

【化学工程与材料】

DOI: 10.14168/j.issn.1673-4939.2015.03.02

# 浊点萃取 HPLC 法测定穿心莲中两种内酯含量

王晓中<sup>1</sup>, 杨庆凤<sup>1,2</sup> <sup>①</sup>

(1. 宁夏大学 化学化工学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学 能源化工重点实验室, 银川 750021)

**摘要:** 建立了浊点萃取高效液相色谱法测定穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的方法。选择以表面活性剂 Genapol X-080 作为萃取剂, 考察了表面活性剂浓度、液固比、盐浓度、平衡温度、平衡时间等因素对萃取结果的影响。获得最佳萃取条件为 Genapol X-080 的浓度为 0.15 g/mL; 液固比定为 100:1; 盐浓度 1.2 mol/L; 平衡温度为 60 ℃; 平衡时间为 30 min。浊点萃取是一种安全、高效、简便的样品处理方法, 在最佳条件下, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的加样回收率分别为 95.4% 和 93.7%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.84% 和 2.31%。利用此方法成功测定了穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。

**关键词:** 浊点萃取; 穿心莲; 高效液相色谱; 含量测定

**中图分类号:** O657.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4939 (2015) 03-0157-04

穿心莲 (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) 为传统常用中药材, 主要功能为清热解毒, 抗菌消炎。目前市场上使用穿心莲作为君药的方剂已有很多, 而穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯是穿心莲中的两种主要成分, 具有祛热解毒, 消炎止痛之功效, 对细菌性与病毒性上呼吸道感染及痢疾有特殊疗效, 被誉为天然抗生素药物。药典中更是以这两种成分的含量作为评价穿心莲好坏的依据。但这两种成分属于二萜类内酯化合物, 不溶于水, 在药典测定含量时使用有毒有机溶剂甲醇作为萃取溶剂, 造成对环境的污染<sup>[1]</sup>。这个问题可以通过选择适当的前处理方法来解决, 浊点萃取就是其中一种。浊点萃取技术 (Cloud Point Extraction, CPE) 是近几年发展起来的一种新型绿色液-液萃取技术, 它不使用有机溶剂作为萃取溶剂, 而是表面活性剂, 利用表面活性剂特有的浊点现象通过改变实验条件 (如温度、离子强度、酸碱度等) 促使表面活性剂相与水相分离, 已广泛应用于复杂样品体系中金属离子<sup>[2-5]</sup>、生物样品<sup>[6,7]</sup>、有机违禁物<sup>[8,9]</sup> 的分离富集, 如今也有学者利用浊点萃取富集中药中的有效成分并取得了很好的效果<sup>[10]</sup>。与常规萃取方法相比, 浊点萃取法具有环保、高效的

特点, 可以减少有机溶剂的使用, 同时省去药典方法中氧化铝柱层析除杂的过程, 更加简便。本实验采用非离子型表面活性剂 Genapol X-080 浊点萃取穿心莲中的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯, 并用高效液相色谱法测定穿心莲中两种物质的含量, 结果令人满意。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Agilent C18 柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm) (美国安捷伦公司); BS224S 电子天平 (德国赛多利斯公司); HH-1 型恒温水浴锅 (江苏省金坛环宇科学仪器厂); TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 穿心莲内酯标准品 (批号: 110797-201108)、脱水穿心莲内酯标准品 (批号: 110854-201308), 购自中国食品药品检定研究院; 表面活性剂 Genapol X-080 (C13E8) (美国西格玛公司); 甲醇、乙腈为色谱纯 (美国西格玛公司); 其它试剂均为分析纯; 水为二蒸去离子

<sup>①</sup> 收稿日期: 2015-06-15

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目 (NZ12135)

作者简介: 王晓中 (1980—), 男, 山东潍坊人, 硕士, 讲师, 研究方向: 分析新方法。

\* 通讯作者: 杨庆凤 (1980—), 女, 山东潍坊人, 博士, 副教授, 研究方向: 新材料的研究及应用。

水。

本实验所用穿心莲购自广西玉林, 经宁夏大学化学学院尤卫副教授鉴定为 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的茎叶。

## 2 实验方法

### 2.1 浊点萃取

穿心莲用粉碎机粉碎, 过 250  $\mu\text{m}$  筛备用。准确称取穿心莲粉末 0.2 g, 置于 25 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.15 g/mL 的 Genapol X-080 水溶液, 超声提取 30 min, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入适量 NaCl 溶液, 置 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中 30 min 至溶液分层, 再 3 500 r/min 离心 10 min, 弃去下层水相, 上层黏稠表面活性剂相用 2 mL 甲醇稀释, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 进高效液相检测。

### 2.2 对照品混合溶液

精密称取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯各 2.0 mg 置于 10 mL 容量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。储备液置于冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  以下保存。

### 2.3 色谱条件

Agilent C18 柱 (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为: 甲醇-水 (54 : 46); 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 232 nm; 流速: 1 mL/min。

## 3 结果与讨论

### 3.1 表面活性剂的选择

在浊点萃取方法的研究中, 经常用到的表面活性剂有 Triton X-114, Triton X-100, PONPE-7.5 等。但这些表面活性剂结构中均含有苯环, 在紫外吸收区有吸收, 从而影响紫外检测器的使用。而 Genapol X-080 疏水基为十三烷基, 在紫外区无吸收。同时 Genapol X-080 出现浊点的温度 (42  $^{\circ}\text{C}$ ) 较低, 分层温度比较容易实现, 故选择 Genapol X-080 作为萃取剂。

### 3.2 Genapol X-080 浓度对萃取率的影响

使用 Genapol X-080 作为萃取溶剂, Genapol X-080 的浓度会影响到萃取率, 实验考察了加入 20 mL 萃取剂, 置 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中 30 min 时, Genapol X-080 浓度对萃取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的影响。结果见图 1, 当表面活性剂的浓度达到 0.15 g/mL 时, 萃取的两种物质的含量已基本达到最高, 后面随着表面活性剂浓度的增加, 萃取结果没有很大变化, 但浓度较高时分层后的表面活性剂相过于黏稠, 影响操作。故 Genapol X-080 的浓度选为 0.15 g/mL。

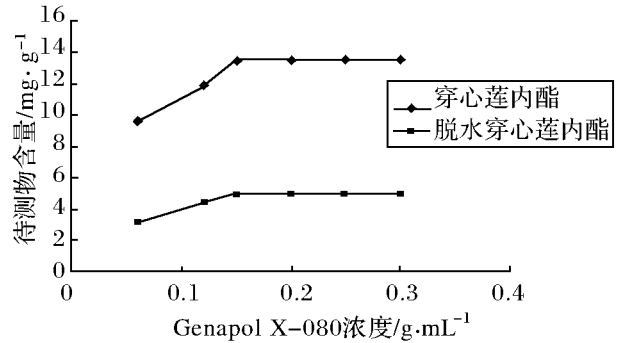


图1 Genapol X-080对萃取结果的影响

### 3.3 液固比对萃取率的影响

表面活性剂的体积 (V) 与被萃取物穿心莲质量 (m) 的液固比 (V/m) 会影响萃取结果, 实验考察了加入不同体积 0.15 g/mL 的 Genapol X-080 水溶液, 置恒温水浴中 30 min 时, 不同液固比 (V/m) 下的萃取结果。结果见图 2, 当液固比在 100:1 附近时萃取率已基本达到最高, 后面随着液固比 (V/m) 的增加, 对萃取结果影响不大, 考虑到成本问题, 所以液固比定为 100:1。

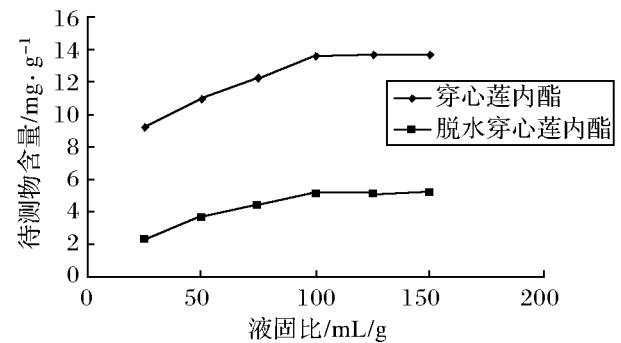


图2 液固比对萃取结果的影响

### 3.4 盐浓度对萃取率的影响

添加适量惰性盐可以加快两相分离的速度, 缩短时间, 同时可以降低萃取物在水相中的溶解度, 提高萃取率<sup>[11]</sup>。实验考察了加入 20 mL 0.15 g/mL 的 Genapol X-080 水溶液, 置 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中 30 min 时, 不同 NaCl 浓度对萃取率的影响。结果表明, 当 NaCl 浓度达到 1.2 mol/L 时, 萃取率最高。

### 3.5 平衡温度和平衡时间对萃取率的影响

温度为影响浊点萃取的重要因素, 只有当平衡温度高于表面活性剂的浊点温度, 溶液才会分为两相。通常理论上选择高于表面活性剂的浊点温度 15~20  $^{\circ}\text{C}$  作为平衡温度。已知表面活性剂 Genapol X-080 的浊点温度为 42  $^{\circ}\text{C}$ , 实验考察了加入 20 mL 0.15 g/mL 的 Genapol X-080 水溶液, 置恒温水浴中 30 min, NaCl 浓度达到 1.2 mol/L 时, 平衡温度在 55~65  $^{\circ}\text{C}$  之间萃取率最高, 故选择平衡

温度为 60 ℃。固定平衡温度为 60 ℃, 盐浓度为 1.2 mol/L, 根据不同平衡时间测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的萃取率, 结果表明, 当平衡时间在 30 ~ 40 min 之间萃取率最高, 故选择平衡时间为 30 min。

### 3.6 方法学考察

#### 3.6.1 线性关系

精密移取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的对照品混合溶液适量, 以甲醇定容于 10 mL 容量瓶中, 配制成穿心莲内酯浓度分别为 0.22、0.55、1.375、2.75、5.5、11、22 μg/mL; 脱水穿心莲内酯浓度分别为 0.21、0.525、1.312、2.625、5.25、10.521 μg/mL 的溶液。分别取上述溶液各 20 μL, 平行进样 3 次, 取平均值。结果表明, 在 0.22 ~ 22 μg/mL 及 0.21 ~ 21 μg/mL 范围内, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯浓度 ( $X$ , μg/mL) 与峰面积 ( $Y$ ) 呈现良好的线性关系。回归方程分别为:  $Y = 24.217X + 2.8738$ ,  $R = 0.9992$ ;  $Y = 25.635X + 6.797$ ,  $R = 0.9990$ 。

#### 3.6.2 精密度试验

按最优条件制备同一批样品的供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样 20 μL, 测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的峰面积。计算穿心莲内酯和脱水

穿心莲内酯峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 2.16% 和 2.47%。

#### 3.6.3 稳定性试验

供试品溶液在 0 ~ 12 h 内每隔 2 h 进样 20 μL, 测定峰面积, 计算样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 2.23% 和 2.92%。结果表明在 12 h 内供试品溶液稳定。

#### 3.6.4 重复性试验

取同一批样品 6 份按最优条件制得 6 份供试品溶液, 分别取上述溶液各 20 μL, 进高效液相色谱仪测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的峰面积。计算穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 2.05% 和 2.33%, 重复性良好。

#### 3.6.5 加样回收率试验

取已知含量 (其中穿心莲内酯 13.76 mg/g, 脱水穿心莲内酯 5.22 mg/g) 的穿心莲粉末 3 份, 每份 0.2 g, 加入穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品适量, 按 (2.1) 项所述的方法操作, 制得 3 份供试品溶液, 每次进样 20 μL, 测定峰面积, 计算穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的加样回收率。穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品及样品分离的色谱图见图 3, 结果见表 1。

表 1 加样回收率结果

成分	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
穿心莲内酯	2.76	2.80	5.43	95.4	95.4	1.84
	2.75	2.80	5.37	93.6		
	2.76	2.80	5.48	97.1		
脱水穿心莲内酯	1.04	1.00	1.99	95.0	93.7	2.31
	1.05	1.00	1.99	94.0		
	1.05	1.00	1.97	92.0		

### 3.7 样品测定

按最优化浊点萃取条件制备穿心莲供试品溶液及按文献报道的传统方法<sup>[12]</sup>制备供试品溶液, 与对照品溶液分别进高效液相检测, 外标法计算穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。结果见表 2。

表 2 含量测定结果

成分	浊点萃取法		传统方法测定	
	测定含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%
穿心莲内酯	13.37	2.38	13.76	1.93
脱水穿心莲内酯	5.04	2.74	5.22	2.59

## 4 结论

浊点萃取是一种新型的双水相萃取方法, 因其在处理样品过程中很少使用有机溶剂, 与传统方法相比较具有低成本、易处理、高效率等优点, 越来越受到人们的重视。本文利用非离子型表面活性剂 Genapol X-080 浊点萃取穿心莲中的两种二萜类内酯化合物, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯并利用 HPLC 法测定其含量, 取得了比较满意的结果。与常规方法相比较, 在保证测量结果准确的同时可以减少有害有机溶剂的使用, 减少对环境的污染, 同时省去药典测定方法中过中性氧化铝柱除杂的过程, 更加简便、快捷, 同时可以为应用浊点萃取法富集分离其他复杂性痕量成分提供参考。

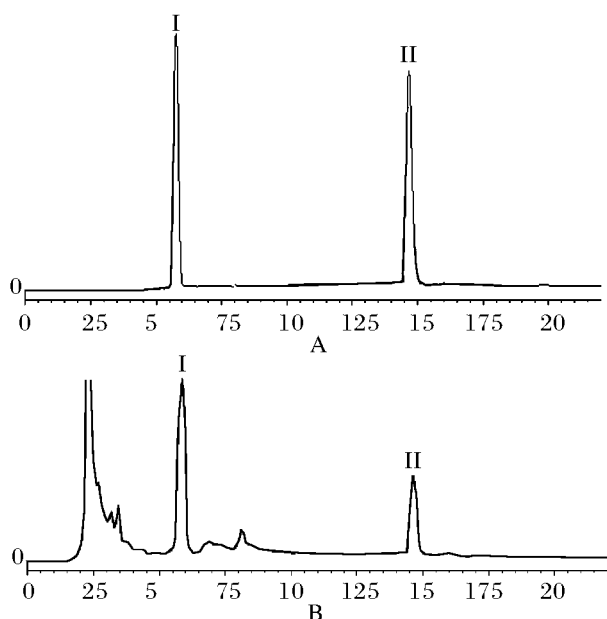


图3 穿心莲内酯 ( I ) 和脱水穿心莲内酯 ( II )  
对照品 ( A ) 及样品 ( B ) 的色谱图

#### 参考文献:

- [1] 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, 2010: 252.
- [2] ZHU X S, ZHU Z, WU S B. Determination of trace vanadium in soil by cloud point extraction and graphite furnace atomic absorption spectroscopy [J]. *Microchimica Acta*, 2008, 161 (1-2): 143-148.
- [3] TONG S S, JIA Q, SONG N Z, et al. Determination of gold (III) and palladium (II) in mine samples by cloud point extraction preconcentration coupled with flame atomic absorption spectrometry [J]. *Microchimica Acta*, 2011, 172 (1-2): 95-102.
- [4] HAYATI F, DUYGU A. Determination of vanadium in food samples by cloud point extraction and graphite furnace atomic absorption spectroscopy [J]. *Food Analytical Methods*, 2012, 5 (3): 359-365.
- [5] 王晓中, 杨庆凤. 浊点萃取石墨炉原子吸收光谱法测定宁夏枸杞中的镉和铅 [J]. *辽东学院学报: 自然科学版*, 2014, 21 (4): 229-232.
- [6] ZHOU J, CHEN J, CHENG Y, et al. Determination of prometryne in water and soil by HPLC-uV using cloud-point extraction [J]. *Talanta*, 2009, 9 (2): 189.
- [7] KUKUSAMUDE C, SANTATAD A, BOONCHIANGMA S, et al. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography [J]. *Talanta*, 2010, 81 (1-2): 486-492.
- [8] TAN Z J, LI F F. Cloud-point extraction and preconcentration of bisphenol A from water samples [J]. *Journal of Central South University*, 2012, 19 (8): 2136-2141.
- [9] REVIA R L, MAKHARADZE G A. Cloud-point preconcentration of fulvic and humic acids [J]. *Talanta*, 1999, 48 (2): 409-413.
- [10] ZHOU J, SUN X L, WANG S W. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1200, (2): 93-99.
- [11] MAHUGO SANTANA C, SOSA FERRERA Z, SANTANA RODRIQUEZ J J. Use of non-ionic surfactant solutions for the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water prior to their HPLC-UV detection [J]. *Analyst*, 2002, 127 (8): 1031-1037.
- [12] 杨琳, 赵昕, 王锦, 等. HPLC法同时测定穿心莲中两种内酯的含量 [J]. *中国药事*, 2010, 24 (7): 690-692.

(责任编辑: 鞠衍清)

## Determination of Andrographolide and Dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* by Cloud Point Extraction Coupled with HPLC

WANG Xiao-zhong<sup>1</sup>, YANG Qing-feng<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. Key Laboratory of Energy & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** A new method was developed for the determination of andrographolide and dehydroandrographolide content in *Andrographis paniculata* by cloud point extraction coupled with HPLC. The surfactant Genapol X-080 was chosen as the extract solvent. Some affecting factors such as the concentration of surfactant, liquid and solid ratio, concentration of sodium chloride, equilibration temperature and equilibration time were investigated and optimized. The optimum conditions were achieved of 0.15 g/mL surfactant concentration, 100:1 liquid and solid ratio, 1.2 mol/L sodium chloride concentration for 30 min under 60 °C. This method is safe, efficient and easy. Under the optimum conditions, the average recoveries of andrographolide and dehydroandrographolide were 95.4% and 93.7%, while RSD were 1.84% and 2.31%. The method was successfully applied to determine andrographolide and dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata*.

**Key words:** cloud point extraction; *Andrographis paniculata*; HPLC; content determination