

HPLC法同时测定感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量

许惠英^{1*}, 许百虹^{1#}, 陈浩桢², 黎 旻², 尚丹婷¹(1.广东省人民医院药学部/广东省医学科学院, 广州 510080; 2.广东省药品检验所, 广州 510180)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1699-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.38

摘要 目的:建立同时测定感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo BDS C₁₈, 流动相为甲醇-水(梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 225 nm(穿心莲内酯)、254 nm(脱水穿心莲内酯), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μl。结果:穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的检测质量浓度线性范围分别为 2.25~45.00、1.00~20.00 μg/ml ($r=0.999\ 9$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD≤0.8%; 加样回收率分别为 96.96%~99.80%、96.79%~100.65%, RSD 分别为 1.0%、1.5% ($n=9$)。结论:该方法简便、准确、可靠,可用于感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;感冒清片;穿心莲内酯;脱水穿心莲内酯

Simultaneous Determination of Andrographide and Dehydroandrographolide in Ganmaoqing Tablet by HPLC

XU Huiying¹, XU Baihong¹, CHEN Haoan², LI Yang², SHANG Danting¹(1.Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2.Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of andrographide and dehydroandrographolide in Ganmaoqing tablet. METHODS: HPLC was performed on the column of Thermo BDS C₁₈ with mobile phase of methanol-water at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 225 nm for andrographide and 254 nm for dehydroandrographolide, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 2.25-45.00 μg/ml for andrographide ($r=0.999\ 8$) and 1.00-20.00 μg/ml for dehydroandrographolide ($r=0.999\ 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 0.8%; average recoveries were 96.96%-99.80% ($n=9$) and 96.79%-100.65% ($n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and can be used for the quality control of andrographide and dehydroandrographolide in Ganmaoqing tablet.

KEYWORDS HPLC; Ganmaoqing tablet; Andrographide; Dehydroandrographolide

感冒清片是常用抗流感病毒的一种中西药复方制剂,主要用于风热感冒、发烧、头痛、鼻塞、流涕等症的治疗^[1],收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂(第十九册)^[2]。感冒清片由穿心莲叶等6味中药和对乙酰氨基酚等3种化学药物组成^[3-5]。方中穿心莲叶具有清热解毒、凉血消肿的功效^[6],对其化学成分研究较多的为内酯类^[9];该类化合物是穿心莲叶的主要药用有效成分^[7]。目前,尚未有对感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量同时测定的报道;且现有文献对穿心莲含量测定的流动相多采用甲醇-水等度洗脱的方式进行试验,但各色谱峰的出峰时间较长、峰形较差^[8-10]。因此,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法,用梯度洗脱的方式处理流动相,建立了同时测定感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的方法,以为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2490型紫外检测器(美国 Waters公

*主管药师。研究方向:医院药学。电话:020-83827812-50930。E-mail: xhygreat@126.com

#通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:020-83827812-60299。E-mail: 13924005252@139.com

司);CP225D型十万分之一电子天平(德国 Sartorius公司);CP224S型万分之一电子天平(德国 Sartorius公司);S300H型超声波清洗机(德国 Elma公司)。

1.2 药品与试剂

感冒清片(广州白云山制药股份有限公司广州白云山制药总厂,编号:S1~S10);穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110797-201108、110854-200306,纯度均为100%);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:穿心莲内酯 225 nm、脱水穿心莲内酯 254 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取穿心莲内酯对照品和脱水穿心莲内酯对照品适量,加甲醇制成每1 ml中含穿心莲内酯 45 μg、脱水穿心莲内酯 20 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,除去薄膜包衣,精密称定,

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	甲醇, %	水, %
0~26	38	62
27~40	38→55	62→45
41~50	55→90	45→10
51~65	90→38	10→62

研细,取约1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加甲醇25 ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:33 kHz)30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按感冒清片处方工艺和配方比例制备缺穿心莲叶的阴性样品,再按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

分别取“2.2”项下阴性对照溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰与其他色谱峰均能达到基线分离,分离度 >1.5 ,理论板数以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰计不低于2000,保留时间分别为21、36 min。结果表明,其他成分对穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定无干扰。

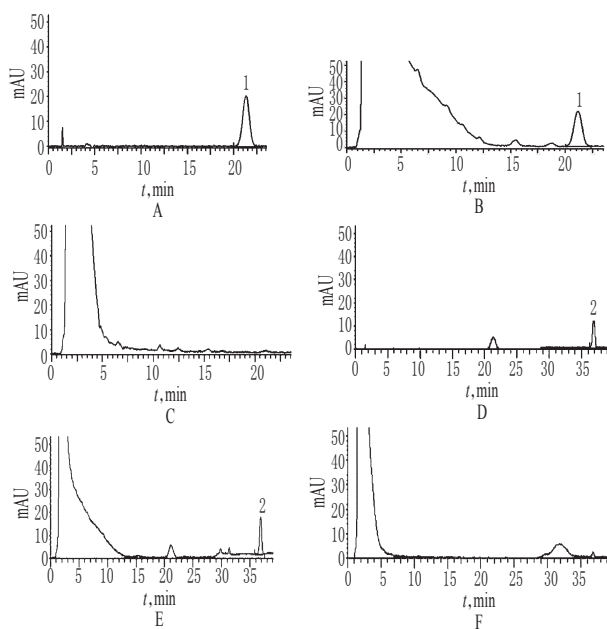


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品(225 nm);B.供试品(225 nm);C.阴性对照(225 nm);D.混合对照品(254 nm);E.供试品(254 nm);F.阴性对照(254 nm);1.穿心莲内酯;2.脱水穿心莲内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference solution (225 nm); B.test sample (225 nm); C.negative control without andrographis paniculata (225 nm); D.mixed reference solution (254 nm); E.test sample (254 nm); F.negative control without andrographis paniculata (254 nm); 1.andrographolide; 2.dehydroandrographolide

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、5、10、20 ml,分别置于20 ml量瓶中,加甲醇定容,制成穿心莲内酯质量浓度分别为2.25、4.50、11.25、22.50、45.00 $\mu\text{g/ml}$ 和脱水穿心莲内酯质量浓度分别为1.00、2.00、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g/ml}$ 的系列对

照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x , $\mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得穿心莲内酯的回归方程为 $y=23.831 0x-0.301 8$ ($r=0.999 9$)、脱水穿心莲内酯的回归方程为 $y=18.300 0x+0.855 1$ ($r=0.999 9$)。结果表明,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的检测质量浓度线性范围分别为2.25~45.00、1.00~20.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,分别按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积并计算含量。当信噪比为3:1时,得检测限(LOD);当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ),结果见表2。

表2 检测限与定量限考察结果

Tab 2 Determination results of detection limit and quantitation limit

待测成分	LOD, ng	LOQ, ng
穿心莲内酯	1.5	4.5
脱水穿心莲内酯	0.5	2.0

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的RSD分别为0.2%、0.5% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下放置0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、36 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的RSD分别为0.7%、0.5% ($n=14$),表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批次(编号:S1)样品约1 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的平均含量分别为0.962 9、0.633 7 mg/g, RSD分别为0.5%、0.8% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(编号:S1)适量,共9份,每3份分别加入低、中、高质量的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.10 样品含量测定

精密称取10个批次的样品适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并采用外标法计算含量,结果见表4。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

本试验曾分别采用索氏提取4 h、超声处理1 h、加热回流1 h的方式进行穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的提取。结果,3种提取方式下穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯总含量的平均值分别为1.606 7、1.618 9、1.620 4 mg/g, RSD=0.5% ($n=3$),表明不同提取方法所得含量不存在明显差异。从节约成本、简化操作步骤等方面考虑,最终选择超声处理为本试验的提取方法。

3.2 提取时间的选择

笔者曾比较超声处理15、30、45、60 min的效果。结果,穿

表3 加样回收率试验结果($n=9$)
Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
穿心莲内酯	0.502 0	0.483 4	0.269 5	0.748 1	98.22	98.5	1.0
	0.501 6	0.483 0	0.269 5	0.750 3	99.18		
	0.501 0	0.482 4	0.269 5	0.751 2	99.74		
	0.502 0	0.483 4	0.502 5	0.972 8	97.39		
	0.500 7	0.482 1	0.502 5	0.975 1	98.11		
	0.502 8	0.484 1	0.502 5	0.971 3	96.96		
	0.503 3	0.484 6	0.656 1	1.139 4	99.80		
	0.502 1	0.483 5	0.656 1	1.129 9	98.52		
	0.501 4	0.482 8	0.656 1	1.132 5	99.02		
	脱水穿心莲内酯	0.502 0	0.318 1	0.190 0	0.503 4		
0.501 6		0.317 9	0.190 0	0.501 8	96.79		
0.501 0		0.317 5	0.190 0	0.505 9	99.16		
0.502 0		0.318 1	0.392 5	0.700 4	97.40		
0.500 7		0.317 3	0.392 5	0.710 0	100.05		
0.502 8		0.318 6	0.392 5	0.698 8	96.87		
0.503 3		0.318 9	0.443 3	0.762 1	99.98		
0.502 1		0.318 2	0.443 3	0.758 8	99.39		
0.501 4		0.317 7	0.443 3	0.763 9	100.65		

表4 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 4 Results of content determination of samples ($n=3$, mg/g)

编号	穿心莲内酯	脱水穿心莲内酯	总含量	平均含量	RSD, %
S1	0.994 1	0.645 7	1.639 8	1.602 4	3.3
S2	0.991 0	0.643 3	1.634 3		
S3	0.974 0	0.632 1	1.606 1		
S4	0.992 1	0.641 2	1.633 3		
S5	0.893 2	0.598 8	1.492 0		
S6	0.983 0	0.634 5	1.617 5		
S7	0.923 7	0.607 9	1.531 6		
S8	0.951 3	0.623 1	1.574 4		
S9	0.991 1	0.645 9	1.637 0		
S10	1.004 0	0.653 7	1.657 7		

心莲内酯和脱水穿心莲内酯总含量的平均值分别为1.489 3、1.618 9、1.621 1、1.607 5 mg/g, RSD=4.5% ($n=6$);而其中30、45、60 min这3个超声处理时间的RSD=0.5% ($n=6$)。这表明,当超声处理时间为30~60 min时,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总含量趋于稳定。为缩短试验流程,最终确定超声处理时间为30 min。

3.3 薄膜包衣是否去除的选择

分别测定除去包衣与不除去包衣得到的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯总含量的平均值,结果分别为1.618 9、1.504 1 mg/g, RSD=5.2% ($n=3$) (即RSD>5%)。这表明,薄膜包衣对于穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的测定存在一定的影响,故取样时应除去包衣。

3.4 检测波长的选择

分别对穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯进行光谱扫描,根据扫描结果并参考相关文献^[11-16],确定本试验穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的检测波长分别为225、254 nm。

3.5 10批次样品含量测定结果的比较

对10批次样品穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定发现,该企业不同批次产品总含量的平均值为1.602 4 mg/g,

RSD=3.3% ($n=3$) (即RSD<5%)。这表明,10批次样品间总含量无明显差异;同时,该企业在这一期间生产的样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量也较稳定。

综上所述,本方法简便、准确、可靠,可用于感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量测定。

参考文献

- [1] 李小燕.反相高效液相色谱法同时测定感冒清片中两组分的含量[J].中国药房,2003,14(9):560.
- [2] 卫生部.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂:第十九册[S].北京:化学工业出版社,1998:229.
- [3] 钟华.感冒清片联合利巴韦林治疗急性上呼吸道感染研究[J].求医问药,2012,10(9):371.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:189.
- [5] 张建勒,盛满莲,付多云.感冒清胶囊质量标准研究[J].中国药品标准,2012,13(2):75.
- [6] 张清民,丁扬洲,冯少斌.HPLC法同时测定消炎利胆片中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯的含量[J].今日药学,2015,25(10):700.
- [7] 何志霞,闫芳,史艳艳,等.穿心莲的药理作用的研究进展[J].现代农业科技,2009(3):21.
- [8] 王雅琪,伍振峰,郑琴,等.穿心莲药材不同提取方式的合理性评价[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):1.
- [9] 周薇,沈犁,张燕,等.穿心莲内酯抗金黄色葡萄球菌生物膜作用及其与庆大霉素的协同作用[J].第三军医大学学报,2014,36(16):1 694.
- [10] 张若良,钟国庆,刘小玉.HPLC法测定穿黄清热胶囊中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J].江西中医药大学学报,2014,26(5):92.
- [11] 邓乔华,梁惠瑜,徐友阳,等.广东等五省穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量比较[J].现代中药研究与实践,2014,12(1):34.
- [12] 王明娟,何风艳,郑笑为,等.消炎利胆片中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯及其总量测定能力验证项目的结果分析[J].中国药事,2014,28(9):981.
- [13] 廖志钟,欧国灯,翁雪萍.HPLC法测定消炎利胆片中的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量研究[J].中国卫生产业,2011,8(6):69.
- [14] 唐维宏.HPLC法同时测定玉叶清火胶囊中梔子苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯[J].药物分析杂志,2015,35(2):246.
- [15] 王保琳,孙晓.HPLC法同时测定疗肺宁片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J].医药前沿,2015,5(17):22.
- [16] 程帆,刘鹏,刘地,等.UPLC法同时测定穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量[J].江西中医药大学学报,2014,26(6):56.

(收稿日期:2015-05-23 修回日期:2016-02-20)

(编辑:刘柳)