

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.029

基于指纹图谱分析和多成分同时定量的玉屏风丸质量评价

王巧清

(中国人民解放军联勤保障部队第900医院,福建 福州 350000)

摘要:目的 建立玉屏风丸的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,测定7种主要成分(毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、升麻素苷、升麻素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ)的含量,为玉屏风丸的质量控制提供可靠方法。方法 色谱柱为Shim-pack VP-ODS柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min时12% A,20~40 min时12% A→35% A,40~46 min时35% A→68% A,46~50 min时68% A→80% A,50~60 min时80% A→12% A);流速为0.85 mL/min,检测波长升麻素苷为300 nm(0~20 min),毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素及升麻素为254 nm(20~40 min),白术内酯Ⅲ及白术内酯Ⅱ为220 nm(40~46 min),白术内酯Ⅰ为275 nm(46~60 min);柱温为35℃;流速为0.85 mL/min;进样量为10 μL。结果 玉屏风丸HPLC指纹图谱有18个共有峰,通过比较,指认其中7个指标成分,分别为4号(升麻素苷)、9号(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、10号(升麻素)、11号(芒柄花素)、16号(白术内酯Ⅲ)、17号(白术内酯Ⅱ)和18号(白术内酯Ⅰ),利用相似度软件对14批样品的指纹图谱进行分析,各批样品相似度均大于0.97。在建立的色谱条件下,7组分分离度良好,精密度和重复性试验的RSD均小于1.5%(n=6),供试品溶液在24 h内稳定,各成分具有良好的线性关系和较宽的线性范围。14批玉屏风丸中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、升麻素苷、升麻素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ质量浓度范围分别为1.549 0~1.564 0 mg/g,0.701 5~0.702 9 mg/g,0.796 0~0.797 7 mg/g,0.590 5~0.592 2 mg/g,0.674 5~0.676 2 mg/g,0.521 0~0.522 9 mg/g,0.399 2~0.401 5 mg/g。结论 该建立的玉屏风丸HPLC指纹图谱检测和定量测定分析方法快速、准确,可有效评价玉屏风丸的质量。

关键词:玉屏风丸;高效液相色谱法;指纹图谱;质量评价

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)05-0111-06

Quality Assessment of Yupingfeng Pills Based on Simultaneous Determination of HPLC Fingerprint and Multi-Components

WANG Qiaoqing

(The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) fingerprint method of Yupingfeng Pills and determine the contents of seven main components(calycosin7-O-β-D-Glucopyranoside, formononetin, prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, atractylenolide III, atractylenolide II, atractylenolide I), so as to provide a reference for the quality control of Yupingfeng Pills. **Methods** The chromatographic column was shim-pack VP-ODS(250 mm×4.6 mm,5 μm) with gradient elution by acetonitrile(A)-0.3% phosphoric acid solution(B)(0-20 min,12% A;20-40 min,12% A→35% A;40-46 min,35% A→68% A;46-50 min,68% A→80% A;50-60 min,80% A→12% A). The detection wavelength was set at 300 nm for prim-O-glucosylcimifugin(0-20min),254 nm for calycosin7-O-β-D-Glucopyranoside, formononetin and cimifugin(20-40 min),220 nm for atractylenolide III and atractylenolide II(40~46 min),275 nm for atractylenolide I(46-60 min). The column temperature was 35℃,the flow rate was 0.85 mL/min,and the injection volume was 10 μL. **Results** The common mode of the fingerprint was set up with 18 common peaks, and seven of them were identified by comparison with the reference. The similar degrees of 14 batches of samples were over 0.97,they were prim-O-glucosylcimifugin(peak 4),calycosin7-O-β-D-Glucopyranoside(peak 9),cimifugin(peak 10),formononetin(peak 11),

第一作者:王巧清,女,大学本科,药师,研究方向为药品质量标准和分析,(电子信箱)494784257@qq.com。

~~~~~

- 2019,28(18):1980-1982.
- [12] LUO HY, WU HW, YU XK, et al. A review of the phytochemistry and pharmacological activities of Magnoliae officinalis cortex[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019,236(20):412-442.
- [13] 李 蕙. 接骨七厘片高效液相色谱法测定阿魏酸的含量[J]. 中国药物与临床, 2019,19(1):13-18.
- [14] 彭文明, 易徐航, 张钰琪, 等. HPLC法测定复方藿香丸中和厚朴酚与厚朴酸的含量[J]. 江西中医药, 2019,50(2):62-64.
- [15] 杜颖川. 高效液相色谱法对复方健胃分散片中延胡索乙素的含量测定及分析[J]. 中国民康医学, 2018,30(21):79-81.
- [16] 任 彬. UPLC法测定木丹颗粒中延胡索乙素的含量[J]. 海峡药学, 2018,30(10):54-56.
- [17] 张火旺, 黄潇潇, 邓淑芳. 高效液相色谱法测定胃痛舒片中厚朴酚与和厚朴酚含量[J]. 中国药业, 2018,27(14):6-8.
- [18] 夏丽珍, 张敏芳, 倪璟雯. 一测多评法测定藿香正气水中厚朴酚与和厚朴酚的含量[J]. 广西中医药大学学报, 2017,20(1):49-52.
- [19] 林向前. 杜仲片质量标准研究[J]. 中国药业, 2018,27(4):20-23.

(收稿日期:2019-08-07)

atractylenolide III (peak 16), atractylenolide II (peak 17) and atractylenolide I (peak 18). The seven compounds were well separated under the determined chromatographic conditions. The RSDs of precision and repeatability experiment were all less than 1.5% and the sample solution was stable during 24 h ( $n=6$ ). All the compounds had a good linearity and linear range. The contents of calycosin 7-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside, formononetin, cimifugin, atractylenolide III, atractylenolide II, and atractylenolide I in the 14 batches of Yupingfeng Pills were 1.549–1.564 mg/g, 0.701 5–0.702 9 mg/g, 0.796 0–0.797 7 mg/g, 0.590 5–0.592 2 mg/g, 0.674 5–0.676 2 mg/g, 0.521 0–0.522 9 mg/g, and 0.399 2–0.401 5 mg/g, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method is fast and accurate, which can be used for the quality control of Yupingfeng Pills.

**Key words:** Yupingfeng Pills; high performance liquid chromatography; fingerprint; quality evaluation

玉屏风丸由黄芪、炒白术及防风3味中药材加工而成,具有益气、固表、止汗功效,主要用于表虚不固、自汗恶风,面色㿔白,或体虚易感风邪者,现收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第一册)》<sup>[1]</sup>。目前,相关研究多集中于玉屏风颗粒剂及散剂等的质量控制<sup>[2-3]</sup>。作为中医药经典剂型,丸剂具有代表性和传承性,玉屏风丸在胃肠道中溶散缓慢,药效持久,发挥药效“缓而不迟”,且方便服用、携带和贮存。复方药效物质基础及质量控制研究在于多味药材的多成分含量测定,而中药指纹图谱正是利用其“整体性”及“模糊性”的特点,全面反映中药化学的相关性,整体评价其质量。中药指纹图谱具有同时、高效、定性定量分析的特点,已广泛运用到中药复方多类多成分研究领域<sup>[4-6]</sup>。为了更全面、有效地评价玉屏风丸的质量,本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法建立了玉屏风丸指纹图谱,并结合聚类分析,对色谱峰所代表的化学成分进行了初步归属,建立同时测定其7个主要成分指标(毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、升麻素苷、升麻素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ)的定量检测方法,以期对系统和准确评价其质量提供技术参考。现报道如下。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,包括 2695 型四元梯度泵、2695 型自动进样器、2489 型紫外可见光检测器、Empower3 色谱工作站,美国沃特世公司); AUW-220D 型电子天平(日本岛津公司,精度为 0.01 mg); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司,功率为 500W)。

### 1.2 试药

毛蕊异黄酮葡萄糖苷(calycosin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, 批号为 111920-201606, 含量 97.6%), 芒柄花素(formononetin, 批号为 111703-201504, 含量 100%), 升麻素苷(prim-O-glucosylcimifugin, 批号为 111522-201712, 含量 96.2%), 升麻素(cimifugin, 批号为 111710-200602, 含量 95.5%), 白术内酯Ⅲ(atractylenolide III, 批号为 111978-201501, 含量 99.9%), 白术内酯Ⅱ(atractylenolide II, 批号为

111976-201501, 含量 99.9%)、白术内酯Ⅰ(atractylenolide I, 批号为 111975-201501, 含量 99.9%), 各对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇(美国 Merck 公司)均为色谱纯; 磷酸为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。玉屏风丸(市售, 14 批, 编号为 S1~S14, S1~S10 为山西华康药业股份有限公司生产, 规格为 6 g $\times$ 10 袋/盒, 批号分别为 20171212, 20180105, 20180207, 20180313, 20180408, 20180518, 20180626, 20180912, 20181019, 20181115; S11~S14 为厦门福满药业有限公司生产, 规格为 6 g $\times$ 18 袋/盒, 批号分别为 180906, 181022, 181108, 181201)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[7-9]</sup>

色谱柱: Shim-pack VP-ODS 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈(A)-0.3% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~20 min 时 12% A, 20~40 min 时 12% A $\rightarrow$ 35% A, 40~46 min 时 35% A $\rightarrow$ 68% A, 46~50 min 时 68% A $\rightarrow$ 80% A, 50~60 min 时 80% A $\rightarrow$ 12% A); 波长: 300 nm (0~2 min, 升麻素苷), 254 nm (20~40 min, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素及升麻素), 220 nm (40~46 min, 白术内酯Ⅲ及白术内酯Ⅱ), 275 nm (46~60 min, 白术内酯Ⅰ); 柱温: 35  $^{\circ}$ C; 流速: 0.85 mL/min; 进样量: 10  $\mu$ L。

### 2.2 溶液制备

分别取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、升麻素苷、升麻素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ对照品各适量, 精密称定, 以 85% 甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 0.786 6, 0.411 2, 0.434 7, 0.310 8, 0.379 5, 0.264 5, 0.200 3 mg/mL 的混合对照品溶液。取装量差异项下的样品内容物, 研细, 取粉末约 3.0 g, 精密称定, 置 50 mL 棕色容量瓶中, 加入 85% 甲醇溶液 35 mL, 室温超声处理(功率为 450 W, 频率为 40 kHz) 45 min 后取出, 放冷, 用 85% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。均室温避光保存。

### 2.3 指纹图谱的建立及分析

#### 2.3.1 方法学考察

精密度试验: 取同一批(批号为 20180912)样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件连续进

样6次,记录色谱图。结果以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参比峰,计算得各相对峰面积的  $RSD$  均小于  $0.8\%$  ( $n=6$ ),共有峰相对保留时间的  $RSD$  均小于  $0.6\%$  ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20180912)样品,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参比峰,计算得各相对峰面积的  $RSD$  均小于  $1.2\%$  ( $n=6$ ),共有峰相对保留时间的  $RSD$  均小于  $0.9\%$  ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20180912)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别于0,4,8,12,16,20,24 h时进样,记录色谱图。结果以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参比峰,计算得各相对峰面积的  $RSD$  均小于  $1.0\%$  ( $n=7$ ),共有峰相对保留时间的  $RSD$  均小于  $0.7\%$  ( $n=7$ ),表明玉屏风丸供试品溶液

在24 h内稳定。

### 2.3.2 指纹图谱的建立及相似度评价

按2.2项下方法制备14批供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果见图1至图3。将14份指纹图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)软件,以S4号玉屏风丸供试品溶液的指纹图谱作为参照图谱,设定时间窗宽度为0.3,采用多点校正全谱匹配,生成指纹图谱共有模式,并计算各图谱与共有模式的相似度。结果14批样品的指纹图谱中,共得到18个共有峰,14批指纹图谱的相似度分别为0.994,0.995,0.999,0.998,0.997,0.996,0.991,0.993,0.992,0.995,0.989,0.979,0.988,0.990,均大于0.97。

### 2.3.3 部分共有峰指认及相对峰面积计算

将指纹图谱与2.3.2项下混合对照品溶液色谱图进行比对,以保留时间为评价指标,指出共有峰中7种

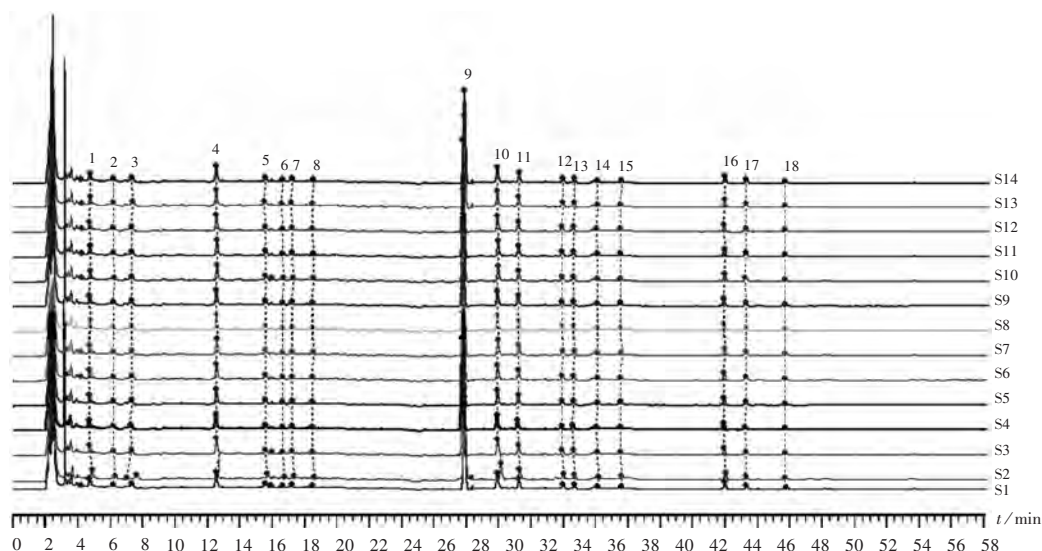


图1 14批样品高效液相色谱叠加指纹图谱

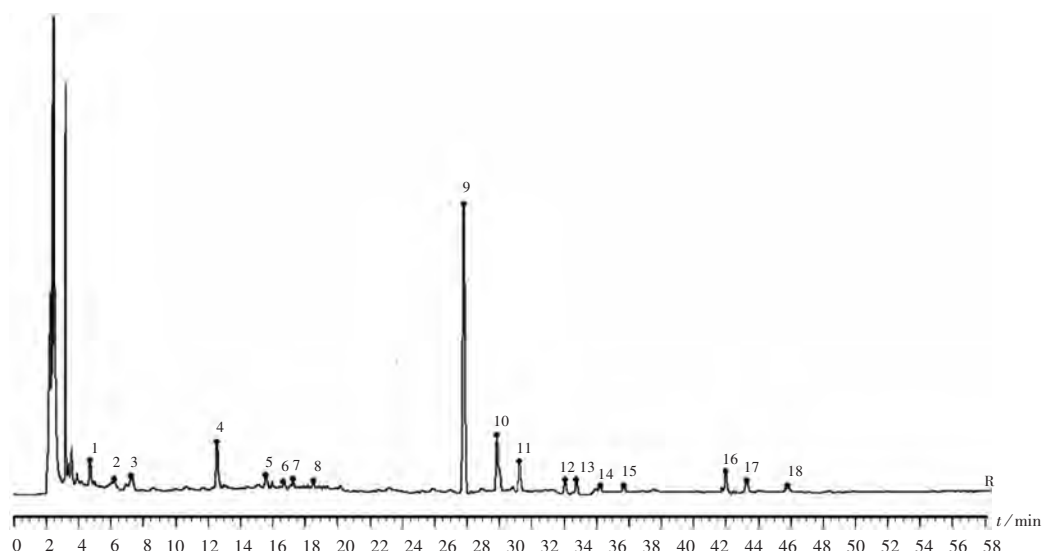


图2 玉屏风丸高效液相色谱对照品指纹图谱

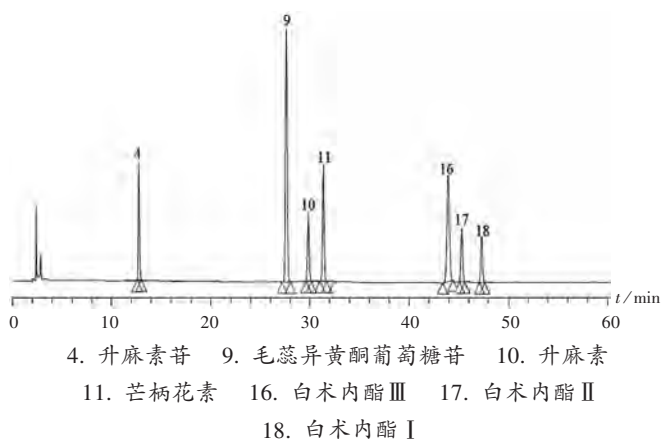


图3 混合对照品溶液高效液相色谱图

化合物,分别为4号(升麻素苷)、9号(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、10号(升麻素)、11号(芒柄花素)、16号(白术内酯Ⅲ)、17号(白术内酯Ⅱ)和18号(白术内酯Ⅰ),其保留时间平均值分别为13.18,28.04,30.11,31.96,44.02,

45.89,47.95 min。其中9号峰信号最强,位置居中,选为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积。结果见表1。

## 2.4 含量测定

### 2.4.1 方法学考察

线性关系考察及检测限和定量限测定:分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液1,2,5,10,15,20  $\mu\text{L}$ ,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。以各组分对照品进样量( $X, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线,计算各组分线性回归方程及相关系数。取2.2项下混合对照品溶液,用85%甲醇逐步稀释,按各组分色谱峰信噪比( $S/N$ )=3:1及10:1分别测定其检测限(LOD)和定量限(LOQ)。结果见表2。

精密度试验:取混合对照品溶液,按拟订色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果见表2,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20180912)样品,按

表1 14批玉屏风丸(S1~S14)共有峰的相对峰面积

| 峰号   | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | S11   | S12   | S13   | S14   |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1    | 0.064 | 0.063 | 0.060 | 0.061 | 0.066 | 0.068 | 0.065 | 0.062 | 0.062 | 0.059 | 0.065 | 0.063 | 0.061 | 0.065 |
| 2    | 0.026 | 0.025 | 0.027 | 0.028 | 0.029 | 0.026 | 0.027 | 0.024 | 0.022 | 0.021 | 0.020 | 0.023 | 0.025 | 0.024 |
| 3    | 0.045 | 0.048 | 0.041 | 0.042 | 0.043 | 0.044 | 0.040 | 0.046 | 0.047 | 0.042 | 0.045 | 0.046 | 0.047 | 0.042 |
| 4    | 0.161 | 0.162 | 0.160 | 0.159 | 0.164 | 0.163 | 0.160 | 0.165 | 0.166 | 0.161 | 0.164 | 0.167 | 0.158 | 0.159 |
| 5    | 0.046 | 0.042 | 0.041 | 0.043 | 0.045 | 0.047 | 0.046 | 0.040 | 0.044 | 0.045 | 0.047 | 0.048 | 0.046 | 0.049 |
| 6    | 0.014 | 0.015 | 0.016 | 0.011 | 0.012 | 0.013 | 0.010 | 0.017 | 0.014 | 0.015 | 0.016 | 0.012 | 0.013 | 0.015 |
| 7    | 0.032 | 0.035 | 0.034 | 0.031 | 0.030 | 0.029 | 0.036 | 0.034 | 0.033 | 0.032 | 0.034 | 0.035 | 0.030 | 0.028 |
| 8    | 0.015 | 0.012 | 0.013 | 0.016 | 0.017 | 0.011 | 0.014 | 0.012 | 0.015 | 0.016 | 0.012 | 0.013 | 0.014 | 0.011 |
| 9(s) | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 10   | 0.193 | 0.195 | 0.196 | 0.192 | 0.194 | 0.193 | 0.190 | 0.191 | 0.197 | 0.198 | 0.192 | 0.191 | 0.190 | 0.194 |
| 11   | 0.097 | 0.096 | 0.098 | 0.099 | 0.091 | 0.092 | 0.094 | 0.093 | 0.095 | 0.096 | 0.090 | 0.092 | 0.093 | 0.094 |
| 12   | 0.079 | 0.078 | 0.077 | 0.071 | 0.072 | 0.074 | 0.076 | 0.075 | 0.073 | 0.074 | 0.077 | 0.079 | 0.078 | 0.076 |
| 13   | 0.081 | 0.085 | 0.083 | 0.084 | 0.086 | 0.081 | 0.080 | 0.080 | 0.083 | 0.087 | 0.086 | 0.089 | 0.084 | 0.083 |
| 14   | 0.012 | 0.011 | 0.013 | 0.015 | 0.016 | 0.017 | 0.014 | 0.05  | 0.018 | 0.019 | 0.014 | 0.013 | 0.016 | 0.015 |
| 15   | 0.012 | 0.013 | 0.015 | 0.017 | 0.014 | 0.016 | 0.018 | 0.010 | 0.011 | 0.014 | 0.015 | 0.017 | 0.016 | 0.013 |
| 16   | 0.077 | 0.079 | 0.076 | 0.078 | 0.081 | 0.082 | 0.080 | 0.075 | 0.074 | 0.079 | 0.078 | 0.077 | 0.076 | 0.076 |
| 17   | 0.051 | 0.052 | 0.050 | 0.053 | 0.054 | 0.050 | 0.051 | 0.055 | 0.056 | 0.053 | 0.054 | 0.052 | 0.053 | 0.057 |
| 18   | 0.037 | 0.039 | 0.038 | 0.040 | 0.042 | 0.041 | 0.039 | 0.036 | 0.038 | 0.039 | 0.037 | 0.036 | 0.035 | 0.037 |

表2 玉屏风丸中7个组分含量测定方法学考察结果

| 组分 | 回归方程                  | $r$     | 线性范围( $\mu\text{g}$ ) | LOQ( $\text{ng}$ ) | LOD( $\text{ng}$ ) | 精密度的试验      | 稳定性的试验      | 重复性的试验              |           |
|----|-----------------------|---------|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|---------------------|-----------|
|    |                       |         |                       |                    |                    | 的 $RSD(\%)$ | 的 $RSD(\%)$ | 含量( $\text{mg/g}$ ) | $RSD(\%)$ |
| A  | $Y = 35.22X + 1.121$  | 0.999 9 | 0.786 6 ~ 15.73       | 0.045              | 0.139              | 0.52        | 0.81        | 1.556 0             | 0.93      |
| B  | $Y = 21.53X + 2.057$  | 0.999 5 | 0.411 2 ~ 8.224       | 0.028              | 0.086              | 0.71        | 1.22        | 0.702 1             | 1.02      |
| C  | $Y = 19.076X + 8.334$ | 0.999 8 | 0.434 7 ~ 8.694       | 0.031              | 0.097              | 0.63        | 1.13        | 0.796 8             | 0.71      |
| D  | $Y = 80.26X - 11.36$  | 0.999 7 | 0.310 8 ~ 6.216       | 0.016              | 0.049              | 0.82        | 0.94        | 0.591 3             | 1.14      |
| E  | $Y = 54.99X - 9.645$  | 0.999 6 | 0.379 5 ~ 7.590       | 0.026              | 0.081              | 0.94        | 1.01        | 0.675 5             | 0.81      |
| F  | $Y = 20.28X + 5.137$  | 0.999 4 | 0.264 5 ~ 5.290       | 0.014              | 0.039              | 0.44        | 0.72        | 0.521 9             | 1.21      |
| G  | $Y = 25.16X + 3.446$  | 0.999 5 | 0.200 3 ~ 4.006       | 0.009              | 0.031              | 0.57        | 0.95        | 0.400 5             | 1.01      |

注:A为毛蕊异黄酮葡萄糖苷,B为芒柄花素,C为升麻素苷,D为升麻素,E为白术内酯Ⅲ,F为白术内酯Ⅱ,G为白术内酯Ⅰ。下表同。

2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别于0,3,6,9,12,18,24 h时进样,记录峰面积。结果见表2,表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为20180912)样品6份,按2.2项方法平行制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表2,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批(批号为20180912)已知含量玉屏风丸粉末6份,每份1.5 g,精密称定,置具塞棕色容量瓶中,精密加入含毛蕊异黄酮葡萄糖苷1.2147 mg/mL、芒柄花素0.3109 mg/mL、升麻素苷0.3411 mg/mL、升麻素0.2353 mg/mL、白术内酯Ⅲ0.2906 mg/mL、白术内酯Ⅱ0.1999 mg/mL和白术内酯Ⅰ0.1547 mg/mL的混合对照品溶液2.0 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,摇匀,滤过,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算各组分加样回收率。结果见表3。

#### 2.4.2 样品含量测定

取S1~S14号玉屏风丸,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法分别计算各成分的含量。结果见表4。

#### 2.5 系统聚类分析<sup>[10-11]</sup>

系统聚类分析作为一种统计分析方法,是在相似性的基础上收集数据来分类。以14批样品中18个共有峰的相对峰面积为变量,采用SPSS 22.0软件聚类法中Ward方法对样品进行系统聚类分析,采用组间平均数联结法,以欧氏距离平方为测度。结果见图4。可见,当类间距为10~25时,14批样品可聚为两大类,第一类为S3,S9,S4,S5,S1,S6,S8,S2,S10,S7;第二类为S12,S14,S11,S13。第一类均为山西华康药业股份有限公司产品,第二类均为厦门福满药业有限公司产品,说明同一厂家产品的质量稳定性较高。

### 3 讨论

#### 3.1 测定目标成分选择

黄芪作为玉屏风丸的君药,占总处方量的60%,具有利水消肿、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌之功效,来源于豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,主要活性成分为黄酮类(毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素)、异黄酮类及其苷类、皂苷类化合物<sup>[12-13]</sup>。方中臣药防风含有色原酮、挥发油及多糖类等有效成分,其中色原酮类具有解热、镇痛、抗炎、抗肿瘤等多种功效,故选取升麻素苷、升麻素作为制剂中防风药材的质控指标<sup>[14-15]</sup>。白术健脾益气,助黄芪以加强益气固表之功效,为佐药,特征成分白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ及白术内酯Ⅰ在HPLC图中可清晰分辨<sup>[16-17]</sup>。

表3 玉屏风丸7组分加样回收试验结果( $n=6$ )

| 组分 | 取样量(g) | 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | RSD(%) |
|----|--------|----------|---------|---------|--------|---------------|--------|
| A  | 1.504  | 2.340    | 2.429   | 4.765   | 99.84  | 100.02        | 0.85   |
|    | 1.516  | 2.359    | 2.429   | 4.768   | 99.18  |               |        |
|    | 1.538  | 2.393    | 2.429   | 4.823   | 100.04 |               |        |
|    | 1.547  | 2.407    | 2.429   | 4.819   | 99.30  |               |        |
|    | 1.552  | 2.415    | 2.429   | 4.851   | 100.28 |               |        |
|    | 1.565  | 2.435    | 2.429   | 4.901   | 101.52 |               |        |
| B  | 1.504  | 0.6184   | 0.6218  | 1.234   | 99.00  | 99.42         | 0.81   |
|    | 1.516  | 0.6234   | 0.6218  | 1.239   | 99.01  |               |        |
|    | 1.538  | 0.6324   | 0.6218  | 1.246   | 98.68  |               |        |
|    | 1.547  | 0.6361   | 0.6218  | 1.253   | 99.21  |               |        |
|    | 1.552  | 0.6382   | 0.6218  | 1.258   | 99.68  |               |        |
|    | 1.565  | 0.6435   | 0.6218  | 1.271   | 100.92 |               |        |
| C  | 1.504  | 0.6538   | 0.6822  | 1.336   | 100.00 | 99.54         | 0.56   |
|    | 1.516  | 0.6590   | 0.6822  | 1.335   | 99.09  |               |        |
|    | 1.538  | 0.6686   | 0.6822  | 1.352   | 100.18 |               |        |
|    | 1.547  | 0.6725   | 0.6822  | 1.348   | 99.02  |               |        |
|    | 1.552  | 0.6747   | 0.6822  | 1.350   | 98.99  |               |        |
|    | 1.565  | 0.6803   | 0.6822  | 1.362   | 99.93  |               |        |
| D  | 1.504  | 0.4674   | 0.4706  | 0.9323  | 98.79  | 99.95         | 0.91   |
|    | 1.516  | 0.4712   | 0.4706  | 0.9369  | 98.95  |               |        |
|    | 1.538  | 0.4780   | 0.4706  | 0.9485  | 99.98  |               |        |
|    | 1.547  | 0.4808   | 0.4706  | 0.9557  | 100.91 |               |        |
|    | 1.552  | 0.4824   | 0.4706  | 0.9541  | 100.23 |               |        |
|    | 1.565  | 0.4864   | 0.4706  | 0.9609  | 100.82 |               |        |
| E  | 1.504  | 0.5708   | 0.5812  | 1.148   | 99.31  | 99.69         | 0.92   |
|    | 1.516  | 0.5753   | 0.5812  | 1.151   | 99.05  |               |        |
|    | 1.538  | 0.5837   | 0.5812  | 1.160   | 99.16  |               |        |
|    | 1.547  | 0.5871   | 0.5812  | 1.162   | 98.92  |               |        |
|    | 1.552  | 0.5889   | 0.5812  | 1.174   | 100.67 |               |        |
|    | 1.565  | 0.5939   | 0.5812  | 1.181   | 101.02 |               |        |
| F  | 1.504  | 0.3978   | 0.3998  | 0.7954  | 99.45  | 99.76         | 0.58   |
|    | 1.516  | 0.4009   | 0.3998  | 0.7961  | 98.85  |               |        |
|    | 1.538  | 0.4068   | 0.3998  | 0.8063  | 99.93  |               |        |
|    | 1.547  | 0.4092   | 0.3998  | 0.8097  | 100.18 |               |        |
|    | 1.552  | 0.4105   | 0.3998  | 0.8090  | 99.67  |               |        |
|    | 1.565  | 0.4139   | 0.3998  | 0.8156  | 100.48 |               |        |
| G  | 1.504  | 0.3013   | 0.3094  | 0.6052  | 98.22  | 99.25         | 0.79   |
|    | 1.516  | 0.3037   | 0.3094  | 0.6079  | 98.32  |               |        |
|    | 1.538  | 0.3081   | 0.3094  | 0.6158  | 99.45  |               |        |
|    | 1.547  | 0.3099   | 0.3094  | 0.6187  | 99.81  |               |        |
|    | 1.552  | 0.3109   | 0.3094  | 0.6197  | 99.81  |               |        |
|    | 1.565  | 0.3135   | 0.3094  | 0.6227  | 99.92  |               |        |

#### 3.2 色谱条件优化

本研究中对样品提取方法(超声、浸渍过夜、回流)、提取溶剂(甲醇、85%甲醇、65%甲醇、55%甲醇)、提取时间(25,35,45 min)、流动相(甲醇、乙腈作为有机相,水、0.1%磷酸溶液、0.3%磷酸溶液、0.5%磷酸溶液、

表4 玉屏风丸中7组分含量测定结果(mg/g, n=3)

| 编号  | A     | B       | C       | D       | E       | F       | G       |
|-----|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| S1  | 1.558 | 0.702 6 | 0.797 2 | 0.591 6 | 0.675 7 | 0.522 2 | 0.400 8 |
| S2  | 1.559 | 0.702 4 | 0.796 9 | 0.591 5 | 0.675 9 | 0.522 5 | 0.400 7 |
| S3  | 1.553 | 0.701 9 | 0.796 0 | 0.590 5 | 0.674 5 | 0.521 3 | 0.399 8 |
| S4  | 1.549 | 0.701 7 | 0.796 3 | 0.590 8 | 0.674 7 | 0.521 5 | 0.399 2 |
| S5  | 1.550 | 0.701 5 | 0.796 2 | 0.591 2 | 0.675 3 | 0.521 0 | 0.399 5 |
| S6  | 1.563 | 0.702 9 | 0.797 5 | 0.592 2 | 0.676 2 | 0.522 9 | 0.401 2 |
| S7  | 1.551 | 0.702 0 | 0.796 1 | 0.590 8 | 0.675 1 | 0.521 1 | 0.400 1 |
| S8  | 1.556 | 0.702 1 | 0.796 8 | 0.591 3 | 0.675 5 | 0.521 9 | 0.400 5 |
| S9  | 1.557 | 0.702 3 | 0.797 7 | 0.591 7 | 0.675 8 | 0.522 0 | 0.400 6 |
| S10 | 1.553 | 0.701 9 | 0.796 5 | 0.591 1 | 0.675 0 | 0.521 4 | 0.400 0 |
| S11 | 1.561 | 0.702 8 | 0.797 1 | 0.591 4 | 0.675 6 | 0.522 4 | 0.400 9 |
| S12 | 1.564 | 0.702 7 | 0.797 3 | 0.591 8 | 0.676 0 | 0.522 3 | 0.401 1 |
| S13 | 1.552 | 0.701 6 | 0.796 4 | 0.591 0 | 0.675 2 | 0.521 6 | 0.400 1 |
| S14 | 1.560 | 0.702 5 | 0.797 0 | 0.591 9 | 0.676 1 | 0.522 8 | 0.401 5 |

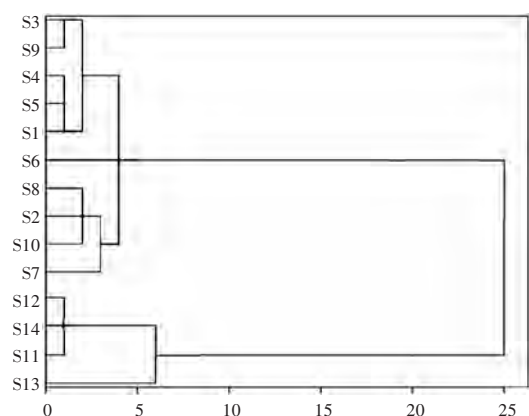


图4 14批玉屏风丸聚类分析树状图

0.5%冰醋酸作为水相)、柱温(25,30,35℃)进行了详细考察,结果显示,85%甲醇作溶剂,超声处理45 min,柱温35℃,流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液梯度洗脱时基线平稳,保留时间适中,指纹图谱色谱峰数量多且分离效果佳,各色谱峰峰形好。采用DAD检测器在190~400 nm波长处扫描,为使各成分均在其最大吸收波长下进行测定,采用不同时段切换不同检测波长:0~20 min时设定检测波长为300 nm,测定升麻素苷;20~40 min时设定检测波长为254 nm,检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素及升麻素;40~46 min时设定检测波长为220 nm,检测白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ;46~60 min时设定检测波长为275 nm,检测白术内酯Ⅰ。

### 3.3 方法评价

基于中成药的质量控制的特点,本研究中建立了玉屏风丸指纹图谱,实现了对其中多指标成分进行整体综合的客观评价与分析,保证药效

的稳定性;同时又建立毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、升麻素苷、升麻素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅰ的含量测定方法,实现玉屏风丸的定量分析。该方法前处理条件简便、快捷,测定结果准确、重复性好、实用性强,同时具备定性和定量双重评价功能,可有效控制玉屏风丸的质量。

### 参考文献:

- [1] WS<sub>3</sub>-B-0051-89. 卫生部药品标准中药成方制剂(第一册)[S].
- [2] 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.
- [3] 周劲松,张洪坤,黄玉瑶,等. 多波长 HPLC 法测定玉屏风散中10种化学成分的含量[J]. 药物分析杂志,2016(6):1072-1081.
- [4] 孙国祥,闫 波,侯志飞,等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展[J]. 中南药学,2015,13(7):673.
- [5] 陶 丽,范方田,刘玉萍,等. 中药及其组分配伍的整合作用研究实践与进展[J]. 中国药理学通报,2013,29(2):153-156.
- [6] 王梦旻,陶 智,张 雁. 一清颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师,2018,21(5):836-839.
- [7] 江国荣,陈卫民,何玲玲,等. 反相高效液相色谱法同时测定九味羌活丸中升麻素苷、升麻素、黄芩苷的含量[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(34):85-86.
- [8] 闫 晗,孙媛媛,于治国,等. HPLC 法同时测定白术药材中白术内酯Ⅰ等4种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(9):699-702.
- [9] 彭 玮,付琴琴. 基于 HPLC 波长切换法对舒肝益脾液中7种成分的质量控制研究[J]. 中国药师,2018,21(9):1667-1670.
- [10] 高 微,陈明生,韦广辉,等. 尖尾凤药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J]. 中国药房,2018,29(16):2215-2219.
- [11] 王领弟,徐宝欣,李艳荣,等. 基于主成分和聚类分析的心安胶囊指纹图谱研究[J]. 中国药师,2017,20(1):35-37.
- [12] 孙政华,邵 晶,郭 致. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究,2015,7(25):22-25.
- [13] 缪建春,曾繁勇,邱双凤,等. 黄芪、灯盏花素复方制剂对阿尔茨海默病大鼠记忆能力及血、脑组织中超氧化物歧化酶、过氧化脂质和乳酸脱氢酶的影响[J]. 中国药师,2017,20(6):1046-1048.
- [14] 刘双利,姜程曦,赵 岩,等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2017,48(10):2146-2152.
- [15] 李 阳,王 旭,李壮壮,等. 防风化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(15):60-64.
- [16] 陈琴华,余 飞,王红梅,等. 白术内酯Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ对炎症巨噬细胞细胞因子表达的影响[J]. 中国药师,2017,20(12):2112-2116.
- [17] 王 涵,杨 娜,谭 静,等. 白术化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. 甘肃医药,2018,37(1):23-26.

(收稿日期:2019-07-18)

本栏目由

重庆药友制药有限责任公司

协办