

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.01.09

兽用中药玉屏风口服液质量标准提升研究

冯亚文¹,张秋娜²,吴兰¹,陈静^{3,4},张娜^{3,4},李会平^{3,4},
张培训^{3,4},安莎莎²,孔红君^{3,4}

(1. 河北省兽药饲料工作总站,石家庄 050000;2. 保定冀中生物科技有限公司,河北 保定 071000;

3. 保定冀中药业有限公司,河北 保定 071500; 4. 河北省中兽药技术创新中心,河北 保定 071500)

[收稿日期] 2023-04-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2024)01-0054-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立一种可同时测定玉屏风口服液中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的高效液相色谱法(HPLC)。采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(5 μm 4.6×250 mm),以乙腈和0.2%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长254 nm,进样体积10 μL。检测的三种成分在测定的质量浓度范围内线性关系良好,r值均为0.999,平均加样回收率均在96%~102%之间,相对标准偏差均小于2.0%。试验精密度、重复性、准确性和稳定性良好。新建立的检测方法简单、准确、高效,为进一步提升玉屏风口服液的质量控制提供了依据。

[关键词] 高效液相色谱;玉屏风口服液;升麻素苷;5-O-甲基维斯阿米醇苷;毛蕊异黄酮葡萄糖苷

Study on Improvement of Quality Standard of Yupingfeng Oral Liquid

FENG Ya-wen¹,ZHANG Qiu-na²,WU Lan¹,CHENG Jing^{3,4},ZHANG Na^{3,4},
ZHANG Pei-xun^{3,4},AN Sha-sha²,KONG Hong-jun^{3,4}

(1. Hebei provincial station of veterinary drug feed,Shijiazhuang 050051,China;2. Baoding Jizhong Biotechnology

Co. LTD. Hebei,Baoding 071000,China;3. Baoding jizhong pharmaceutical co. LTD. Hebei, Baoding 071500,China;

4. The engineer technology research center of Chinese traditional drug for animal in Hebei province,Hebei,Baoding 071500,China)

Abstract: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of glucoside, 5-O-methyl Visamitol side and calnoisoflavone glucoside in Yupingfeng oral liquid. The chromatography was performed on a column (5 μm 4.6×250 mm) with acetonitrile and 0.2% phosphoric acid as the fillers. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30℃. The detection wavelength was 254 nm and the sample volume was 10 μg. The linear relationship of the three components was good in the range of mass concentration, r values were 0.999, the average recoveries were between 96% and 102%, and the relative standard deviations were less than 2.0%. The test has good precision, repeatability, accuracy and stability. The newly established detection method is simple, accurate and efficient,

which can provide a basis for the quality control of Yupingfeng oral liquid.

Key words: HPLC; Yupingfeng oral liquid; Glucoside; 5-O-methylvisamitol glycoside; Calycosin isoflavones glucoside

玉屏风口服液源于元代《丹溪心法》,具有益气固表,提高机体免疫力的功能;主治表虚不固,易感风邪。由保定冀中药业有限公司研制生产的玉屏风口服液于 2010 年获得新兽药证书,至今上市已超过 12 年,现收录于《中华人民共和国兽药典》2020 年版二部。

该制剂临床使用安全有效,但随着时代的发展,其原有的质量标准也需要进一步优化提升。查阅文献,近年来,广大学者^[1-8]对玉屏风散、玉屏风口服液、玉屏风颗粒等人用药品进行深入的多指标含量测定及指纹图谱研究,多集中于黄酮-色原酮药效物质群。可见其原有质量标准收录的黄芪甲苷的含量测定过于片面,无论是药效还是物质基础都已不能满足对产品品质提升的需求。

研究中,采用高效液相色谱(HPLC)法同时对玉屏风口服液中的升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行定量检测,同时优化原有质量标准中的薄层鉴别项,为全面提升玉屏风口服液的质控标准提供了依据,也实现了提升产品品质、保证疗效、提高养殖户用药认可度的目标。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂 e2695 高效液相系统,2489UV 检测器,Empower3 色谱工作站(美国 Waters 公司)、CPA225D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。色谱柱:SymmetryC18(5 μm 4.6 \times 250 mm)。

标准品:升麻素苷(批号:111522-201913,纯度为 94.6%)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号:111523-201811,纯度为 97.4%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号:111920-201907,纯度为 96.8%)均购自中国食品药品检定研究院。乙腈(Merck 公司,色谱纯),磷酸(天津市致远化学试剂有限公司,色谱纯),水为超纯水。

玉屏风口服液样品共计 6 批,保定冀中药业有限公司 3 批,批号为 202201002、202205003、

202205004;保定冀中生物科技有限公司 3 批,批号为 202201001、202202005、202201002。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(5 μm 4.6 mm \times 250 mm);乙腈为流动相 A,0.2% 磷酸溶液为流动相 B。按表 1 梯度洗脱;检测波长为 254 nm,流速:1.0 mL/min,柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样体积 10 μL 。

表 1 梯度洗脱方法

Tab 1 Gradient elution method

时间/min	乙腈(A)/%	0.2% 磷酸溶液(B)/%
0~5	15	85
5~20	15 \rightarrow 20	85 \rightarrow 80
20~27	20 \rightarrow 25	80 \rightarrow 75
27~32	25 \rightarrow 80	75 \rightarrow 20
32~37	80 \rightarrow 15	20 \rightarrow 85
37~40	15	85

1.2.2 对照品溶液的制备 分别取升麻素苷对照品、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇定容至刻度,制得浓度分别为 400、400、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液。再分别精密量取各个对照品储备液,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含升麻素苷 20 μg 、5-O-甲基维斯阿米醇苷 20 μg 、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 10 μg 的混合对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备 取玉屏风口服液 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇定容至刻度,摇匀,用 0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

1.2.4 阴性玉屏风口服液的制备 参照《中华人民共和国兽药典》2020 版二部,分别制备缺黄芪和缺防风的阴性玉屏风口服液。

2 结果和分析

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性 通过对比玉屏风口服液样品和自行制备的阴性样品,记录色谱图,结果表明在与升麻素苷对照品(保留时间 9.842 min)、5-O-甲基维

斯阿米醇苷对照品(保留时间 21.543 min)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(保留时间 14.390 min)保留时间一致处,玉屏风口服液中均见相对应的色谱峰。

同时各阴性样品在与 3 种对照品保留时间一致处无干扰,见图 1 ~ 图 4。因此,该方法的专属性良好。

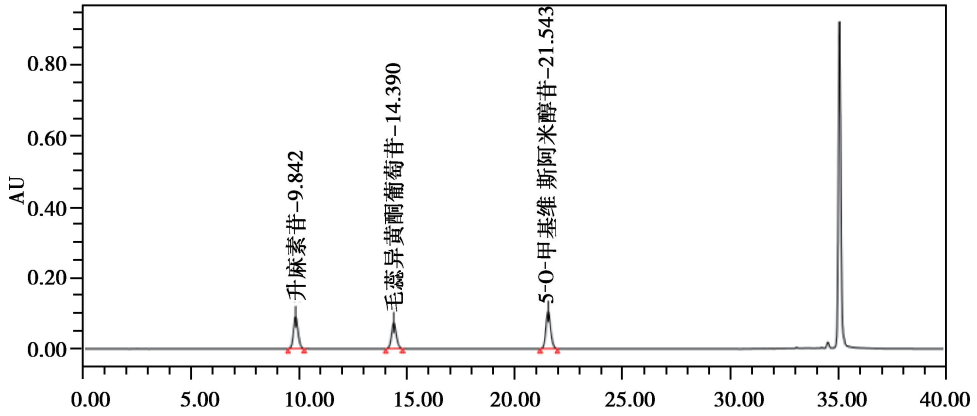


图 1 混合对照品高效液相色谱图

Fig 1 HPLC of mixed standards

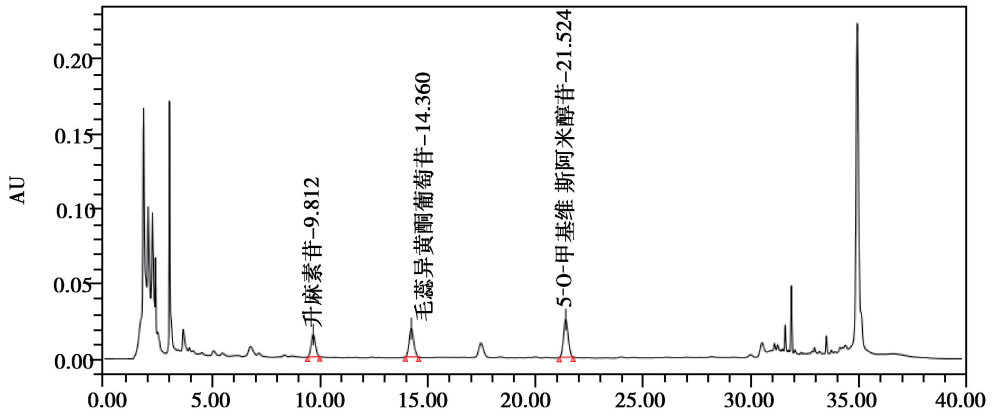


图 2 玉屏风口服液高效液相色谱图

Fig 2 HPLC of Yupingfeng Oral Liquid

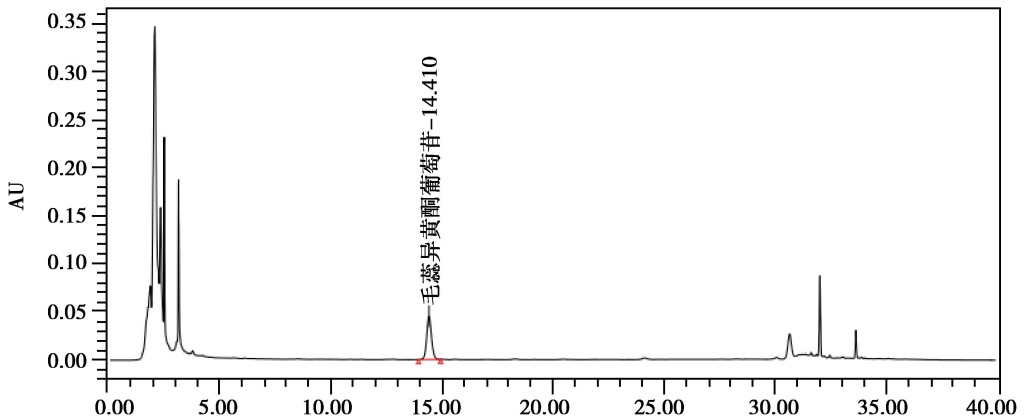


图 3 缺防风阴性样品高效液相色谱图

Fig 3 HPLC of negative Fangfeng sample

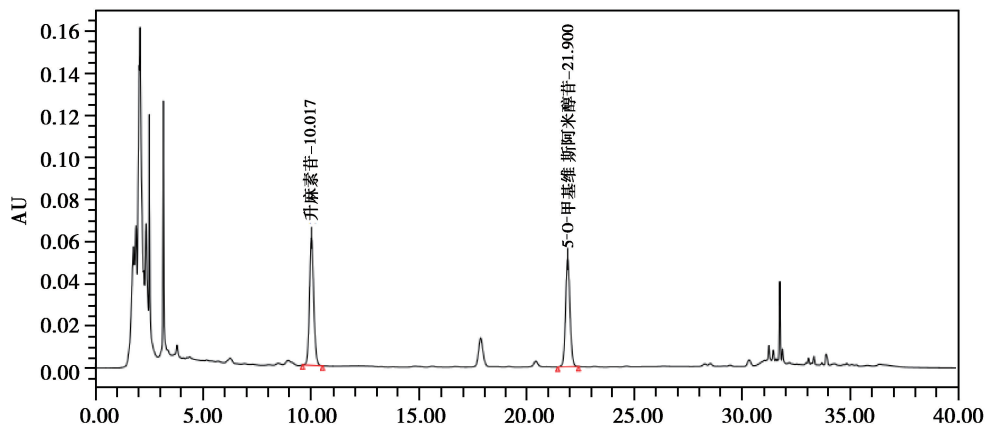


图 4 缺黄芪阴性样品高效液相色谱图

Fig 4 HPLC of negative Huangqi sample

2.1.2 线性 精密称取升麻素苷对照品、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,精密称定,分别加 50% 甲醇制成每 1 mL 含升麻素苷 381 μg、含 5-O-甲基维斯阿米醇苷 354 μg、含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 203 μg 的对照品溶液储备液,备用。

分别取三种储备液各 1 mL 分别置 100、50、20、10、5 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成线性 1~5 的混合对照品溶液;分别取

三种储备液各 3 mL,置 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成线性 6 的混合对照品溶液,即得升麻素苷浓度为 3.81、7.62、19.05、38.10、76.20、114.30,5-O-甲基维斯阿米醇苷浓度为 3.54、7.08、17.70、35.40、70.80、106.20,毛蕊异黄酮葡萄糖苷浓度为 2.03、4.06、10.15、20.30、40.60、60.90 μg/mL 的标准曲线溶液。照 1.2.1 液相条件测定,并计算回归方程和相关系数,见表 2。

表 2 三种对照品的线性关系考察

Tab 2 Linear relationship investigation of three comparasites

化合物	线性方程	相关系数	线性范围
升麻素苷	$y = 19494x + 12776$	$r = 0.999$	3.81 ~ 114.30 μg/mL
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$y = 20467x + 20547$	$r = 0.999$	3.54 ~ 106.20 μg/mL
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$y = 33988x + 15299$	$r = 0.999$	2.03 ~ 60.90 μg/mL

2.1.3 精密度 取供试品溶液,连续进样 6 次测定。经计算升麻素苷对照品、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品的峰面积 RSD 分别为 0.94%、0.95%、0.86%,表明该方法精密度良好。

2.1.4 重复性 按 1.2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,测得该批产品中黄升麻素苷对照品、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品的平均含量分别为 0.156、0.230、0.121

mg/mL,RSD 分别为 0.57%、0.43%、0.62%,结果表明该方法的重复性良好。

2.1.5 溶液稳定性 取 2.1.4 项下的同一份供试品溶液,分别于 0、4、6、8、10、12、18、24 h 进样测定,测得升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.77%、1.67%、1.70%,结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 准确度 精密量取已知含量的玉屏风口服

液 1 mL,置 25 mL 容量瓶中,加入 0.156 mg/mL 的升麻素苷对照品溶液,0.230 mg/mL 的 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液和 0.121 mg/mL 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液各 1 mL,加 50% 甲醇定容至

刻度,摇匀,过滤,即得。照上述供试品方法制备 6 份供试品溶液,照 1.2.1 所述方法进行测得,计算平均加样回收率,结果见表 3。3 种物质的加样回收率均在 96% ~ 102% 之间,相对标准偏差均小于 2.0%。

表 3 玉屏风口服液 3 种成分加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 3 Recovery results of 3 compounds in Yupingfeng oral liquid ($n=6$)

化合物	原有值(mg)	加入值(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	RSD(%)
升麻素苷	0.156	0.156	0.314	101.28	1.52
			0.310	98.72	
			0.310	98.72	
			0.310	98.72	
			0.307	96.79	
			0.312	100.00	
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.230	0.226	0.458	100.88	1.56
			0.452	98.23	
			0.452	98.23	
			0.453	98.67	
			0.448	96.46	
			0.456	100.00	
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.121	0.124	0.245	100.00	1.34
			0.242	97.58	
			0.243	98.39	
			0.244	99.19	
			0.241	96.77	
			0.245	100.00	

2.2 含量测定 分别取升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,加 50% 甲醇稀释成每 1 mL 含升麻素苷 20 μg 、5-O-甲基维斯阿米醇苷 20 μg 、毛蕊异黄酮葡萄糖

苷 10 μg 的混合对照品溶液。按照“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,供试品溶液和对照品溶液各进 10 μL ,以“1.2.1”项下色谱条件检测,记录色谱图,计算含量,结果见表 4。

表 4 样品测定结果

Tab 4 The results of the sample content

批号	升麻素苷(mg/mL)	5-O-甲基维斯阿米醇苷(mg/mL)	防风总量(mg/mL)	毛蕊异黄酮葡萄糖苷(mg/mL)
202201001	0.146	0.229	0.375	0.117
202201002	0.154	0.227	0.381	0.116
202202005	0.141	0.245	0.386	0.104
202202002	0.133	0.232	0.365	0.105
202205003	0.138	0.228	0.366	0.105
202205004	0.135	0.230	0.365	0.103

3 讨论与结论

3.1 标准来源与追溯 玉屏风口服液历次标准修订过程中,主要是对【鉴别】(1)(3)进行了修订,《兽药质量标准》2017 年版中药卷删除【鉴别】(3)

“采用 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品 HPLC 法鉴别防风”,在【鉴别】(1)增加了“采用 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品用于 TLC 法防风的鉴别”,并沿用至今,具体见表 5。

表 5 玉屏风口服液质量标准对比表

Tab 5 The Comparison table of the Yupingfeng oral liquid

	《中国兽药典》 2020 年版二部	《兽药质量标准》 2017 年版中药卷	《兽药质量标准汇编》 2006-2011 年
鉴别(1)	TLC 法同时鉴别黄芪和防风,采用黄芪甲苷对照品和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品	TLC 法同时鉴别黄芪和防风,采用黄芪甲苷对照品和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品	TLC 法鉴别黄芪,采用黄芪甲苷对照品
鉴别(2)	TLC 法鉴别白术,采用白术对照药材	TLC 法鉴别白术,采用白术对照药材	TLC 法鉴别白术,采用白术对照药材
鉴别(3)	——	——	HPLC 法鉴别防风,采用 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品
含量测定	黄芪 本品每 1 mL 含黄芪以黄芪甲苷计, 不得少于 0.20 mg。	黄芪 本品每 1 mL 含黄芪以黄芪甲苷计, 不得少于 0.20 mg。	黄芪 本品每 1 mL 含黄芪以黄芪甲苷计, 不得少于 0.20 mg。

本研究中,注重药效物质基础的关系,拟将防风、黄芪中的有效成分升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行定量检测,同时用于薄层鉴别研究,进一步丰富了检测指标,提升了质量控制标准。

3.2 全面性 相比单一指标性成分(黄芪甲苷),药效组分群含量测定可更好地表达玉屏风口服液的总体功效。查阅大量文献,发现玉屏风制剂中的研究多集中在黄酮-色原酮组分群^[1-3],黄酮-色原酮-内酯组分群^[4-7],目标成分多见于毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、芒柄花苷、芒柄花素、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III,共计 11 种。

在诸多成分中,申亚君^[8]等通过建立玉屏风散的 HPLC 指纹图谱,分别对上述 11 种成分进行进行聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)发现,各批次样品之间的质量差异导致 15 批样品聚为 2 类,并进一步通过正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)得出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷是对玉屏风散整体质量影响较大的 5 种成分。但是鉴于

前期研究中发现毛蕊异黄酮、芒柄花素均低于 0.05 mg/mL,因此本研究中仅对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷的含量测定进行研究。

3.3 与药效相关性 毛蕊异黄酮葡萄糖苷(CG)是黄芪药材中的异黄酮成分。现代药理学研究表明,CG 能够明显对抗 4 刀豆蛋白 A(ConA)诱导的 T 淋巴细胞增殖和脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞毒性,具有免疫抑制和抗炎作用^[9]。姜文月等^[10]采用 Spearman 双变量相关分析对化学成分与其增强免疫药效的谱效相关性进行分析,发现 CG 含量与脾脏指数呈显著正相关,是有免疫增强功能的主要药效物质。此外,CG 还具有抗炎、抗肿瘤等多种药理功效。

3.4 结论 综上所述,本方法采用高效液相色谱(HPLC)法同时对玉屏风口服液中的黄芪和防风进行定量分析,经验证定量准确、快速、重复性好,为提升玉屏风口服液质量控制的全面性提供了方法。

参考文献:

[1] 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.
- Yuan W J, Meng Q, Li T T. HPLC simultaneous determination of two isoflavonoids, four chromones in Yupingfeng granules [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(2):237-240.
- [2] 吴拾保, 邓渝, 袁铭铭, 等. 玉屏风口服液 1 个异黄酮类及 3 个色原酮类成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12):2221-2225.
- Wu S B, Deng Y, Yuan M M, *et al.* Simultaneous determination of one isoflavonoids and three chromones in Yupingfeng oral liquid by HPLC[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(12):2221-2225.
- [3] 曲范娜, 王一博, 笔雪艳, 等. UPLC 法测定玉屏风颗粒中升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 中国药品标准, 2013, 14(6):429-432.
- Qu F N, Wang Y B, Bi X Y, *et al.* Simultaneous Determination of Prim-O-glucosylcimifugin, Calycosin-7-O- β -D-glucoside and 4'-O- β -Glucosyl-5-O-methylvisammioside in Yupingfeng Granules by UPLC[J]. Drug Standards of China, 2013, 14(6):429-432.
- [4] 郑浩, 刘可心, 王彦予, 等. 高效液相色谱法分析玉屏风散成分[J]. 化学分析计量, 2019, 28(01):29-34.
- Zheng H, Liu K X, Wang Y Y, *et al.* Composition analysis of Yupingfeng Powder by using HPLC fingerprints [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2019, 28(01):29-34.
- [5] 张洪坤, 周劲松, 黄玉瑶, 等. 玉屏风散高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中药材, 2016, 39(03):582-585.
- Zhang H K, Zhou J S, Huang Y Y, *et al.* Study on HPLC Fingerprint of Yupingfeng Powder [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(03):582-585.
- [6] 廖小芳, 毕晓黎, 胥爱丽, 等. UPLC 法同时测定玉屏风颗粒中 9 种成分[J]. 中成药, 2019, 41(8):1778-1781.
- Liao X F, Bi X L, Xu A L, *et al.* Simultaneous determination of nine constituents in Yupingfeng Granules by UPLC[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(8):1778-1781.
- [7] 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, 36(6):1072-1081.
- Zhou J S, Zhang H K, Huang Y Y, *et al.* Simultaneous determination of ten chemical components in Yupingfeng San by HPLC under multiple UV wavelengths. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(6):1072-1081.
- [8] 申亚君, 安琪, 丁笑颖, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与多成分含量测定结合化学计量学的玉屏风散质量评价[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(07):1121-1128.
- Shen Y J, An Q, Ding X Y, *et al.* Quality evaluation of Yupingfeng Powder based on HPLC fingerprint, determination of multi-index components and chemometrics analysis [J]. Nat Prod Res Dev, 2021, 33(07):1121-1128.
- [9] 徐风, 叶加, 张薇薇, 等. 毛蕊异黄酮苷在制备免疫抑制剂及抗炎药物方面的用途: CN201310132348.1 [P]. 北京大学. 2014-10-22.
- Xu F, Ye J, Zhang W W, *et al.* The use of Calycosin in the preparation of immunosuppressant and anti-inflammatory drugs: CN201310132348.1 [P]. Peking University. 2014-10-22.
- [10] 姜文月, 韩淑丽, 唐明哲, 等. 贞芪扶正颗粒 HPLC 指纹图谱与其增强免疫功能的谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(08):123-130.
- Jiang W Y, Han S L, Tang M Z, *et al.* Spectrum-effect Relationship Analysis Between HPLC Fingerprint and Immunomodulatory Activity of Zhenqi Fuzheng Granules [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(08):123-130.

(编辑:陈希)