

UPLC 同时测定秦皮配方颗粒中 7 种成分

穆希岩¹, 付炎¹, 张玉倩¹, 相聪坤², 张冠华¹, 王琪¹, 王巧^{1*}

(1. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017;

2. 河北省中医院, 石家庄 050017)

[摘要] **目的:**建立 UPLC 同时测定秦皮配方颗粒中 7 种成分(秦皮甲素、毛柳苷、秦皮乙素、丁香苷、秦皮苷、秦皮素和东莨菪内酯)的方法,比较不同厂家及批次秦皮配方颗粒中 7 种成分含量的差异,为秦皮配方颗粒的科学质量控制提供依据。**方法:**采用 Waters 超高效液相色谱仪, Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),以甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~1 min, 5%~10% A; 1~10 min, 10%~12% A),流速 0.4 mL·min⁻¹,进样量 2 μL,柱温 38 °C,检测波长 220 nm。**结果:**色谱峰纯度结果表明方法专属性良好。秦皮甲素、毛柳苷、秦皮乙素、丁香苷、秦皮苷、秦皮素和东莨菪内酯分别在各自范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系;平均回收率分别为 100.0% (RSD 2.0%), 99.5% (RSD 2.1%), 99.9% (RSD 1.5%), 99.7% (RSD 2.2%), 99.4% (RSD 1.4%), 100.8% (RSD 1.8%), 99.4% (RSD 2.6%)。**结论:**该方法简便、准确,适用于秦皮配方颗粒中 7 种成分的同时定量测定,分析时间明显缩短,并对秦皮配方颗粒中除秦皮甲素和秦皮乙素之外的多种成分首次进行了定量测定,不同厂家及批次的秦皮配方颗粒主要成分含量存在一定的差异。

[关键词] 秦皮配方颗粒; 超高效液相色谱; 秦皮甲素; 毛柳苷; 秦皮乙素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0063-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110063

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20170309.1001.002.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:01

Simultaneous Determination of Seven Constituents in Fraxini Cortex Formula Granule by UPLC

MU Xi-yan¹, FU Yan¹, ZHANG Yu-qian¹, XIANG Cong-kun², ZHANG Guan-hua¹,
WANG Qi¹, WANG Qiao^{1*}

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Hebei Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC method for the simultaneous determination of aesculin, salidroside, aesculetin, syringin, fraxin, fraxetin and scopoletin in the Fraxini Cortex formula granule, in order to compare the difference of the seven chemical constituents in various Fraxini Cortex formula granule samples and provide an effective method to ensure the scientific quality of Fraxini Cortex formula granule. **Method:** The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), and eluted with mobile phase consisting of methanol-0.1% phosphoric acid solution in a gradient mode (0-1 min, 5%-10% A; 1-10 min, 10%-12% A) at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. The sample size was 2 μL. The detection wavelength was 220 nm, and the column temperature was 38 °C. **Result:** Peak area and concentration for aesculin, salidroside, aesculetin, syringin, fraxin, fraxetin and scopoletin showed a good linearity within their ranges, the

[收稿日期] 20160621(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102412)

[第一作者] 穆希岩,在读硕士,从事药物质量控制研究,Tel:15633870145,E-mail:1161463444@qq.com

[通讯作者] *王巧,博士,教授,从事药物质量控制研究,Tel:0311-86265625;E-mail:qiaowang88@hotmail.com

average recoveries of the chemical constituents were 100.0% (RSD 2.0%), 99.5% (RSD 2.1%), 99.9% (RSD 1.5%), 99.7% (RSD 2.2%), 99.4% (RSD 1.4%), 100.8% (RSD 1.8%), 99.4% (RSD 2.6%), respectively. **Conclusion:** The established method is simple and accurate, and can be used to simultaneously determine seven chemical constituents in Fraxini Cortex formula granule, and the analysis time was significantly shortened. It's the first time to make a quantitative determination for many ingredients except for aesculin and the aesculetin in the Fraxini Cortex formula granule. There are certain differences in the contents of chemical compositions in the Fraxini Cortex formula granule of various batches and manufacturers.

[**Key words**] Fraxini Cortex formula granule; UPLC; aesculin; salidroside; aesculetin

秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchphylla*, 白蜡树 *F. chinensis*, 尖叶白蜡树 *F. szaboana* 或 宿柱白蜡树 *F. stylosa* 的干燥枝皮或干皮。秦皮具有清热燥湿、收涩止痢等功效, 主要用于湿热泻痢、赤白带下和目赤肿痛等症状^[1]。据报道^[2], 秦皮中主要含有多种香豆素类成分, 此外还有皂苷、酚类和生物碱等, 其中秦皮甲素、秦皮乙素和秦皮苷等成分具有抗病毒^[3]、抗肿瘤^[4-5] 和抗炎^[6] 等功效。

现代技术突破了传统中药饮片煎煮服用的模式, 将秦皮饮片经提取、浓缩、干燥、制粒等程序制成秦皮配方颗粒, 具有免煎易服和携带方便等优点^[7]。由于生产工艺不同, 不同生产厂家和批次间秦皮配方颗粒质量可能存在差异, 而目前国家对其质量标准尚未进行统一规定。关于秦皮配方颗粒质量控制方法的研究, 目前仅限于高效液相色谱法 (HPLC) 用于指纹图谱的建立以及对秦皮甲素、秦皮乙素 2 种成分的定量分析^[8-10], 尚未对除秦皮甲素、秦皮乙素以外的秦皮苷和秦皮素等活性成分进行同时分离测定。

超高效液相色谱 (UPLC) 采用小粒径填料为固定相, 峰容量、分析效率、灵敏度和分辨率较常规 HPLC 有了很大的提高, 能大大缩短样品分析时间^[11-13]。因此, 本研究采用 UPLC 技术, 建立了一种快速、准确同时测定秦皮配方颗粒中秦皮甲素、毛柳苷、秦皮乙素、丁香苷、秦皮苷、秦皮素和东莨菪内酯 7 种成分的方法, 并对不同厂家、不同批次的秦皮配方颗粒进行比较, 使其分析时间明显缩短, 并对秦皮配方颗粒中除秦皮甲素和秦皮乙素之外的多种成分进行了定量测定, 以期对秦皮配方颗粒的科学质量控制提供有效方法。

1 材料

ACQUITY UPLC® H-Class 型超高效液相色谱仪 (配有在线脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱, TUV 光学检测器, 美国 Waters 公司), SCQ-200 型

超声波清洗器 (上海声谱超声波设备厂), BP211D 型电子分析天平 (德国 Satorius 公司), LG10-2 4A 型高速离心机 (北京雷勃尔离心机有限公司)。

对照品秦皮甲素 (批号 140513, 纯度 ≥ 98%), 秦皮乙素 (批号 140511, 纯度 ≥ 98%), 秦皮苷 (批号 140513, 纯度 ≥ 98%), 秦皮素 (批号 140511, 纯度 ≥ 98%), 毛柳苷 (批号 20110921, 纯度 ≥ 98%) 均购自上海鼎瑞化工有限公司; 丁香苷 (批号 111574-200603, 纯度 ≥ 98%) 和东莨菪内酯 (批号 110768-200504, 纯度 ≥ 98%) 均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙酸色谱纯, 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限责任公司)。9 批秦皮配方颗粒标记为 S1 ~ S9 (华润三九医药股份有限公司, 批号 1309001S, 1311002W; 广东一方制药有限公司, 批号 1306053, 406044T, 501535T; 四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 批号 14020147, 13060401, 1212090, 1307032)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相甲醇 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 5% ~ 10% A; 1 ~ 10 min, 10% ~ 12% A; 10 ~ 12 min, 12% ~ 100% A; 12 ~ 12.5 min, 100% A; 12.5 ~ 12.6 min, 100% ~ 5% A; 1 ~ 10 min 为分析周期, 10 ~ 12.6 min 为升高梯度洗脱时间, 恢复至初始浓度后平衡 4.4 min), 进样量 2 μL, 柱温 38 °C, 检测波长 220 nm。

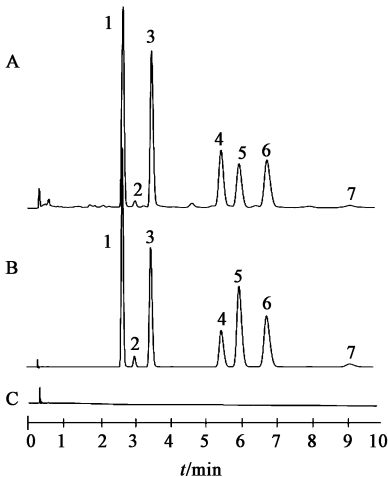
2.2 溶液制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 取秦皮甲素约 4.0 mg, 毛柳苷约 1.2 mg, 秦皮乙素约 1.6 mg, 丁香苷约 2.0 mg, 秦皮苷约 3.6 mg, 秦皮素约 1.2 mg, 精密称定, 分别置于 2 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度; 取东莨菪内酯约 1.5 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度; 制得各成分对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取秦皮配方颗粒约 50 mg,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 30 mL,密塞,称定质量,超声提取 40 min,放冷,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 分别吸取空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各 2 μL ,注入 UPLC,按 2.1 项下色谱条件分析,空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液的色谱见图 1。秦皮甲素、毛柳苷、秦皮乙素、丁香苷、秦皮苷、秦皮素和东莨菪内酯的保留时间分别为 2.76, 3.11, 3.58, 5.62, 6.13, 6.93, 9.33 min,各成分分离度良好,空白溶液与供试品溶液中均没有其他组分干扰。



1. 秦皮甲素;2. 毛柳苷;3. 秦皮乙素;4. 丁香苷;5. 秦皮苷;6. 秦皮素;7. 东莨菪内酯

图 1 秦皮配方颗粒供试品溶液(A),混合对照品溶液(B)和空白溶液(C)的 UPLC

Fig.1 Typical UPLC chromatograms of Fraxini Cortex formula granule solution (A), mixed reference solution (B) and blank solution (C)

2.3.2 检测限和定量限 分别精密量取秦皮甲素、毛柳苷、秦皮乙素、丁香苷、秦皮苷、秦皮素和东莨菪内酯对照品贮备液适量,逐级稀释进样。测得 7 种成分的检测限($S/N \geq 3$)分别为 61, 72, 51, 91, 126, 69, 62 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;定量限($S/N \geq 10$)分别为 81, 135, 68, 142, 202, 92, 83 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 线性关系考察 分别精密量取各成分对照品贮备液,秦皮甲素 200 μL ,毛柳苷 80 μL ,秦皮乙素 200 μL ,丁香苷 80 μL ,秦皮苷 200 μL ,秦皮素 200 μL 和东莨菪内酯 80 μL ,置于同一 5 mL 量瓶中,精密加入水 1.0 mL,加 50% 甲醇稀释至刻度,即

得混合对照品溶液。分别取混合对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积对进样量进行线性回归,得到 7 种成分的回归方程,见表 1。

表 1 7 种成分线性回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Linear regression, correlation index and linearity range of 7 compounds

成分	线性方程	r	线性范围/ μg
秦皮甲素	$Y = 5\ 154\ 695.9X + 726.3$	0.999 8	0.008 24 ~ 0.247 0
毛柳苷	$Y = 3\ 002\ 342.6X + 727.8$	0.999 7	0.000 99 ~ 0.029 8
秦皮乙素	$Y = 11\ 898\ 761.6X - 8\ 756$	0.999 9	0.003 20 ~ 0.096 0
丁香苷	$Y = 9\ 494\ 927.1X - 3\ 133$	0.999 9	0.001 68 ~ 0.050 4
秦皮苷	$Y = 5\ 747\ 268.9X - 7\ 636$	0.999 9	0.007 12 ~ 0.214 0
秦皮素	$Y = 15\ 793\ 200.8X - 7\ 763$	0.999 9	0.002 44 ~ 0.073 2
东莨菪内酯	$Y = 9\ 568\ 642.6X - 756.3$	0.999 9	0.000 24 ~ 0.007 2

2.3.4 精密度试验 取同一供试品溶液(批号 1311002W),按 2.1 项下色谱条件进样分析 6 次,测定各成分峰面积,7 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.1%, 0.1%, 0.1%, 0.1%, 0.1%, 0.1%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批供试品(批号 1311002W)约 25, 50, 75 mg 各 3 份,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备低、中、高 3 个浓度的供试品溶液进行分析,测得 7 种成分峰面积并计算供试品中各成分质量分数分别为 53.24, 1.36, 24.42, 5.94, 25.27, 11.07, 0.68 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.4%, 2.2%, 0.9%, 2.3%, 1.1%, 0.9%, 1.3%,表明此方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 1311002W),室温条件下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析,测得各成分峰面积并计算其 RSD。7 种成分的 RSD 分别为 1.3%, 2.4%, 1.2%, 0.7%, 0.7%, 1.8%, 2.2%,表明供试品溶液在 24 h 内各成分稳定性良好。

2.3.7 加样回收率试验 取供试品约 25 mg 共 9 份,精密称定,分别加入低、中、高 3 个浓度(各浓度 3 份)的混合对照品溶液,按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液进样分析,测得各成分平均回收率和 RSD;结果表明,本方法准确度良好。见表 2。

2.4 样品测定 分别取不同厂家不同批次的秦皮配方颗粒约 50 mg,精密称定,分别制备供试品溶液进行测定,每个样品测定 3 次,采用标准曲线法计算含量,测定结果见表 3。

3 讨论

3.1 溶剂效应 用纯甲醇作为稀释溶剂制备混合

表 2 秦皮配方颗粒中 7 种成分的加样回收率测定

Table 2 Recovery test of 7 compounds in Fraxini Cortex formula granule

成分	称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
秦皮甲素	25.02	1.337	0.663	2.007	101.1	100.0	2.0
	25.05	1.339	0.663	1.993	98.8		
	25.12	1.342	0.663	2.002	99.5		
	25.14	1.343	1.325	2.693	101.9		
	24.99	1.335	1.325	2.606	95.9		
	25.03	1.338	1.325	2.672	100.7		
	24.95	1.333	1.988	3.356	101.8		
毛柳苷	25.02	0.034	0.017	0.051	100.0	99.5	2.1
	25.05	0.034	0.017	0.050	96.4		
	25.12	0.034	0.017	0.051	101.0		
	25.14	0.034	0.034	0.068	99.8		
	24.99	0.034	0.034	0.069	102.7		
	25.03	0.034	0.034	0.068	98.7		
	24.95	0.034	0.052	0.086	101.6		
秦皮乙素	25.02	0.611	0.304	0.916	100.5	99.9	1.5
	25.05	0.612	0.304	0.913	99.1		
	25.12	0.613	0.304	0.910	97.5		
	25.14	0.614	0.608	1.231	101.6		
	24.99	0.610	0.608	1.204	97.7		
	25.03	0.611	0.608	1.231	102.0		
	24.95	0.609	0.912	1.522	100.1		
丁香苷	25.02	0.149	0.074	0.221	98.2	99.7	2.2
	25.05	0.149	0.074	0.220	95.4		
	25.12	0.149	0.074	0.223	99.1		
	25.14	0.149	0.148	0.297	100.0		
	24.99	0.148	0.148	0.301	102.9		
	25.03	0.149	0.148	0.294	98.3		
	24.95	0.148	0.223	0.374	101.3		
秦皮苷	25.02	0.632	0.326	0.961	100.9	99.4	1.4
	25.05	0.633	0.326	0.956	99.2		
	25.12	0.635	0.326	0.954	98.0		
	25.14	0.635	0.652	1.274	98.0		
	24.99	0.631	0.652	1.296	101.9		
	25.03	0.632	0.652	1.287	100.4		
	24.95	0.630	0.978	1.601	99.2		
秦皮素	25.02	0.632	0.978	1.605	99.5		
	25.07	0.633	0.978	1.589	97.7		

续表 2

成分	称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
秦皮素	25.02	0.277	0.132	0.404	96.3	100.8	1.8
	25.05	0.277	0.132	0.410	100.9		
	25.12	0.278	0.132	0.413	102.9		
	25.14	0.278	0.263	0.544	101.2		
	24.99	0.277	0.263	0.541	100.5		
	25.03	0.277	0.263	0.542	100.9		
	24.95	0.276	0.395	0.675	101.0		
东莨菪内酯	25.02	0.017	0.008	0.025	96.3	99.4	2.6
	25.05	0.017	0.008	0.025	101.8		
	25.12	0.017	0.008	0.025	100.9		
	25.14	0.017	0.017	0.034	102.3		
	24.99	0.017	0.017	0.033	99.1		
	25.03	0.017	0.017	0.033	94.5		
	24.95	0.017	0.025	0.042	101.5		
秦皮素	25.02	0.017	0.025	0.041	98.8		
	25.07	0.017	0.025	0.042	99.2		

表 3 不同秦皮配方颗粒中 7 种成分含量测定

Table 3 Determination of 7 compounds in Fraxini Cortex formula granule

批号	秦皮甲素	毛柳苷	秦皮乙素	丁香苷	秦皮苷	秦皮素	东莨菪内酯
S1	64.70	1.40	20.56	8.74	24.16	8.93	0.46
S2	53.58	1.34	24.44	6.03	25.18	11.03	0.68
S3	61.88	3.62	50.28	0.94	37.58	4.98	0.29
S4	59.35	3.52	48.20	0.79	35.92	4.76	0.27
S5	56.58	3.34	45.25	0.73	30.19	4.77	0.24
S6	58.39	3.22	45.36	0.74	32.30	4.91	0.25
S7	63.65	4.26	20.63	0.53	49.55	2.91	0.25
S8	64.918	4.21	19.67	0.53	51.03	2.49	0.30
S9	61.73	4.59	19.39	0.54	50.54	2.23	0.25

对照品溶液,进样分析发现各成分色谱峰峰形较差,且色谱峰明显重叠,调整流动相比比例后峰形仍没有得到改善,推测可能存在溶剂效应,因此采用 50% 甲醇作为稀释溶剂制备混合对照品溶液,各成分色谱峰峰形得到良好改善,分离度达到要求。

3.2 检测波长的选择 采用 DAD 检测器,对混合对照品溶液进行分析,测得各成分分别在 220,225,230,320,340 nm 波长下有较大吸收,在以上波长条件下对混合对照品溶液进行测定,对被测成分不同波长下峰面积进行比较,实验结果表明在 220 nm 波长下各被测成分响应较好且峰面积较大,故选择

220 nm 作为各被测成分检测波长。

3.3 流动相中酸的选择 实验初期为改善各成分色谱峰峰形,采用甲醇-0.1% 乙酸水溶液作为流动相,在 220 nm 处乙酸的 2 个羰基存在紫外吸收,且基线不稳定,而磷酸分子结构中不含羰基,在紫外波长下也无吸收,因此考虑使用磷酸。实验证实,进样时磷酸对样品的测定干扰小于乙酸,220 nm 处基线很平稳,各被测成分的峰面积都增大,最终选择磷酸。

3.4 样品分析 测定结果表明,秦皮甲素在所有样品中含量最高,其他成分含量顺序在不同样品中有所变化,但总体上各批次样品中秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素和秦皮素含量相对较高,而丁香苷、毛柳苷和东莨菪内酯含量相对较低,其中东莨菪内酯的含量最低。不同厂家供试品中丁香苷、东莨菪内酯、秦皮乙素和秦皮素的含量差异较大,其中丁香苷差异最大;秦皮苷、毛柳苷和秦皮甲素 3 种成分的含量差异较小,其中秦皮甲素最小,由此说明各厂家制备技术参差不齐,急需制定秦皮配方颗粒质量标准以保证其质量稳定。对于同一厂家不同批次的供试品,一些成分的含量也存在一定差异,提示秦皮配方颗粒制备工艺有待完善或者原药材的来源缺乏稳定性。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:271.
[2] 方莲花,吕扬,杜冠华,等. 秦皮的药理作用研究进展

[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):27-32.

[3] 杨天鸣,葛欣,王晓妮. 秦皮抗菌作用研究[J]. 西北国防医学杂志,2003,24(5):387-388.
[4] 姬剑,伟忠民. 秦皮乙素对人肝癌 BEL-7402 细胞体外增殖的影响[J]. 中药药理与临床,2015,31(3):38-40.
[5] 王晶. 秦皮甲素通过抑制 Ras/ERK 通路诱导人肺癌细胞 A549 凋亡[J]. 中成药,2015,37(1):40-43.
[6] Turabo A, Del N P, Ragazzi E, et al. Anti-inflammatory and peripheral analgesic activity of esculetin *in vivo*[J]. Pharmacol Res Comm,1988,20(5):83-85.
[7] 张建春,王少臣,胡浩. 中药颗粒剂研究概况[J]. 中国现代医学与临床,2005,3(2):30-31.
[8] 胥爱丽,李素梅,毕晓黎,等. 秦皮配方颗粒质量控制研究[J]. 中国药房,2014,17(1):95-98.
[9] 孙冬梅,范宋玲,涂瑶生,等. 高效液相色谱法测定秦皮浓缩颗粒中秦皮甲素的含量[J]. 中药新药与临床药理,2000,11(3):172-173.
[10] 潘银蕉,郑晓英,袁焕合,等. 秦皮配方颗粒质量标准研究[J]. 今日药学,2016,26(7):485-488.
[11] 霍玉荣. 超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展[J]. 首都食品与医药,2016,16(10):25-26.
[12] 陈佳,王钢力,姚令文,等. 超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1976-1981.
[13] 张定堃,韩雪,李瑞煜,等. UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):463-469.

[责任编辑 顾雪竹]