

不同来源的穿心莲药材 HPLC 指纹图谱研究

谢郁峰¹ 李斌¹ 陈卓瀚¹ 陈荣海¹ 郑海英² 郭丽冰²

(广东药学院 1. 药科学院; 2. 中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立穿心莲药材的指纹图谱并进行聚类分析,为其科学评价及质量控制提供可靠的方法。方法 采用 Welch Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱,以乙腈-水为流动相梯度洗脱,检测波长 226 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 25 °C。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对其进行了相似度计算,并利用 SPSS 统计分析软件进行了聚类分析。结果 建立了穿心莲药材的指纹图谱,确定了 10 个共有峰为特征峰。相似度评价结果显示,规范化种植基地穿心莲药材相似度均大于 0.91,70% 以上的市售穿心莲药材相似度在 0.86 以上。根据系统聚类分析结果,将不同来源的 12 批穿心莲药材分为 2 类。结论 该方法简便、准确、重复性好,可作为穿心莲药材质量评价的依据。

关键词: 穿心莲; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R917 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2012.04.014

文章编号: 1006-8783(2012)04-0410-05

Study on HPLC fingerprint of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees of different sources

XIE Yu-feng¹ LI Bin¹ CHEN Zhuo-han¹ CHEN Rong-hai¹ ZHENG Hai-ying² GUO Li-bing²

(1. School of Pharmacy; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint for quality control of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. by cluster analysis. **Methods** The chromatographic fingerprints were obtained by HPLC with Welch Ultimate XB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water solution with gradient elution. The detection wavelength was set at 226 nm. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was maintained at 25 °C. The similarity assay of *A. paniculata* of different sources was carried out to evaluate their quality by Traditional Chinese Medicine fingerprint similarity evaluation system (2004A Edition), and hierarchical cluster analysis was performed by SPSS software. **Results** Ten main characteristic peaks were selected in the standard fingerprint, and the similarity of samples from different GAP bases was over 0.91, and the similarity of 70% samples from different pharmacies was over 0.86. About 12 batches of *A. paniculata* from different sources were classified into two groups through the results of hierarchical cluster analysis. **Conclusion** The method with good reproducibility is simple and accurate, which can be used as a quality control method for *A. paniculata*.

Key words: *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees.; HPLC; chromatographic fingerprint

穿心莲为爵床科穿心莲属植物穿心莲 *Andrographis paniculata*(Burm. F.) Nees 的干燥地上部分,有清热解毒、消肿止痛的功效,主治急性扁桃体炎、咽喉炎、肺炎等,主要分布于广东、广西、福建

等地^[1]。穿心莲的主要有效成分是穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯等二萜内酯类化合物^[2],穿心莲内酯及其衍生物具有消炎抗菌、抗病毒的功效,现代药理研究表明,穿心莲内酯可明显降

收稿日期: 2012-05-04

基金项目: 国家自然科学基金(81073045); 广东药学院 2010 年学生创新实验项目

作者简介: 谢郁峰(1971-),女,从事天然药物化学成分的研究与开发,电话: 020-39352140,Email: phytochemistry@163.com;

通信作者: 郭丽冰(1965-),女,教授,硕士生导师,主要从事中药化学成分研究与开发,电话: 020-39352179,Email: xiaobing_12@yahoo.com.cn。

网络出版时间: 2012-07-06 14:35 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20120706.1435.001.html>

低 LPS 诱导的巨噬细胞炎症因子表达^[3]。本实验在参考文献[4-6]的基础上,优化了流动相梯度洗脱的条件,以采自广东、广西规范化种植(Good Agricultural Practice, GAP)基地及市售的穿心莲药材为研究对象,建立了穿心莲水提物的 HPLC 指纹图谱。并采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对其进行相似度评价,利用 SPSS 统计分析软件进行了聚类分析,对来源于 GAP 基地、广州市内连锁药店及本校药圃的穿心莲药材质量进行评价,为穿心莲药材的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 HPLC 系统(CBM-20A 控制器、SIL-20A 自动进样器、SPD-10AVP 检测器、SPD-10AVP 泵、LC-10ATVP 泵、CTO-10ASVP 柱温箱,日本岛津仪器有限公司),Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm),AUW220D 电子天平(日本岛津仪器有限公司),LABOROTA4000 旋转蒸发仪(德国海道夫公司)。

1.2 试剂

穿心莲内酯对照品(批号:5508-58-7)、脱水穿心莲内酯对照品(批号:134418-28-3)均购自成都曼斯特生物科技有限公司,质量分数均≥98%;乙腈为色谱纯(瑞士欧森巴克环境化学公司);液相用水为屈臣氏蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

12 批穿心莲药材中 4 批分别采自广东和广西的穿心莲 GAP 基地,7 批购自广州各连锁药店,1 批采自本校大学城校区的药圃,见表 1。经广东药学院曾令义教授鉴定均为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相: 乙腈(A) - 水(B) 梯度洗脱;梯度洗脱程序: 0 ~ 5 min(24% A → 28% A) 5 ~ 12 min(28% A → 28% A) 12 ~ 22 min(28% A → 30% A) 22 ~ 35 min(30% A → 55% A) 35 ~ 45 min(55% A → 71% A) 45 ~ 50 min(71% A → 79% A) 50 ~ 60 min(79% A → 79% A);检测波长: 226 nm;流速: 1.0 mL · min⁻¹;柱温: 25 °C;进样量: 5 μL。理论塔板数按穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯计算均不低于 5 000。分别精密吸取穿心莲内酯、脱

水穿心莲内酯对照品及穿心莲供试品溶液(S5)各 5 μL 进样,结果见图 1。

表 1 12 批穿心莲药材信息表

Table 1 Sources of 12 batches of *A. paniculata* samples

编号	采集(或购买)地	产地	采集日期 或批号
S1	广西桂林穿心莲 GAP 基地	广西	2010 年 10 月
S2	广东清远大湾穿心莲 GAP 基地	广东	2010 年 9 月
S3	广东清远穿心莲 GAP 基地	广东	2010 年 9 月
S4	广东湛江穿心莲 GAP 基地	广西	2010 年 9 月
S5	广东药学院药圃	广东	2011 年 9 月
S6	广州市正和堂药店	广东	20080815
S7	广州市慈得堂药店	广东	090413L503
S8	广州市大参林	广东	20101213
S9	广州市采芝林	广东	YPAOK001
S10	广州市百源堂	广西	20080301
S11	广州市老百姓大药房	广东	批号不详
S12	广州市力丰医药有限公司	不详	批号不详

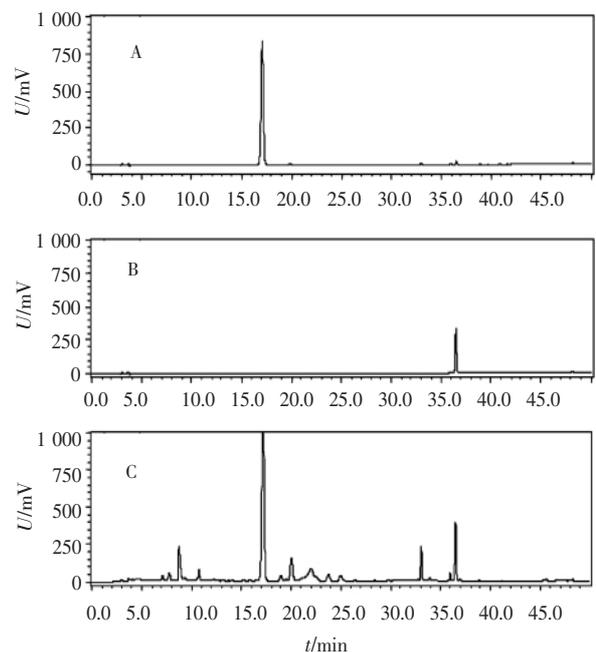


图 1 穿心莲内酯(A)、脱水穿心莲内酯(B)对照品及供试品(C)溶液的 HPLC 图

Figure 1 HPLC of reference substances of andrographolide (A) dehydroandrographolide (B) and tested sample (C)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯对照品适量,分别用甲醇配制成穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯质量浓度均为 1 mg

• mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将各批干燥穿心莲药材粉碎,过 20 目筛,取穿心莲药材粉末 5.0 g,加入 250 mL 的圆底烧瓶中,加入 100 mL 水回流提取 60 min。提取液加乙酸乙酯萃取 3 次,每次 100 mL。合并乙酸乙酯层,回收溶剂使成浸膏,加甲醇使之充分溶解,置于 10 mL 容量瓶中稀释至刻度,即得。

2.3 指纹图谱测定方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (S2) 各 5 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定。以穿心莲内酯色谱峰 (2 号峰) 为参照峰,其保留时间和峰面积为 1,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD 值均小于 2.0%,说明方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (S2) 各 5 μL,室温下放置后分别在 0、1、2、4、12、24 h 依法测定。以穿心莲内酯色谱峰为参照峰,计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1%,相对峰面积的 RSD 小于 5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 分别取同一批次穿心莲样品 (S2) 6 份,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定。以穿心莲内酯色谱峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1%,相对峰面积的 RSD 值均小于 5%,说明该方法重复性良好。

2.4 穿心莲药材 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 12 批药材 HPLC 图谱的测定及特征峰的指认 分别取 12 批不同来源的穿心莲药材适量,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。12 批穿心莲药材共确定共有峰 10 个,经与对照品溶液色谱图比对后,确认样品图谱中 2 号峰是穿心莲内酯,10 号峰是脱水穿心莲内酯。见图 2。

2.4.2 穿心莲药材对照指纹图谱的建立 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 对 GAP 基地的 4 批穿心莲药材 HPLC 图谱进行处理,选择色谱图中 10 个共有峰为校正点,建立穿心莲药材的对照指纹图谱,见图 3。穿心莲内酯是穿心莲的主要活性成分,从图 3 中可以看出穿心莲内酯的色谱峰分离度较好,峰面积所占比例较大且相对稳定,因此选择穿心莲内酯色谱峰 (2 号峰) 为参照峰,

其保留时间和峰面积为 1,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。见表 2、3。

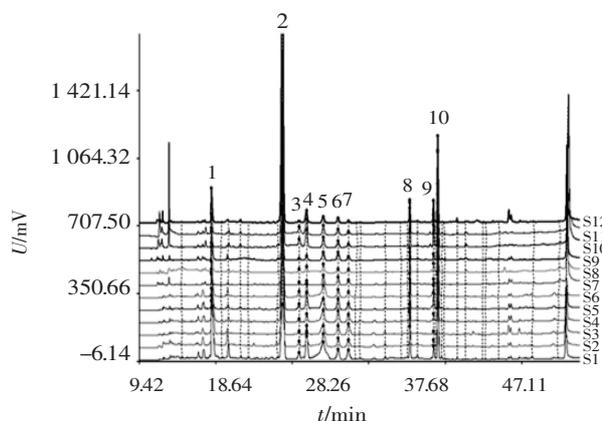


图 2 12 批穿心莲的 HPLC 叠加图

Figure 2 Overlapped HPLC chromatograms of 12 batches of *A. paniculata*

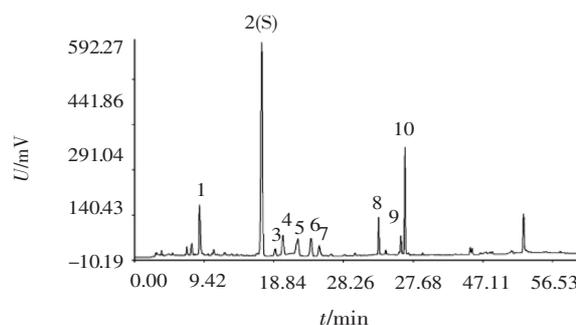


图 3 穿心莲药材对照 (R) 指纹图谱

Figure 3 The HPLC fingerprint chromatogram of reference of *A. paniculata*

2.4.3 穿心莲药材指纹图谱相似度评价 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 将 12 批穿心莲药材的 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱 (R) 相比较,计算出表 1 中 S1 ~ S12 这 12 批药材与之相似度分别为: 0.916、0.989、0.973、0.989、0.962、0.781、0.865、0.959、0.959、0.970、0.709、0.950。结果显示,在 8 批非 GAP 基地的穿心莲药材中,除购自慈德堂药店、正和堂药店和老百姓大药房的 3 批穿心莲药材的相似度分别为 0.865、0.781、0.709 外,其他各批药材指纹图谱与 R 的相似度均大于 0.95。这说明本校药圃种植的穿心莲及本次收集的大部分市售穿心莲均与 GAP 基地穿心莲药材的共有模式具有较高的相似度,均可认为属于穿心莲药材。在 4 批 GAP 基地穿心莲药材中,同为广东产的穿心莲药材相似度均大于 0.97,而广西产的穿心莲药材指纹图与 R 相比存在一定差异,相似度为 0.916。

表2 12批穿心莲药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks from 12 batches of *A. paniculata*

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
S1	0.500	1.000	1.125	1.170	1.290	1.391	1.467	1.859	2.019	2.047
S2	0.500	1.000	1.124	1.171	1.290	1.391	1.467	1.859	2.019	2.046
S3	0.503	1.000	1.125	1.170	1.290	1.393	1.467	1.859	2.018	2.047
S4	0.500	1.000	1.125	1.172	1.290	1.391	1.467	1.859	2.019	2.047
S5	0.501	1.000	1.123	1.170	1.292	1.391	1.467	1.859	2.020	2.047
S6	0.500	1.000	1.125	1.170	1.290	1.392	1.467	1.859	2.019	2.049
S7	0.500	1.000	1.127	1.171	1.291	1.391	1.467	1.859	2.019	2.047
S8	0.502	1.000	1.125	1.170	1.290	1.390	1.467	1.859	2.018	2.047
S9	0.500	1.000	1.126	1.172	1.290	1.391	1.467	1.859	2.019	2.047
S10	0.500	1.000	1.125	1.170	1.290	1.391	1.467	1.859	2.017	2.047
S11	0.500	1.000	1.125	1.170	1.290	1.391	1.467	1.859	2.019	2.048
S12	0.500	1.000	1.125	1.170	1.290	1.391	1.467	1.859	2.019	2.048

表3 12批穿心莲药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks from 12 batches of *A. paniculata*

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
S1	0.062	1.000	0.141	0.135	0.070	0.044	0.030	0.108	0.062	0.254
S2	0.085	1.000	0.009	0.042	0.024	0.017	0.007	0.032	0.036	0.135
S3	0.091	1.000	0.110	0.161	0.070	0.040	0.023	0.123	0.068	0.240
S4	0.462	1.000	0.065	0.137	0.264	0.247	0.113	0.201	0.085	0.782
S5	0.297	1.000	0.023	0.146	0.240	0.057	0.056	0.113	0.030	0.179
S6	0.478	1.000	0.090	0.132	0.321	0.113	0.106	0.180	0.039	0.502
S7	1.427	1.000	0.136	0.159	0.574	0.338	0.490	0.171	0.060	0.407
S8	0.489	1.000	0.029	0.076	0.237	0.127	0.095	0.095	0.044	0.233
S9	0.248	1.000	0.033	0.131	0.124	0.084	0.052	0.108	0.062	0.283
S10	0.290	1.000	0.044	0.125	0.261	0.081	0.059	0.162	0.057	0.469
S11	0.137	1.000	0.055	0.080	0.203	0.164	0.108	0.134	0.061	0.424
S12	0.504	1.000	0.053	0.115	0.152	0.070	0.050	0.169	0.069	0.595

2.4.4 聚类分析 将不同来源的12批穿心莲药材HPLC指纹图谱的10个共有峰的相对峰面积为特征,使用SPSS分析软件,采用组间连接法,以欧式平方距离为测度,对样品进行聚类分析。结果见图4。12批穿心莲药材可聚为2类,其中S1、S2、S3、S4、S5、S6、S8、S9、S10、S11、S12为第1类,S7为第2类。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器于200~400 nm对供试品溶液进行全波长扫描,发现在波长为226 nm时色谱图基线平稳,色谱峰数目较多且信号良好,故选择226 nm为检测波长。

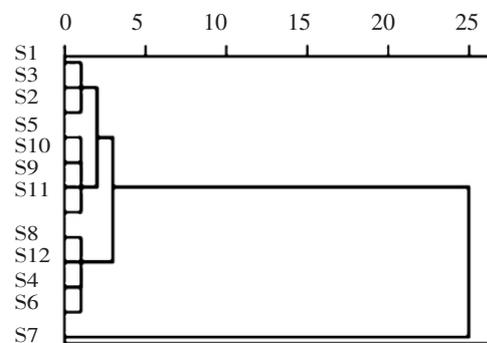


图4 12批穿心莲指纹图谱的聚类分析树状图

Figure 4 Hierarchical cluster analysis of HPLC fingerprint chromatogram of *A. paniculata*

3.2 流动相的优化 分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1% (体积分数) 磷酸溶液、甲醇-水 3 种系统的分离效果。结果表明,乙腈-水溶液作为流动相时分离效果良好。通过对不同比例乙腈-水进行反复试验,确定乙腈-水(体积比 24:76)梯度洗脱至乙腈-水(体积比 79:21)分离效果最佳,各色谱峰分离度好,峰形尖锐,保留时间适中。

3.3 穿心莲药材指纹图谱的评价 不同 GAP 基地穿心莲药材虽然都出现了相应的特征峰,但广东与广西两地产的穿心莲指纹图谱存在差异,说明穿心莲药材的质量受地理环境和气候条件影响较大。因此穿心莲药材必须固定产地,才能确保其质量的稳定可控。由相似度评价结果可知,有 2 批市售穿心莲药材与对照图谱的相似度小于 0.8,说明它们与 GAP 基地药材存在某种差异。本试验购买的所有市售穿心莲药材中穿心莲内酯的质量分数都低于来源于 GAP 基地的穿

心莲药材,充分说明了规范化种植对确保药材质量的重要意义。

参考文献:

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编:上册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996: 586-588.
- [2] 颜玉贞,谢培山. 穿心莲质量控制的再评价[J]. 中药新药与临床药理,1998,9(4):204-206.
- [3] 李明,陈伟强,胡太平,等. 穿心莲内酯对巨噬细胞炎症因子表达的影响[J]. 广东药学院学报,2010,26(4):423-425.
- [4] 蒋珍藕,饶伟源,陈秋虹,等. 穿心莲药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):6-7.
- [5] 杨琳,张振秋. 不同产地穿心莲药材高效液相指纹图谱的比较研究[J]. 中药材,2008,31(1):32-35.
- [6] 阮毅铭,彭伟文,梅全喜. 穿心莲指纹图谱的实验研究[J]. 中国民族民间医药,2009(13):26-27.

(责任编辑:刘晓涵)

Disposition of nanoparticle-based delivery system via inner ear administration

ZHANG Xiao

(广东药学院 药科学院,广东 广州 510006)

Abstract: The inner ear is difficult to access by conventional systemic drug delivery due to formidable physiological and anatomic barriers. There is an increasing interest in the treatment of inner ear disorders by topical application of drugs to the inner ear. One of the most important issues to overcome before full clinical application is the development of smart delivery systems for drugs to the target sites and controlled release in the inner ear. This is an area where nanoparticles will play an extremely important role. These submicron particles have exhibited improved biocompatibility, *in vivo* stability, target specificity, and cell/tissue uptake and internalization of the encapsulated therapeutic agents, leading to a decrease in the dose required and a decrease in side effects. This unique combination of properties makes nanoparticles a novel delivery device, which fulfils the requirements for inner ear application. This review will summarize recent findings and applications of various nanoparticle-based systems like poly (*D*, *L*-lactic/glycolic acid) nanoparticles, magnetic nanoparticles, lipid nanoparticles, liposomes, polymersomes, hydroxyapatite nanoparticles, and silica nanoparticles in the field of inner ear drug delivery. Moreover, the review will provide an insight into the future strategies of nanoparticle-based cochlear drug delivery. In conjunction, physiological considerations related to inner ear administration will be highlighted. The routes and applications for local inner-ear drug delivery will also be mentioned. In closing, this review will give an overview of the potential future development in inner ear administration with nanoparticles.

Key words: nanoparticles; cochlea; local drug delivery; intratympanic administration; round window membrane; perilymph