

· 中药工业 ·

基于 UPLC 含量测定的不同厂家穿心莲胶囊质量评价

赵振霞, 苏建, 孔亚萍, 刘永利*

河北省药品检验研究院, 石家庄 050011

[摘要] 目的: 建立同时测定穿心莲胶囊中穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量的方法, 并对不同厂家产品的质量进行评价。方法: 采用双波长超高效液相色谱法测定穿心莲胶囊中穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯的含量。色谱条件为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 225 nm (穿心莲内酯)、254 nm (脱水穿心莲内酯)。结果: 在建立的检测条件下, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯均能达到基线分离, 两者的进样量线性范围分别为 0.082 6 ~ 2.064 8 ($r = 0.999\ 9$)、0.040 8 ~ 1.019 7 μg ($r = 0.999\ 9$); 平均加样回收率分别为 98.7%、100.7% (RSD 分别为 1.0%、1.8%, $n = 9$)。27 批穿心莲胶囊样品中, 穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯的含量分别为 0.94 ~ 7.50、5.62 ~ 10.12 mg/粒。结论: 建立的方法操作简便、快速, 可用于穿心莲胶囊的质量控制及评价。

[关键词] 穿心莲胶囊; 超高效液相色谱法; 含量测定; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯

[中图分类号] R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)09-1545-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191014001

Evaluation on Quality of Chuanxinlian Capsule from Various Manufacturers Based on Content Determination of UPLC

ZHAO Zhen-xia, SU Jian, KONG Ya-ping, LIU Yong-li*

Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining the contents of andrographolide and dehydroandrographolide in chuanxinlian capsule, and evaluate the quality of chuanxinlian capsule from various manufacturers. **Methods:** UPLC method was adopted. The samples were conducted by ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and eluted with acetonitrile-water as the mobile phase with gradient elution and the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 225 nm (andrographolide), 254 nm (dehydroandrographolide). **Results:** Under this condition, andrographolide and dehydroandrographolide could be separated in baseline. The linear range of them were 0.082 6-2.064 8 ($r = 0.999\ 9$) and 0.040 8-1.019 7 μg ($r = 0.999\ 9$). The average recovery rates were 98.7% and 100.7% (RSD = 1.0% and 1.8%, $n = 9$). The content of andrographolide and dehydroandrographolide in sample of 27 batches were 0.94-7.50 and 5.62-10.12 mg/capsule. **Conclusion:** The established method is simple and rapid, and can be used for the quality control and evaluation of chuanxinlian capsule.

[Keywords] Chuanxinlian capsule; UPLC; content determination; andrographolide; dehydroandrographolide

穿心莲胶囊是由穿心莲单味药制成的中成药, 具有清热解毒、凉血消肿的功效, 是临床常用清热解毒用药, 主要用于咽喉肿痛、口舌生疮等^[1]。穿心莲主要有效成分为穿心莲内酯 (andrographolide, AP)、脱水穿心莲内酯 (dehydroandrographolide, DAP)、去氧穿心莲内酯和新穿心莲内酯等二萜内酯类成分, 其中 AP 和 DAP 含量较高, 在解热消炎、抗肿瘤等方面具有

较强的药理作用^[2-4]。全国穿心莲胶囊的生产企业共有 28 家, 此次依托国家药品评价抽验, 在全国药品生产、经营、使用单位共抽取了 27 批样品, 涉及 4 个生产企业, 基本覆盖了目前市场上主流产品。本研究采用超高效液相色谱法 (UPLC), 建立了同时测定穿心莲胶囊中 AP 与 DAP 含量的方法, 对 27 批穿心莲胶囊样品的含量进行分析, 发现了穿心莲胶囊的主要

* [通信作者] 刘永利, 主任药师, 研究方向: 中药质量控制方法研究; Tel: (0311)85212008-8041, E-mail: liuyongli2008@126.com

质量问题,为药品生产企业改进质量与完善质量标准提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(配备四元泵、DAD 检测器,美国 Waters 公司);AE240 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

AP 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110797-201609,纯度:99.7%);DAP 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110854-201509,纯度:99.4%);穿心莲胶囊样品抽自全国药品生产、经营、使用单位;甲醇、乙腈(色谱纯,Merck,Germany);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m);以乙腈为流动相 A,水为流动相 B,梯度洗脱(0~5 min, 10%~15% A; 5~15 min, 15%~22% A; 15~20 min, 22%~25% A; 20~30 min, 25%~35% A);柱温:30 $^{\circ}$ C,流速:0.3 mL·min⁻¹;检测波长:225 nm(AP)、254 nm(DAP)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取 AP 对照品、DAP 对照品 10.45、10.90 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成质量浓度分别为 0.208 4、0.216 7 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,即得。

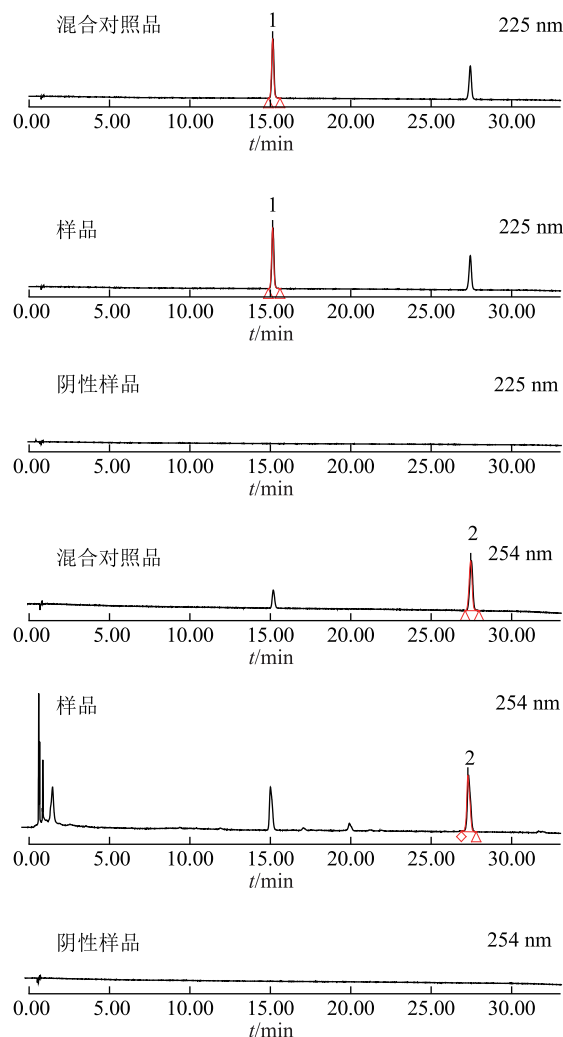
2.2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的本品,研细,取约 1 粒的量,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 取穿心莲胶囊阴性样品粉末适量(按处方及工艺,制备不含穿心莲的阴性样品),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频

率 40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性实验

精密量取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在该色谱条件下,AP 和 DAP 与相邻成分均可达到较好的分离,分离度 > 1.5,理论板数以 AP 峰计不低于 5000,且阴性无干扰,说明系统适用性良好,见图 1。



注: 1. AP; 2. DAP。

图 1 穿心莲胶囊专属性 UPLC 图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 依次精密量取不同浓度的 AP 对照品溶液与 DAP 对照品溶液 2 μ L,分别注入超高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定,以对照品进样量(μ g)为横坐标,峰面积积分值为纵坐

标, 绘制标准曲线, 计算线性回归方程。结果表明, AP 在 $0.082\ 6 \sim 2.064\ 8\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系, 回归方程: $Y = 7.863 \times 10^6 X + 6.103 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$); DAP 在 $0.040\ 8 \sim 1.019\ 7\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系, 回归方程: $Y = 6.239 \times 10^6 X + 5.327 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$)。

2.4.2 稳定性试验 取按 2.2 项下制备的同一份穿心莲胶囊供试品溶液, 照 2.1 项下的色谱条件分别在 0、1、2、4、8、16、24 h 进样测定, 记录峰面积, AP 和 DAP 峰面积的 RSD 分别为 0.85%、1.24%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批穿心莲胶囊样品, 研细, 取 0.15、0.30、0.45 g, 各 3 份, 精密称定, 分别按 2.2 项下制备方法制备供试品溶液, 照 2.1 项下的色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 计算得到 AP 和 DAP 的平均质量分数分别为 46.64、17.99 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.1%、1.6%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 精密称取已知含量的穿心莲胶囊样品约 0.15 g, 共 9 份, 分别加入低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液, 按 2.2 项下制备方法制备供试品溶液, 照 2.1 项下的色谱条件进样测定, 计算回收率及其 RSD, 结果见表 1, 表明该方法回收率较好。

表 1 穿心莲胶囊中 AP 与 DAP 加样回收率试验结果 ($n=9$)

成分	样品中 含量/mg	对照品加 入量/mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
AP	7.091 6	3.692 7	10.683 5	97.27	98.7	1.0
	7.203 6	3.692 7	10.834 5	98.33		
	7.086 0	3.692 7	10.775 8	99.92		
	7.153 2	7.385 4	14.521 7	99.77		
	7.253 9	7.385 4	14.498 5	98.09		
	7.102 8	7.385 4	14.332 5	97.89		
	7.024 5	11.078 1	18.003 7	99.11		
	7.147 6	11.078 1	18.122 7	99.07		
	7.080 4	11.078 1	18.115 4	99.61		
	2.735 8	1.411 9	4.132 5	98.92		1.8
	2.779 0	1.411 9	4.159 8	97.80		
	2.733 6	1.411 9	4.171 2	101.82		
	2.759 6	2.823 9	5.596 4	100.46		
	2.798 4	2.823 9	5.567 9	98.07		
	2.740 1	2.823 9	5.573 8	100.35		
	2.709 9	4.235 8	6.953 2	100.18		
	2.757 4	4.235 8	6.997 8	100.11		
	2.731 5	4.235 8	6.984 7	100.41		
DAP	2.735 8	1.411 9	4.132 5	98.92	100.7	1.8
	2.779 0	1.411 9	4.159 8	97.80		
	2.733 6	1.411 9	4.171 2	101.82		
	2.759 6	2.823 9	5.596 4	100.46		
	2.798 4	2.823 9	5.567 9	98.07		
	2.740 1	2.823 9	5.573 8	100.35		
	2.709 9	4.235 8	6.953 2	100.18		
	2.757 4	4.235 8	6.997 8	100.11		
	2.731 5	4.235 8	6.984 7	100.41		
	2.735 8	1.411 9	4.132 5	98.92		
	2.779 0	1.411 9	4.159 8	97.80		
	2.733 6	1.411 9	4.171 2	101.82		

2.5 样品测定

精密吸取按 2.2 项下方法制备的穿心莲胶囊供试品溶液, 照 2.1 项下的色谱条件依次进样测定, 按外

标法计算各样品中 AP 和 DAP 的含量, 结果见表 2, 不同生产企业之间测定结果比较的箱式图见图 2。

表 2 穿心莲胶囊中 AP 与 DAP 的含量测定结果

		mg/粒		
样品编号	来源	批号	AP	DAP
1	南京厚生药业有限公司	170404	2.82	6.01
2	南京厚生药业有限公司	170403	2.89	6.38
3	南京厚生药业有限公司	170301	2.98	6.56
4	南京厚生药业有限公司	170102	2.00	6.77
5	南京厚生药业有限公司	170103	2.03	7.15
6	南京厚生药业有限公司	170202	2.37	7.41
7	南京厚生药业有限公司	170402	2.67	5.84
8	南京厚生药业有限公司	170302	3.26	7.36
9	四川好医生攀西药业有限责任公司	170608	3.39	5.62
10	四川好医生攀西药业有限责任公司	170607	2.88	6.23
11	四川好医生攀西药业有限责任公司	170609	4.26	6.84
12	四川好医生攀西药业有限责任公司	170606	3.16	6.13
13	四川好医生攀西药业有限责任公司	170206	0.94	7.05
14	四川好医生攀西药业有限责任公司	160502	1.78	5.74
15	四川好医生攀西药业有限责任公司	170902	4.43	7.15
16	江西恒康药业有限公司	20170802	2.32	8.37
17	江西恒康药业有限公司	20170502	1.65	10.12
18	江西恒康药业有限公司	20170504	1.12	7.57
19	江西恒康药业有限公司	20170801	1.85	7.31
20	江西恒康药业有限公司	20170901	2.44	7.64
21	江西恒康药业有限公司	20170505	1.00	7.77
22	江西恒康药业有限公司	20170503	1.44	9.51
23	江西恒康药业有限公司	20180102	2.80	9.26
24	广西千珍制药有限公司	170402	7.50	8.88
25	广西千珍制药有限公司	170501	7.02	10.11
26	广西千珍制药有限公司	170901	5.24	8.33
27	广西千珍制药有限公司	171101	5.63	8.73

含量测定结果显示, 27 批穿心莲胶囊样品中, AP 与 DAP 的含量分别为 $0.94 \sim 7.50$ 、 $5.62 \sim 10.12\ \text{mg/粒}$ 。箱式图显示, 不同生产企业之间 DAP 的含量相差较小, 测定结果较为集中; 而 AP 的含量相差悬殊, 部分样品的测定结果较低; 表明生产企业在生产中未关注 AP 含量, 只关注了法定标准中测定的 DAP 含量。另外, 各企业样品都是 DAP 含量 $>$ AP 含量, 与药材中两者含量相反^[5-7], 可能与药材质量、生产工艺等有关。

AP 聚类分析(见图 3)显示, 广西千珍制药有限公司的样品单独聚为一类, 说明与其他企业之间存在明显差异, 从测定结果也可以看出广西千珍制药有限公司的样品含量测定值比其他企业要高; DAP 聚类分析结果显示, 各企业不同批次之间样品含量测定结果都有交叉, 说明企业之间的差异性较小。

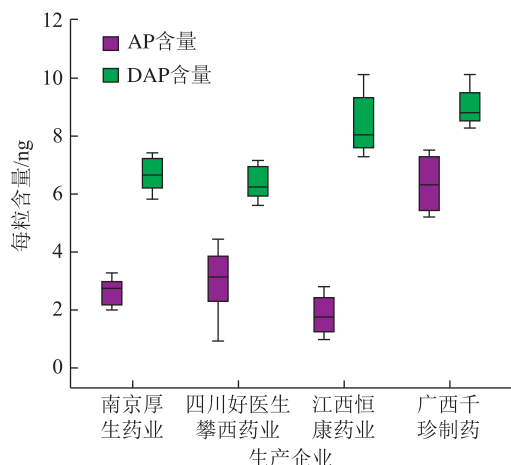
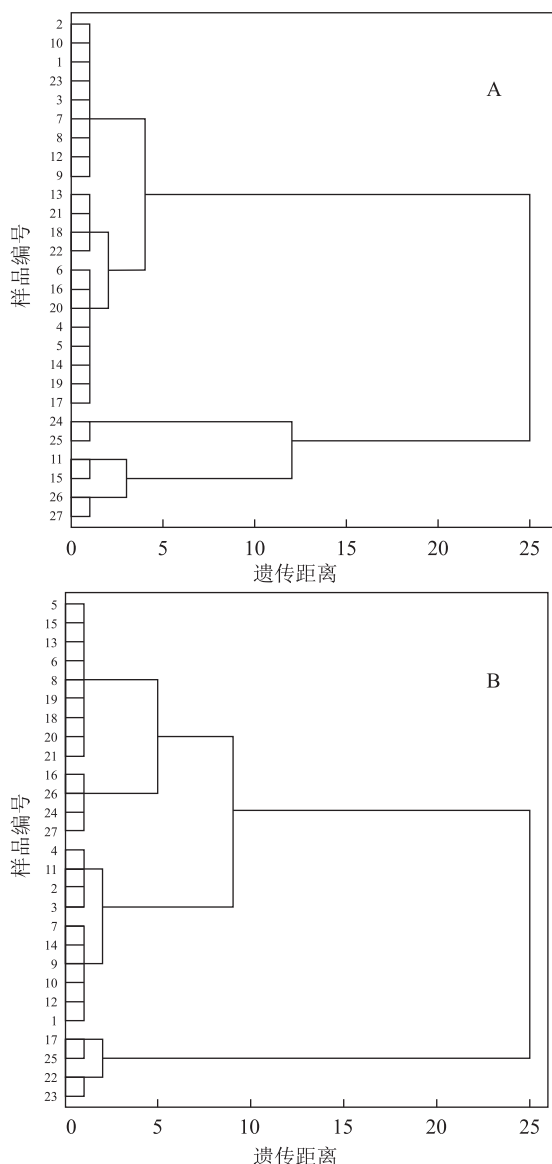


图2 穿心莲胶囊中AP与DAP的含量测定结果



注: A. AP; B. DAP; 使用平均联接(组间)的树状图重新调整距离聚类合并。

图3 穿心莲胶囊含量测定聚类分析结果

3 讨论

3.1 提取条件的选择

在前期实验中考察了回流提取法和超声提取法对样品中AP和DAP提取量的影响。结果表明,回流和超声对两者的提取量差异无统计学意义,且超声提取法简单、方便,故确定超声提取法为样品提取方法。还对40%甲醇、60%甲醇、80%甲醇和甲醇等不同提取溶剂进行考察,结果表明,采用甲醇为溶剂提取效果最好。

3.2 检测波长的选择

采用紫外全波长光谱扫描得到AP最大吸收波长在225 nm处,DAP最大吸收波长在254 nm处,选用其中任意一个波长,另一组响应值都较低,因此选定双波长法对样品进行测定。

3.3 样品质量评价

中成药是通过整体作用而发挥疗效,因此生产中需尽可能关注所有成分的变化情况,而不是仅仅关注质量标准中测定的指标成分。此次样品测定结果表明,企业只关注了法定标准中规定的DAP含量,未关注AP含量,而AP稳定性较差,在提取过程中易降解^[8],文献报道通过合适的工艺参数可有效提高AP的转移率^[9-10],因此企业需优化工艺参数,保证AP与DAP的转移率。

3.4 意义

鉴于中药的特殊性,采用何种方法对其质量进行评价,是目前行业内亟须解决的关键问题^[11-12]。虽然多成分的含量测定技术并不足以对产品不同批次质量的一致性进行科学全面的评价,但在实际生产过程中,厂家可以通过对这2种主要成分含量变化的关注,快速、科学地评价产品质量。另外,本研究对穿心莲胶囊的质量标准的提高也具有重要意义。

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,2015:1309.
- [2] SHAILAJA A, BINDU B B V, SRINATH M, et al. In silico structural and functional analysis of copalyl diphosphate synthase enzyme in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: A plant of immense pharmaceutical value[J]. Ann Phytomed, 2018, 7(1): 69-77.
- [3] 王丽娟, 湛立巍, 何巧, 等. 穿心莲内酯的协同抗菌作用及相关机制研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 45-49.

(下转第1575页)

- [63] AMMAD F, MOUMEN O, GASEM A, et al. The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood [J]. C R Biol, 2018, 341(2):97-101.
- [64] CHUTIA M, DEKA-BHUYAN P, PATHAK M G, et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India [J]. Food Sci Technol, 2009, 42(3):777-780.
- [65] PRAKASH B, SINGH P, MISHRA P K, et al. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 153(1/2):183-191.
- [66] 弭向辉, 龚祝南, 张卫明, 等. 花椒挥发油的提取、分离和抗菌实验 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2004, 27(4):63-66.
- [67] HYLDGAARD M, MYGIND T, MEYER R L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components [J]. Front Microbiol, 2012, 3:12.
- [68] ULTEE A, WELLS-BENNIK M, MOEZELAAR R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* [J]. Appl Environ Microb, 2002, 68(4):1561-1568.
- [69] BURT SA. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 94(3):223-253.
- [70] ROSANGELA D P. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media [J]. J Agr Food Chem, 2006, 54(7):2745-2749.
- [71] SIROLI L, PATRIGNANI F, GARDINI F, et al. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* [J]. Food Chem, 2015, 182:185-192.
- [72] GRIFFIN S G, WYLLIE S G, MARKHAM J L, et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity [J]. Flavour Frag J, 1999, 14(5):322-332.
- [73] CARSON C F, MEE B J, RILEY T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy [J]. Antimicrob Agents Ch, 2002, 46(6):1914-1920.
- [74] OUSSALAH M, CAILLET S, LACROIX M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* [J]. J Food Protect, 2006, 69(5):1046-1055.
- [75] SOYLU E M, SOYLU S, KURT S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans* [J]. Mycopathologia, 2006, 161(2):119-128.
- [76] VERCESI A E, KOWALTOWSKI A J, GRIJALBA M T, et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition [J]. Biosci Rep, 1997, 17(1):43-52.

(收稿日期: 2019-06-07 编辑: 王笑辉)

(上接第1548页)

- [4] 崔丹丹, 曾令杰, 黄嘉玲, 等. 基于主成分聚类 and PLS 回归分析的穿心莲质量等级评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13):3200-3206.
- [5] 黄竞怡, 刘小琳, 周水平, 等. 穿心莲 UPLC-PDA 指纹图谱研究及 4 种内酯类成分含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21):4240-4245.
- [6] 程帆, 刘鹏, 刘地发, 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):56-58.
- [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] 杨东升, 陈松光, 欧阳惠芳, 等. 穿心莲流膏中穿心莲内酯类成分在烘干过程中的变化 [J]. 中成药, 2003, 25(11):868-870.
- [9] 范文成, 王岳, 韩月芝, 等. 不同提取浓缩干燥工艺对穿心莲内酯类成分的影响 [J]. 中国药业, 2014, 23(2):54-56.
- [10] 褚晨亮, 曾令杰, 翁海鹏. 穿心莲提取液膜浓缩工艺研究 [J]. 中成药, 2012, 34(11):2255-2257.
- [11] 杨冰, 封亮, 贾晓斌. 基于“组分结构”特征的中药制剂质量评价策略 [J]. 中草药, 2019, 50(17):4003-4007.
- [12] 张南平, 余坤子, 魏峰, 等. 中药材质量的本质与评价方法探讨 [J]. 中国药事, 2018, 32(1):48-53.

(收稿日期: 2019-10-14 编辑: 王笑辉)