

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.024

高效液相色谱-二极管阵列检测器法检查复方罗布麻片 I 中掺伪大花罗布麻叶方法研究*

谢思敏, 刘主洁, 侯惠婵[△], 顾利红

(广东省广州市药品检验所, 广东 广州 510160)

摘要:目的 建立检查复方罗布麻片 I 中罗布麻叶非法掺伪大花罗布麻叶的高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法。方法 采用 HPLC-DAD 法,以白麻苷、金丝桃苷为指标成分,检查复方罗布麻片 I 中大花罗布麻叶掺伪的情况。结果 白麻苷、金丝桃苷进样量分别在 1.135~56.762 ng 和 1.073~53.674 ng($r=1.000\ 0$, $n=6$)范围内与峰面积线性关系良好;平均加样回收率分别为 98.06% 和 99.53%, RSD 分别为 1.33% 和 0.43% ($n=6$)。结论 该方法操作简便,专属性强,可快速检查复方罗布麻片 I 中罗布麻叶掺伪大花罗布麻叶的情况。

关键词:复方罗布麻片 I; 罗布麻叶; 大花罗布麻叶; 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)15-0087-04

Identification of *Poacynum Hendersonii*(Hook. f) Wodson Adulteration in Compound Luobuma Tablets I by HPLC-DAD

XIE Simin, LIU Zhuojie, HOU Huichan, GU Lihong

(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510160)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography-diode-array detection(HPLC-DAD) method of adulterated *Apocynum venetum* in Compound Luobuma Tablets I. **Methods** The HPLC-DAD method was established by using Quercetin-3-O-sophoroside and hyperin as reference to identify the adulterated *Apocynum venetum* in Compound Luobuma Tablets I. **Results** Quercetin-3-O-sophoroside and hyperin showed good linear relationships with peak area in the ranges of 1.135-56.762 ng and 1.073-53.674 ng($r=1.000\ 0$, $n=6$) with the peak area, respectively. The average recoveries were 98.06% and 99.53% respectively; the RSDs were 1.33% and 0.43%, respectively($n=6$). **Conclusion** The established method is simple and fast, which can effectively identify the adulteration of *Apocynum venetum* in Compound Luobuma Tablets I.

Key words: Compound Luobuma Tablets I; *Poacynum hendersonii*(Hook. f) Wodson; *Apocynum venetum*; high performance liquid chromatography; diode-array detection

复方罗布麻片 I 是由罗布麻叶、野菊花、氢氯噻嗪等 10 味中药材、化学药物组成的复方制剂,为治疗高血压的常用药。现行质量标准收载于《国家药品标准·化学药品地方标准上升国家标准(第十一册)》,其中有盐酸氯丙嗪、防己的薄层色谱鉴别和氢氯噻嗪、维生素 B₁/B₆ 的液相色谱鉴别,同时还有氢氯噻嗪的含量测定方法,但并未对方中罗布麻叶 *Apocynum venetum* L. 进行质量控制。日常检验中发现,罗布麻商品药材使用较混乱,常以大花罗布麻叶 *Poacynum hendersonii* (Hook. f) Wodson 混充罗布麻叶 *Apocynum venetum* L. 使用。文献[1-4]报道,通过测定复方罗布麻片 I 中白麻苷、芦丁含量,可对复方罗布麻片 I 中罗布麻叶进行质量控制。前期研究中发现,以白麻苷、金丝桃苷为指标性成分,可快速鉴别罗布麻叶和大花罗布麻叶^[5-6]。为进一步探索含罗布麻叶的复方制剂复方罗布麻片 I 在

生产过程中是否存在掺伪大花罗布麻叶,本研究中采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法测定了复方罗布麻片 I 中白麻苷、金丝桃苷的含量,可快速、准确地检查复方罗布麻片 I 中是否掺伪大花罗布麻叶,并进一步采用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法进行确证。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型二极管阵列检测器-高效液相色谱仪,Chem-Station C 色谱工作站(美国安捷伦公司);3200QTRAP 型液质联用仪,Analyst 1.7 分析软件(美国 AB 公司);MS105 型电子天平(精度为万分之一),XP26 型电子天平(精度为百万分之一),均购自瑞士 Mettler Toledo 公司。

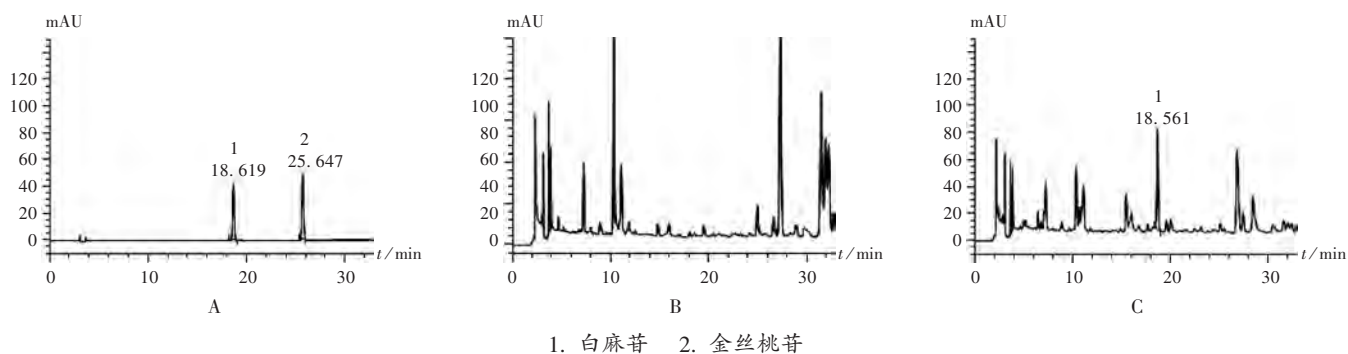
1.2 试剂

复方罗布麻片 I 样品(共 21 批,企业 A,编号为

*基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究课题[2018X001]。

第一作者:谢思敏,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为药品质量检验,(电子信箱)798447372@qq.com。

[△]通信作者:侯惠婵,女,大学本科,主任中药师,研究方向为中药鉴定及中药药品质量检验,(电子信箱)1732807959@qq.com。



1. 白麻苷 2. 金丝桃苷
A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 复方罗布麻片 I 供试品溶液
图 1 高效液相色谱图

A1 ~ A10; 企业 B, 编号为 B1 ~ B6; 企业 C, 编号为 C1 ~ C5); 罗布麻叶药材 (共 8 批, 编号为罗布麻叶 1 ~ 8), 大花罗布麻叶药材 (共 7 批, 编号为大花罗布麻叶 1 ~ 7), 均经广州市药品检验所中药室侯惠婵主任中药师鉴定为正品; 罗布麻叶对照药材 (批号为 120979 - 200704), 金丝桃苷对照品 (批号为 111521 - 201708, 纯度为 95.1%), 均购自中国食品药品检定研究院 (以下简称中检院); 白麻苷对照品 (成都德思特生物技术有限公司, 批号为 DST180404 - 076, 含量不低于 98%); 甲醇、乙腈 (HPLC 级, 德国 Merck 公司); 冰醋酸、醋酸 (色谱纯, 美国阿拉丁公司); 自制 Milli-Q 超纯水; 其余试剂均为分析纯, 均购自广州化学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenon Gemini C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 1% 冰醋酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 30 min 时 10% A → 20% A, 30 ~ 31 min 时 20% A → 95% A, 31 ~ 38 min 时 95% A, 38 ~ 39 min 时 95% A → 10% A, 39 ~ 48 min 时 10% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 354 nm; 柱温: 50 °C; 进样量: 5 μL。

2.2 溶液制备

称取白麻苷对照品 5.79 mg、金丝桃苷对照品 5.64 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得白麻苷、金丝桃苷混合对照品贮备液; 精密量取混合对照品贮备液 5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。取本品 20 片, 糖衣片除去包衣, 精密称定, 研细, 取约 10 片重, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得复方罗布麻片 I 供试品溶液。取药材粉末约 0.1 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补

足缺失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得药材供试品溶液。按样品处方工艺制备缺罗布麻叶药材的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备, 即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取 2.2 项下对照品溶液、复方罗布麻片 I 供试品溶液、阴性对照品溶液各 5 μL, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱峰。结果白麻苷、金丝桃苷的保留时间分别约为 18.619 min 和 25.617 min, 理论板数按白麻苷峰计应不低于 10 000, 基线分离良好, 且阴性对照无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察: 分别精密量取混合对照品贮备液 1 mL, 置 1, 2, 5, 10, 25, 50 mL 容量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 即得系列质量浓度对照品溶液。再分别吸取系列对照品溶液各 5 μL, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积。以进样量 (X) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归。结果见表 2。

表 2 线性关系考察结果 (n = 6)

成分	线性回归方程	r	线性范围 (ng)
白麻苷	$Y = 8.5323X + 1.7275$	1.000 0	1.135 ~ 56.762
金丝桃苷	$Y = 12.096X + 1.4525$	1.000 0	1.073 ~ 53.674

精密度试验: 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 5 μL, 按拟订色谱条件连续进样 6 次, 测定。结果白麻苷、金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 0.37% 和 0.13% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液 (编号为 A4, B5), 室温放置, 分别于 0, 2, 6, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定。结果白麻苷、金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 0.51% 和 0.87% (n = 5), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取同一批 (编号为 A4) 样品 6 份, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定。结果白麻苷含量的 RSD 分别为 0.99% (n = 6), 表明方法重复性良好。

表3 加样回收试验结果($n=6$)

编号	取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0.514 6	0.514 6	0.234 9	0	0.283 8	0.268 4	0.510 7	0.265 5	97.18	98.92				
2	0.506 3	0.506 3	0.231 1	0	0.283 8	0.268 4	0.508 1	0.267 7	97.60	99.74				
3	0.519 6	0.519 6	0.237 2	0	0.283 8	0.268 4	0.518 8	0.266 9	99.22	99.44	98.06	99.53	1.33	0.43
4	0.516 2	0.516 2	0.235 6	0	0.283 8	0.268 4	0.519 1	0.267 6	99.89	99.70				
5	0.520 2	0.520 2	0.237 5	0	0.283 8	0.268 4	0.515 9	0.268 8	98.10	100.15				
6	0.504 2	0.504 2	0.230 2	0	0.283 8	0.268 4	0.503 7	0.266 4	96.37	99.25				

注:A为白麻苷,B为金丝桃苷。

加样回收试验:取同一批(编号为A4)样品0.5 g,精密称定,共6份,分别精密加入混合对照品贮备液5 mL,再精密加入70%甲醇20 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,并计算回收率。结果见表3。

检测限确定:取加样回收试验项下编号3供试品溶液,加入70%甲醇分别稀释250倍(金丝桃苷质量浓度为0.042 7 $\mu\text{g/mL}$)及500倍(白麻苷质量浓度为0.041 5 $\mu\text{g/mL}$),分别进样5 μL ,取样量以10片计,按信噪比为3:1计算检测限。结果复方罗布麻片I中白麻苷、金丝桃苷的检测限为每片0.1 μg 。

2.4 样品含量测定

分别取21批复方罗布麻片I样品、收集的8批、中检院的1批罗布麻叶和7批大花罗布麻叶药材,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,并计算含量。结果见表4至表5。

表4 复方罗布麻片I样品含量测定结果($\mu\text{g}/\text{片}$, $n=2$)

生产企业	编号	白麻苷	金丝桃苷	生产企业	编号	白麻苷	金丝桃苷
企业A	A1	110.86	未检出	企业B	B1	未检出	101.90
	A2	76.36	未检出		B2	未检出	90.06
	A3	123.38	未检出		B3	未检出	93.70
	A4	64.63	未检出		B4	未检出	85.80
	A5	73.08	未检出		B5	未检出	95.05
	A6	132.17	未检出		B6	未检出	85.67
	A7	69.10	未检出	企业C	C1	未检出	118.76
	A8	66.53	未检出		C2	未检出	56.01
	A9	36.43	未检出		C3	未检出	74.99
	A10	23.96	未检出		C4	未检出	189.13
					C5	未检出	53.28

2.5 HPLC-MS法确证

色谱柱:Agilent-poroshell 120 C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min时13% A $\rightarrow$ 20% A);流速:0.4 mL/min;质谱检测器:电喷雾负离子模式(ESI^-),选择多反应监测(MRM),白麻苷选择质荷比(m/z)625.0(双电荷) $\rightarrow$ 300.4、 m/z 625.0(双电荷) $\rightarrow$ 271.2和 m/z 625.0(双电荷) $\rightarrow$ 255.2作为检测离子

表5 罗布麻叶及大花罗布麻叶样品测定结果(%, $n=2$)

名称	编号	含量		名称	编号	含量	
		白麻苷	金丝桃苷			白麻苷	金丝桃苷
罗布	罗布麻叶1	未检出	0.48	大花罗	大花罗布麻叶1	0.80	未检出
麻叶	罗布麻叶2	未检出	0.38	布麻叶	大花罗布麻叶2	0.62	未检出
	罗布麻叶3	未检出	0.50		大花罗布麻叶3	0.80	未检出
	罗布麻叶4	未检出	0.47		大花罗布麻叶4	0.77	未检出
	罗布麻叶5	未检出	0.37		大花罗布麻叶5	0.81	未检出
	罗布麻叶6	未检出	0.33		大花罗布麻叶6	0.87	未检出
	罗布麻叶7	未检出	0.42		大花罗布麻叶7	0.91	未检出
	罗布麻叶8	未检出	0.43				
	中检院(对照药材)	未检出	0.36				

对,金丝桃苷选择质荷比(m/z)463.1(双电荷) $\rightarrow$ 300.4、 m/z 463.1(双电荷) $\rightarrow$ 271.2和 m/z 463.1(双电荷) $\rightarrow$ 255.1作为检测离子对;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:1 μL 。对罗布麻叶(编号为3~4)、大花罗布麻叶(编号为4~5)及复方罗布麻片I(企业A,编号为A3和A4;企业B,编号为B1和A2;企业C,编号为C1和C5)中白麻苷、金丝桃苷的含量与HPLC-DAD测定结果比较,RSD均小于2.5%,表明HPLC-DAD法和HPLC-MS法测定结果无显著差异。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

白麻苷、金丝桃苷的全光谱扫描图显示,白麻苷在256 nm和354 nm波长处有最大吸收,而供试品溶液在354 nm波长下,干扰少,故选择354 nm为检测波长。本试验中考察了不同的流动相、不同品牌的色谱柱,不同柱温下白麻苷的分离情况及对测定结果的影响,结果显示,采用乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相,在Agilent, Phenomenex, Waters 3个品牌的色谱柱下,白麻苷、金丝桃苷均能得到有效分离,阴性对照无干扰;随着柱温的升高,可得到更好的分离度,故选择50 $^{\circ}\text{C}$ 为柱温。

3.2 样品中掺伪情况

本试验收集的8批、中检院的1批罗布麻叶和企业B生产的6批、企业C生产的5批复方罗布麻片I均检出金丝桃苷,未检出白麻苷;收集的7批大花罗布麻叶