

UPLC 快速分析穿心莲药材及制剂中内酯成分

黄朋纳*

(广州市医药职业学校, 广州 510430)

[摘要] 目的:建立 UPLC-PDA 技术快速测定穿心莲药材及制剂中主要内酯类成分含量的方法。方法:采用超高效液相色谱仪,用 Acquity BEH Shield RP C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~2 min, 40% A; 2~4 min, 40%~45% A; 4~10 min, 45%~50% A; 10~15 min, 50% A);流速 0.5 mL·min⁻¹,检测波长 226 nm,柱温 30 ℃。结果:在 15 min 内可以完成药材和制剂中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的分析,分离度良好,线性范围分别为 0.028 6~0.286 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 6, n=6$), 0.094 0~0.940 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 3, n=6$);平均加样回收率分别为 97.32%, 97.11%。结论:该方法快速、准确、灵敏度高,可用于穿心莲药材及制剂的质量控制。

[关键词] 穿心莲;超高效液相色谱法;穿心莲内酯;脱水穿心莲内酯

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0098-04

UPLC Determination of Lactone in *Andrographis paniculata* Preparation

HUANG Peng-na*

(Guangzhou Pharmaceutical School, Guangzhou 510430, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an UPLC method for the Determination of lactone in *Andrographis paniculata* preparation. **Method:** Acquity BEH Shield RP C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was used with Methanol (A) -Water (B) as a mobile phase by gradient elution program (0-2 min, 40% A; 2-4 min, 40% -45% A; 4-10 min, 45% -50% A; 10-15 min, 50% A). The flow rate was 0.5 mL · min⁻¹. The detecting wavelength was 226 nm. The column temperature was 30 ℃. **Result:** The linear ranges of andrographolide and dehydroandrographoline were 0.028 6-0.286 g · L⁻¹ ($r=0.999\ 6, n=6$), 0.094 0-0.940 g · L⁻¹ ($r=0.999\ 3, n=6$). The average recoveries were 97.32% and 97.11%. **Conclusion:** The method was accurate, quickly and sensitive. It can be used for quality control of *A. paniculata* preparation.

[Key words] *Andrographis paniculata*; UPLC; andrographolide; dehydroandrographoline

穿心莲具有清热解毒、凉血、消肿的作用,主要用于治疗感冒发热、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^[1]。主要有效成分为穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯等二萜内酯类成分,其中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量最高^[2-3]。目前有关穿心莲含量测定的报道,多采用传统的 HPLC,分析时间较长,进行多组分分析的时间往往要 30 min 以上。超高效液相色谱法(UPLC)可大大缩短

分析时间,提高分析的灵敏度和分离度。笔者采用 UPLC-PDA 法系统分析穿心莲药材及制剂中内酯类成分,建立了主要成分的含量测定方法,可用于穿心莲药材及制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司),配备四元溶剂管理系统、自动进样器、光电二极管阵列检测器、柱温箱、EMPOWER II 色谱工作站, XSD-1001A 型超声波清洗机(中山市先声达机电设备有限公司), 1/10 万电子天平(美国 DENVER)。甲醇(色谱纯,南京化学试剂有限公司),液相用水为屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯,脱氧穿心莲内酯苷等对照品均由

[收稿日期] 20120103(002)

[通讯作者] *黄朋纳,制药工程师,从事药物制剂工艺、质量研究, Tel: 020-86418572, E-mail: huangpna@21cn.com

中国药品生物制品检定所提供,使用时用甲醇配成适宜浓度,穿心莲药材,购自广州市清平药材市场,粉碎成 20 目粉,穿心莲片,广州白云山和记黄埔中药有限公司,消炎利胆片,广东省博罗先锋药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取穿心莲内酯对照品 14.25 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 $1.425 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照储备液,记为 a,精密称取脱水穿心莲内酯对照品 18.76 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 $1.876 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照储备液,记为 b,取 10 mL 量瓶,依次精密加入 a, b 各 1, 2.5 mL,加甲醇定容,摇匀,即得混标对照液(穿心莲内酯 $0.143 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、脱水穿心莲内酯 $0.470 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.1.2 供试品溶液 穿心莲药材:精密称取穿心莲药材粉末约 2 g,置具塞三角瓶中,加甲醇 50 mL,浸渍 30 min,超声提取 30 min,放冷,抽滤,用少量甲醇洗涤 2 次,合并滤液和洗液。水浴蒸干溶剂,残渣用 10 mL 甲醇溶解并定容,即得穿心莲药材提取液。精密吸取上述溶液 3 mL,加入已处理好的 sep-pak C_{18} 微柱(先用 10 mL 甲醇,后用 10 mL 水洗,然后注入空气,尽快将柱挤干)上,弃去 1 mL 流出液,收取第 2 ~ 3 mL 流出液,过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得。

穿心莲片:取穿心莲片 20 片,去掉包衣,将片芯研细,精密称取 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL,密塞,浸渍 30 min,超声提取 30 min,过滤并将滤渣用少量甲醇洗涤 2 次,合并滤液和洗液,加甲醇定容置 50 mL。精密吸取上述溶液 3 mL,加入已处理好的 sep-pak C_{18} 微柱(先用 10 mL 甲醇,后用 10 mL 水洗,然后注入空气,尽快将柱挤干)上,弃去 1 mL 流出液,收取第 2 ~ 3 mL 流出液,过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得。

消炎利胆片:取消炎利胆片 20 片,去掉包衣,将片芯研细,精密称取 1.0 g,按穿心莲片供试品液的制备方法依法制备,即得。

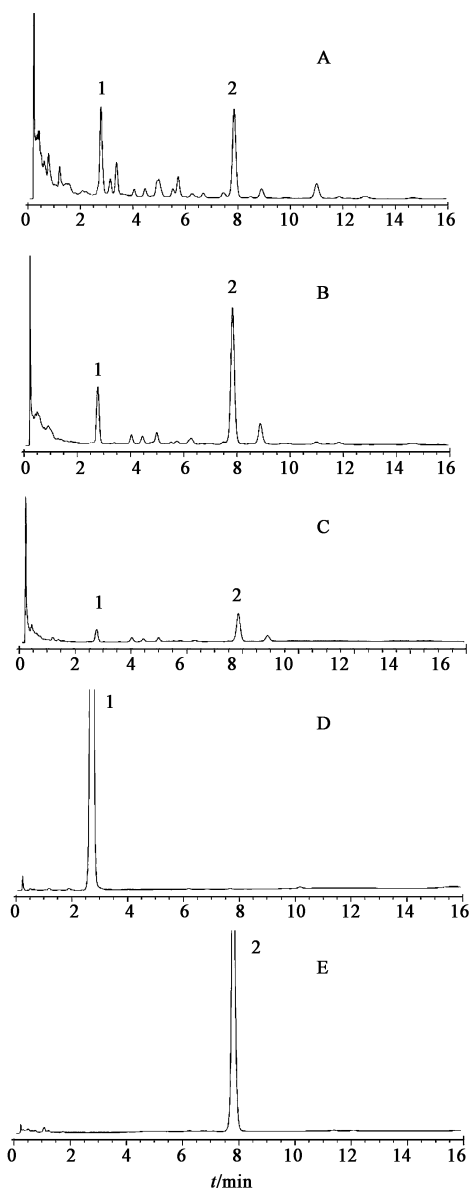
2.2 色谱条件与系统适应性 Acquity BEH Shield RP C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相由 A(甲醇)和 B(水)线性梯度系统组成,梯度程序见表 1,流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 226 nm,进样体 2 μL 。

系统适应性:分别吸取供试品溶液和对照品溶液各 2 μL ,按 2.1 所述色谱条件进行分析,从图 1

表 1 UPLC 分析溶剂梯度程序

t/min	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	A/%	B/%
0	0.5	40	60
2	0.5	40	60
4	0.5	45	55
10	0.5	50	50
15	0.5	50	50
16	0.5	40	60

结果可以看出,各被测组分与其他组分均达到基线分离,分离度 $R > 1.5$,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的保留时间分别约为 2.79, 7.85。见图 1。



A. 穿心莲药材; B. 穿心莲片; C. 消炎利胆片; D, E. 对照品;
1. 穿心莲内酯; 2. 脱水穿心莲内酯

图 1 超高效液相色谱

2.3 线性范围 将 2.1.1 项下混标对照液和对照品储备液稀释至系列浓度的混标对照溶液,摇匀,过

0.22 μm 微孔滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液, 进样 2 μL。以质量浓度 ($X, \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为 (Y) 为纵坐标, 得到回归方程, 穿心莲内酯 $Y_1 = 8.64 \times 10^6 X_1 + 10\,437, 0.028\,6 \sim 0.286 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (r = 0.999\,6, n = 6)$, 脱水穿心莲内酯 $Y_2 = 4.43 \times 10^6 X_2 - 8\,952, 0.094\,0 \sim 0.940 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (r = 0.999\,3, n = 6)$ 。

2.4 精密度试验 分别精密吸取混标对照溶液 2 μL, 重复进样 6 次, 计算各成分峰面积 RSD, 分别为 1.17%, 1.04%。

2.5 稳定性试验 取 2.1.2 项下的同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 5, 10, 15, 20, 24 h, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 计算两种化合物峰面积的 RSD 分别为 0.83%, 1.26%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同一批次穿心莲药材粉末 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 结果穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的平均含量分别为 0.718, 2.306 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.27%, 2.14%。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的穿心莲药材粉末 6 份, 每份约 1.0 g, 精密称定, 分别精密加入混标对照储备液, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 测定含量, 并计算回收率。结果见表 2~3。

表 2 穿心莲内酯回收率试验

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.142 63	0.807	0.625	1.386	96.79		
2	1.088 46	0.768	0.625	1.344	96.48		
3	0.996 82	0.704	0.625	1.297	97.59		
4	1.027 09	0.725	0.625	1.328	98.37	97.32	0.78
5	0.986 11	0.696	0.625	1.294	97.96		
6	1.127 50	0.789	0.625	1.368	96.75		

2.8 样品含量测定结果 取不同批次黄芪药材及穿心莲片、消炎利胆片, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 结果见表 4。

3 讨论

实验发现, 在穿心莲药材和两种市售制剂中, 只检测到穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯、其他内酯类成分如脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯, 脱氧穿心莲内酯苷等均未检测到, 可能与这些成分在药材中的

表 3 脱水穿心莲内酯回收率试验

No.	称样量 /mg	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.142 63	2.660	1.876	4.374	96.43		
2	1.088 46	2.534	1.876	4.267	96.76		
3	0.996 82	2.321	1.876	4.114	98.02		
4	1.027 09	2.391	1.876	4.138	96.98	97.11	0.80
5	0.986 11	2.296	1.876	4.093	98.11		
6	1.127 50	2.602	1.876	4.315	96.36		

表 4 样品中 2 种成分含量测定 ($n = 3$) mg·g⁻¹

No.	穿心莲内酯	脱水穿心莲内酯
1	0.708	2.217
2	0.716	2.344
3	0.727	2.149
4	11.106	30.240
5	10.826	31.443
6	10.385	30.669
7	2.146	6.308
8	2.065	6.427
9	2.128	6.383

含量较低有关。

样品采用甲醇超声提取过滤直接进样发现, 待测组分干扰较大, 参考相关文献后将甲醇提取液过固相萃取小柱净化后达到要求。

参考文献^[4-6], 采用甲醇-水系统洗脱, 为了缩短分析时间, 对梯度程序进行了优化, 使得待测成分在 10 min 之内出峰, 单针进样的分析时间控制在 15 min 左右, 而且使得待测组分达到了较好的分离。另外采用 PDA 检测器所具有的峰纯度鉴别功能, 对药材和制剂中的待测组分进行了检测, 均为单一峰。

本试验采用 UPLC 建立了快速分析穿心莲药材及制剂中内酯类成分的方法, 为穿心莲药材和制剂的质量控制提供了试验依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:252.
- [2] 王国才, 胡永美, 张晓琦, 等. 穿心莲的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5):405.
- [3] 肖树熊, 王晓钰, 郑剑红. 穿心莲的成分及其分析方法研究概况[J]. 中国药师, 2002, 11(5):693.

细胞浓度和作用时间对细胞毒性检查法影响的探讨

李丽*, 周建平, 胡宇驰

(北京市药品检验所, 北京 100035)

[摘要] **目的:** 摸索浸提液中能灵敏反映细胞毒性的最适宜培养时间; 探讨细胞接种浓度对判断细胞毒性结果灵敏度的影响。**方法:** 采用 MTT 法测定 7 批不同受试样品浸提液与 L-929 细胞(细胞接种浓度分别为 1×10^4 个/mL 和 1×10^5 个/mL)作用(1~7)d 细胞毒性分级, 从中寻找最适宜的培养天数。**结果:** 在样品浸提液与 1×10^4 个/mL L-929 细胞相互作用(1~7)d 中, 随着作用时间的延长, 细胞毒性作用越来越显著, 从 d3 起, 细胞毒性分级已经稳定; 在样品浸提液与 1×10^5 个/mL L-929 细胞相互作用的(1~7)d 中, 随着作用时间的延长, 细胞毒性作用越来越显著, 从 d2 起, 细胞毒性分级已经稳定, 从 d5 起细胞的吸光度值出现下降。**结论:** 细胞毒性作用具有时效性。在细胞接种浓度 1×10^4 个/mL 条件下, 能灵敏反映细胞毒性的最短的培养时间为 72 h。在细胞接种浓度 1×10^5 个/mL 条件下, 能灵敏反映细胞毒性的最短的培养时间为 48 h。增大细胞接种浓度能缩短细胞毒性出现的时间, 增大判断细胞毒性敏感度。

[关键词] 细胞毒性; MTT 法; 影响因素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0101-04

Study on Effect of Cell Concentration and Action Time to Cytotoxicity Tests

LI Li*, ZHOU Jian-ping, HU Yu-chi

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the most appropriate time reflecting cytotoxicity sensitively, to study the effect of cell inoculating concentration determining the sensitivity of cytotoxic results. **Method:** Seven test extracts interacted with L-929 cells (the inoculating concentration was $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) from 1 to 7 days in MTT method to determining the most appropriate day which reflected the cytotoxicity sensitively. **Result:** The extension of cytotoxicity increased with the extracts interacting with $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ cells from 1 to 7 days. It was 3rd day that the cytotoxicity classification became stabilized. The extension of cytotoxicity increased with the extracts interacting with $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ cells from 1 to 7 days. It was 2nd day that the cytotoxicity became stabilized, and from the 5th day the absorbance value of cells decreased. **Conclusion:** The effect of cytotoxicity has relationship with time. In $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ inoculating concentration condition, the shortest appropriate time reflecting cytotoxicity was 72 h. In $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ inoculating concentration condition, the shortest incubation time reflecting cytotoxicity was 48 h. Increased cell inoculating concentration could shorten the time of cytotoxicity, increase the sensitivity of cytotoxicity.

[Key words] cytotoxicity; MTT method; influencing factors

[收稿日期] 20110725(004)

[通讯作者] *李丽, 硕士学位, 主管药师, 从事药物临床前安全性评价研究, Tel: 010-83288837, E-mail: lili800214@163.com

[4] 田硕. HPLC 测定莲芝消炎胶囊中穿心莲内酯的含量 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1914.

[5] 刘菊, 张红伟, 张耀军. 不同厂家不同批次消炎利胆片中脱水穿心莲内酯含量分析 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(2): 402.

[6] 任睿, 张园园. 反相高效液相色谱法测定喉舒宁片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量 [J]. 中南药学, 2011, 9(4): 271.

[责任编辑 顾雪竹]