲 内酯对照品的量(mg) | 测定值 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收 率(%) | RSD (%) |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 0.4958 | 0.694 | 0.681 | 1.384 | 101.35 | | |
| 0.5036 | 0.688 | 0.681 | 1.365 | 99.44 | | |
| 0.5021 | 0.684 | 0.681 | 1.362 | 99.58 | 99.92 | 0.8 |
| 0.5049 | 0.685 | 0.681 | 1.367 | 100.22 | | |
| 0.5052 | 0.690 | 0.681 | 1.366 | 99.26 | | |
| 0.5011 | 0.691 | 0.681 | 1.369 | 99.66 | | |

2.9 样品含量测定 从市场收集的 4 批样品及实验室自制的一批样品,按 2.2.2 项下方法制备供试

品溶液。按 2.1.1 色谱条件进样计算穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的平均含量和总含量,结果见表 5。

表 5 样品含量测定结果

Tab 5 Determination result of sample content

| 编号 | 批号 | 穿心莲内酯含量/ (mg · g ⁻¹) | 脱水穿心莲内酯含量/ (mg · g ⁻¹) | 总含量/ (mg · g ⁻¹) |
|----|----------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 20052301 | 12.20 | 2.37 | 14.58 |
| 2 | 20211111 | 5.07 | 2.05 | 7.12 |
| 3 | 21102601 | 0.56 | 0.21 | 0.77 |
| 4 | 20210517 | 2.41 | 3.2 | 5.61 |
| 5 | 实验室自制 | 8.40 | 1.02 | 9.42 |

3 小 结

3.1 提取条件优化 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯为二萜类内酯化合物,根据化学性质,在预试验中考察了 80 ℃ 乙醇超声 30 分钟;75% 乙醇加热回流 1 小时;乙醇浸泡过夜;40% 甲醇浸泡一小时,超声 30 分钟;甲醇超声 30 分钟等提取条件,前期也对超声时长以及是否过中性氧化铝柱进行了比较,最终选择甲醇超声 30 分钟。

3.2 波长的选择 PDA 检测器在 210 ~ 400 nm 的波长范围内进行扫描,结果穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的吸收波长最大吸收波长分别在 225 nm、254 nm。

3.3 流动相的选择 在预实验中,在参考《中国兽药典》2020 版、《中国药典》等相关资料的基础上,分别考察了:甲醇 - 水、甲醇 - 磷酸水溶液、乙腈 - 水不同比例,等度洗脱和梯度洗脱,最终选择甲醇 - 水(52:48)作为流动相,等度洗脱。

从市售的 4 批供试品的含量检测中发现,不同厂家生产的四味穿心莲散质量参差不齐,穿心莲内

酯和脱水穿心莲内酯含量差异明显,需通过建立统一的便捷的检测方法控制产品质量,以利于四味穿心莲散产品生产、使用和监管。目前已有的关于四味穿心莲散有效成分穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯定量分析的报道有两篇,包爱情^[2]、汪艳秋^[3]等人开发建立的 HPLC 法均采用梯度洗脱,定量检测时时间长,基线波动大,柱压较高。本文所建立的方法更简单便捷,准确,重复性好,为规范和提高四味穿心莲散质量标准提供依据。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版[S]. 中国农业出版社, 2020.
China Veterinary Pharmacopoeia Committion. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia ,2020 version2[S].
- [2] 包爱情,陆春波,林仙军,陈晓林,蔡文金,金香莲. RP - HPLC 双波长法测定四味穿心莲散中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. 中国兽药杂志,2016,50(06):56 - 60.
Bao A Q, Lu C B, Lin X J, et al. Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in Siwei Chuanxinlian San by Dual - wavelength RP - HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016,50(06):56 - 60.
- [3] 汪艳秋,楼步青,汪芳,刘国雄,邓丽红,强皎,赖小平,张军. 兽用中成药四味穿心莲散质量标准提高研究[J]. 中兽医医药杂志,2013,32(06):37 - 41.
Wang Y Q, Lou B Q, Wang F, et al. Study on the quality standard of Siwei Chuanxinlian San [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2013,32(06):37 - 41.

(编辑:陈希)