

穿心莲药材的 HPLC 指纹图谱研究

蒋珍藕^{1*}, 饶伟源¹, 陈秋虹², 黄岛平²

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

[摘要] 目的: 建立穿心莲药材指纹图谱的检测方法, 以更有效地控制穿心莲药材的质量。方法: 采用高效液相色谱法对穿心莲药材的指纹图谱进行研究, 以乙腈-0.1% 磷酸进行梯度洗脱, 检测波长为 254 nm; 以中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范软件进行评价。结果: 建立了精密度、稳定性和重复性均良好的 HPLC 指纹图谱检测方法, 通过相似度软件的评价, 10 批不同收购地的穿心莲药材指纹图谱相似度均大于 0.90。结论: 所建立的指纹图谱检测方法可用于穿心莲药材的质量控制。

[关键词] 穿心莲药材; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)03-0006-02

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, 常用于感冒发热, 咽喉肿痛, 口舌生疮等症。穿心莲主要有效成分是二萜内酯类成分, 穿心莲药材及其复方制剂多以该类成分中含量较大的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量作为质量控制指标。然而, 单一的某成分含量测定不能完全反映中药的药效作用。我们采用高效液相色谱法对穿心莲药材指纹图谱进行了研究, 并应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范”^[1] 分析不同产地穿心莲药材的指纹图谱相似度, 为穿心莲药材的质量控制提供有效方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范。

乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯, 蒸馏水为双蒸水; 穿心莲内酯对照品(供含量测定用, 批号为 0797-200106) 和脱水穿心莲内酯对照品(供含量测定用, 批号: 110854-200305) 均由中国药品生物制品检定所

提供; 10 批不同产地穿心莲药材分别购自广西贵港桥圩、广西蒙山、广州九佛、广西梧州、广西黎塘、广西灵川、广东清远、福建厦门、安徽临泉、广西贵港木格, 经广西中医药研究院饶伟源副研究员鉴定, 均为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验 Waters XTerra™ RP₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相 A 和 0.1% 磷酸溶液为流动相 B 进行梯度洗脱: 0~18 min(24% A-76% B), 18~40 min(38% A-62% B), 40~55 min(46% A-54% B), 55~60 min(24% A-76% B), 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温: 25 °C; 进样量参照物溶液 5 μL, 供试品溶液 20 μL。理论塔板数按穿心莲内酯计算应不低于 10 000 按脱水穿心莲内酯计算应不低于 100 000。记录 60 min 色谱图, 35 min 以后没有出峰, 提示 35 min 内穿心莲药材成分出峰完全。

2.2 参照物溶液的制备 精密称取穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 各含 0.1 mg 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取穿心莲药材 0.5 g, 置 25 mL 量瓶中, 加入 40% 甲醇 20 mL, 浸泡 1 h, 超声处理(功率 160 W, 频率 40 KHz) 20 min, 放冷, 加 40% 甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 即得。

2.4 方法学考察

[收稿日期] 2007-05-09

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻 0424008-2E); 广西大型仪器协作共用专项资金资助项目(163-2004-42)

[通讯作者] * 蒋珍藕, Tel: (0771) 5869102; E-mail: zhenou_jiang@yahoo.com.cn.

2.4.1 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(1号)各 20 μL , 分别于 0, 4, 9, 22, 34, 48 h 进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 各指纹图谱相似度均为 1.000, 符合色谱指纹图谱研究技术的要求。

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(1号)各 20 μL , 分别连续 6 次进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 各指纹图谱相似度均为 1.000, 符合色谱指纹图谱研究技术的要求。

2.4.3 重复性试验 取同一样品(1号), 按 2.3 项下方法分别制备供试品溶液 6 份, 进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 各指纹图谱相似度均为 1.000, 符合色谱指纹图谱研究技术的要求。

2.5 样品测定 取不同产地穿心莲药材 10 批, 每批 2 份, 分别制成供试品溶液, 按 2.1 色谱条件测定, 记录色谱图。

2.6 共有指纹峰的确定 根据 10 批样品测定结果, 各批样品指纹图谱色谱峰均在 35 min 内全部出完。综合 10 批样品的色谱图, 有 11 个峰是 10 批样品所共有, 其中 8 号峰为穿心莲内酯峰, 11 号峰为脱水穿心莲内酯峰, 各批样品的 11 个峰总面积占总峰面积均大于 90%, 因此确定这 11 个峰为共有指纹峰(见图 1)。

10 批样品的指纹图谱, 设定时间窗宽度为 0.20 min, 以中位数法生成对照指纹图谱, 测得样品与对照指纹图谱之间的相似度均大于 0.90。

3 讨论

曾试用两种制备方法: 一是按“2.3 供试品溶液的制备”制备; 二是按方法一制备后, 上中性氧化铝柱, 收集甲醇洗脱液, 定容。对以上两种方法制备的供试品溶液进行色谱检测, 结果方法一的出峰数比方法二的多, 而且制备方法更简便, 故选择方法一制备供试品溶液。

试验过程中曾选择甲醇-水、甲醇-磷酸溶液和乙腈-磷酸溶液等多组流动相系统, 以不同的比例和不同的梯度进行梯度洗脱。结果以乙腈-0.1% 磷酸溶液的梯度洗脱为佳, 色谱图上在 254 nm 的各色谱峰分离效果及形状较好, 故选其作为指纹图谱研究的流动相。

参考有关文献^[2-4], 曾分别选用 225 nm 和 254 nm 为检测波长。以 225 nm 为检测波长时, 峰数较多, 但分离效果不好, 基线不平; 而以 254 nm 为检测波长时, 检出的峰数虽比在 225 nm 检出的峰数少 2 个, 但其分离度、峰形和柱效及出峰的稳定性较为满意, 故选择 254 nm 为检测波长。

通过对 10 批不同产地穿心莲药材的指纹图谱分析, 初步构建了穿心莲药材对照指纹图谱; 10 批药材指纹图谱相似度均大于 0.90, 说明 10 批药材有比较好的一致性, 因此建议在对穿心莲药材质量进行评价时, HPLC 指纹图谱相似度应达到 0.90 以上。本文所建立的 HPLC 指纹图谱分析方法, 穿心莲药材中有效成分能在色谱图中得到充分体现, 所建立的色谱指纹图谱具有较好的稳定性和可控性, 可用于穿心莲药材的质量控制。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范[S]. 2004 A.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 189-190.
- [3] 祝晨露, 莫建霞. 规范化种植穿心莲药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(10): 737-739.
- [4] 张尊建, 董海娟, 余静. 穿心莲药材的色谱指纹图谱[J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 373-376.

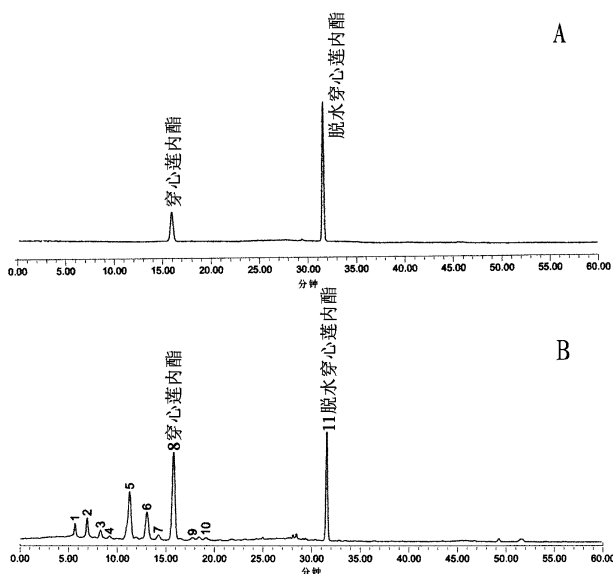


图 1 参照物图(A)、穿心莲药材指纹图谱图(B)

2.7 对照指纹图谱的建立及相似度的测定 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范评价