

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.005

穿心莲饮片的特征图谱及主要内酯成分的含量测定*

张峻淞^{1,2}, 曾令杰^{1,2,Δ}, 崔丹丹^{1,2}, 黄嘉玲^{1,2}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 国家中医药管理局岭南中药材生产与开发重点研究室, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立穿心莲饮片的特征图谱,以及测定不同来源的穿心莲饮片中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯和去氧穿心莲内酯含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Dikma C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(18:82, V/V),梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 226 nm,进样量为 20 μL,柱温为室温。结果 不同来源的穿心莲饮片的 HPLC 图谱具有共同的鉴别特征,特征图谱中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯相对于穿心莲内酯的相对保留时间分别为 1.0, 1.8, 2.0, 2.1, 含量分别为 0.16%~0.51%, 0.13%~0.34%, 0.12%~0.49%, 0.11%~0.55%。结论 建立的特征图谱及主要内酯成分的含量测定方法,能全面评价不同来源的穿心莲饮片质量,可监控穿心莲饮片加工和储存过程中的质量变化。

关键词:穿心莲饮片;内酯;特征图谱;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)19-0019-04

Specific Chromatogram and Determination of Main Lactones in *Andrographis Herba* Decoction Pieces

ZHANG Junsong^{1,2}, ZENG Lingjie^{1,2}, CUI Dandan^{1,2}, HUANG Jialing^{1,2}

(1. School of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 2. Key Laboratory of SATCM for Production & Development of Cantonese Medicinal Materials, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To establish the specific chromatogram of *Andrographis Herba* Decoction Pieces and to determine andrographolide, dehydrated andrographolide, new andrographolide, and deoxyandrographolide by high performance liquid chromatography(HPLC) method. **Methods** Dikma C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was employed, with acetonitrile-water(18:82, V/V) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min, gradient elution; the wavelength was 226 nm, the injection volume was 20 μL, and the column temperature was room temperature. **Results** The specific chromatogram of *Andrographis Herba* Decoction Pieces from different origins had common distinguish characteristics, the relative retention time(RT) of andrographolide, new andrographolide, deoxy andrographolide refer to andrographolide were 1.0, 1.8, 2.0 and 2.1, respectively; the content ranges of andrographolide, new andrographolide, dehydrated andrographolide and deoxyandrographolide were 0.16%~0.51%, 0.13%~0.34%, 0.12%~0.49% and 0.11%~0.55%, respectively.

Conclusion The specific chromatogram and the determination method of the main lactones established can evaluate the quality of *Andrographis Herba* Decoction Pieces and monitor the quality changes during the process of production and storage.

Key words: *Andrographis Herba* Decoction Pieces; lactones; specific chromatogram; high performance liquid chromatography; content determination

*基金项目:国家新兴产业重大工程包中药标准化项目[ZYBZH-Y-GD-13]。

第一作者:张峻淞,男,在读大学本科,研究方向为中药质量标准,(电子信箱)Xuelichika@163.com。

Δ通信作者:曾令杰,博士研究生,教授,研究方向为中药质量标准,(电子信箱)lingjiezheng@gdpu.edu.cn。

[8] 谭 鹏,蒲旭峰,罗 霄. 高效液相色谱法测定虎黄烧伤搽剂中虎杖苷的含量[J]. 成都中医药大学学报,2013,36(1):53-54.
[9] 陈志平,郑维兵,赵 东,等. HPLC法测定虎黄烧伤搽剂中虎杖苷的含量[J]. 海峡药学,2019,31(8):110-112.
[10] BEE O, BEY G, WEI Y. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Involvement of Nrf2 Antioxidant Redox Signaling in Macrophage Foam Cells Formation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(11):2336-2342.
[11] BIAN T, LI H, ZHOU Q, et al. Human β-Defensin 3 Reduces TNF-α-Induced Inflammation and Monocyte Adhesion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. Mediators of Inflammation, 2017, 2017(9):1-11.
[12] 谢志娟,戴新贵,张 平,等. 预先给予白藜芦醇对 TGF-β₁ 诱导生长小鼠肾足细胞株 MPC5 增殖的影响及其机制[J]. 山东医药,2019,59(27):17-20.
[13] 陈 苒,余 曦,阮云军,等. 白藜芦醇对氧化损伤巨噬细

胞自噬相关蛋白表达的影响[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(1):13-16.
[14] MA Y, GONG X, MO Y, et al. Polydatin inhibits the oxidative stress-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by activating the eNOS/SIRT1 pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 6(3):1652-1660.
[15] 刘东媛,刘妮英,汪向红,等. 白藜芦醇对肿瘤 Hela 细胞增殖和凋亡作用及影响[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(5):909-911.
[16] SHAYGANNI E, BAHMANI M, ASGARY S, et al. Inflammation and cardiovascular disease: Management by medicinal plants[J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2015, 23(11):1119-1126.
[17] 李永光,赵 雨,赵丽杰,等. 白藜芦醇对血管平滑肌细胞增殖以及 STAT3 信号通路的作用[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(5):77-81.

(收稿日期:2020-03-30)

穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 为爵床科穿心莲属的草本植物,全草入药,主要活性成分有穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯及 14-去氧-11,12-二去氢穿心莲内酯(又称脱水穿心莲内酯)等二萜内酯类成分,具有清热解毒、凉血、消肿、燥湿等功效。穿心莲饮片为穿心莲的干燥地上部分,经切段、干燥而成,在干燥、贮藏等过程中,穿心莲内酯类成分的含量会发生降解或转化,导致其质量下降^[1-2]。2015年版《中国药典(一部)》仅规定了穿心莲饮片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量^[3],不能全面反映其主要内酯成分的变化情况。穿心莲中除穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯外,还含有较高含量的新穿心莲内酯(达 1.615%)及去氧穿心莲内酯(达 0.76%)^[4-7]。本研究建立了同时测定穿心莲饮片中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯含量的高效液相色谱(HPLC)法,并通过特征图谱或指纹图谱来表征上述内酯成分及其他成分的相对比例及变化,以准确反映穿心莲饮片的质量状况及全面表征,并合理评价穿心莲饮片质量的优劣,供其质量标准制订时参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Sartorius 型分析天平(德国赛多利斯公司,精度为 0.1 mg);AK-100D 型超声波清洗器(深圳市钰洁清洗设备有限公司,功率为 200 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

30 批穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 饮片经广东药科大学曾令杰教授鉴定为正品,确认为合

格穿心莲饮片样品。样品信息详见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(18:82, V/V),梯度洗脱,0~60 min 时 18% A→40% A;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:226 nm;柱温:室温。

2.2 溶液制备

分别取穿心莲内酯对照品、脱水穿心莲内酯对照品、新穿心莲内酯对照品和去氧穿心莲内酯对照品适量,精密称定,置 5 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.1 mg 的对照品母液,备用。取样品粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 25 mL 40% 甲醇溶液,称定质量;浸泡 1 h 后,超声处理 40 min(功率为 200 W,频率为 40 kHz);放冷,称定质量,用 40% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液 10 mL,置中性氧化铝柱(100~200 目,5 g,内径为 1.5 cm)上,用 15 mL 40% 甲醇溶液洗脱;收集洗脱液,置 25 mL 容量瓶中,加 40% 甲醇溶液至刻度线,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取 2.2 项下的对照品母液适量,置 5 mL 容量瓶中,加入甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液。按拟订色谱条件进样 20 μL 测定,以混合对照品溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,分别得穿心莲内酯、新穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯的回归方程, $Y_{穿} = 3 \times 10^7 X_{穿} + 61\,423$ ($r = 0.999\,2$), $Y_{新} = 6 \times 10^6 X_{新} + 21\,605$ ($r = 0.999\,3$), $Y_{脱} = 4 \times 10^6 X_{脱} + 6\,862.5$ ($r =$

表 1 穿心莲饮片样品信息

样品	样品编号	采收质量(kg)	采收时间	来源	样品	样品编号	采收质量(kg)	采收时间	来源
S1	GX17-1	2.0	2017年9月	广西	S16	GD17-1	2.0	2017年9月	广东
S2	GX17-2	2.0	2017年9月	广西	S17	GD17-2	2.0	2017年9月	广东
S3	GX17-3	2.0	2017年9月	广西	S18	GD17-3	2.0	2017年9月	广东
S4	GX17-4	2.0	2017年9月	广西	S19	GD17-4	2.0	2017年9月	广东
S5	GX17-5	2.0	2017年9月	广西	S20	GD17-5	2.0	2017年9月	广东
S6	GX17-6	2.0	2017年9月	广西	S21	GD17-6	2.0	2017年9月	广东
S7	GX17-7	2.0	2017年9月	广西	S22	GD17-7	2.0	2017年9月	广东
S8	GX17-8	2.0	2017年9月	广西	S23	GD16-1	1.5	2016年10月	广东
S9	FJ17-1	2.0	2017年10月	福建	S24	GD16-2	1.5	2016年10月	广东
S10	FJ17-2	2.0	2017年10月	福建	S25	GD16-3	1.5	2016年10月	广东
S11	FJ17-3	2.0	2017年10月	福建	S26	GD16-4	1.5	2016年10月	广东
S12	FJ17-4	2.0	2017年10月	福建	S27	BJ17-1	1.5	2017年9月	北京
S13	FJ17-5	2.0	2017年10月	福建	S28	BJ17-1	1.5	2017年9月	北京
S14	FJ17-6	2.0	2017年10月	福建	S29	SC17-1	1.0	2017年9月	四川
S15	FJ17-7	2.0	2017年10月	福建	S30	SC17-1	1.0	2017年9月	四川

0.999 4), $Y_{去} = 1 \times 10^7 X_{去} + 40\ 743$ ($r = 0.999\ 2$)。

精密度试验:取2.2项下的对照品溶液,按拟订色谱条件,连续进样6次,测定峰面积。结果4个内酯成分总含量的RSD为0.43% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(S16)样品粉末0.5 g,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样,于0,2,4,6,8 h时测定峰面积。结果4个内酯成分总含量的RSD为1.34% ($n = 5$),表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(S16)样品粉末6份,每份0.5 g,精密称定,依法制备供试品溶液,并测定峰面积。结果4个内酯成分总含量的RSD为1.04% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取穿心莲饮片样品(S16)粉末6份,精密称定,分别加入穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯和去氧穿心莲内酯对照品溶液各1 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表2。

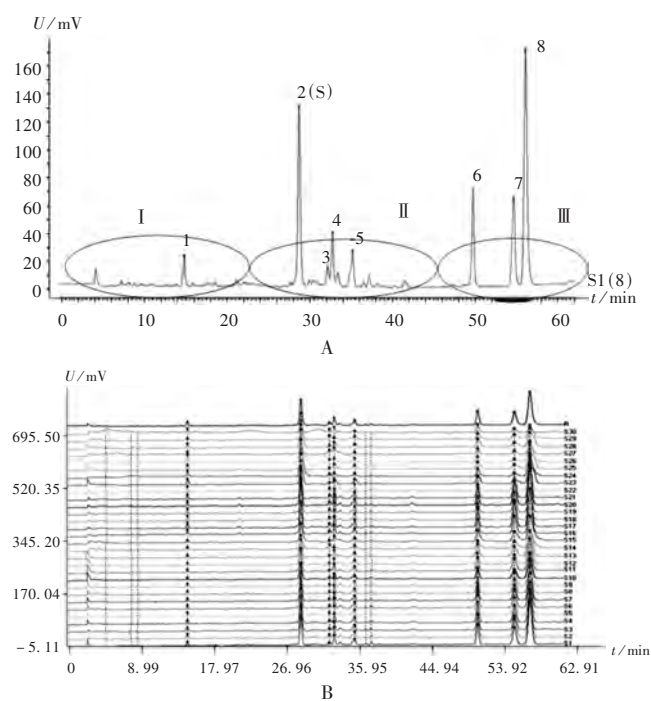
表2 加样回收试验结果($n = 6$)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
A	0.502 1	0.010 4	0.032 3	0.041 6	96.59	97.31	1.06
	0.503 9	0.010 9	0.032 3	0.042 2	96.90		
	0.501 1	0.009 6	0.032 3	0.040 7	96.28		
	0.502 5	0.010 6	0.032 3	0.041 9	96.90		
	0.504 6	0.022 7	0.032 3	0.054 5	98.45		
	0.504 4	0.023 1	0.032 3	0.055 0	98.76		
B	0.501 1	0.010 3	0.014 6	0.024 8	99.32	99.20	0.28
	0.504 6	0.021 8	0.014 6	0.036 2	98.63		
	0.502 5	0.010 8	0.014 6	0.025 3	99.32		
	0.502 1	0.010 6	0.014 6	0.025 1	99.32		
	0.504 4	0.021 0	0.014 6	0.035 5	99.32		
	0.503 9	0.010 2	0.014 6	0.024 7	99.32		
C	0.502 5	0.022 7	0.048 4	0.069 8	97.31	98.21	1.44
	0.504 6	0.048 0	0.048 4	0.096 5	100.21		
	0.504 4	0.046 8	0.048 4	0.095 1	99.79		
	0.502 1	0.023 2	0.048 4	0.070 4	97.52		
	0.503 9	0.024 1	0.048 4	0.071 3	97.52		
	0.501 1	0.022 0	0.048 4	0.068 9	96.90		
D	0.503 9	0.008 9	0.031 5	0.039 5	97.14	97.57	0.70
	0.504 6	0.016 3	0.031 5	0.047 3	98.41		
	0.501 1	0.009 5	0.031 5	0.040 2	97.46		
	0.502 1	0.008 8	0.031 5	0.039 3	96.83		
	0.502 5	0.009 0	0.031 5	0.039 6	97.14		
	0.504 4	0.016 5	0.031 5	0.047 5	98.41		

注:A为穿心莲内酯,B为新穿心莲内酯,C为脱水穿心莲内酯,D为去氧穿心莲内酯。

2.4 穿心莲饮片特征图谱建立与分析

取不同来源的30批样品粉末0.5 g,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样20 μ L,建立穿心莲饮片的HPLC特征图谱,详见图1。可见,来源不同的穿心莲饮片的HPLC图谱具有共同的鉴别特征,以相似度评价软件计算,其相似度在95%以上。各样品的色谱图中均具有8个明显的色谱峰,可划分为3组,详见图1 A。第I组(t 为0~22 min,含溶剂峰),以1号峰为主;第II组由4个(或以上)色谱峰(t 为22~44 min)组成,穿心莲内酯[2(S)]色谱峰的峰高最大;第III组由新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯等色谱峰组成(t 为44~60 min),脱水穿心莲内酯色谱峰的峰高最高。由图1 B可见,穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯相对于穿心莲内酯的相对保留时间分别为1.0,1.8,2.0,2.1。



1,3,4,5. 未测定色谱峰 2(S). 穿心莲内酯 6. 新穿心莲内酯
7. 去氧穿心莲内酯 8. 脱水穿心莲内酯
A. 对照特征图谱 B. 特征图谱

图1 高效液相色谱图

2.5 不同来源样品中4个内酯成分含量测定

由图1 B可见,各批样品中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯的峰面积,按各回归方程计算4个内酯的含量,详见图2。可见,不同来源的穿心莲饮片中上述4种内酯成分的相对比例及总含量差异较大,有的饮片4个内酯的含量均高或均低,有的是某个(或某几个)内酯含量很低,其他内酯的含量很高。30批样品中,穿心莲内酯的含量为0.16%~

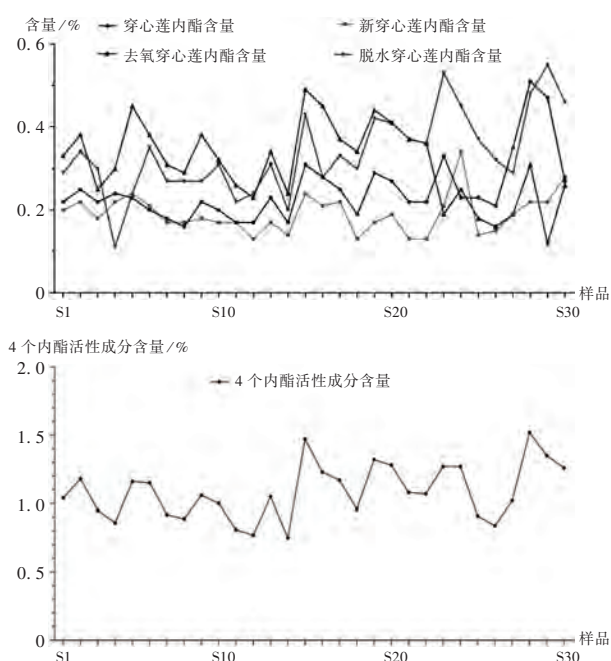


图2 不同来源的穿心莲饮片中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯含量及其总含量的变化

0.51%, 新穿心莲内酯的含量为 0.13% ~ 0.34%, 脱水穿心莲内酯的含量为 0.11% ~ 0.55%, 去氧穿心莲内酯的含量为 0.12% ~ 0.49%, 上述 4 个内酯成分总含量为 0.75% ~ 1.52%。

3 讨论

穿心莲药材或饮片的指纹图谱或特征图谱能较全面地鉴别及评价其质量^[8-16]。为了综合评价不同来源穿心莲饮片的质量,并监控穿心莲饮片加工和储存过程中的质量变化,本研究中建立了同时测定穿心莲饮片的特征图谱及 4 个主要内酯活性成分的 HPLC 法。结果表明,来源不同的穿心莲饮片的 HPLC 特征图谱特征基本一致,其差异为各峰的峰值大小和相对比例。穿心莲饮片的特征图谱中,共有 8 个主要色谱峰,且均以脱水穿心莲内酯峰面积最大,其次是穿心莲内酯;穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯相对于穿心莲内酯的相对保留时间分别为 1.0, 1.8, 2.0, 2.1。

分别考察了不同比例的水-甲醇、水-乙腈、0.4% H_3PO_4 -甲醇、0.4% H_3PO_4 -乙腈、醋酸钠缓冲液(pH 6.4)-甲醇、醋酸钠缓冲液(pH 6.4)-乙腈等的作为流动相的分离效果,最后确定以水-乙腈(82:18, V/V)梯度洗脱较好。曾考察 Agilent, Yilete, Phenomen, Dikma, Diomonsil 的 C_{18} 色谱柱分别在 15, 25, 35, 45 °C 条件下各色谱峰的分离情况。结果表明,由不同厂家生产的 C_{18} 色谱柱对穿心莲内酯的分离有一定影响,其中 Agilent, Dikma 和 Yilete 的 C_{18} 色谱柱均能对穿心莲内

酯成分实现较好分离,且柱温条件对穿心莲内酯类成分分离的影响不明显,故选择室温作为柱温。

参考 2015 年版《中国药典(一部)》中穿心莲饮片标准的含量测定方法,增加了新穿心莲内酯和去氧穿心莲内酯的含量测定方法。同时测定穿心莲饮片中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯这 4 个内酯成分的含量,能更全面地把控穿心莲饮片的质量。

参考文献:

- [1] 曾令杰,梁 晖,谢晓萍. 穿心莲药材干燥前后穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量变化研究[J]. 中成药,2009,31(9): 1399-1401.
- [2] 徐友阳,张慧晔,邓乔华,等. 不同加工方式的穿心莲药材在不同贮藏期的含量变化[J]. 现代中药研究与实践,2015, 29(3):21-23.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:268.
- [4] 邓贵华,林朝展,祝晨陈,等. 穿心莲药材及其制剂中 6 个内酯类成分的含量分析[J]. 药物分析杂志,2011,31(2): 231-235.
- [5] 刘晟楠,魏惠珍,殷文静,等. 不同产地不同部位 3 种穿心莲内酯成分研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(6):1483-1484.
- [6] 林 青,匡艳辉,黄 琳,等. 一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分[J]. 中草药,2012,43(12):2406-2410.
- [7] 肖传学,孙玉侠,耿晓梅,等. 不同药用部位及产地穿心莲药材中 4 个二萜内酯类成分的研究[J]. 中国现代中药,2017, 19(5):675-678.
- [8] 林蔚兰,曾令杰,梁惠瑜,等. 不同产地穿心莲药材 HPLC 指纹图谱初步研究[J]. 中成药,2007,29(5):730-733.
- [9] 邵艳华,王建刚,赖小平,等. 穿心莲二萜内酯类成分的高效薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中药材,2017,37(2): 219-233.
- [10] 杨 琳,张振秋. 不同产地穿心莲饮片高效液相指纹图谱的比较研究[J]. 中药材,2008,31(1):32-35.
- [11] 夏玉英,宁 媛,林朝展,等. 穿心莲饮片的高效薄层色谱指纹图谱研究[J]. 华西药学杂志,2014,29(1): 63-64.
- [12] 林蔚兰,谢 黛,曾令杰,等. 穿心莲饮片薄层色谱鉴别方法研究[J]. 现代中药研究与实践,2005,19(6):51-52.
- [13] 董海娟,张尊建,余 静. 不同产地穿心莲药材色谱指纹图谱的比较研究[J]. 中成药,2006,28(3):321-324.
- [14] 兰继平,胡彦君,王雅琪,等. 穿心莲制剂指纹图谱及其制备过程药效相关性研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(15): 2802-2808.
- [15] 刘飞飞,范春林,黄晓君,等. 穿心莲干浸膏 HPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中药材,2015,38(7):1505-1508.
- [16] 谢 青,陈珠灵,洪培山,等. 高效液相色谱指纹图谱结合聚类分析法对不同产地穿心莲药材的质量评价[J]. 光谱实验室,2012,29(4):2392-2397.

(收稿日期:2020-04-30)