

白薇配方颗粒中白薇及伪品老瓜头 HPLC 检测方法研究

张杰 李培 董清

聊城市检验检测中心 山东聊城 252000

摘要: 目的 建立白薇配方颗粒中活性成分对羟基苯乙酮的含量测定方法。同时,对常见伪品老瓜头定性,防止误投误用。方法 以 DiamonsilC18 柱(5 μm, 250mm×4.6mm)为色谱柱,梯度洗脱,波长为 276nm、325nm,流速为 1.0ml/min,柱温为 30℃。结果 对羟基苯乙酮在 2.1718 μg/ml ~ 43.4000 μg/ml 范围内呈良好的线性关系, r=0.9996; 样品平均加样回收率为 98.5% (n=9), RSD=1.90%。结论 本方法简便、准确,结果稳定,可用于白薇配方颗粒中对羟基苯乙酮的测定。

关键词: 白薇配方颗粒; 对羟基苯乙酮; 含量测定; 老瓜头定性

中药配方颗粒因免煎煮、服用方便、易于储运等优点应用广泛,成为中药制剂工艺改进的一个研究方向。但中药配方颗粒的科学性及与中医传统用药理论的一致性问题,仍是当今研究的热点^[3]。配方颗粒是对汤剂的改革,汤剂是诸药合煎,配方颗粒是一味中药单独煎煮,中药配方颗粒能否替代饮片应用于临床仍值得探讨^[3-4]。由于国家食品药品监督管理局无审批中药配方颗粒,也未制订相关国家法定标准,各个省对中药配方颗粒的政策把握差异很大。在山东省,中药配方颗粒属监管空白地带。

白薇配方颗粒企业标准均无含量测定项,不能很好的控制白薇配方颗粒的质量。目前白薇药材市场状况混乱,同科近缘植物冒充白薇现象普遍,以老瓜头最为常见。白薇饮片外观性状与其常见伪品老瓜头相近,易混淆,部分中药生产企业由于药材鉴定水平较低,存在误买误用的可能。同时,由于老瓜头分布广泛、资源丰富,价廉、易得,不排除部分生产企业为节约成本以老瓜头代替白薇投料的可能。在这样的背景下,才尝试进行相关方面的探索研究。现报道如下。

1. 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo U-3000 高效液相色谱系统(德国 thermo 公司,配有 DAD 检测器); WatersC18 柱(5 μm, 250mm×4.6mm, Waters 科技公司); Sartorius BT125D 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司); KQ100 型超声波药品处理机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对羟基苯乙酮对照品(中国食品药品检定研究院,批

号: 111897-201602); 白薇苷 A (BioBioPha Co., Ltd, 批号: BBP03414); 白薇对照药材(中国食品药品检定研究院,批号: 121518-201604)。样品: 白薇配方颗粒(A 厂 2 批,批号: 7073053, 7073052; B 厂 2 批,批号: 1709001S, 1702001S; C 厂 1 批,批号: 18101013; D 厂 1 批,批号: 18034812), 甲醇(色谱纯, Thermo Fisher 公司); 水为超纯水; 其他化学试剂均为市售分析纯。

未购买到老瓜头对照药材,以山东省食品药品检定研究院(以下称“省院”)提供的老瓜头饮片作为对照药材。

2. 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Waters-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);

流动相 A: 甲醇;

流动相 B: 0.1% 磷酸溶液;

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~10	20 → 30	80 → 70
10~25	30	70

检测波长为 276nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30℃, 进样量为 10 μl;

理论板数按对羟基苯乙酮峰计算应不低于 4000。

2.2 溶液的制备

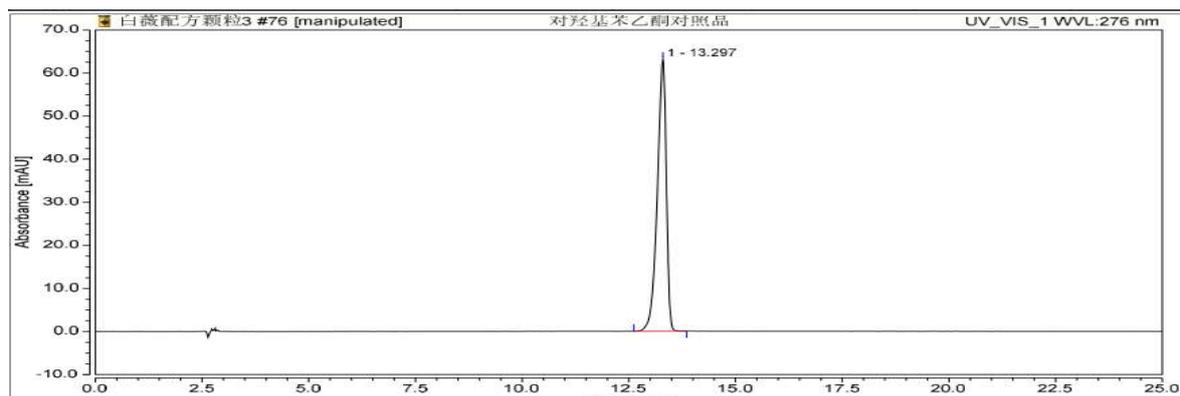
供试品溶液及阴性对照: 取本品适量,研细,取约 1g 精密称定(详见表 1),置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50ml, 密塞,称重,超声处理 30 分钟,放冷,再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照溶液：以空白辅料代替白薇颗粒供试品，同法制备，即得。

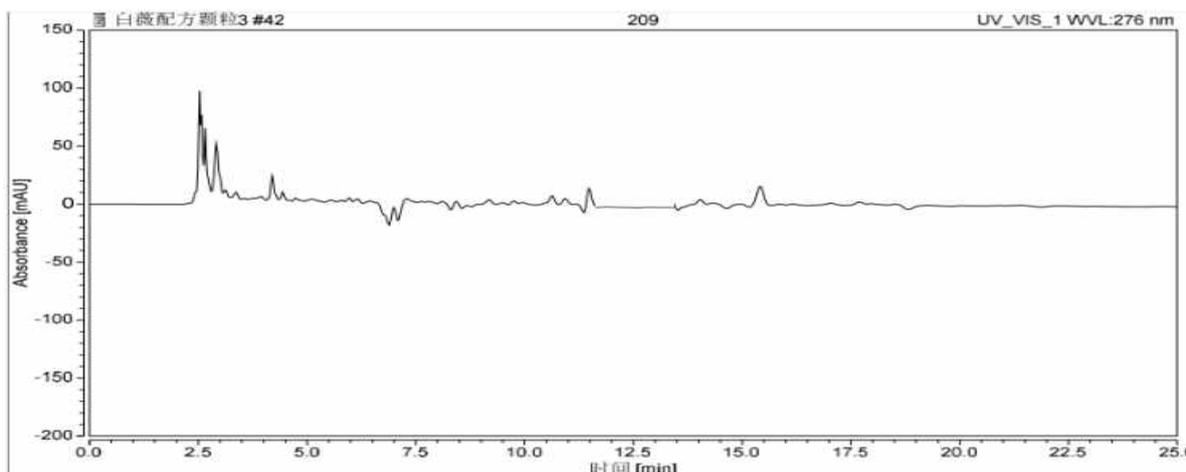
对照品溶液：精密称取对羟基苯乙酮对照品适量，置 500ml 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3 干扰试验

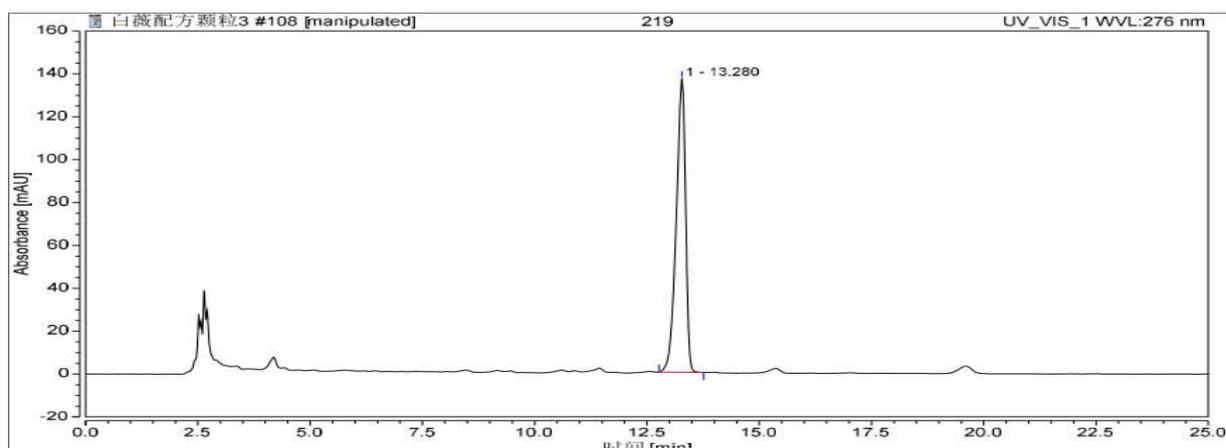
分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，按“2.1”项下条件测定。结果表明，阴性样品中在与对羟基苯乙酮对照品保留时间相应的位置无色谱峰，其他组分对测定无干扰。色谱见图 1。



A 对羟基苯乙酮对照品



B 阴性对照



C 白薇配方颗粒样品

图 1：干扰试验图谱

2.4 线性关系考察

精密吸取对羟基苯乙酮对照品溶液 (0.0217mg/ml), 分别取 1 μ l、2 μ l、5 μ l、10 μ l、12.5 μ l、15 μ l、20 μ l, 按上述色谱条件注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以峰面积 Y 为纵坐标, 以进样浓度 X (μ g/ml) 为横坐标分别绘制标准曲线, 得回归方程: $Y=0.7002x+0.127$, $r=0.9996$

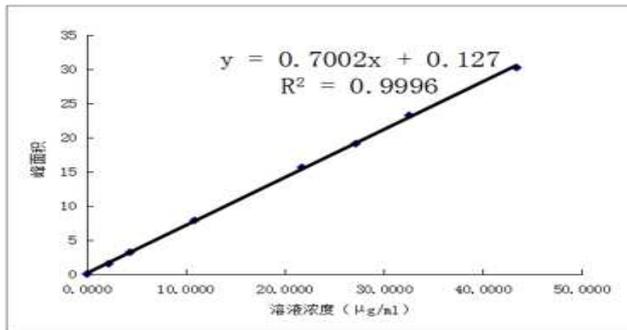


图 2: 对羟基苯乙酮标准曲线

表明对羟基苯乙酮在 2.1718 ~ 43.4000 μ g/ml 此范围内峰面积呈良好的线性关系。

2.5 方法学考察

精密度试验: 按“2.2”项下制备样品溶液, 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定进样 10 μ l, 连续进样 6 次, 以峰面积计算, 结果对羟基苯乙酮的 RSD 为 2.47% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 按“2.2”项下制备的样品溶液, 分别在 0、2、6、12、20、24h 进样 10 μ l, 以峰面积计算, 结果对羟基苯乙酮的 RSD 为 1.31%, 表明供试品溶液在 24h 内稳定。

重现性试验: 取同一批号的供试品, 按“2.2”项下制备样品溶液, 平行制备 5 份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以峰面积计算含量。结果对羟基苯乙酮的 RSD 为 2.20%, 表明本方法重现性符合要求。

加样回收试验: 精密称取已知含量的供试品 (批号: 1702001S, 含量: 0.52%) 9 份, 分别精密称取一定量的对羟基苯乙酮对照品 (详见表 1), 加入上述 9 份供试品中, 按“2.2”项下操作, 设计低、中、高 3 种不同浓度, 每种浓度分别制备 3 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算平均回收率为 97.4%, RSD 为 0.82%。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验 ($n=9$)

样品重量 (g)	样品含量 (mg)	对照加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
0.1031	0.536	0.368	0.894	97.20		
0.1050	0.546	0.365	0.893	95.24		
0.1033	0.537	0.365	0.893	97.47		
0.1027	0.534	0.542	1.066	98.18		
0.1017	0.529	0.537	1.068	100.54	98.5	1.90
0.0983	0.511	0.544	1.063	101.55		
0.1018	0.529	0.652	1.170	98.33		
0.1006	0.523	0.633	1.145	98.21		
0.1018	0.529	0.642	1.168	99.454		

2.6 样品测定

对 3 批样品进行测定, 分别按“2.2”项下方法制备样品, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以峰面积计算含量。结果批号为 18101013、1709001S、1702001S 的样品含量分别为 0.74%、0.55%、0.52%。

3. 白薇主要伪品老瓜头定性

3.1 老瓜头的确认

通过山东省院林主任、穆老师指导, 用山东省院已经确认过的老瓜头药材作为对照药材使用。省院通过性状、显微、基因测序等研究判定样品为萝藦科植物老瓜头 (*Cynanchum komarovii* Al. Iljinski) 的干燥根和根茎 (以老瓜头代称)^[5]。

3.1.1 药材外观及断面见图 3 ~ 6。



图 3 白薇药材图



图 4 白薇断面图 (木部较小)



图 5 老瓜头药材图

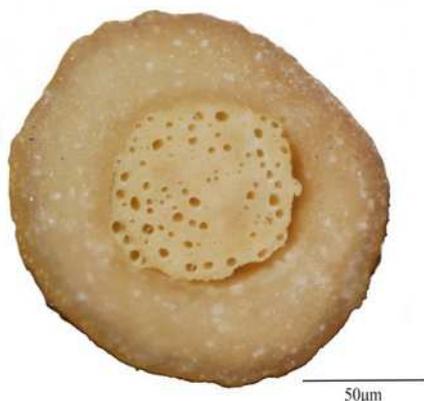


图 6 老瓜头断面 (木部较大)

3.1.2 DNA 鉴定 将正品白薇和收集的老瓜头药材分别测序, 白薇、老瓜头的测序结果如下:

白薇:

TCGCAATCGTTGCGATTGCCCTCGCTGAAGGGACTCG

TCTCGCACGGGTCCAAATGCTCTCCTCGACGCAGCTTGCC
GGCAACTCGCGTACAATCTCGACGACCACCACTTGTGCGGA
CGTCCGCGCCGAGGGAACCGTTGTTTCAGGCTAGCCGAAA
CGCTGCACGGGAAGCCAACCTCCGCCCCACGCTAAGGCC
CGCGACCCTTTCGGGACACGGGTGAGGGGGGACGACGCA
ATGCGTGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGG
CTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCCATGGTTCACGG
GATTCTGCAATTCACACCAACTATCGCAGTTTGCTACGTT
TTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCG
TACTCTATTATACAACATTTTCATTTGGAGACCCTTTTAAAT
CCCCGCGCCAGGATGCCGCGGGAAGGCCGTCCTCTATTT
GCCAGTCCTTGGCGCTTCCGCGCCGGATTTTGTTCGATG
CTCGACGCGTCCGGCAACAAGTCGCCGACCCACACCGAGCA
AGGGCGCAACAGCGCTTGTGATTTTCGGAACGTGTTCCGAG
GTCATTCCGTACGAGGATTTGACAATGACCTTCCGCAGGTC
ACCTAC

老瓜头:

TTTGCTAAAGTCAGCGGTAGCCCCGCTGACTTGGG
GTGCGAATCGTTGCGATTGCCCTCGCCGAAGGGACTCGTC
TCGCACAGGGTCCAAATGCTCTCCTCGACGCAGCTTGCCCG
CAACTCGCGTACAATCTCGACGGACCACCACTTGTGCGGAC
GTCCGCGCCGAGGGAACCGTTGTTTCGGGCTAGCCGAAAC
GCTGCACGGGAAGCCAACCTCCGCCCCACCCCTAAGGCC
GCGACCCTTTCGGGACACGGGTGAGGGGGGACGACGCAA
TGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTT
CGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCCATGGTTCACGGGAT
TCTGCAATTCACACCAACTATCGCAGTTTGCTACGTTCTCA
TCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTA
GTGTACACAACATTTTCATTTGGAGACCCTTTAATCCCCGCG
GCATGCCAGGATGCCGCGGGAAGGCCATCCTCTATTTCCGT
AGTCCTTGGCGCTTCCGCGCCGGATTTTGTTCGATGCTC
GACCGCTCCGGCAACAAGTCACCGACCCGCACCGAGCAAG
GGCGCAACGGCGCTTGTGATTTTCGGAACGTGTTCCGAGGT
CATTCCGTACAAGGATTTGACAATGATCCTTCCGCAGGTT
ACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCTCTAAATG

3.2 HPLC 波长切换为 325nm, 其他色谱条件法采用白薇配方颗粒中对羟基苯乙酮的含量的测定方法对老瓜头特征成分定性

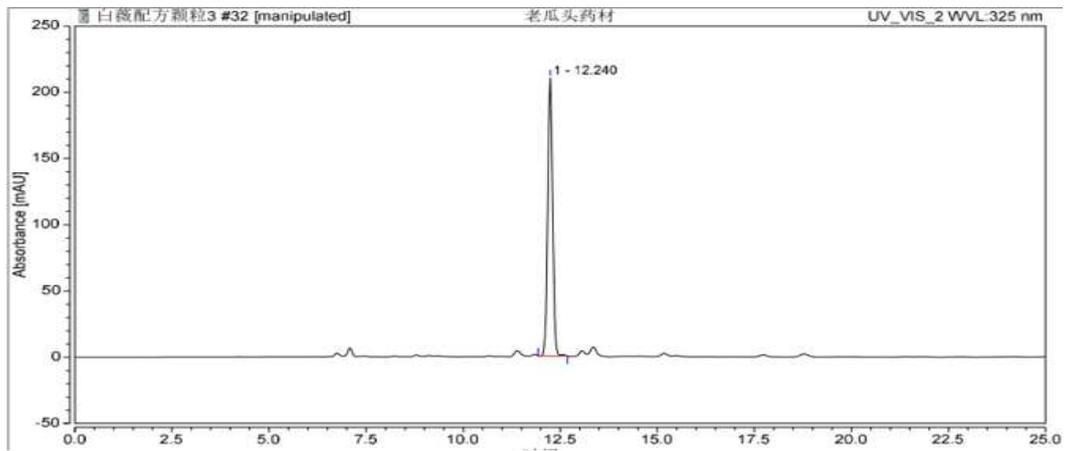


图7 老瓜头的 HPLC 色谱图

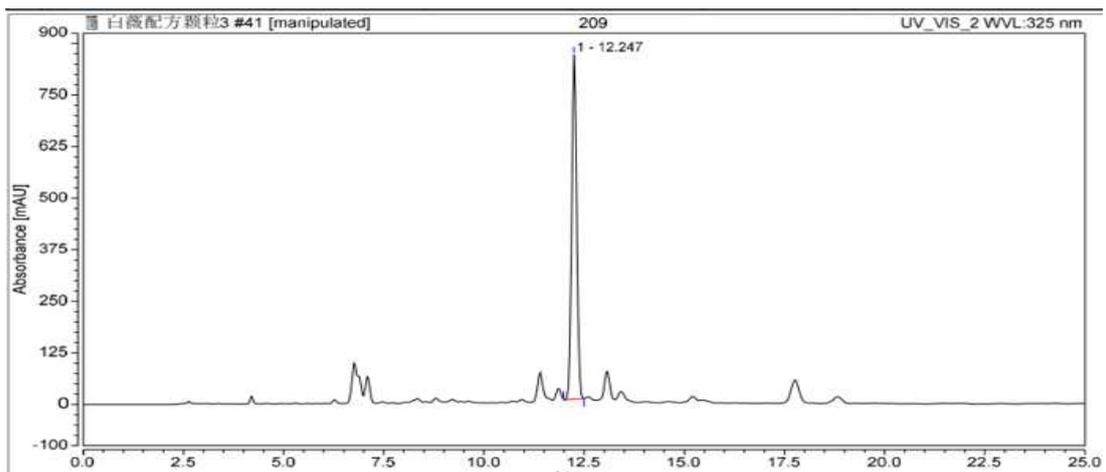


图8 检出老瓜头的白薇配方颗粒样品 HPLC 色谱图

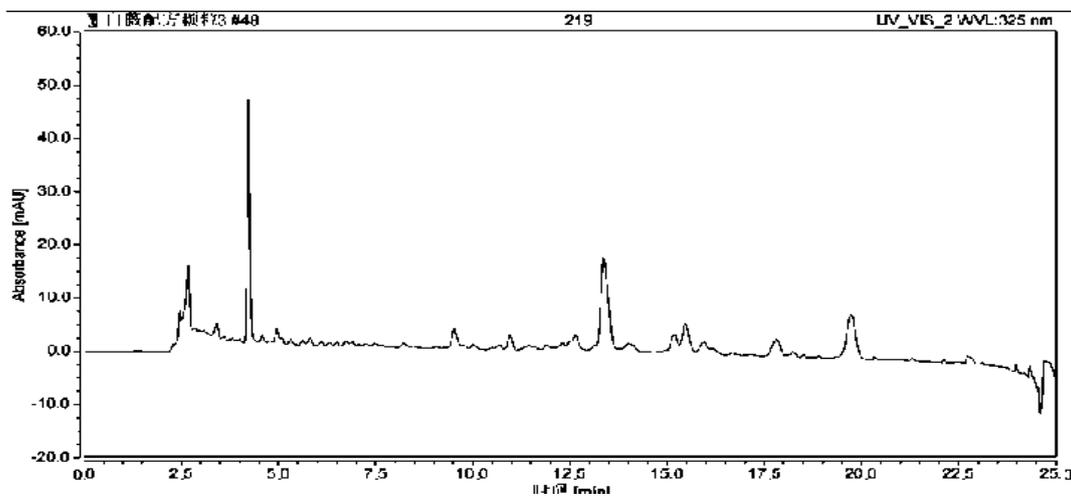
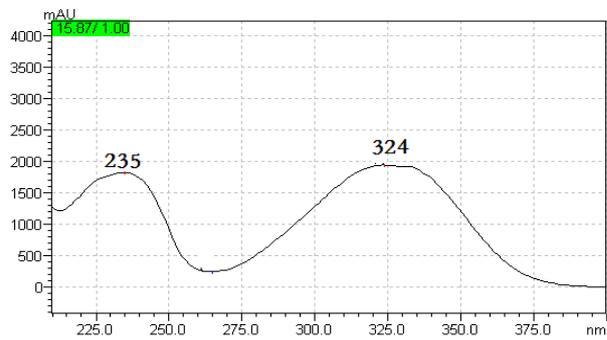
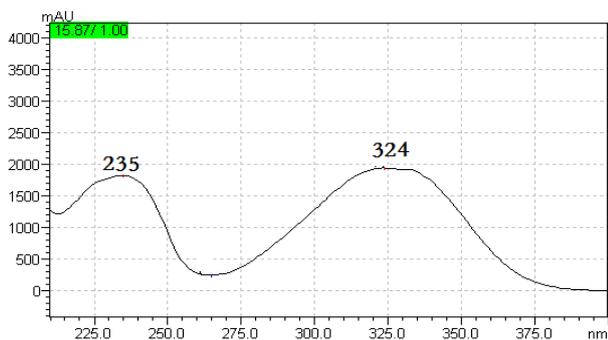


图9 未检出老瓜头的白薇配方颗粒样品 HPLC 色谱图



3.3 掺假样品中老瓜头检出比例

按该标准检验，6 批样品中 3 批符合规定，合格率为 50%。图谱见图 10。

4. 讨论

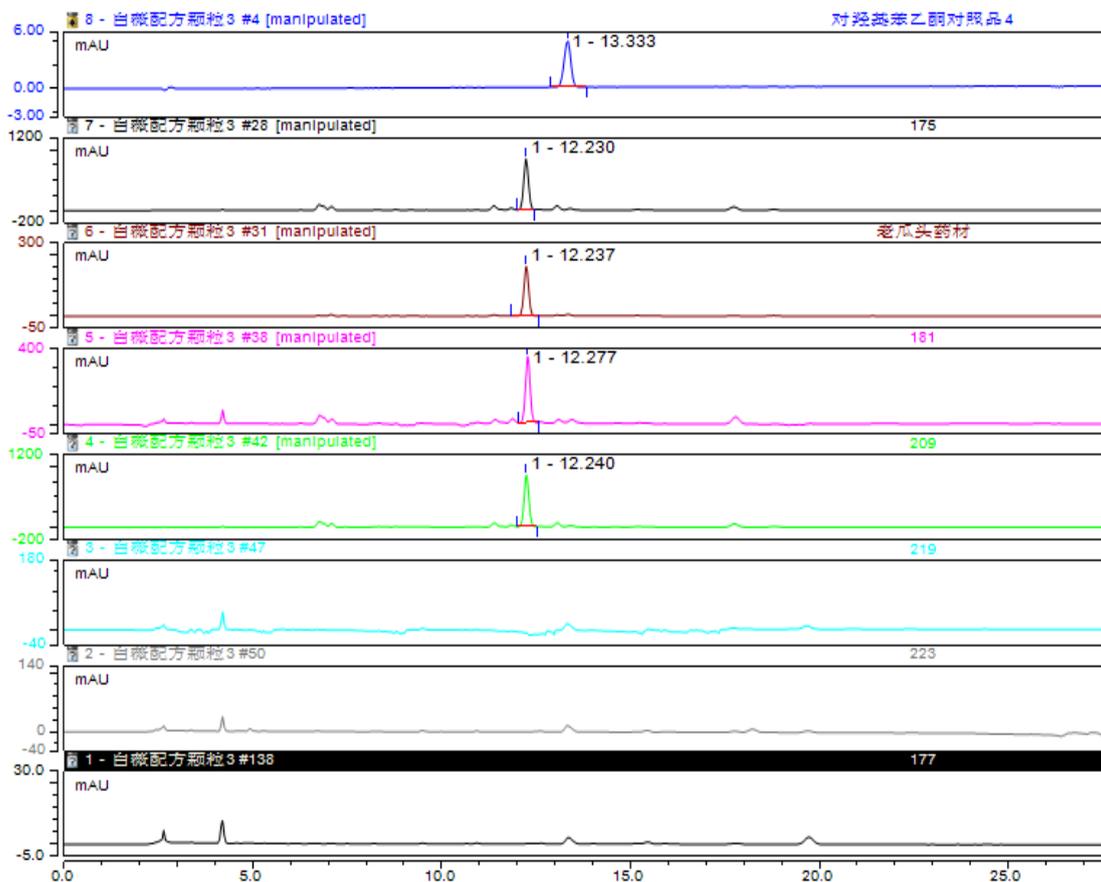


图 10

4.1 检测波长的选择

主要依据供试品溶液中对羟基苯乙酮主峰有无干扰，通过 DAD 检测器对供试品中对羟基苯乙酮的全波长检测，经比较供试品在按“2.1”项色谱条件测定，在 276nm 波长处对羟基苯乙酮主峰与其他杂质峰分离良好，对羟基苯乙酮

主峰的纯度因子 999，在可接受的阈值内。见图 10。

4.2 含量测定主要成分的选择

白薇《中国药典》2015 年版来源有两个，萝藦科植物白薇 *Cynanchum atratum* Bge. 或蔓生白薇 *Cynanchum*

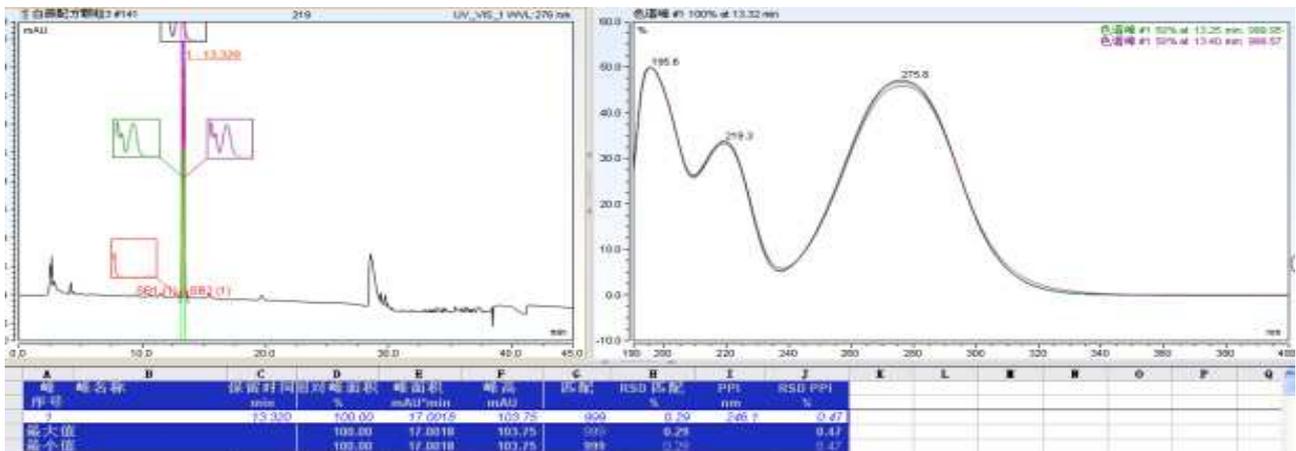


图 10 供试品中对羟基苯乙酮 276nm 处峰纯度

versicolor Bge. 的干燥根和根茎。查阅文献，直立白薇根含白薇素、挥发油、强心甙。蔓生白薇根中含有 C21 甾体甙蔓生白薇甙，蔓生白薇新甙 (neocynanversicoside) 和白前甙。两种来源的白薇所含化学成分存在差异，有报道两种白薇中都含白薇苷 A。经实验验证，白薇苷 A 紫外吸收弱，且价格比较贵。在实验中发现白薇中对羟基苯乙酮紫外吸收强，且经济实惠，用对羟基苯乙酮作为质控成分进行 HPLC 含量测定完全能够达到白薇配方颗粒质量控制的目的。故以对羟基苯乙酮的含量为指标进行质量控制。

4.3 本文参考国内外大量有关白薇的文献资料和多次试验，建立了本实验方法，实验结果显示，本方法简便、准确，结果稳定，可用于控制白薇配方颗粒的质量。同时对常见伪品老瓜头定性，防止误投误用。

5 感谢

感谢山东省食品药品检验研究院林永强主任、穆向荣老师的指导帮助。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 2015:38,111-111.
 [2] 马良珠. 中药配方颗粒的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2013(18):81-82.
 [3] 葛少波, 刘婕, 张杰, 等. 中药配方颗粒临床应用方法现状探讨 [J]. 中国药业, 2017,26(9):1-4.
 [4] 李玲, 聂海洋. 中药配方颗粒的发展现状及思考 [J]. 航空航天医学杂志. 2019,30(4):466-468.
 [5] 肖功胜, 王永兵, 等. 不同产地白薇中 C21 甾体皂苷的含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2014,31(10):1228-1231.

[6] 郑兆广, 柳润辉, 等. 蔓生白薇中的 C21 甾体类成分 [J]. 中国天然药物, 2006,(5):338-343.

[7] 王元书, 赵新超, 等. HPLC 法测定直立白薇中对羟基苯乙酮和 2,4-二羟基苯乙酮的含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22:1073-1076.

[8] 邱声祥, 张壮鑫, 等. 蔓生白薇中白薇新甙的分离和结构鉴定 [J]. 药学报 1990,(6):473-476.

[9] 袁鹰. 直立白薇活性成分及质量控制研究 [J]. 上海交通大学.

[10] 王宏洁, 司南, 等. 中药白薇中白薇正苷 A 含量测定 [J] 中国实验方剂学杂志, 2005,(1):5-6.

[11] 白虹, 王元书, 刘爱芹. 直立白薇挥发油成分的气相色谱-质谱联用分析 [J] 时珍国医国药, 2007,(10):2343-2344.

[12] 袁鹰, 张卫东, 等. 白薇的化学成分和药理研究进展 [J] 药学实践杂志, 2007,(1):6-9.

第一作者: 第一作者简介: 张杰 (1978 年), 男, 汉族, 山东省聊城市人, 本科, 聊城市检验检测中心, 副主任中药师, 研究方向: 药品检验及标准研究。

省级基金编号: 鲁药监办 [2019]14 号 -9.