

胡黄连苷-II原料药的定性与定量分析

李鹏, 郑璐*, 汪斌, 薛明, 陈炜伟, 姚仲青

(扬子江药业集团有限公司 中药研究院, 江苏 泰州 225321)

[摘要] 目的:对胡黄连苷-II原料药进行结构鉴定,建立 HPLC 含量测定方法。方法:根据理化常数和光谱数据进行结构鉴定;采用反相高效液相色谱法,对胡黄连苷-II原料药进行含量测定。结果:胡黄连苷-II原料药结构鉴定表明其成分为6-香草酰基梓醇,即胡黄连苷-II;HPLC 测定胡黄连苷-II在 0.315~5.05 μg 进样量与峰面积线性关系良好,平均加样回收率为 98.09%,RSD 1.6%,3批胡黄连苷-II原料药质量分数分别为 101.53%,101.50%,102.25%。结论:胡黄连苷-II原料药含量较高,所建立含量测定方法简便可行,重复性好,可用于胡黄连苷-II原料药的质量控制。

[关键词] 胡黄连苷-II;原料药;定量;定性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0056-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140056

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1041.014.html>

[网络出版时间] 2015-05-27 10:41

Qualitative and Quantitative Analysis of Active Pharmaceutical Ingredient Picroside-II LI Peng, ZHENG Lu*, WANG Bin, XUE Ming, CHEN Wei-wei, YAO Zhong-qing (Institute of Traditional Chinese Medicine, Yangtze River Pharmaceutical Group, Taizhou 225321, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the structure of picroside-II and establish an HPLC method for determining the content of picroside-II. **Method:** The structure was elucidated by its physicochemical characteristics and spectral analysis. The content of picroside-II was determined by HPLC. **Result:** The structure was elucidated as 6-vanillyl catalpol (picroside-II). The linear range of picroside-II was within 0.315-5.05 μg. The average recovery was 98.09%, with RSD 1.6%. The three batches of active pharmaceutical ingredient picroside-II were 101.53%, 101.50%, and 102.25%, respectively. **Conclusion:** The method is simple and specific, and can be used for control of picroside-II.

[Key words] picroside-II; active pharmaceutical ingredient; qualitative; quantitative

胡黄连具有清湿、凉血、燥湿、消痞功效,适用于治疗骨蒸劳热、黄疸、冷热泄痢、小儿疳积、自汗、盗汗、痔瘕、疮肿等。胡黄连苷-II(picroside-II)是胡黄连药材中环烯醚萜苷类成分中含量较高的活性成分。现代研究表明其具有保护肝损伤、保护神经细胞损伤、抗炎平喘、免疫调节等药理作用^[1-2]。本文对胡黄连苷-II原料药结构鉴定及含量测定方法的研究,为胡黄连苷-II原料药的质量控制提供科学依据。

1 材料

1260 Infinity 型高效液相色谱仪(美国 Agilent

公司,包括 G1315D 型二极管阵列检测器),XS205 Dual Range 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),GWA-VN 型超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司),NEXUS870 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 NICOLET 公司),1100 型 LC/Micro 型 Mass Q-Tof Micro MS/MS(美国 Agilent 公司/英国 Micromass 公司)。

离子源电喷雾,离子化采集模式(ESI⁺),毛细管电压 3.2 kV;电喷雾离子化采集模式(ESI⁻),毛细管电压 -2.8 kV。AVANCE AV-500 型超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司),氢谱为 500 MHz。

[收稿日期] 20141020(015)

[第一作者] 李鹏,助理研究员,从事中药新药制备工艺及质量标准研究,Tel:025-58616121,E-mail:morealittle@sina.com

[通讯作者] * 郑璐,教授级工程师,从事中药新药开发及团队管理研究,Tel:021-68128999,E-mail:hznjl@yangzijiang.com

胡黄连苷-II 原料药由扬子江药业集团有限公司提供(批号 20140405-1, 20140405-2, 20140405-3), 胡黄连苷-II 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111596-200402), 乙腈(色谱纯, 北京百灵威科技有限公司), 纯化水实验室自制。

2 主成分结构鉴定

胡黄连苷-II 原料药(批号 20140405-1), 白色结晶性粉末(水), 易溶于甲醇、乙醇。[α]_D = -165.37° (c = 1.0, MeOH); mp 137 ~ 140 °C; IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3 418.9, 2 934.9, 1 708.7, 1 655, 1 597.5, 1 515.9, 1 430.0; HR-ESI-MS: m/z 535.144 2 [$M + Na$]⁺ (Cal. for 535.142 8, C₂₃H₂₈O₁₃)。

¹H-NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz) 显示一组苯环上 ABX 偶合系统信号 [6.94 (1H, d, J = 8.3 Hz); 7.53 (1H, dd, J = 8.3, 1.8 Hz), 7.48 (1H, d, J = 1.8 Hz)], 一组烯烃信号 [6.44 (1H, d, J = 6.0 Hz), 4.98 (1H, t, J = 5.5 Hz)], 一个缩醛信号 5.13 (1H, d, J = 9.6 Hz), 一个糖端基质子信号 4.64 (1H, d, J = 7.8 Hz), 一个甲氧基信号 3.84 (3H, s)。¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 165.6 为一酯键信号, 151.9 和 147.5 为两个苯环连氧基团信号, 55.7 为一个甲氧基信号, 结合¹H-NMR 可知该化合物结构中可能存在一个香草酸片段; 有 141.1 和 101.81 两个烯碳特征信号和典型的葡萄糖 6 个碳信号 (97.9, 73.4, 77.4, 70.3, 76.4, 61.4), 结合¹H-NMR 可知该化合物结构中可能存在一个梓醇片段, 结合 HMBC 可知 δ_H 5.08 (1H, d, J = 7.8 Hz) 与 δ_C 165.6 远程相关, 证明香草酸片段通过羰基和梓醇片段 6 位相连形成酯键。经查阅文献, 其 NMR 数据与文献[3-6]中的胡黄连苷 II 的数据对照相一致, 故鉴定该化合物为胡黄连苷-II (picroside II)。NMR 数据见表 1。

3 RP-HPLC 含量测定

3.1 色谱条件 Agilent plus C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (19:81), 检测波长 264 nm, 进样量 10 μL , 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C。该条件下胡黄连苷-II 色谱峰与其他成分可以获得较好的分离, 理论塔板数按胡黄连苷-II 计算不低于 10 000。见图 1。

3.2 溶液制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取胡黄连苷-II 对照品 10.10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 1.01 g · L⁻¹ 的对照品溶液储备液。

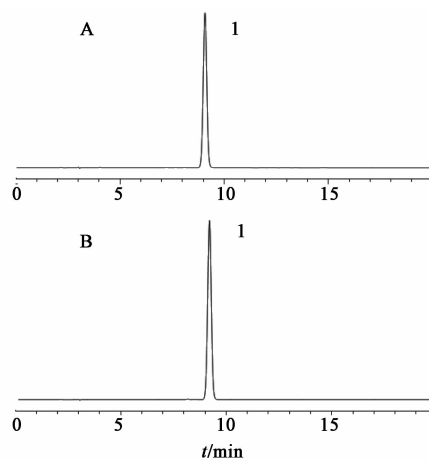
3.2.2 供试品溶液 精密称取胡黄连苷-II 原料药

表 1 胡黄连苷-II NMR 数据

Table 1 NMR data of picroside-II

	¹³ C-NMR	¹ H-NMR (HSQC)	HMBC (H→C)
1	93.0	5.13 (1H, d, J = 9.6 Hz)	C-4, 8, 9, 1'
3	141.1	6.44 (1H, d, J = 5.95 Hz)	C-1, 4, 5
4	101.8	4.98 (1H, t, J = 4.7 Hz)	C-1, 3, 5, 6, 9
5	35.2	2.60 (1H, m)	C-1, 3, 4, 6, 9
6	79.7	5.08 (1H, d, J = 7.75 Hz)	C = O, C-4, 5, 7
7	58.2	3.78-3.74 (1 H, m) *	OCH ₃ , C-5, 9
8	65.8	-	-
9	41.8	2.5 (1H, m)	C-1, 5, 6, 8, 10
10a	58.5	3.78-3.74 (1 H, m) *	-
10b		3.94 (1H, d, J = 7.38 Hz)	C-7, 8
<i>β-D-glc</i>			
1'	97.9	4.64 (1H, d, J = 7.8 Hz)	C-1, 2', 3', 5'
2'	73.4	3.09-3.04 (1H, m) *	C-3', 5', 6'
3'	77.4	3.24-3.17 (1H, m) *	C-6'
4'	70.3	3.09-3.04 (1H, m) *	C-3', 5', 6'
5'	76.4	3.24-3.17 (1H, m) *	C-3', 6'
6'a	61.4	3.45 (1H, m)	C-3'
6'b		3.78-3.74 (1 H, m) *	-
1''	120.0	-	-
2''	112.8	7.48 (1H, d, J = 1.75)	C = O, C-1'', 3'', 4'', 6''
3''	151.9	-	-
4''	147.4	-	-
5''	115.3	6.94 (1H, d, J = 8.35 Hz)	C = O, C-1'', 2'', 3'', 4''
6''	123.8	7.53 (1H, dd, J = 1.75, 8.4 Hz)	C = O, C-2'', 3'', 4''
C = O	165.6	-	-
OCH ₃	55.7	3.84 (3H, s, OMe)	C-4''

注: * 由于信号重叠无法辨认几重峰。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 胡黄连苷-II

图 1 胡黄连苷-II 原料药 HPLC

Fig. 1 Chromatograms of pharmaceutical ingredient

5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

3.3 线性关系考察 用水梯度稀释胡黄连苷-II 对照品溶液储备液, 得到质量浓度为 0.505, 0.252, 0.126, 0.063, 0.031 5 g · L⁻¹ 的对照品溶液。各

10 μL 分别注入液相色谱仪,测定。以进样量为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),计算得回归方程 $Y = 1376.8X + 15.98 (r = 1)$ 。胡黄连苷-II 对照品在 0.315 ~ 5.05 μg 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

3.4 精密度试验 吸取对照品溶液 10 μL 进行测定,连续进样 6 次,记录每一次进样的峰面积。结果胡黄连苷-II 峰面积的 RSD 0.1%,表明仪器精密度良好。

3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 20140405-1),分别在制备后 0,2,5,8,13,24 h 后依 2.1 项下色谱法方法测定,结果胡黄连苷-II 峰面积 RSD 0.5%,表明样品溶液 24 h 内稳定性良好。

3.6 重复性试验 取胡黄连苷-II 原料药(批号 20140405-1),精密称取 5 份,按 3.2.2 项下方法配制供试品溶液。分别吸取供试品溶液 10 μL 进行测定,结果峰面积 RSD 1.2%,表明该法重复性好。

3.7 回收率试验 精密称取已知含量的胡黄连苷-II 原料药(批号 20140405-1)2 mg 置 10 mL 量瓶中,平行 6 份。每份分别加胡黄连对照品($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液 1 mL,再加水溶解,稀释至刻度,摇匀,按 3.1 项下色谱法测定,见表 2。

表 2 胡黄连苷-II 加样回收率测定

Table 2 Recovery test of picroside-II

称样量 /mg	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
2.02	2.050 9	3.990	96.97		
1.99	2.020 4	4.003	99.14		
2.02	2.050 9	4.064	100.66	98.09	1.6
2.07	2.101 7	4.037	96.76		
2.00	2.030 6	3.975	97.24		
2.00	2.030 6	3.986	97.79		

注:加入量均为 2 mg。

3.8 检测限 逐级稀释 3.2.1 项下对照品储备液,按上述 HPLC 方法检测,以信噪比为 3:1 确定胡黄连苷-II 的最低检测限为 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.9 样品含量测定 分别精密称取 3 批胡黄连苷-II 原料药(20140405-1,20140405-2,20140405-3),按照 2.2.2 项下方法制备供试品。按 2.1 项下色谱条件测定,外标一点法计算胡黄连苷-II 含量分别为 101.53%,101.50%,102.25% ($n = 2$)。

4 讨论

近年来,中药新药审评对于新药质量标准研究提出了更高的全面性要求,对中药一类新药的主成分鉴定及定量研究也十分必要。胡黄连中环烯醚萜

类成分胡黄连苷-II 作为其中一种重要活性物质,具有广泛的药理活性。本课题研究的 3 批胡黄连苷-II 原料药是首创利用纯水作为结晶溶剂,所获得的中试产品质量分数均 >101%,结合结构鉴定结果表明其制备工艺合理。

通过全波长扫描结果胡黄连苷-II 在 264 nm 处有最大紫外吸收。

胡黄连苷-II 为环烯醚萜苷类成分,目前较为普遍的定量方式是 HPLC 法,本实验运用 2010 年版《中国药典》(一部)^[7] 胡黄连药材中检测胡黄连苷-II 的色谱条件,以甲醇-水-磷酸为流动相,发现有一杂质峰与目标成分峰未能达到基线分离,结合文献[8-9]及实验比较确定本实验色谱条件具有较好的分离效果,采用二极管阵列检测器测定,结果表明目标成分峰为单一化合物。本文还比较了甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.2% 乙酸水等含酸溶剂系统,发现乙腈-水系统能将目标成分峰基线分离,且理论塔板数、选择因子与其他等含酸溶剂系统没有显著性差异。

HPLC 法检测胡黄连苷-II 发现其具有溶剂效应,如用纯乙醇或甲醇会出现峰型变宽、前沿峰现象,经比较溶解样品的溶剂以水或体积分数 75% 以下甲醇的水溶液为宜。

[参考文献]

- [1] 刘志春. 西藏胡黄连的化学成分研究进展[J]. 药学实践杂志,2010,28(5):321-324.
- [2] 何希瑞,李倩,张春玲,等. 胡黄连化学成分及单体化合物药理活性研究新进展[J]. 环球中医药,2012,5(9):708-713.
- [3] 尹立子. 西藏胡黄连根茎部分的化学成分及其体外抑菌活性的研究[D]. 长春:吉林大学,2009.
- [4] 黄开毅. 西藏胡黄连化学成分的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2008.
- [5] 汪豪,吴佳俊,刘戈,等. 西藏胡黄连中的环烯醚萜类化学成分[J]. 中国天然药物,2006,4(1):36-39.
- [6] Tetsuo Iwagawa, Hiroaki Asai, Tsunao Hase, et al. Monoterpenoids from radermachia sinica [J]. Phytochemistry, 1990, 29(6):1913-1916.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:226.
- [8] 陈惠英,宋粉云. 高效液相色谱法测定万应胶囊中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 的含量[J]. 中国药房,2006,17(31):1011-1012.
- [9] 何凌云,王雪根,张胜平,等. 大孔树脂分离纯化胡黄连苷 II 的工艺研究[J]. 中成药,2011,33(4):697-699.

[责任编辑 顾雪竹]