

复方王不留行片的质量标准研究

赵建颖*, 卢晓梅, 李亮亮, 许明哲(洛阳市食品药品检验所, 河南 洛阳 471023)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3426-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.39

摘要 目的:对复方王不留行片的质量标准进行补充研究。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中的王不留行进行定性鉴别;采用高效液相色谱法同时测定王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸的含量。色谱柱为YMC-Pack Pro C₁₈,流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μl。结果:TLC斑点清晰、分离较好,阴性对照无干扰。王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸进样量分别在0.055 7~2.228 7、2.011 4~40.227 9 μg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均≤1.01%;平均加样回收率分别为99.69%、99.84%,RSD分别为1.11%、1.18%($n=6$)。结论:该方法操作简便、快捷,结果准确、重复性好,可作为复方王不留行片的质量控制方法。

关键词 复方王不留行片;王不留行黄酮苷;邻氨基苯甲酸;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on the Quality Standard of Compound Vaccariae Tablets

ZHAO Jian-ying, LU Xiao-mei, LI Liang-liang, XU Ming-zhe (Luoyang Institute for Food and Drug Control, Henan Luoyang 471023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To conduct supplementary study for quality standard for Compound vaccariae tablets. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of Vaccariae; HPLC was used to determine the contents of vaccarin and anthranilic acid. The column was YMC-Pack Pro C₁₈ with mobile phase of methanol - 0.3% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 35 ℃ and volume size was 10 μl. RESULTS: The chromatographic spots were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range was 0.055 7-2.228 7 μg ($r=0.999\ 9$) for vaccarin and 2.011 4-40.227 9 μg ($r=0.999\ 9$) for anthranilic acid; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.01%; average recoveries were respectively 99.69% (RSD=1.11%, $n=6$) and 99.84% (RSD=1.18%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate with good reproducibility, and can be used for quality control of Compound vaccariae tablets.

KEYWORDS Compound vaccariae tablets; Vaccarin; Anthranilic acid; TLC; HPLC

复方王不留行片是由王不留行、邻氨基苯甲酸、干酵母、乳酸钙组成的复方制剂,具有增强体质、通经活血、散结、下乳、消肿、消痈的功效,临床上用于产后气血亏损、乳汁不通不下或乳少及乳痛、乳肿等症。国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第十四册WS-10001-(HD-1369)-2003未对方中主药王不留行进行质量控制,文献报道^[1]仅见方中王不留行薄层色谱(TLC)鉴别方法,未见王不留行中王不留行黄酮苷的含量测定方法。为了有效地控制产品质量,笔者建立了TLC法对王不留行进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定方中邻氨基苯甲酸及王不留行黄酮苷的含量。

1 材料

1.1 仪器

U3000型HPLC仪,包括LPG-3400SD型泵、WPS-3000SL型自动进样器、TCC-3000RS型柱温箱、VWD-3100型紫外检测器、Chromleon色谱工作站(美国Dionex公司);92SM-202-A-DR电子分析天平(瑞士Precisa公司);UV-2401PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方王不留行片(白云山汤阴东泰药业有限责任公司,批

粒中阿魏酸和丹酚酸B含量[J].中成药,2009,31(4):554.

[7] 刘征辉,叶挺祥,赵琳琳,等.HPLC多波长法同时测定血府逐瘀颗粒中多指标成分的含量[J].中国中药杂志,2010,35(16):2157.

[8] 杜志茂,黄安军,白娟.HPLC同时测定消栓通络胶囊中阿魏酸、芦丁和丹酚酸B的含量[J].中成药,2010,32

(3):433.

[9] 黄安军,聂晓玲.HPLC法同时测定乳核内消液中芍药苷和阿魏酸的含量[J].西北药学杂志,2009,24(6):436.

[10] 王静,魏娜,赵洪芝,等.HPLC、UPLC测定芪参益气滴丸中5个丹参活性成分含量的比较研究[J].药物分析杂志,2011,31(9):1678.

(收稿日期:2014-08-09 修回日期:2015-06-19)

(编辑:余庆华)

*主管药师。研究方向:药品质量标准。电话:0379-63935767。

E-mail: lyxbl2012@163.com

号:130302、120606、130311、131104;焦作市博爱药业有限公司,批号:110621)。王不留行黄酮苷对照品(批号:111853-201001,纯度:91.7%)、王不留行对照药材(批号:121094-200703)均购自中国食品药品检定研究院;邻氨基苯甲酸对照品(批号:C1305010,纯度:99.5%)购自上海晶纯生化科技股份有限公司;聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);甲醇为色谱纯,磷酸、乙醇、无水乙醇、三氯化铝均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 王不留行的TLC鉴别

取本品,除去糖衣,粉碎,取粉末适量(约相当于王不留行1.0g),置于锥形瓶中,加70%甲醇40ml,超声(功率:200W,频率:40kHz)处理30min,放冷,滤过,滤液作为供试品溶液。另取王不留行对照药材1g,照上述供试品溶液的制备方法制成对照药材溶液。再取王不留行黄酮苷对照品适量,加甲醇制成每1ml含0.1mg的溶液,作为对照品溶液。再取“2.2.2”项下缺王不留行的阴性样品适量,照上述供试品溶液的制备方法制成缺王不留行的阴性样品溶液。按TLC法^[2]试验,吸取上述4种溶液各2μl,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以无水乙醇-水(4:6,V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,采用2%三氯化铝乙醇溶液浸渍法显色,热风吹干,置紫外光灯(365nm)下检视。结果,供试品溶液中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,缺王不留行的阴性样品无干扰,详见图1。

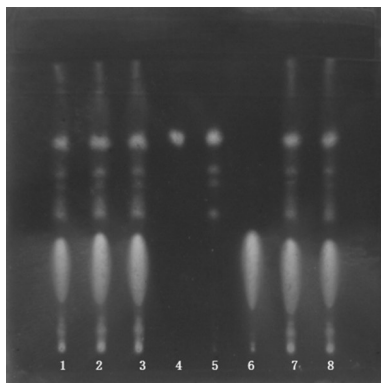


图1 薄层色谱图

1~3、7~8.5批样品;4.王不留行黄酮苷对照品;5.王不留行对照药材;6.缺王不留行的阴性样品

Fig 1 TLC chromatograms

1-3, 7-8.test sample; 4.reference substance of vaccarin; 5.reference substance of *Vaccaria segetalis*; 6.negative sample without *V. segetalis*

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:YMC-Pack Pro C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:甲醇为流动相A,0.3%磷酸溶液为流动相B,梯度洗脱,程序详见表1;流速:1.0ml/min;检测波长:280nm;柱温:35℃;进样量:10μl。

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液。精密称取王不留行黄酮苷对照品30.38mg,置于50ml量瓶中,用70%甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为王不留行黄酮苷对照品贮备液。再精密称取邻氨基苯甲酸101.08mg,置于50ml量瓶中,再精密量取上述王不留行黄酮苷对照品贮备液5ml,置于同一50ml量瓶中,用70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of the linear gradient elution

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	30	70
10	30	70
20	40	60
35	50	50

液。(2)供试品溶液。取样品40片,除去糖衣,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于王不留行1.0g),置于50ml量瓶中,加70%甲醇30ml,超声(功率:200W;频率:40kHz)处理30min,放置至室温,用70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。(3)阴性对照溶液。按处方比例分别称取除邻氨基苯甲酸、王不留行外的其余各成分,按制备工艺分别制成缺邻氨基苯甲酸、王不留行的阴性样品,按上述供试品溶液制备方法,制成缺邻氨基苯甲酸、王不留行的阴性对照溶液。

2.2.3 系统适用性试验 精密吸取“2.2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,供试品溶液中邻氨基苯甲酸和王不留行黄酮苷能达到基线分离,理论板数以王不留行黄酮苷计不低于5500,分离度>9.2;阴性对照溶液无干扰。色谱见图2。

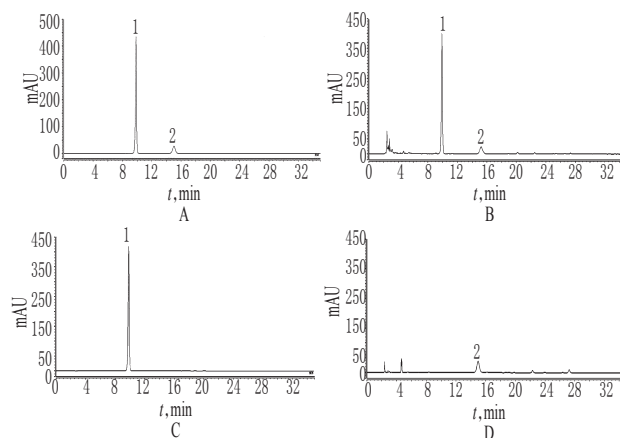


图2 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺王不留行的阴性对照;D.缺邻氨基苯甲酸的阴性对照;1.邻氨基苯甲酸;2.王不留行黄酮苷

Fig 2 HPLC chromatograms

A.mixed reference; B.test sample; C.negative sample without *V. segetalis*; D.negative sample without anthranilic acid; 1.anthranilic acid; 2.vaccarin

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液1、3、5、7、10、20μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰面积。以进样量(x,μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y_{\text{王不留行黄酮苷}} = 21.56x - 0.100$ ($r = 0.9999$); $y_{\text{邻氨基苯甲酸}} = 3.755x + 1.296$ ($r = 0.9999$)。结果表明,王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸的进样量分别在0.0557~2.2287、2.0114~40.2279μg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液10μl,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样6次。结果,王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸的峰面积的RSD分别为0.97%、0.38%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品(批号:130302)溶液适量,分别

于配制0、2、6、8、12 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸峰面积的RSD分别为0.86%、0.79% ($n=6$),表明供试品溶液12 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品(批号:130302)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,样品中王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸的平均含量分别为1.010 2、32.016 mg/g, RSD分别为1.01%、0.68%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号:130302)细粉适量(约相当于王不留行0.5 g),共6份,分别置于50 ml量瓶中,分别加入邻氨基苯甲酸对照品约50 mg、“2.2.2”项下王不留行黄酮苷对照品贮备液3.0 ml,加70%甲醇30 ml,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定并计算加样回收率,结果详见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
王不留行黄酮苷	1.610 3	1.626 7	1.671 5	3.283 0	99.09	99.69	1.11
	1.611 6	1.628 0	1.671 5	3.301 0	100.09		
	1.612 5	1.628 9	1.671 5	3.297 3	99.81		
	1.610 4	1.626 8	1.671 5	3.287 9	99.38		
	1.613 4	1.629 9	1.671 5	3.327 1	101.54		
	1.610 8	1.627 2	1.671 5	3.269 4	98.25		
邻氨基苯甲酸	1.610 3	51.555 4	51.280 0	101.923 0	98.22	99.84	1.18
	1.611 6	51.597 0	50.290 0	101.975 0	100.17		
	1.612 5	51.625 8	51.120 0	103.366 0	101.21		
	1.610 4	51.558 6	49.850 0	101.710 0	100.60		
	1.613 4	51.654 6	50.230 0	102.009 0	100.25		
	1.610 8	51.571 4	50.980 0	101.830 0	98.58		

2.2.9 样品含量测定 取5批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,以外标法计算,结果详见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	含量, mg/片	
	王不留行黄酮苷	邻氨基苯甲酸
120606	0.326 3	9.933 8
130302	0.323 2	9.923 0
130311	0.221 2	9.837 3
130304	0.310 7	9.962 4
110621	0.262 1	9.855 1

3 讨论

3.1 检测波长的选择

精密称取王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸对照品各适量,用70%甲醇配制成适宜浓度的溶液,照紫外-可见分光光度法在200~400 nm范围内扫描吸收光谱。结果表明,王不留行黄酮苷在280 nm波长处有最大吸收,邻氨基苯甲酸在217、243 nm波长处均有最大吸收。由于处方中王不留行黄酮苷的含量相对较低,为使两种成分都有较好的响应,故选择280 nm作为检测波长。

3.2 流动相的筛选

参考相关文献^[1-9],本试验比较了多种流动相系统,分离效果均不理想。最终选用甲醇-0.3%磷酸溶液作为流动相,通过优化,使样品中邻氨基苯甲酸与王不留行黄酮苷色两组分达到基线分离,阴性对照样品无干扰,且各组分分离度良好,峰形佳。

3.3 耐用性考察

本文考察了YMC-Pack Pro C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo Syncronis C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)等色谱柱对目标化合物分离度和含量测定结果的影响。结果表明,3个不同厂家的同类型色谱柱对样品含量测定结果没有显著影响,含量测定RSD<2.8%,分离度均>3.4。

3.4 TLC鉴别中展开系统和温度的考察

笔者曾采用甲醇-水(4:6, V/V)、甲醇-水(1:1, V/V)等展开系统对方中王不留行进行TLC鉴别,但阴性对照样品均有干扰,效果不佳。最终采用无水乙醇-水(4:6, V/V)的展开系统,该方法阴性对照样品无干扰,斑点清晰,分离度好。试验中笔者还发现,温度对样品的分离度有较大影响,温度高时阴性样品干扰大,斑点分离度差,因此TLC鉴别时应控制温度在20℃以下。

3.5 含量测定结果分析

由本研究结果可知,不同厂家样品中王不留行黄酮苷的含量相差极大,且低于2010年版《中国药典》(一部)^[10]中对王不留行药材最低限量(0.40%)的规定。分析原因,主要是由于原质量标准中无王不留行质量控制,厂家投料用饮片含量差异所致。为了更好地控制复方王不留行片的质量,保证用药安全、有效,有必要建立王不留行黄酮苷的含量控制标准。

综上所述,该方法操作简便、快捷,结果准确、重复性好,可作为复方王不留行片的质量控制方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:49、附录VI B.
- [2] 王玉霞, 殷永伟, 耿琴. HPLC测定肾石通颗粒中王不留行黄酮苷的含量[J]. 数理医药学杂志, 2012, 25(5):557.
- [3] 韩晋, 李娜, 刘冬, 等. 复方灵芝乳膏中王不留行黄酮苷含量测定方法研究[J]. 解放军药学报, 2012, 28(5):415.
- [4] 孟贺, 陈玉平, 秦文杰, 等. HPLC测定王不留行中王不留行黄酮苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):2 072.
- [5] 张辉, 陈乃江. HPLC法测定复方王不留行片中邻氨基苯甲酸的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(4):63.
- [6] 王小雪, 郑文捷, 谢国祥, 等. 高效毛细管电泳同时测定板蓝根中水杨酸、丁香酸、苯甲酸和邻氨基苯甲酸[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2):189.
- [7] 方建国, 万进, 汤杰, 等. 大孔吸附树脂分离纯化大青叶有机酸部位的实验研究[J]. 中国药房, 2007, 18(16):1 214.
- [8] 王文清, 张飞, 方建国, 等. 反相高效液相色谱法测定大青叶中邻氨基苯甲酸与丁香酸的含量[J]. 医药导报, 2005, 25(5):456.

(收稿日期:2015-03-18 修回日期:2015-06-19)

(编辑:余庆华)