

## 穿心莲内酯原料中有关物质和稳定性研究

胡向青, 巴晓雨, 郝福, 武勇, 周学刚

神威药业集团有限公司 河北省中药注射剂工程技术研究中心, 河北 石家庄 051430

**摘要:** **目的** 建立 RP-HPLC 法测定穿心莲内酯中有关物质, 并对穿心莲内酯原料进行不同影响因素的稳定性考察, 了解影响其稳定性的具体因素。**方法** 采用反相高效液相色谱法, 菲罗门 Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 224 nm, 柱温为 30 °C, 体积流量为 1.0 mL/min, 流动相为乙腈-甲醇-水梯度洗脱。考察穿心莲内酯原料药在不同 pH 值、氧化、高温、高湿、强光照条件下的稳定性。**结果** 穿心莲内酯及其 3 个有关物质得到了很好地分离, 所建立的有关物质方法经验证, 表明专属性、重复性及稳定性均良好。穿心莲内酯固体状态较为稳定; 在溶液状态对氧化和 pH 3~5 条件较为稳定, 在碱性介质、高温、光照条件下均不稳定。**结论** 该方法可以很好地用于穿心莲内酯的质量控制, 穿心莲内酯在溶液状态下总体稳定性较差, 该结果为穿心莲内酯及其相关制剂研究提供一定参考。

**关键词:** 穿心莲内酯; 有关物质; 稳定性; 高效液相色谱

**中图分类号:** R927.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)04-0523-05

**DOI:**10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.014

## Related substances and their stability of andrographolide in raw materials

HU Xiang-qing, BA Xiao-yu, HAO Fu, WU Yong, ZHOU Xue-gang

Hebei Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine Injection, Shineway Pharmaceutical Group Co. Ltd, Shijiazhuang 051430, China

**Abstract: Objective** To establish a selective RP-HPLC method for the determination of related substances in andrographolide, and to investigate the stability of them affected by different factors. **Methods** RP-HPLC method was used on Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at the temperature of 30 °C. The mobile phases consisted of acetonitrile, methanol, and water. The flow rate was set at 1.0 mL/min and the UV detection was performed at 224 nm. This method was applied to evaluate the stability of andrographolide in solid and liquid forms by the following conditions: different pH values, oxidation, high temperature, high humidity, and strong light. **Results** The andrographolide and three related substances were separated. The developed method was further validated and proved to be sensitive, precise, and stable. The andrographolide in solid state was stable relatively, and its liquid state was also stable relatively in oxidation and pH 3-5 conditions; however in the conditions of alkaline, high temperature and light, andrographolide was proved not to be stable. **Conclusion** The method is successfully applied to the quality control of andrographolide. The andrographolide in liquid state has poor stability, and the results could give some references for the preparation study.

**Key words:** andrographolide; related substances; stability; HPLC

穿心莲内酯系自爵床科穿心莲属植物穿心莲 *Andrographis Paniculata* (Brum. f.) Nees 中提取得到的二萜内酯类化合物, 是穿心莲的有效活性成分之一。同时存在于穿心莲中的还有新穿心莲内酯 (neoandrographolide)、去氧穿心莲内酯 (deoxyandrographolide) 以及脱水穿心莲内酯 (dehydroandrographolide) 等二萜内酯类化合物。

这些化合物有些是在提取过程中引入的, 也有通过降解或内部转化而成<sup>[1-5]</sup>。穿心莲内酯具有酯类结构, 在水溶液中易水解、开环、异构化、树脂化而影响原料和制剂的质量, 但影响稳定性的具体因素却未见报道。本实验建立了一种简便的 HPLC 法用于穿心莲内酯中有关物质的测定, 并采用该方法考察了原料在不同影响因素作用下的稳定性, 为制剂

收稿日期: 2013-01-31

作者简介: 胡向青, 药剂学硕士, 工程师, 研究方向为药物新制剂的研究与开发。Tel: (0316) 5759866-8654 E-mail: sun@shineway.com

工艺研究、储藏条件的制定提供依据。

## 1 仪器与试药

MS105DU 电子天平、Delta 320 pH 计 (梅特勒-托利多公司), Agilent1200 高效液相色谱仪 (安捷伦公司), SHH-200GD-I 型光照试验箱 (重庆永生实验仪器厂), SHH-250SD 型恒温恒湿箱 (重庆永生实验仪器厂), KQ5200 DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

穿心莲内酯原料 (四川省玉鑫药业有限公司, 批号 110701, 质量分数 99.0%), 穿心莲内酯 (批号 110797-201108, 质量分数 98.7%)、脱水穿心莲内酯 (批号 110854-201007, 质量分数 99.7%) 对照品 (中国食品药品检定研究院), 新穿心莲内酯 (批号 11082301, 质量分数 99.2%)、去氧穿心莲内酯 (批号 11063001, 质量分数 89.0%) 对照品 (上海纯优生科技有限公司), 甲醇、乙腈均为色谱纯, 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、双氧水、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯, 水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 有关物质测定方法的建立和验证

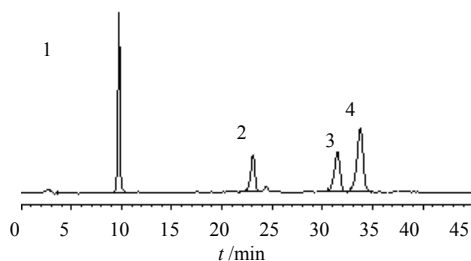
**2.1.1 杂质对照品的选择** 穿心莲叶中主要含有的内酯成分包括穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、8-甲基新穿心莲内酯苷、3-脱氢脱氧穿心莲、新穿心莲内酯苷元等一系列穿心莲内酯衍生物<sup>[1,3]</sup>, 其中主要存在的成分为前 4 种, 这些成分在提取过程容易引入或通过降解和内部转化而成, 且这些成分结构相近, 较难分离, 故在建立测定穿心莲内酯中有关物质方法中, 以新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯作为杂质对照品来验证方法的专属性。

**2.1.2 色谱条件** 菲罗门 Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 224 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 以水-乙腈-甲醇为流动相, 进行梯度洗脱: 0~18 min、水-乙腈-甲醇 (70:30:0), 18~50 min、水-乙腈-甲醇 (65:30:5), 后运行 15 min。

**2.1.3 溶液的制备** 取穿心莲内酯原料约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。精密量取 1 mL 溶液, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

**2.1.4 系统适用性试验** 精密称取穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对

照品适量, 用甲醇溶解并稀释, 制备质量浓度依次为 0.03、0.1、0.08、0.05 mg/mL 的混合对照品溶液, 作为系统适用性溶液。按以上色谱条件测试系统适用性溶液, 结果穿心莲内酯的理论板数不低于 3 000, 去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯色谱峰的分离度不低于 2.0, 色谱图见图 1。



1-穿心莲内酯 2-新穿心莲内酯 3-脱水穿心莲内酯 4-去氧穿心莲内酯  
1-andrographolide 2-neoandrographolide 3-dehydroandrographolide 4-deoxyandro-grapholide

图 1 系统适用性试验的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of system suitability

**2.1.5 测定方法** 照上述色谱条件, 精密量取供试品溶液和对照溶液各 10 μL, 分别进样, 记录色谱图。供试品溶液中如有杂质峰, 按主成分自身对照法计算杂质的质量分数。

**2.1.6 重复性试验** 通过加入杂质对照品, 平行制备 6 份穿心莲内酯供试品溶液, 使得其中新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量均为 0.15%, 进样分析, 结果峰面积 RSD 值分别为 1.52%、1.67%、1.48%。

**2.1.7 稳定性试验** 取穿心莲内酯供试品溶液, 室温放置, 6 h 测定 1 次, 持续到 48 h, 结果新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积 RSD 值分别为 1.78%、1.87%、1.93%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

**2.1.8 专属性试验** 将穿心莲内酯原料置于不同的强制降解条件下, 考察穿心莲内酯主成分和降解产物的质量分数以及与杂质的分离度, 计算降解回收率, 以表征方法的专属性。

回收率=(降解后的主成分质量分数+杂质总质量分数)/(未破坏样品主成分质量分数+杂质总质量分数)×100%

**(1) 高温破坏试验** 取穿心莲内酯原料约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入稀释剂约 15 mL, 置于 80 °C 电热干燥箱中, 放置 2 h, 取出, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为高温破坏试验溶液, 进样测定, 色谱图见图 2。

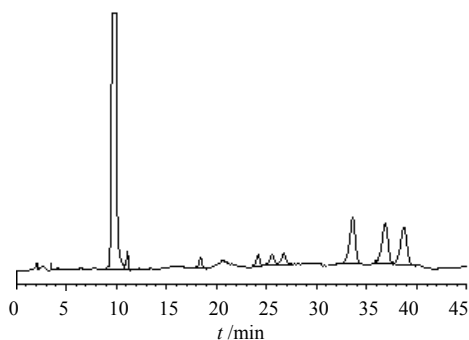


图 2 穿心莲内酯高温破坏试验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of andrographolide in high temperature degradation condition

(2) 酸破坏试验 取穿心莲内酯原料约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入 10.0 mL 稀释剂, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 3.0 mL, 70 °C 水浴放置 1 h, 取出, 放冷至室温, 用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液中和 pH 3~5, 稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为酸破坏试验溶液, 进样测定, 其色谱图见图 3。

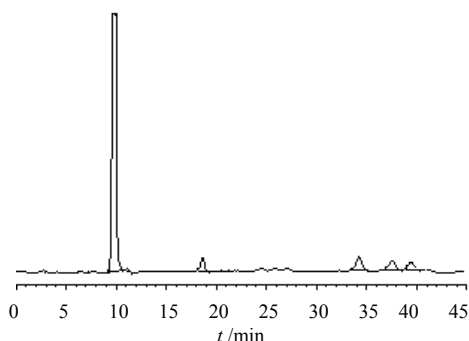


图 3 穿心莲内酯酸破坏试验色谱图

Fig. 3 Chromatogram of andrographolide in acid degradation condition

(3) 碱破坏试验 取穿心莲内酯原料约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入 10.0 mL 稀释剂, 振摇 1 min, 加入 0.01 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 70 °C 水浴放置 1 h, 取出, 放冷至室温, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为碱破坏试验溶液, 进样测定, 其色谱图见图 4。

(4) 强光照破坏试验 取穿心莲内酯原料, 置于强白光下照射, 总照度不小于  $1.2 \times 10^6$  lx, 取出, 作为强光照破坏试验溶液, 进样测定, 其色谱图见图 5。

(5) 氧化破坏试验 取穿心莲内酯原料约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入 10.0 mL 稀释剂, 振摇 1 min, 加入 30% 过氧化氢溶液 3.0 mL,

室温放置 1.5 h, 密封, 取出, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为氧化破坏试验溶液, 进样测定, 其色谱图见图 6。

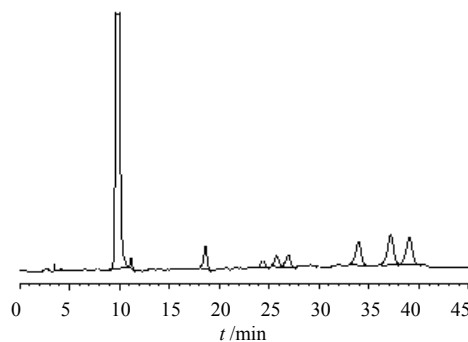


图 4 穿心莲内酯碱破坏试验色谱图

Fig. 4 Chromatogram of andrographolide in base degradation condition

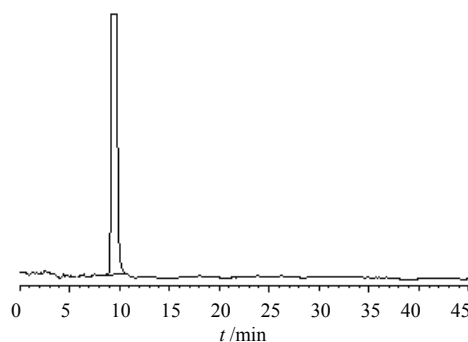


图 5 穿心莲内酯强光照破坏试验色谱图

Fig. 5 Chromatogram of andrographolide in light degradation condition

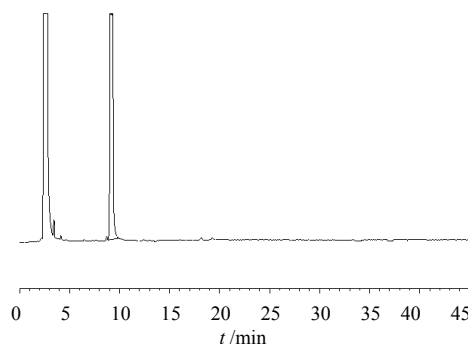


图 6 穿心莲内酯氧化破坏试验色谱图

Fig. 6 Chromatogram of andrographolide in oxidative degradation condition

试验结果见表 1。可见在该色谱条件下, 穿心莲内酯和降解产物分离良好, 且基于物料平衡的回收率均在 96.9%~99.9%, 表明该方法专属性良好。

表 1 专属性试验数据

Table 1 Data of specificity test

条 件	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/%	其余杂质/%	回收率/%
未破坏	99.10	—	—	0.12	0.08	—
高温	87.65	—	—	1.98	2.45	97.6
碱	85.32	—	—	3.48	2.97	96.9
酸	93.8	—	—	0.81	0.77	97.2
光照	99.02	—	—	0.12	0.06	99.9
氧化	98.82	—	—	0.12	0.07	99.8

—无数据

— no data

## 2.2 穿心莲内酯原料稳定性考察

**2.2.1 色谱条件** 菲罗门 Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 224 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相为甲醇-水 (60:40)。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取约 10 mg 穿心莲内酯对照品, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

**2.2.3 pH 值敏感性试验** 取穿心莲内酯原料, 加适量甲醇使其溶解, 分别以 0.1 mol/L 盐酸溶液 (pH 1)、pH 3、pH 5、pH 7、pH 9、pH 11 磷酸盐缓冲液, 0.1 mol/L NaOH 溶液 (pH 13) 为稀释剂, 室温放置。

**2.2.4 高温试验** 取穿心莲内酯原料, 加适量甲醇使其溶解, 以 pH 5 缓冲液为稀释剂, 分别于 60、

40 °C 条件下放置。固态穿心莲内酯原料同法放置。

**2.2.5 强氧化试验** 取穿心莲内酯原料, 加适量甲醇使其溶解, 以 3% 双氧水为稀释剂, 室温放置。

**2.2.6 光照试验** 取穿心莲内酯原料, 加适量甲醇使其溶解, 以 pH 5 缓冲液为稀释剂, 置 4 500 lx 光照箱中。固态穿心莲内酯原料同法放置。

**2.2.7 高湿试验** 取穿心莲内酯原料分别置室温下、相对湿度分别为 92.5%、75% 的环境中。

**2.2.8 检测结果** 取不同暴露或强制条件下的各样品, 观察样品外观, 并于 0、1、2、5、10 d 取样, 配制成约 1 mg/mL 的样品, 分别进样分析, 记录主峰面积, 以外标法计算含量。结果除 pH 7~13 条件下的样品外, 其余样品外观均无明显变化, pH 7~13 条件下样品外观变化见表 2。有关物质及主成分测定结果见表 3。

表 2 pH 7~13 条件下穿心莲内酯溶液的外观变化

Table 2 Appearance changes of andrographolide solution in pH 7—13 conditions

状 态	0 d	1 d	2 d	5 d	10 d
pH 7	无色透明	少量沉淀	少量沉淀	少量沉淀	少量沉淀
pH 9	无色透明	较多沉淀	较多沉淀	较多沉淀	较多沉淀
pH 11	较多沉淀	较多沉淀	较多沉淀	较多沉淀	较多沉淀
pH 13	黄色溶液	黄色溶液	黄色溶液	黄色溶液	黄色溶液

结果表明, 穿心莲内酯原料固体在各种条件下均较为稳定, 外观、含量和有关物质均无明显变化。穿心莲内酯在不同 pH 值溶液中室温放置, 在 pH 3~5 是相对较为稳定的, 其含量未有明显变化, 有关物质略有增加; 在碱性条件下降解较快, 碱性越强, 降解越快, pH 11、13 条件下, 主成分被完全降解。穿心莲内酯溶液在 3% 双氧水的氧化条件下较为稳定。穿心莲内酯溶液对光照有一定敏感性,

有关物质有所增加; 在高温条件下稳定性较差, 温度越高, 稳定性越差。

## 3 讨论

穿心莲内酯在碱性、高温条件下产生白色沉淀, 该白色沉淀需要加入更多量的相应条件下缓冲液可保证其溶解, 因此在测定时, 需用相应条件下的缓冲液稀释, 对照品质量浓度要做相应的调整, 将产生沉淀完全溶解是测定有关物质回收率重要保证。

表3 不同条件下穿心莲内酯含量和有关物质测定结果

Table 3 Determination of andrographolide content and related substances in different conditions

放置条件	质量分数/%									
	0 d		1 d		2 d		5 d		10 d	
	主成分	杂质	主成分	杂质	主成分	杂质	主成分	杂质	主成分	杂质
pH 1	99.4	0.39	99.2	1.21	98.5	1.43	97.5	1.52	95.1	1.60
pH 3	99.6	0.34	99.3	0.56	99.7	0.63	99.2	0.79	98.0	0.89
pH 5	99.0	0.32	99.4	0.52	99.2	0.61	99.1	0.76	98.3	0.88
pH 7	97.2	1.54	90.2	2.79	88.5	3.87	90.6	5.18	89.2	6.92
pH 9	92.3	4.47	71.5	10.53	59.9	16.15	49.7	26.76	40.0	35.51
60 °C (固态)	99.0	0.32	99.0	0.32	98.5	0.33	98.0	0.36	98.9	0.39
60 °C (液态)	99.3	0.32	94.0	1.24	88.0	2.25	82.5	6.32	71.4	13.59
40 °C (固态)	99.0	0.32	99.4	0.31	99.9	0.33	99.5	0.33	99.4	0.35
40 °C (液态)	99.4	0.32	98.4	0.82	97.9	1.24	97.4	2.01	96.0	2.47
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99.1	0.35	99.0	0.37	99.5	0.33	98.8	0.36	98.7	0.36
Light (固态)	99.0	0.32	99.0	0.37	99.5	0.33	98.8	0.36	98.9	0.36
Light (液态)	99.1	0.35	98.4	0.79	98.0	1.01	97.8	1.21	97.4	1.76
92.5% (相对湿度)	99.0	0.32	99.3	0.33	99.4	0.34	98.8	0.38	98.9	0.35
75% (相对湿度)	99.0	0.32	98.9	0.34	98.9	0.35	99.3	0.36	99.2	0.37

穿心莲内酯为中药提取物,经查询国家食品药品监督管理局网站,穿心莲内酯原料药批准文号共8件,其中7件按照化学药品管理,但目前《中国药典》2010年版穿心莲内酯标准中尚未要求进行有关物质检查,本实验建立了专属性好的HPLC法能够更好地用于该产品的质量控制在液体状态下虽不稳定,但其降解产物中的部分成分是有其药用价值的,故今后可对其降解产物的结构、药理、毒理进行更加深入的研究,根据药理、毒理信息去制定一个更加合理的杂质控制标准也是未来研究的一个方向。

穿心莲内酯在液体状态下总体不太稳定,即使是在pH 3~5溶液中,有关物质仍不断增加,故提示在进行液体制剂研发时,需要寻找其稳定剂,或者采取一些新的制剂手段,如环糊精包合、制备微

囊、微球等新制剂以增加药物稳定性,提高药品质量,保证人民安全用药。

#### 参考文献

- [1] 陈艳. 穿心莲的化学成份及其制剂分析方法研究进展 [J]. 医学信息, 2009, 22(9): 1968-1970.
- [2] 戴桂馥, 王俊峰, 何帅伟, 等. 穿心莲内酯及其衍生物的药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2000, 28(7): 1032-1035.
- [3] Lomlim L, Jirayupong N, Plubrukarn A. Heat-accelerated degradation of solid-state andrographolide [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51(1): 24-26.
- [4] Plubrukarn A, Pinsuwan S, Ingkawatwornwong S, et al. Stability of andrographolide in powdered *Andrographis herb* under accelerated conditions [J]. *Planta Med*, 2006, 72(10): 954-956.
- [5] 靳鑫, 时圣明, 张东方, 等. 穿心莲化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 47-50.