

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)10-0097-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.10.020



黄芪复方制剂供试品溶液制备方法优化

冉京燕, 谢 委, 谢雪佳, 汪秋兰, 熊 微, 方建国, 王文清[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 优化黄芪复方制剂供试品溶液的制备方法。方法 以提取溶剂为影响因素, 以扶正强筋片样品中黄芪甲苷含量为考察指标, 优选供试品溶液制备方法。并以此方法对4种市售黄芪复方制剂(前列通片、复方石韦片、芪明颗粒、复方血栓通胶囊)进行验证。结果 优选方法为在药典方法基础上, 用氨试液-水-水饱和的正丁醇(10:30:50, V/V/V)混合溶剂进行加热回流提取(含量测定结果为1.09 mg/g, RSD为1.93%)。4种复方制剂测得黄芪甲苷含量为药典方法的1.8~2.6倍, RSD介于1.61%~4.73%。结论 该方法快捷高效, 专属性、重复性良好, 降低了系统误差, 结果准确, 可用于黄芪复方制剂供试品溶液的制备。

关键词: 黄芪; 复方制剂; 黄芪甲苷; 供试品溶液; 高效液相色谱法; 含量测定

Optimization of the Preparation for the Test Solution of Huangqi Compound Preparation

RAN Jingyan, XIE Wei, XIE Xuejia, WANG Qiulan, XIONG Wei, FANG Jianguo, WANG Wenqing

(Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China 430030)

Abstract: Objective To optimize the preparation method of the test solution of Huangqi Compound Preparation. **Methods** The preparation method of the test solution was optimized with the extraction solvent as the influencing factor and the content of astragaloside IV in the Fuzheng Qiangjin Tablets as the investigation indicator. The above optimal method was verified with four commercial Huangqi Compound Preparations (Qianlietong Tablets, Compound Shiwei Tablets, Qiming Granules, Compound Xueshuantong Capsules) as the test subjects. **Results** The optimal method was that the ammonia test solution - water - water saturated *n* - butanol (10 : 30 : 50, V / V / V) was used for heating reflux extraction based on the method of *Chinese Pharmacopoeia*; the content of astragaloside IV determined by the above method was 1.09 mg / g with an RSD of 1.93%. The content of astragaloside IV in four compound preparations determined by the above optimal method was in the range of 1.8 to 2.6 times higher than that determined by the method of *Chinese Pharmacopoeia*, with an RSD in the range of 1.61% to 4.73%. **Conclusion** This method is fast, efficient, specific, repeatable, accurate and has low systematical error, which can be used for the preparation of the test solution of Huangqi Compound Preparation.

Key words: Astragali Radix; compound preparation; astragaloside IV; test solution; HPLC; content determination

黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根^[1], 是临床常用的大宗中药材之一。现代药理学研究及临床实践表明, 黄芪具有免疫调节、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生物学功能^[2-3], 在经典名方及中药复方制剂中应用广泛, 用于治疗心血管疾病、糖尿病、癌症、呼吸系

统疾病、神经系统疾病等^[4-8]。与2015年版《中国药典(一部)》相比, 2020年版《中国药典(一部)》收录的含黄芪成方制剂新增27种, 总数已达224种^[9]。黄芪的化学成分众多, 主要包括多糖类、皂苷类、黄酮类、氨基酸类等^[10]。黄芪甲苷是黄芪皂苷中的代表性单体, 也是黄芪

第一作者: 冉京燕, 女, 硕士, 药师, 研究方向为现代中药制剂分析, (电子信箱)rjy360@163.com。

[△]通信作者: 王文清, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为现代中药制剂分析, (电子信箱)wwq3560@sina.com。

[10] 吴 燕, 张娴颢, 胡晓丹, 等. 健肾颗粒的质量标准建立[J]. 解放军药学报, 2018, 34(2): 151-154.

[11] 陈娟红, 念君玉, 肖建平. 中药黄芪的药理作用及临床应用价值[J]. 临床合理用药, 2023, 16(12): 121-124.

[12] 叶 飞, 王亚丽, 魏娟娟, 等. 黄芪中黄芪甲苷含量测定的最新研究进展[J]. 宁夏师范学院学报, 2018, 39(4): 52-56.

[13] 石和元, 桑红灵, 谭爱华, 等. 山茱萸多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 现代免疫学, 2022, 42(6): 482-488.

[14] 戴 鹏, 潘汉升, 王火福, 等. 中医药防治骨质疏松症的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(13): 2193-2195.

[15] 湛顺清, 梁 伟, 张雪妹, 等. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2737-2745.

[16] 马冰洁. 圣愈汤缓解化疗药物诱导骨髓抑制的药效物质基础及作用机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2023.

[17] 杨显红, 齐新文, 李松军. 骨髓间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折的机制[J]. 医学综述, 2020, 26(7): 1288-1292.

[18] 梁 健, 伍 亮, 黄先盈, 等. 柚皮苷防治骨质疏松症的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2022, 51(7): 19-21.

[19] 童 丹, 王 芳. HPLC-UV法测定黄芪中黄酮类化合物含量[J]. 中兽医医药杂志, 2022, 41(3): 84-87.

[20] 张 羽, 李云霞, 郑艳春, 等. 高效液相色谱法同时测定黄芪精颗粒中3种黄酮类成分及其指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2019, 17(4): 561-566.

(收稿日期: 2023-08-15; 修回日期: 2023-12-21)

的主要活性成分,目前多以其含量为评价指标对黄芪药材及黄芪复方制剂进行质量控制。随着科学技术的发展,黄芪甲苷的检测方法已日益成熟,为保证测定结果的准确性,含量测定用供试品溶液的制备十分重要。2020年版《中国药典(一部)》中含黄芪且以黄芪甲苷含量为监测指标的成方制剂,其供试品溶液制备方法通常包括不同溶剂提取、水饱和正丁醇萃取、氨试液洗涤、大孔吸附树脂洗脱^[11]等步骤。经氨试液处理后,其他黄芪皂苷类成分可转化为黄芪甲苷,即测定结果中黄芪甲苷含量为黄芪饮片中原始含量及其他皂苷转化后的含量之和。氨试液处理过程影响了黄芪皂苷的转化率,进而影响最终测定结果,且此类以黄芪甲苷为单一监测指标的成方制剂质量标准中均未对氨试液具体处理过程如振摇次数、振摇后静置时间等参数作明确规定,制备过程中可能因检测人员操作的差异导致黄芪皂苷类成分转化不完全,测定结果差异显著,中间精密度及重复性欠佳,严重时可能影响对制剂质量的准确评价。同时,上述通用制备过程繁杂,萃取时易产生严重的乳化现象,影响测定结果的准确度。2020年版《中国药典(一部)》黄芪饮片中黄芪甲苷含量测定项下供试品溶液制备方法较2015年版《中国药典》有了较大改进,故本研究中以此为研究思路,以本院制剂扶正强筋片为试验制剂,通过对提取溶剂、氨试液体积分数等进行优选及验证,建立了更高效的含量测定用供试品溶液制备方法,并将该方法用于黄芪复方制剂(包括前列通片、复方石韦片、芪明颗粒、复方血栓通胶囊)中黄芪甲苷含量的测定。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-16型高效液相色谱仪,ELSD-LT II型蒸发光散射检测器、AUW220D型双量程电子天平(日本Shimadzu公司,精度为0.01 mg);JHH-6型数显恒温水浴锅(金坛市精达仪器制造有限公司)。

1.2 试药

扶正强筋片(医院制剂,批号为20220514);芪明颗粒(浙江万晟药业有限公司,批号为20210709);前列通片(广州白云山中一药业有限公司,批号为B02004);复方石韦片(颈复康药业集团有限公司,批号为230029);复方血栓通胶囊(广东众生药业股份有限公司,批号为220321);黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110781-201616,含量97.4%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent 5 TC-C₁₈(2)柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(32:68, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:40 °C。蒸发光散射检测器:雾化温度50 °C,增益6,载气为氮气(N₂),压力0.35 MPa。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液

取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,定容,制成质量浓度为0.2 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

方法1(原方法^[12],为该制剂品种审定标准中所载方法):取样品20片,除去糖衣,研细,取粉末约3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中(此前的操作,方法2,3,4同),加甲醇50 mL,加热回流提取2 h,冷却至室温,滤过,用少量甲醇分次洗涤容器和残渣,合并洗液与滤液,蒸干,残渣加水30 mL,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取4次(每次40 mL),合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤2次(每次40 mL),弃去氨试液,蒸干正丁醇液,用甲醇溶解并转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液I。

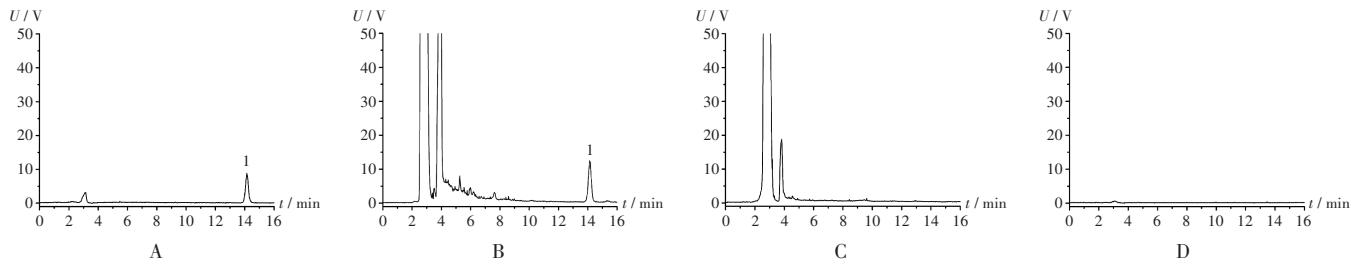
方法2:将样品置具塞锥形瓶后,加入含4%浓氨试液的80%甲醇(取浓氨试液4 mL,加80%甲醇至100 mL,摇匀)50 mL,加热回流2 h,冷却至室温,滤过,用少量含4%浓氨试液的80%甲醇分次洗涤容器和残渣,合并洗液与滤液,蒸干,残渣加水约30 mL,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取3次(每次40 mL),合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液II。

方法3:将样品置具塞锥形瓶后,加氨试液40 mL,完全湿润后再加水饱和的正丁醇50 mL,加热回流2 h,冷却至室温,置分液漏斗内,用少量水饱和的正丁醇洗涤容器,置分液漏斗内,静置使完全分层,分取正丁醇液,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液III。

方法4(本研究方法):将样品置具塞锥形瓶后,加氨试液10 mL,完全湿润后加水30 mL,混匀,再精密加入水饱和的正丁醇50 mL,称定质量,加热回流2 h,冷却至室温,称定质量,用水饱和的正丁醇补足减失的质量,摇匀,置分液漏斗内,静置1 h使完全分层,精密量取上层正丁醇液25 mL,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液IV。

2.2.3 阴性对照品溶液

按扶正强筋片处方和工艺制备不含黄芪的阴性样



1. 黄芪甲苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液 D. 空白溶液

图1 高效液相色谱图

1. Astragaloside IV

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution D. Blank solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

品,按供试品溶液制备方法4制备,即得。

2.2.4 空白溶液

以甲醇为空白溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验:精密量取2.2项下供试品溶液Ⅳ和对照品溶液、阴性对照品溶液、空白溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。黄芪甲苷主峰保留时间为14.2 min,理论板数按主峰计为21 744,分离度为26.2 (> 1.5),且空白溶液及阴性对照品溶液无干扰。详见图1。

线性关系考察:精密吸取对照品溶液4, 8, 10, 15, 20, 25 μL ,按2.1项下色谱条件进样测定,以进样量的对数(\lg)值(X)为横坐标、峰面积的 \lg 值(Y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0862X + 0.2668$ ($r = 0.9994, n = 6$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在0.86 ~ 5.40 μg 范围内其对数值与峰面积对数值线性关系良好。

精密度试验:取供试品溶液Ⅳ适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为2.05% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下对照品溶液、供试品溶液Ⅳ各适量,分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 分别为1.55%, 1.82% ($n = 7$),表明对照品溶液、供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:取扶正强筋片样品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液Ⅳ,共6份,按2.1项下色谱条件进样测定,以外标两点法对数方程计算,结果样品含量分别为1.010, 1.020, 1.031, 1.041, 0.986, 1.006 mg/g ,平均值为1.02 mg/g , RSD 为1.92% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取扶正强筋片样品粉末适量,精密称定,共6份,精密加入黄芪甲苷对照品溶液(相当于黄

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
0.741	0.707	1.422	96.32	97.74	2.10
0.733	0.707	1.427	98.16		
0.736	0.707	1.403	94.34		
0.744	0.707	1.442	98.73		
0.737	0.707	1.436	98.87		
0.747	0.707	1.454	100.00		

芪甲苷0.707 mg),按2.2.2项下方法制备供试品溶液Ⅳ,按2.1项下色谱条件进样测定,结果见表1。

2.4 样品含量测定

不同制备方法比较:取同一批扶正强筋片样品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液Ⅰ-Ⅳ,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算黄芪甲苷含量,结果见表2(其中静置时间1,2分别为水饱和正丁醇萃取后及氨试液洗涤后的静置时间)。其中,方法1耗时最长,且氨试液处理时间不同时黄芪甲苷测得量差异较大。方法2中黄芪甲苷测得量约为方法1的2倍,但复方制剂成分复杂,此条件下提取杂质较多,正丁醇萃取时乳化严重不易分层,操作时易造成人为损失,重复性试验结果不理想。方法3、方法4与方法2相比避免了萃取过程引入的误差,测得含量略有增加;且方法4较方法3降低了氨试液体积分数而黄芪甲苷测得量无明显变化。

表2 不同制备方法结果比较

Tab. 2 Comparison of different preparation methods

编号	静置时间1	静置时间2	有机试剂使用量(mL)	制备总时长	结果	
					含量(mg/g)	RSD (%)
1	每次15 min	每次30 min	230	约9 h	0.34	2.88
1	每次15 min	每次40 min	230	约9 h	0.43	1.61
2	每次15 min		180	约7 h	0.94	9.13
3			50	约4 h	1.10	5.12
4			50	约4 h	1.09	1.93

方法验证:取前列通片、复方石韦片、芪明颗粒、复方血栓通胶囊各适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液IV,按2.1项下色谱条件进样测定,并与2020年版《中国药典》所载方法对比,结果见表3(上述复方制剂标准方法中均未对氨试液洗涤过程有具体规定,实际操作每次均静置30 min)。对于黄芪复方制剂,改进方法能使供试品溶液中黄芪皂苷类成分转化完全,测得的黄芪甲苷含量为标准方法的1.8~2.6倍。

表3 黄芪复方制剂中黄芪甲苷含量测定结果(n=6)

Tab.3 Results of content determination of astragaloside IV in Huangqi Compound Preparation (n = 6)

制剂名称	药典方法		方法4	
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)
前列通片	0.36	1.84	0.67	3.10
复方石韦片	0.43	3.81	1.00	1.61
芪明颗粒	0.45	2.93	0.91	4.73
复方血栓通胶囊	0.11	4.52	0.28	2.33

3 讨论

氨试液洗涤过程在去除部分杂质的同时,还会使酰基化的黄芪皂苷如黄芪皂苷I、黄芪皂苷II脱去酰基转化为黄芪甲苷^[13-15],进而提高供试品溶液中黄芪甲苷含量,总皂苷含量则不受影响^[16]。对于仅以黄芪甲苷为单一指标进行质量监控的复方制剂,可能因检测人员在氨试液处理过程中操作的差异而导致最终测定结果的差异,严重时可能影响对制剂质量的准确评价。

本研究中建立的方法能同时进行转化、提取、萃取等操作,不仅能确保其他黄芪皂苷完全转化为黄芪甲苷,同时也大幅缩短了制备时间,测定结果重复性及准确度均可控。将本研究中优选方法(方法4)应用于4种市售黄芪复方制剂中黄芪甲苷含量的测定,均取得了满意结果,可见,本研究结果也可为其他含黄芪的中药复方制剂的黄芪甲苷含量测定用供试品溶液的制备提供参考。

综上所述,本研究所建立的方法快捷高效,专属性、重复性良好,降低了系统误差,结果准确,可用于黄芪复方制剂黄芪甲苷含量测定用供试品溶液的制备。

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, 2020: 315.
[2] GUO Z, LOU Y, KONG M, et al. A Systematic Review of Phytochemistry, Pharmacology and Pharmacokinetics on Astragali Radix: Implications for Astragali Radix as a Personalized Medicine [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6): 1463.
[3] FU J, WANG Z, HUANG L, et al. Review of the botanical

characteristics, phytochemistry, and pharmacology of Astragalus membranaceus (Huangqi) [J]. Phytother Res, 2014, 28(9): 1275 - 1283.

[4] ZHENG Q, ZHU JZ, BAO XY, et al. A Preclinical Systematic Review and Meta - Analysis of Astragaloside IV for Myocardial Ischemia / Reperfusion Injury [J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 795.
[5] CHEN X, WANG H, JIANG M, et al. Huangqi (astragalus) decoction ameliorates diabetic nephropathy via IRS1 - PI3K - GLUT signaling pathway [J]. American Journal of Translational Research, 2018, 10(8): 2491 - 2501.
[6] ZHENG YF, DAI Y, LIU WP, et al. Astragaloside IV enhances taxol chemosensitivity of breast cancer via caveolin - 1 - targeting oxidant damage [J]. Journal of Cellular physiology, 2019, 234(4 Pt2): 4277 - 4290.
[7] JIN H, LUO Q, ZHENG Y, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T cells contribute to the antiasthmatic effects of Astragalus membranaceus extract in a rat model of asthma [J]. International Immunopharmacology, 2013, 15(1): 42 - 49.
[8] QU YZ, LI M, ZHAO YL, et al. Astragaloside IV attenuates cerebral ischemia - reperfusion - induced increase in permeability of the blood - brain barrier in rats [J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 606(1 - 3): 137 - 141.
[9] 陶雨凡, 董凡, 兀琦, 等. 《中国药典》2020年版含黄芪成方制剂分析及其现代研究进展 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(1): 202 - 209.
[10] HU XJ. Protective capability of Astragalus (Huangqi) on auditory function in a rat model of estrogen deficiency [J]. Chin Med J, 2019, 132(1): 106 - 108.
[11] 熊有明, 崔虹, 熊学庆. 高效液相 - 蒸发光散射法测定芪归益母膏中黄芪甲苷含量 [J]. 中国药业, 2020, 29(9): 123 - 125.
[12] 谢委, 方建国, 杜光, 等. 高效液相色谱 - 蒸发光散射法测定扶正强筋片中黄芪甲苷含量 [J]. 医药导报, 2012, 31(2): 208 - 210.
[13] 韩旭阳, 曾祖平, 彭冰, 等. UPLC / Q - TOF - MS 方法测定黄芪皂苷 I、II、IV 含量并研究水解对黄芪皂苷类成分的影响 [J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 523 - 528.
[14] 陈超, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 黄芪药材提取纯化过程中黄芪皂苷 IV 含量变化及相关成分分析 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(12): 1487 - 1493.
[15] 王宗权, 贾继明, 裴彩云. 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器法测定不同产地黄芪中黄芪甲苷含量 [J]. 中国药业, 2013, 22(19): 10 - 12.
[16] 刘玫, 周晶, 张庆伟, 等. 氨液水解法用于提高黄芪中黄芪甲苷含量的工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 635 - 638.

(收稿日期: 2023 - 06 - 06; 修回日期: 2023 - 11 - 27)