

[质 量]

UPLC 法同时测定玉屏风颗粒中 9 种成分

廖小芳¹, 毕晓黎^{2,3*}, 胥爱丽^{2,3}, 袁春平⁴, 李养学^{2,3}, 高永坚⁴

(1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095; 3. 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095; 4. 国药集团广东环球制药有限公司, 广东 佛山 528303)

摘要: **目的** 建立 UPLC 法同时测定玉屏风颗粒(黄芪、白术、防风)中升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ的含有量。**方法** 该药物 75% 甲醇提取液的分析采用 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μ m); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 0.20 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 220 nm。**结果** 9 种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 0$), 平均加样回收率 96.40%~106.82%, RSD 2.14%~3.85%。**结论** 该方法简便、快速、准确, 可用于玉屏风颗粒的质量控制。

关键词: 玉屏风颗粒; 化学成分; UPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)02-1778-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.08.005

Simultaneous determination of nine constituents in Yupingfeng Granules by UPLC

LIAO Xiao-fang¹, BI Xiao-li^{2,3*}, XU Ai-li^{2,3}, YUAN Chun-ping⁴, LI Yang-xue^{2,3}, GAO Yong-jian⁴

(1. The Fifth Clinical Medicine College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Institute for Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory for Research and Development of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China; 4. Sinopharm Group Guangdong Medi-world Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528303, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a UPLC method for the simultaneous content determination of prim-*O*-glucosylcimifugin, calycosin-7-*O*- β -D-glucoside, cimifugin, 4'-*O*- β -glucopyranosyl-5-*O*-methylvisamminol, ononin, calycosin, sec-*O*-glucosylhamaudol, formononetin, atractylenolide Ⅲ in Yupingfeng Granules (*Astragali Radix*, *Atractylodis macrocephalae Rhizoma*, *Saposhnikoviae Radix*). **METHODS** The analysis of 75% methanol extract of this drug was performed on a 30 $^{\circ}$ C thermostatic ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ column (2.1 mm×150 mm, 1.8 μ m), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 0.20 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 220 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.40%–106.82% with the RSDs of 2.14%–3.85%. **CONCLUSION** This simple and accurate method can be used for the rapid quality control of Yupingfeng Granules.

KEY WORDS: Yupingfeng Granules; chemical constituents; UPLC

收稿日期: 2018-08-23

基金项目: 广东省名优中成药二次开发项目(粤中医办函[2017]19); 广东省科技计划项目(2017A070701017)

作者简介: 廖小芳(1993—), 女, 硕士生, 从事中药质量评价研究。Tel: (020) 83482098, E-mail: lalala0234@126.com

* 通信作者: 毕晓黎(1979—), 女, 博士, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药质量评价研究。Tel: (020) 83482098, E-mail: 549732952@qq.com

网络出版日期: 2019-01-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20190115.0930.002.html>

玉屏风颗粒源于元代《丹溪心法》中的玉屏风散，是治疗表虚自汗的经世名方，由黄芪、炒白术、防风组成，主要功效为益气、固表、止汗，一般用于表虚不固、自汗恶风、面色皓白或体虚易感风邪者。黄芪、炒白术、防风含有丰富的化学成分，具有广泛的药理活性^[1-7]，其中黄芪主要含多糖、皂苷、黄酮类成分，具有增强机体免疫力、抗病毒、抗应激功效等作用^[8]；升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷具有解热、镇痛、清除自由基等作用^[9]；白术内酯Ⅲ具有抗炎、促进胃肠运动等作用^[10]。

目前，对玉屏风颗粒的质量控制主要集中在测定黄芪甲苷、黄酮类单一成分的含有量，尚无多成分同时测定的报道^[11-15]。因此，本实验通过 UPLC 法同时测定玉屏风颗粒中升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ的含有量，为全面评价该制剂质量提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters Acquity UPLC® 色谱仪（美国 Waters 公司）；XS205DU 电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ-700DE 台式数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；AdeantageA10 自动型纯水机（美国 Milli-Q 公司）；JP-150A 高速多功能粉碎机（永康市久品工贸有限公司）。

1.2 试药 升麻素苷（批号 S-004-180110）、毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷（批号 111920-201203）、升麻素（批号 S-007-170426）、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷（批号 J-002-170731）、芒柄花苷（批号 M-013-160906）、毛蕊异黄酮（批号 M-021-170614）、亥茅酚苷（批号 C-018-171217）、芒柄花素（批号 C-018-171217）、白术内酯Ⅲ（批号 111978-201501）对照品购自中国食品药品检定研究院或成都瑞芬思生物科技有限公司。乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司）；甲醇为分析纯（广州化学试剂厂）；液相用水为超纯水。4 批玉屏风颗粒由国药集团广东环球制药有限公司提供，批号 171102、171219、180111、180203。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×150 mm，1.8 μm）；流动相乙腈-水，梯度洗脱，程序见表 1；体积流量 0.20 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 220 nm；进样量 1 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	乙腈/%	水/%
0~7	10~20	90~80
7~18	20~30	80~30
18~27	30~70	70~30
27~30	70	30

2.2 供试品溶液制备 精密称取颗粒约 0.5 g，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 10 mL 75% 甲醇，称定质量，超声（700 W、50 kHz）45 min，放冷，75% 甲醇补足减失的质量，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制成分别含升麻素苷 657.500 μg/mL、毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 431.040 μg/mL、升麻素 506.370 μg/mL、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 539.940 μg/mL、芒柄花苷 551.170 μg/mL、毛蕊异黄酮 591.210 μg/mL、亥茅酚苷 502.23 μg/mL、芒柄花素 260.530 μg/mL、白术内酯Ⅲ98.010 μg/mL 的溶液，即得。

2.4 阴性样品溶液制备 按处方比例及制剂工艺，分别制成缺黄芪、炒白术、防风的阴性样品，按“2.1.2”项下方法制备，即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，制得系列质量浓度的对照品溶液，各精密吸取 1 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5.2 专属性考察 精密吸取供试品（批号 171102）、对照品、阴性样品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。

2.5.3 精密度试验 取同一批供试品（批号 171102），按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ峰面积 RSD 分别为 0.47%、0.57%、0.29%、1.05%、1.03%、1.22%、1.41%、0.66%、0.54%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批供试品（批号

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
升麻素苷	$Y=1.60\times10^4X-3.69\times10^3$	0.999 9	4.142~14.497
毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y=2.12\times10^4X-4.76\times10^3$	0.999 9	3.492~12.220
升麻素	$Y=2.47\times10^4X-8.67\times10^2$	0.999 8	0.752~2.632
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y=1.42\times10^4X-3.17\times10^3$	0.999 8	4.374~14.497
芒柄花苷	$Y=1.38\times10^4X-8.41\times10^2$	0.999 9	0.992~3.743
毛蕊异黄酮	$Y=2.67\times10^4X-5.66\times10^3$	0.999 8	1.064~3.725
亥茅酚苷	$Y=1.32\times10^4X-1.56\times10^3$	0.999 7	0.565~1.976
芒柄花素	$Y=1.88\times10^4X-1.01\times10^3$	0.999 9	0.387~1.354
白术内酯Ⅲ	$Y=1.49\times10^4X-6.61\times10^2$	0.999 7	0.386~1.341

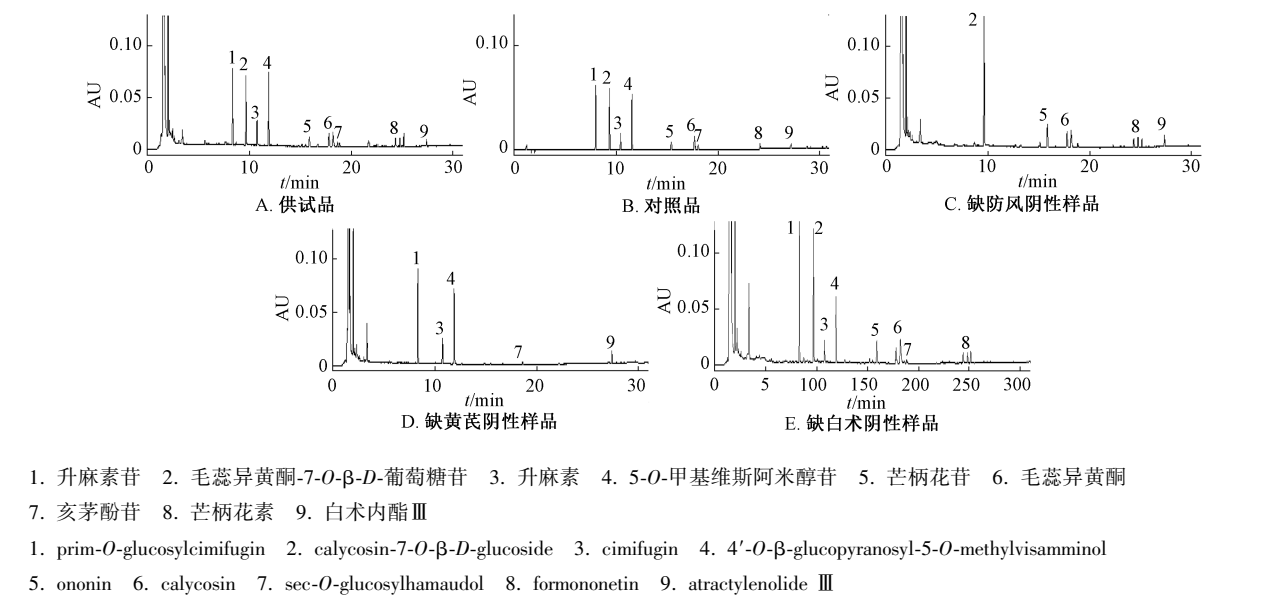


图 1 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

171102), 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ含有量 RSD 分别为 0.65%、1.74%、1.07%、0.87%、1.57%、0.51%、1.70%、3.39%、1.93%, 表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一批供试品 (批号 171102), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”色谱条件下于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定, 测得升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ峰面积 RSD 分别为 0.19%、1.66%、0.27%、0.85%、0.89%、1.03%、1.89%、1.31%、0.82%, 表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取同一批供试品 (批号 171219) 约 0.25 g, 共 6 份, 置于 50 mL 量瓶中, 加入各对照品适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ平均加样回收率分别为 100.75%、102.87%、101.89%、100.03%、101.30%、106.82%、96.40%、103.94%、99.77%, RSD 分别为 3.48%、3.42%、2.52%、3.02%、2.72%、2.22%、3.85%、3.25%、2.14%。

2.5.7 样品含有量测定 取 4 批颗粒, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 计算含有量, 结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=2)

Tab. 3 Results of content deterrmination of various constituents (mg/g, n=2)

成分	批号			
	171102	171219	180111	180203
升麻素苷	0.243 4	0.244 0	0.231 4	0.276 0
毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	0.239 9	0.219 6	0.286 0	0.222 6
升麻素	0.068 4	0.083 7	0.107 3	0.075 4
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	0.299 8	0.326 7	0.317 7	0.354 8
芒柄花苷	0.084 2	0.074 7	0.102 9	0.075 1
毛蕊异黄酮	0.090 3	0.107 2	0.083 2	0.088 0
亥茅酚苷	0.031 5	0.035 9	0.027 8	0.036 4
芒柄花素	0.029 3	0.034 5	0.028 7	0.034 9
白术内酯Ⅲ	0.044 0	0.032 4	0.039 6	0.032 0

3 讨论

本实验将供试品溶液在 190~400 nm 波长处进行扫描,发现 220 nm 下色谱峰数目、丰度、分离度较好,故选择其作为检测波长。然后,依次考察了提取方式(浸泡、超声处理、加热回流)、提取溶剂(50% 甲醇、75% 甲醇、甲醇、乙醇、水)、提取时间(30、45、60 min)、柱温(25、30、35 ℃)、体积流量(0.18、0.20、0.22 mL/min)、流动相(乙腈-水、乙腈-0.02% 甲酸、甲醇-水)、色谱柱(ACQUITY UPLC[®] HSS T3 柱、Phenomenex Luna Omega 柱、ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈柱),发现在 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱、柱温 30 ℃、体积流量 0.20 mL/min、流动相乙腈-水条件下 75% 甲醇提取 45 min 时,各成分色谱峰的峰形、分离度较好。

4 结论

本实验建立 UPLC 法同时测定玉屏风颗粒中升麻素苷、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯Ⅲ的含有量,该方法简便、快速、准确,对全面控制该制剂质量具有指导意义。

参考文献:

[1] 崔琦珍,杜 群,巫燕莉,等. 玉屏风颗粒益气固表作用研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(2): 2-4.

[2] 曹继军. 玉屏风颗粒的药效学研究[J]. 中国临床药理学杂志,2010,26(5): 390,394.

[3] 陈 聪,王 琦,苏泽琦,等. 玉屏风颗粒调理气虚体质反复感冒患者临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(5): 182-187.

[4] 白明华,周妍妍,张 健,等. 近五年玉屏风颗粒儿科临床应用研究进展[J]. 环球中医药,2015,8(8): 1002-1007.

[5] 李 婕. 玉屏风颗粒联合匹多莫德对儿童反复呼吸道感染的疗效及对免疫功能和炎性细胞因子水平的影响[J]. 中药材,2014,37(3): 534-537.

[6] 李茹月,陈玉兴,黄雪君,等. 玉屏风颗粒抗感染作用及其作用机制的研究[J]. 广东药科大学学报,2017,33(6): 753-757.

[7] 李青灵,巨 慧,薛燕茹. 玉屏风颗粒对反复呼吸道感染患儿的疗效观察[J]. 中药材,2016,39(5): 1176-1178.

[8] 邱勇波,刘 锦,武 飞. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国疗养医学,2011,20(5): 435-436.

[9] 赵 博,杨鑫宝,杨秀伟,等. 防风化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(12): 1569-1572.

[10] 李 伟,文红梅,崔小兵,等. 白术健脾有效成分研究[J]. 南京中医药大学学报,2006,22(6): 366-367.

[11] 周 倩,李 莹,戴衍朋,等. RP-HPLC 法测定黄芪及玉屏风颗粒中 4 种异黄酮类成分[J]. 中成药,2014,36(8): 1674-1677.

[12] 袁文娟,高文分,孟 芹,等. 玉屏风颗粒 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药师,2012,15(3): 316-318.

[13] 袁文娟,孟 芹,李婷婷. 玉屏风颗粒 2 个异黄酮类及 4 个色原酮类成分的含量测定[J]. 药物分析杂志,2012,32(2): 237-240.

[14] 胡端龙,姜丽珍,奚静芳,等. 丹溪玉屏风颗粒中黄芪甲苷的含量测定[J]. 中国现代中药,2011,13(6): 41-42.

[15] 范其坤,陈梅荣,汪 军,等. HPLC-ELSD 法测定加味玉屏风颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 江西化工,2014(3): 143-145.