

复方龙胆碳酸氢钠片中非法成分土大黄苷定性筛查与定量测定方法的建立^Δ

陈学艳^{1,2*}, 张敏娟^{1,2#}, 魏文芝^{1,2} (1. 青海省药品检验检测院化学室, 西宁 810016; 2. 青海省中藏药现代化研究重点实验室, 西宁 810016)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1919-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.10

摘要 目的:建立复方龙胆碳酸氢钠片组方药材大黄伪品中标志性成分土大黄苷的定性筛查与定量测定方法。方法:从药品流通领域抽样获取来自国内8家药品生产企业(编号:A~H)的45批复方龙胆碳酸氢钠片,采用薄层色谱法(TLC)初步定性鉴别样品中的土大黄苷;采用高效液相色谱法(HPLC)对土大黄苷进行含量测定;采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)进一步对检出的土大黄苷成分进行结构确证。结果:TLC法检测结果显示,来自D企业的10批样品在紫外光灯(365 nm波长)可见土大黄苷的亮蓝色荧光斑点。HPLC法方法学考察结果显示,土大黄苷质量浓度在0.884~88.4 μg/mL范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.9999$);进样量检出限、定量限分别为0.707 2、3.536 ng;精密性、重复性、稳定性试验RSD均小于1%;平均加样回收率为96.55% (RSD=0.53%, $n=6$)。D企业产10批样品中土大黄苷含量为0.732 4~2.890 8 mg/g。UPLC-MS/MS法检测结果显示,D企业产样品与土大黄苷对照品均有质荷比(m/z)419.0的准分子离子峰和 m/z 257.1、241.2的碎片离子峰。结论:建立的TLC法定性初筛、HPLC法定量测定与UPLC-MS/MS法结构确证相结合的检测方法操作简便、灵敏、可靠,可用于复方龙胆碳酸氢钠片中土大黄苷的定性筛查和定量测定。45批次抽检样品中,有来自1个生产企业的10批样品中检出土大黄苷成分,提示该企业在生产复方龙胆碳酸氢钠片时存在以伪品大黄药材替代正品的现象。

关键词 复方龙胆碳酸氢钠片;大黄;土大黄苷;薄层色谱法;高效液相色谱法;超高效液相色谱-串联质谱法;定性筛查;定量测定

Method Establishment for Qualitative Screening and Quantitative Determination of Illegal Composition Rhaponticin in Compound Gentian and Sodium Bicarbonate Tablets

CHEN Xueyan^{1,2}, ZHANG Minjuan^{1,2}, WEI Wenzhi^{1,2} (1. Chemistry Room, Qinghai Provincial Drug Inspection and Testing Institute, Xining 810016, China; 2. Qinghai Key Lab of Chinese and Tibetan Medicine Modernization Study, Xining 810016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for qualitative screening and quantitative determination of indicative composition rhaponticin from counterfeit *Rheum palmatum* in Compound gentian and sodium bicarbonate tablets. METHODS: Totally 45 batches of Compound gentian and sodium bicarbonate tablets were collected from 8 domestic pharmaceutical manufacturers (No. A-H) in the field of drug distribution. TLC method was used to identify rhaponticin in the samples primarily. The content of rhaponticin was determined by HPLC, and then UPLC-MS/MS method was used to confirm the structure of

- [11] 韩继红,王麟,社会茹,等.当归补血不同制剂高效液相特征图谱比较[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(9):71-76.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:40、86、149、182、280、302、314.
- [13] 翟宏宇,王海洋,凌颖,等. HPLC法测定丹黄祛瘀胶囊中黄芪甲苷含量[J].中国卫生工程学,2018,17(1):99-101.
- [14] 朱日明,罗瑜. HPLC-ELSD法测定三草鼻咽清煎膏剂中黄芪甲苷的含量[J].中国现代药物应用,2018,12(7):215-216.
- [15] 刘晓瑜,华颖婷. HPLC-ELSD法测定复胃散胶囊中黄芪甲苷的含量[J].药学研究,2018,37(3):149-151、183.
- [16] 陈国广,陈振华,刘伯成,等.羟丙基-β-环糊精对黄芪甲苷包合作用的研究[J].时珍国医国药,2007,18(6):1457-1458.
- [17] 霍金海,任晓蕾,贺小雪,等.球磨粉碎对黄芪中有效成分溶出度的影响[J].中国粉体技术,2014,20(1):13-16.
- [18] 曹邦静,苏娟,叶霁,等.蒸发光散射检测器在中药分析中的应用[J].药学实践杂志,2015,33(1):13-16.

(收稿日期:2018-12-06 修回日期:2019-05-27)

(编辑:段思怡)

Δ 基金项目:青海省科技计划项目-药品检验检测平台项目(No. 2017-ZJ-Y40);国家药品抽检计划项目(No.食药监药化监[2017]131号)

* 主管药师,硕士。研究方向:药品质量分析、药品质量标准。电话:0971-8247794。E-mail:296261547@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药品质量分析、药品质量标准。电话:0971-8247794。E-mail:1415328549@qq.com

rhaponiticin. RESULTS: TLC results showed that bright blue fluorescent spots of rhaponiticin could be seen in 10 batches of samples from manufacturer D at 365 nm wavelength of ultraviolet lamp. Results of HPLC methodology investigation showed that the linear range of rhaponiticin was 0.884-88.4 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$); the detection limit and quantitative limit were 0.707 2, 3.536 ng; RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 1%; average recovery was 96.55% (RSD=0.53%, $n=6$). The contents of rhaponiticin in 10 batches of samples from manufacturer D were 0.732 4-2.890 8 mg/g. Results of UPLC-MS/MS method showed that quasimolecular ions with m/z of 419.0 and fragment ions with m/z 257.1 and 241.2 were found in both samples from manufacturer D and rhaponiticin control. CONCLUSIONS: TLC for primary screening, HPLC for content determination and UPLC-MS/MS for structure confirmation is simple, sensitive and reliable, and can be used for qualitative screening and quantitative determination of rhaponiticin in Compound gentian and sodium bicarbonate tablets. Among 45 batches of samples tested, rhaponiticin is detected in 10 batches of samples from one manufacturer, suggesting that the manufacturer substitute fake *R. palmatum* for genuine ones in the production of Compound gentian sodium bicarbonate tablets.

KEYWORDS Compound gentian and sodium bicarbonate tablets; *Rheum palmatum*; Rhaponiticin; TLC; HPLC; UPLC-MS/MS; Qualitative screening; Quantitative determination

复方龙胆碳酸氢钠片是由碳酸氢钠、大黄膏(粉)、龙胆膏(粉)、丁香油、薄荷油和适宜辅料组方而成的复方制剂,临床主要用于治疗胃胀、反酸、食欲不振等^[1]。按照2015年版《中国药典》(一部)规定,该制剂组方中的大黄药材应来源于蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)或药用大黄(*Rheum officinale* Baill.)^[2],不含土大黄苷成分;而藏边大黄(*Rheum australe* D. Don)、华北大黄(*Rheum franzenbachii* Munt)和波叶大黄(*Rheum undulatum* L.)等伪品中含有土大黄苷^[3-4]。当前药材市场上大黄品种混乱及质量不均一的问题较为严峻,尤其在价格上升时,存在以廉价而几乎无泻下作用、服用后有腹痛副作用的藏边大黄、华北大黄等掺假冒充的情况^[5-6]。复方龙胆碳酸氢钠片的现行质量标准为《国家药品标准》WS-10001(HD-0351)-2002-2011,其中缺乏土大黄苷的检查项。原国家食品药品监督管理局于2010年5月5日批准发布药品检验补充检验方法和检验项目,要求对伪品大黄药材中的土大黄苷进行检查(批件号:2010001),但未规定复方龙胆碳酸氢钠片中非法成分土大黄苷的补充检验方法,也未见相关研究报道。为此,本课题组参考上述补充检验方法、2015年版《中国药典》(一部)“大黄”品种项下的相关规定及相关文献等,建立了复方龙胆碳酸氢钠片中土大黄苷的检测方法,旨在为控制该制剂原药材的质量、确保该药临床使用的有效性和安全性提供技术支持。

1 材料

1.1 仪器

BS224S型万分之一电子天平、CP225D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);e2695-2998型高效液相色谱(HPLC)仪(包括二极管阵列检测器、四元泵一体机)、Acquity UPLC-TQD型液相色谱质谱联用仪(包括三重四级杆质量分析器)均购自美国Waters公司;KQ-500DE型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司);

TLC Visualizer型薄层数码成像仪(瑞士CAMAG公司)。

1.2 药品与试剂

复方龙胆碳酸氢钠片(从药品流通领域抽样获取,分别来自编号为A、B、C、D、E、F、G、H的国内8家药品生产企业,样品信息详见表1);土大黄苷对照品[中国食品药品检定研究院,批号:110794-201708,供薄层色谱(TLC)和HPLC检查用];聚酰胺薄膜(台州市路桥四甲生化塑料厂,供薄层层析用);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

表1 复方龙胆碳酸氢钠片样品信息

Tab 1 Sample information of Compound gentian and sodium bicarbonate tablets

生产企业编号	样品批次	批号	处方中大黄投料形式
A	18	20170717, 20170601, 20170718, 20171101, 20180105, 20171106, 20180106, 20180201, 20171201, 20180102, 20171104, 20170305, 20170706, 20180206, 20180207, 20170803, 20180501, 20180402	大黄粉(相当于原生药50 mg)
B	4	170602, 170501, 171110, 170203	大黄膏(粉)(相当于原生药50 mg)
C	5	171213, 171214, 171215, 161010, 171211	大黄粉(相当于原生药50 mg)
D	10	20170609, 20170201, 20171001, 20170612, 20171008, 20171007, 20171002, 20171006, 20171005, 20171004	大黄粉50 mg
E	3	20161012, 20161019, 20161020	大黄粉(相当于原生药50 mg)
F	2	20180301, 20180201	大黄粉(相当于原生药50 mg)
G	1	20160902	大黄粉(相当于原生药50 mg)
H	2	20170201, 20170301	大黄粉(相当于原生药50 mg)

1.3 药材

大黄药材(本课题组自购,分别产自青海省大通县、湟中县、果洛藏族自治州,样品批次编号:S1、S2、S3)经青海省药品检验检测院中药室刘亚蓉主任中药师鉴定为唐古特大黄(*R. tanguticum* Maxim. ex Balf.)的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 TLC法对土大黄苷的初步定性筛查

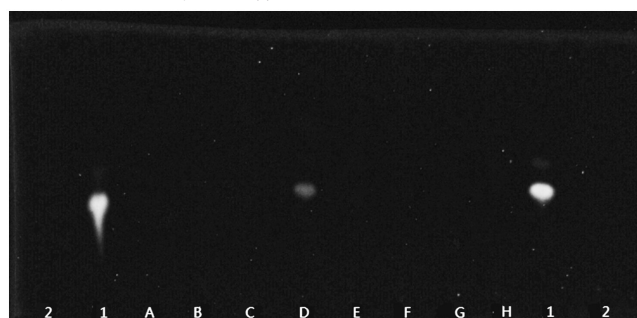
参考文献[7]方法进行检测。

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品20片,精密称定,研细,按制剂处方称取约相当于大黄生药100 mg的粉末,加甲醇10 mL,超声(功率:500 W,频率:40 kHz,下同)处理20 min,滤过;取续滤液1 mL,加甲醇稀释至10 mL,摇匀,即得。

2.1.2 阴性样品溶液的制备 分别按本品各生产企业处方,制成缺大黄药材的阴性样品,再按“2.1.1”项下方法制得阴性样品溶液。

2.1.3 土大黄苷对照品溶液的制备 取土大黄苷对照品适量,加甲醇溶解制成每1 mL含10 μg的溶液,即得(临用新制)。

2.1.4 8家企业样品的TLC抽检及复检 抽取8家企业生产的复方龙胆碳酸氢钠片各20片(A企业样品批号:20170717;B企业样品批号:170602;C企业样品批号:171213;D企业样品批号:20170609;E企业样品批号:20161012;F企业样品批号:20180301;G企业样品批号:20160902;H企业样品批号:20170201),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液。分别吸取上述供试品溶液、“2.1.2”项下阴性样品溶液和“2.1.3”项下土大黄苷对照品溶液各5 μL,点样于同一聚酰胺薄膜上,以甲苯-甲酸乙酯-丙酮-甲醇-甲酸(30:5:5:20:0.1, V/V/V/V)为展开剂,展开;取出晾干,采用薄层数码成像仪以紫外灯365 nm波长进行检视。结果,土大黄苷对照品溶液显1个亮蓝色荧光斑点;阴性样品溶液在相应的位置处未见类似荧光斑点;供试品溶液(D企业产品,批号:20170609)在相应的位置处显相同的亮蓝色荧光斑点,其余7家企业产品的供试品溶液则均未见有类似荧光斑点。由此表明,阴性样品对TLC检测无干扰;抽检的8家企业产复方龙胆碳酸氢钠片样品中仅D企业产品中有疑似非法成分土大黄苷检出。8家生产企业抽检样品中土大黄苷的薄层色谱图见图1。



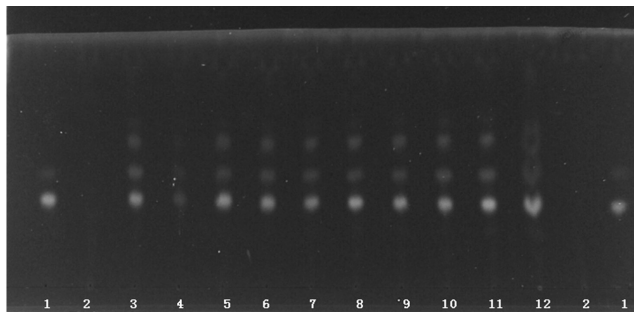
注:1.土大黄苷对照品溶液;2.阴性样品溶液;A~H.8家企业(A~H)供试品溶液

Note: 1. rhaponticin control solution; 2. negative sample solution; A-H. test sample solution from 8 manufacturers (A-H)

图1 8家生产企业抽检样品中土大黄苷的薄层色谱图
Fig 1 TLC chromatogram of rhaponticin in spot-checking samples from 8 manufacturers

进一步对D企业生产的复方龙胆碳酸氢钠片进行重点筛查,对该企业产10个批次样品(批号见表1)同法

进行TLC检测。结果,各批次样品的供试品溶液均在与土大黄苷对照品溶液相应的位置处显相同的亮蓝色荧光斑点。由此初步判定,D企业产样品中含有非法成分土大黄苷。D企业样品中土大黄苷的薄层色谱图见图2。



注:1.土大黄苷对照品溶液;2.阴性样品溶液;3~12.D企业10个批次供试品溶液

Note: 1. rhaponticin control solution; 2. negative sample solution; 3-12. 10 batches of sample solution from manufacturer D

图2 D企业产样品中土大黄苷的薄层色谱图
Fig 2 TLC chromatogram of rhaponticin from manufacturer D

2.2 HPLC法对土大黄苷的定性鉴定和含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:XSelectCSH C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(20:80, V/V);检测波长:328 nm(二极管阵列检测器);柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品20片,精密称定,研细,精密称取约相当于大黄生药100 mg的粉末,精密加入甲醇25 mL,精密称定;超声处理60 min,放冷,再次精密称定,用甲醇补足减失的质量,以0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 取“2.1.2”项下缺大黄药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.4 土大黄苷对照品溶液的制备 精密称取土大黄苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.221 mg的对照品贮备液;精密吸取该贮备液5 mL,置于20 mL量瓶中,加甲醇稀释定容,制成质量浓度为55.25 μg/mL的对照品溶液,即得。

2.2.5 大黄药材溶液的制备 取大黄药材,粉碎并过4号筛,精密称取药材粉末0.2 g,按“2.2.2”项下方法制备大黄药材溶液。

2.2.6 专属性考察 取D企业产10个批次样品(批号见表1),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。分别取上述供试品溶液、“2.2.3”项下阴性样品溶液、“2.2.4”项下土大黄苷对照品溶液和“2.2.5”项下大黄药材溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,10批次样品均在约11.7 min处出现与土大黄苷对照品溶液主峰保留时间一致的色谱峰,详见图3。

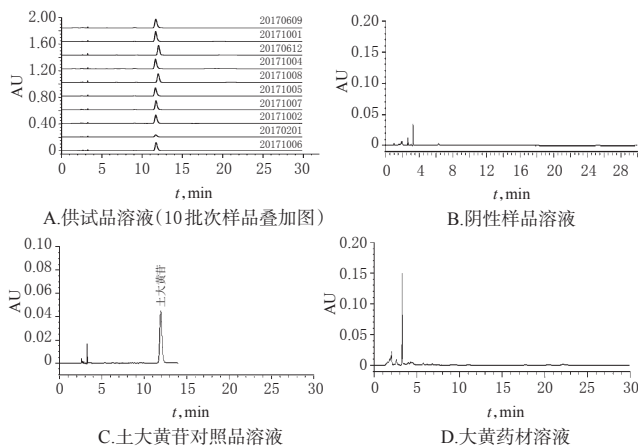


图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

为进一步确认与土大黄苷对照品溶液主峰保留时间一致的供试品溶液图谱中主峰是否为土大黄苷成分,本课题组采用Empower 3色谱系统工作站对色谱峰进行了二极管阵列扫描紫外光谱提取。结果,二者的紫外光谱扫描图相似度为99.9%,且均在219.0、324.6 nm波长处有较大吸收,由此可判定二者主峰为同一物质,即土大黄苷,详见图4。

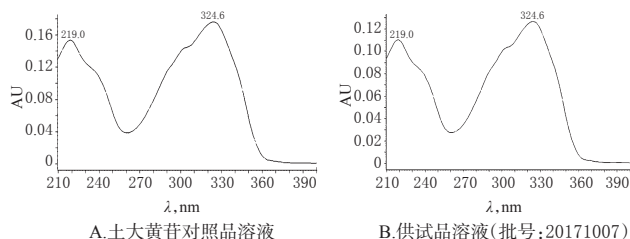


图4 二极管阵列扫描紫外光谱图

Fig 4 Diode array scanning ultraviolet spectrograms

结合图3、图4可见,供试品色谱图中呈现与对照品色谱保留时间相同的色谱峰,并经紫外光谱提取后证实对应的是同一物质土大黄苷,且阴性样品无干扰,由此表明所建方法专属性良好。

2.2.7 线性关系考察 精密吸取“2.2.4”项下土大黄苷对照品贮备液适量,以甲醇稀释制成质量浓度分别为0.884、8.84、22.1、44.2、88.4 μg/mL的系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以土大黄苷对照品质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、其峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果,回归方程为 $y = 36\ 535.57x - 27\ 105.99$ ($r = 0.999\ 9$),表明土大黄苷质量浓度在0.884~88.4 μg/mL范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系。

2.2.8 检测限与定量限 按“2.2.7”项下方法制备质量浓度为0.088 4 μg/mL的土大黄苷对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样5~10 μL测定,以信噪比3:1测得土大黄苷进样量检测限为0.707 2 ng;同法制备质量浓度为0.176 8 μg/mL的土大黄苷对照品溶液,并同法分别进样15~25 μL测定,以信噪比10:1测得土大黄苷进

样量定量限为3.536 ng。

2.2.9 精密度试验 精密吸取“2.2.4”项下质量浓度为55.25 μg/mL的土大黄苷对照品溶液10 μL,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,土大黄苷峰面积RSD为0.20% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.2.10 稳定性试验 取同一份供试品溶液(批号:20171007),分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,土大黄苷峰面积的RSD为0.73% ($n = 7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.11 重复性试验 取D企业样品(批号:20171007)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并按标准曲线法计算含量。结果,土大黄苷平均含量为2.860 0 mg/g (RSD = 0.78%, $n = 6$),表明本方法重复性良好。

2.2.12 加样回收率试验 取已知含量的D企业样品(批号:20171007,土大黄苷含量为2.860 0 mg/g)约0.3 g,平行操作6份,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入质量浓度为0.863 mg/mL的土大黄苷对照品溶液(按“2.2.4”项下制备方法新制)1 mL,再精密加入甲醇25 mL,称定质量;超声处理60 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,即得。按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,按标准曲线法计算土大黄苷含量,并计算回收率。结果,土大黄苷的平均回收率为96.55% (RSD = 0.53%, $n = 6$),表明本方法准确度良好,详见表2。

表2 土大黄苷回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery tests of rehmannitonicin

编号	取样量, g	样品中土大黄苷含量, mg	土大黄苷加入量, mg	实测土大黄苷总量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
1	0.341 5	0.976 7	0.863 0	1.806 3	96.13		
2	0.347 0	0.992 4	0.863 0	1.831 2	97.20		
3	0.347 9	0.995 0	0.863 0	1.832 6	97.06		
4	0.347 2	0.993 0	0.863 0	1.827 9	96.74	96.55	0.53
5	0.344 4	0.985 0	0.863 0	1.813 7	96.02		
6	0.344 5	0.985 3	0.863 0	1.815 0	96.14		

2.2.13 耐用性试验 采用不同品牌液相色谱仪(美国Waters公司e2695-2998型、日本Shimadzu公司LC-20AT型、美国Agilent公司1260 Infinity型)、不同品牌及型号的色谱柱(XSelect CSH C₁₈柱、Waters SunFire C₁₈柱、Thermo BDS Hypersil C₁₈柱)分别进行相应测定,主峰与相邻峰之间的分离度均可达到1.5以上,理论板数均大于6 000;连续测定结果RSD均小于2%,表明本方法耐用性良好。

2.2.14 各企业45批次样品中土大黄苷的含量测定 精密称取D企业产10批次样品(批号见表1)适量,平行操作2份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表3。另取

其余7家企业生产的35批次样品(批号见表1)适量,平行操作2份,同法配制供试品溶液并测定,结果均未检出土大黄苷峰,色谱图见图5。

表3 D企业产10批次样品中土大黄苷的含量测定结果($n=2$, mg/g)

Tab 3 Results of content determination of rhaponticin in 10 batches of samples from manufacturer D($n=2$, mg/g)

批号	含量	批号	含量
20170609	2.6179	20171007	2.8645
20170201	0.7324	20171002	2.8837
20171001	2.8359	20171006	2.8893
20170612	2.7720	20171005	2.6544
20171008	2.6032	20171004	2.8908

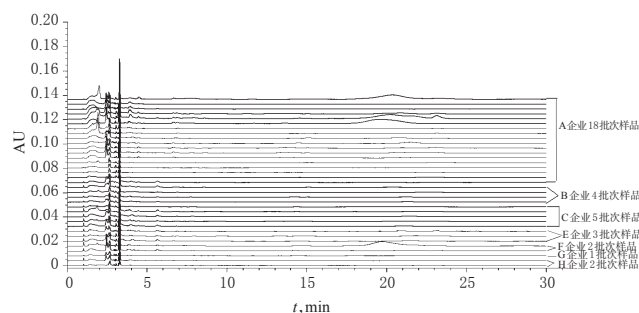


图5 A~C、E~H企业产35批次样品高效液相色谱图(叠加图)

Fig 5 HPLC chromatograms of 35 batches of samples from manufacturers A-C and E-H (overlaid maps)

2.3 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)对检测结果的确定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.01 mol/L 醋酸铵溶液(B)^[8], 梯度洗脱(0~4 min, 90% A→70% A; 4~9 min, 70% A; 9~11 min, 70% A→90% A); 流速: 0.35 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾质谱检测器, 负离子模式(ESI⁻); 检测方式: 选择离子监测(SIR), 二级质谱扫描(Daughter scan)方式; 去溶剂气温度: 330 °C; 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 28 V; 碰撞能量: 42 eV; 离子源温度: 110 °C^[9-10]。

2.3.3 供试品稀释液的制备 取“2.2.2”项下供试品溶液, 精密量取1 mL至10 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.4 土大黄苷对照品稀释液的制备 取“2.2.4”项下的质量浓度为55.25 μg/mL的土大黄苷对照品溶液, 加甲醇稀释得0.5525 μg/mL对照品溶液, 0.22 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.5 阴性溶液的制备 取“2.2.3”项下阴性样品溶液, 0.22 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.6 大黄药材稀释液的制备 取“2.2.5”项下大黄药材溶液, 精密量取1 mL至10 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.7 样品测定 精密吸取“2.3.3~2.3.6”项下各溶液, 按“2.3.1”“2.3.2”项下色谱与质谱条件进样测定。采用Masslynx 4.1软件进行分析, 记录一级质谱图与二级质谱图。结果显示, 在土大黄苷对照品稀释液中检测到其准分子离子[M-H]⁻峰质荷比(m/z)为419.0; 对 m/z 419.0峰进行二级子离子扫描, 产生的主要碎片离子 m/z 分别为257.1、241.2。同时, 在供试品稀释液中也检测到 m/z 419.0的准分子离子峰, 对其进行二级子离子扫描质谱分析, 同样产生 m/z 分别为257.1、241.2的碎片离子峰, 与土大黄苷对照品基本一致, 详见图6。此外, 阴性溶液和大黄药材稀释液经检测均未产生与土大黄苷对照品一致的准分子离子(图略), 这进一步证实了正品大黄药材中不含土大黄苷成分且阴性样品对检测无干扰。

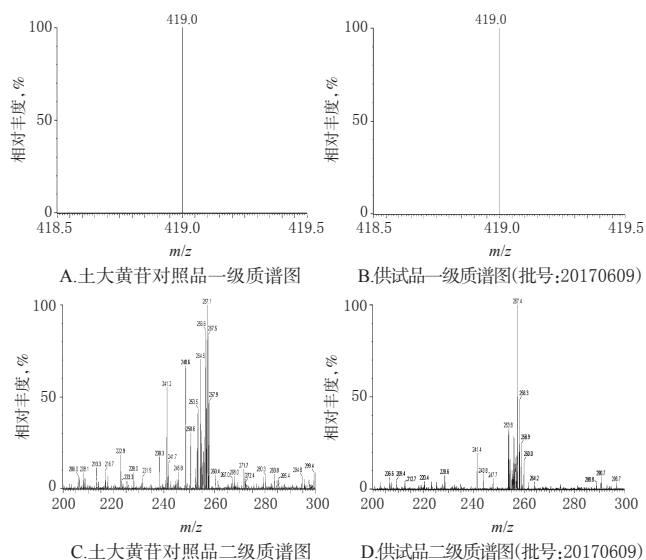


图6 土大黄苷质谱图

Fig 6 MS spectra of rhaponticin

3 讨论

3.1 检测方法的选择

由于中成药复方制剂成分复杂, 若仅采用TLC法检测某种成分是否存在, 易产生假阳性结果。本研究对复方龙胆碳酸氢钠片中非法成分土大黄苷采用TLC法进行定性检测, 初步筛选出阳性样品; 进一步与土大黄苷对照品进行比对, 通过HPLC法准确测定样品中土大黄苷的含量; 最后, 采用UPLC-MS/MS法对检出的土大黄苷的结构进行确证, 以验证前述HPLC法用于检测制剂中土大黄苷含量的方法是否准确、可行。

3.2 TLC法条件筛选

本课题组前期考察了不同薄层板的分离效果, 结果采用市售硅胶G板和聚酰胺薄膜均可有效分离供试品中的土大黄苷, 但后者用于土大黄苷检测的灵敏度更高且分离度更好; 同一土大黄苷对照品溶液在硅胶G板上

展开后呈现1个斑点,而在聚酰胺薄膜上除主斑点外尚可见其他2个斑点。此外,因土大黄苷对照品溶液不稳定,长期放置主斑点易分解^[1],故对照品溶液需临用新制。中药制剂成分复杂,采用TLC法检测时常会出现多个斑点,且在日光下、紫外光灯下检视或通过氨蒸气熏蒸后均呈现不同结果。本研究最终选择在紫外光灯下辨识度较高、显亮蓝色荧光斑点的结果为检视结果。

3.3 HPLC法样品处理方法筛选

在供试品溶液制备时,本课题组参考文献[12]方法,分别以甲醇、乙醇、乙酸乙酯为溶剂,考察了加热回流0.5、1、2 h和超声提取20、40、60 min等条件。结果,以甲醇为溶剂时土大黄苷提取较完全,且几乎无杂质干扰;加热回流1 h与超声处理1 h均可将样品中的土大黄苷提取完全。考虑到操作的简便可行,本研究选择加甲醇超声处理1 h进行提取。

3.4 UPLC-MS/MS法条件筛选

在进行UPLC-MS/MS分析时,由于供试品中成分复杂,分离效果不佳。本课题组将流动相洗脱条件由等度洗脱优化为适宜的梯度洗脱条件,结果可提高各成分间的分离度;同时,考察了不同的离子化模式、毛细管电压、锥孔电压及碰撞能量等条件,结果在ESI⁻模式下,调节较低的锥孔电压和适宜的碰撞能量,可获得较佳的质谱信号。

3.5 8家企业抽样的45批次样品检测结果分析

本研究采用HPLC法对从8家企业抽样的45批次复方龙胆碳酸氢钠片样品中的土大黄苷进行了含量测定,结果有10个批次检出了土大黄苷,检出率达22%。这10批样品均由D企业生产,说明该企业在生产复方龙胆碳酸氢钠片时投料的大黄药材存在以伪品替代正品的现象。因此,建立专属性强、灵敏度高的检测方法以控制复方龙胆碳酸氢钠片乃至所有含大黄的中药制剂中土大黄苷的含量,对于规范药品生产、确保药品质量很有必要。

综上所述,本研究建立的TLC法定性初筛结合HPLC法定量测定复方龙胆碳酸氢钠片中非法成分土大黄苷的方法简便、灵敏、可靠,现已申报国家药品监督管理局拟作为药品补充检验方法实施;在实际检验中,如有必要可采用UPLC-MS/MS法进一步确证结果。

参考文献

- [1] 中国执业药师协会.全国执业药师继续教育培训教材[M].北京:中国中医药出版社,2007:46.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:23.
- [3] 刘红梅.同属不同种大黄土大黄苷含量测定[J].实用中医内科杂志,2017,31(1):65-67.
- [4] 葛建华,刘训红,许虎,等.基于化学分析的不同品种大黄区分研究[J].中国中药杂志,2015,40(12):2309-2313.
- [5] 任伟光,王琦,黄林芳.大黄类药材的质量评价进展[J].中南药学,2014,12(4):354-359.
- [6] 刘若冰,刘灿辉.四黄泻火片中土大黄苷的定性鉴别[J].中医药导报,2013,19(10):88-91.
- [7] 朱南霖,许菊.牛黄消炎片中非法成分土大黄苷的检测[J].中成药,2013,35(4):870-871.
- [8] 孙爱萍,张西如,谷菲菲.LC-MS/MS方法测定中成药麻仁丸中添加伪品大黄的研究[J].中成药,2011,33(2):357-359.
- [9] 王银红,万胜利,王艳,等.TLC、HPLC、UPLC-MS法联合定性检查厚朴排气合剂中的土大黄苷[J].中南药学,2013,11(10):764-766.
- [10] 孟姝,林玉莲.采用TLC和HPLC法检查利胆片中的土大黄苷[J].中成药,2012,34(6):1193-1195,1202.
- [11] 严华,魏锋,肖新月,等.同属不同种大黄及含大黄制剂中土大黄苷检查方法的研究[J].药物分析杂志,2010,30(9):1615-1620.
- [12] 沈于兰,杨敏智,栾洁,等.对大黄中土大黄苷检测方法的改进[J].中国药事,2010,24(5):493-495.

(收稿日期:2019-03-13 修回日期:2019-06-06)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅