

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)17-0096-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.17.022



康寿丸质量标准提升研究*

程宏辉¹, 江涛^{1△}, 曾晨¹, 苏锐辉¹, 栗建明², 顾利红², 汤迎湛¹, 陈丽斯¹

(1. 广州白云山敬修堂药业股份有限公司, 广东 广州 510130; 2. 广东省广州市药品检验所·国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 广东 广州 510160)

摘要:目的 提升康寿丸的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对康寿丸中的人参、地骨皮、何首乌进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷)的含量,色谱柱为Phenomenex C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 4 μm),流动相为乙腈-水(19:81, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为320 nm,柱温为25 °C,进样量为10 μL。测定2家生产厂家各10批样品中二苯乙烯苷的含量,并制订其含量限度。结果 人参、地骨皮和何首乌的薄层色谱图主斑点清晰,分离度良好,且阴性对照无干扰。二苯乙烯苷的进样量在30.094~3761.7 ng范围内与峰面积积分值线性关系良好($r = 1.000, n = 11$);精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%;平均加样回收率为102.88%,RSD为0.59%($n = 8$)。10批样品中二苯乙烯苷含量介于1.14~3.32 mg/g。结论 所建立的方法专属性强、重复性好、准确度高,可用于康寿丸的质量控制。暂订每1g康寿丸含何首乌以二苯乙烯苷计不得少于0.90 mg。

关键词:康寿丸;高效液相色谱法;薄层色谱法;人参;地骨皮;何首乌;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

Improvement of the Quality Standard of Kangshou Pills

CHENG Honghui¹, JIANG Tao¹, ZENG Chen¹, SU Ruihui¹, LI Jianming², GU Lihong², TANG Yingzhan¹, CHEN Lisi¹

(1. Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou, Guangdong, China 510130; 2. Guangzhou Institute for Drug Control · NMPA Key Laboratory of Quality Control of Chinese Patent Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510160)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Kangshou Pills. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify Ginseng Radix et Rhizome, Lycii Cortex, Polygoni Multiflori Radix in Kangshou Pills. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (referred to as stilbene glycoside) in Kangshou Pills. The chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 4 μm), the mobile phase was acetonitrile-purified water (19:81, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 320 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. The content of stilbene glycoside in 10 batches of samples from two manufacturers was determined and the content limit was established. **Results** The TLC chromatograms of Ginseng Radix et Rhizome, Lycii Cortex and Polygoni Multiflori Radix showed clear spots, good separation, and no interference from the negative control. The linear range of stilbene glycoside was 30.094 - 3761.7 ng ($r = 1.000, n = 11$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%, and the average recovery of stilbene glycoside was 102.88% with an RSD of 0.59% ($n = 8$). The content of stilbene glycoside in 10 batches of samples was 1.14 - 3.32 mg/g. **Conclusion** The established method has strong specificity, good repeatability, and high accuracy, which can be used for quality control of Kangshou Pills. Temporarily, every 1 g of Kangshou Pills should contain no lower than 0.90 mg of Polygoni Multiflori Radix (calculated as stilbene glycoside).

Key words: Kangshou Pills; HPLC; TLC; Ginseng Radix et Rhizome; Lycii Cortex; Polygoni Multiflori Radix; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside

康寿丸由何首乌、熟地黄、地骨皮、人参等8味中药材组方,具有补气养血、润肺滋肾功效,用于治疗气血两虚、精血两虚、精血不足导致的身体瘦弱、神疲乏力、眩晕健忘、失眠多梦等症。其现行质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂(第十一册)》^[1],但仅对人参进行了薄层色谱(TLC)鉴别,无法较好控制

产品质量。本研究中参考2020年版《中国药典(一部)》^[2]及文献^[3-4],对原标准中人参的TLC法进行优化,并建立了定性鉴别地骨皮及何首乌的TLC法,同时建立了测定何首乌中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷)含量的高效液相色谱(HPLC)法,且制订了含量限度。现报道如下。

*基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究课题[2019Z048]。

第一作者:程宏辉,男,大学本科,制药高级工程师,研究方向为中药制剂及质量控制,(电子信箱)jxtyjs1790@163.com。

△通信作者:江涛,男,硕士,制药正高级工程师,研究方向为中药学,(电子信箱)jiangtao1609@163.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);ATS 4型全自动薄层点样仪及薄层数码成像系统(瑞士Camag公司);KQ-600DE型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为600 W,频率为40 kHz);XA1050U型电子天平(精度为0.1 mg),ME204T型电子分析天平(精度为0.01 mg),均购自瑞士Mettler Toledo公司;DHG-9246A型电热鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);硅胶G板(青岛海洋化工厂)。

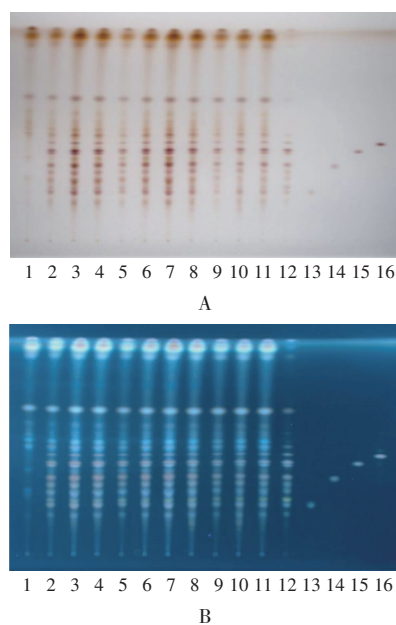
1.2 试药

人参对照药材(批号为120917-201712),人参皂苷Rb₁对照品(批号为110704-201726),人参皂苷Re对照品(批号为110754-201827),人参皂苷Rg₁对照品(批号为110703-201832),人参皂苷Rf对照品(批号为111719-201806),地骨皮对照药材(批号为121087-201707),东莨菪内酯对照品(批号为110768-200504),何首乌对照药材(批号为120934-201410),制何首乌对照药材(批号为121454-200502),大黄素对照品(批号为110756-201913),大黄素甲醚对照品(批号为110758-201616),二苯乙烯苷对照品(批号为110844-201814,纯度为91.0%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯;康寿丸(广州白云山敬修堂药业股份有限公司,批号分别为B07007, B07008, B07009, B07010, B07011, B07012, B09013, B09014, B09015, B09016);按康寿丸制备工艺分别制备缺人参、地骨皮、何首乌的阴性样品。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

人参^[5-7]:取样品及缺人参的阴性样品粉末各5 g,加水饱和的正丁醇30 mL,超声(功率为100 W,频率为40 kHz)30 min,滤过,滤液用氨试液洗涤3次,每次20 mL,取正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液及缺人参阴性对照品溶液。取人参对照药材0.2 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rf对照品各适量,分别加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。按2020年版《中国药典(一部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述4种溶液各1 μL,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(15:22:40:10, V/V/V/V)低于10℃温度放置过夜的下层溶液为展开剂,展开距离在12 cm以上,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰,分别置日光及紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应



A. 日光 B. 365 nm

1. 阴性对照品溶液 2 - 11. 供试品溶液 12. 对照药材溶液
13 - 16. 对照品溶液(分别为人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rf)

图1 人参薄层色谱图

A. Sunlight B. 365 nm

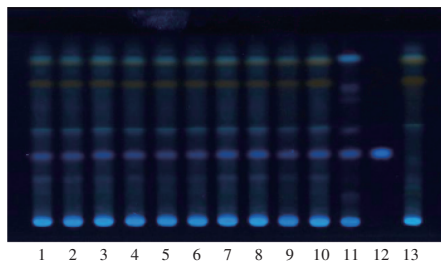
1. Negative reference solution 2 - 11. Test solution 12. Reference medicinal material solution 13 - 16. Reference solution (ginsenoside Rb₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, and ginsenoside Rf, respectively)

Fig. 1 TLC chromatogram of Ginseng Radix et Rhizome

位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图1。

地骨皮^[8-9]:取样品、缺地骨皮的阴性样品粉末各3 g,加甲醇25 mL,超声(功率为100 W,频率为40 kHz)30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液及缺地骨皮阴性对照品溶液。取地骨皮对照药材2 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取东莨菪内酯对照品适量,加甲醇制成每1 mL含15 μg的溶液,作为对照品溶液。按2020年版《中国药典(一部)》通则0502 TLC法试验,吸取供试品溶液、缺地骨皮阴性对照品溶液、对照药材溶液各4 μL及对照品溶液2 μL,点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(5:6:0.2, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图2。

何首乌^[10-13]:取地骨皮项下的供试品溶液作为何首乌检测用供试品溶液。取缺何首乌的阴性样品粉末3 g及何首乌、制何首乌对照药材各0.5 g,同地骨皮项下方法制备缺何首乌阴性对照品溶液及对照药材溶液。取大黄素、大黄素甲醚对照品各适量,分别加甲醇制成每1 mL含0.2 mg的溶液,作为对照品溶液。按2020年版



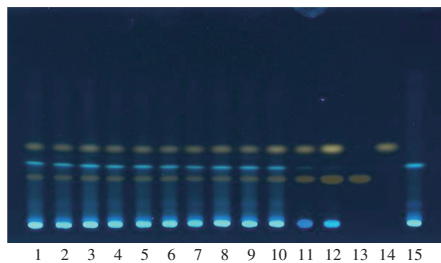
1 - 10. 供试品溶液 11. 对照药材溶液 12. 对照品溶液
13. 阴性对照品溶液

图2 地骨皮薄层色谱图(365 nm)

1 - 10. Test solution 11. Reference medicinal material solution
12. Reference solution 13. Negative reference solution

Fig. 2 TLC chromatogram of Lycii Cortex (365 nm)

《中国药典(一部)》通则 0502 TLC法试验,吸取上述4种溶液各2 μL ,点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$) - 乙酸乙酯 - 冰醋酸(15:1.5:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图3。

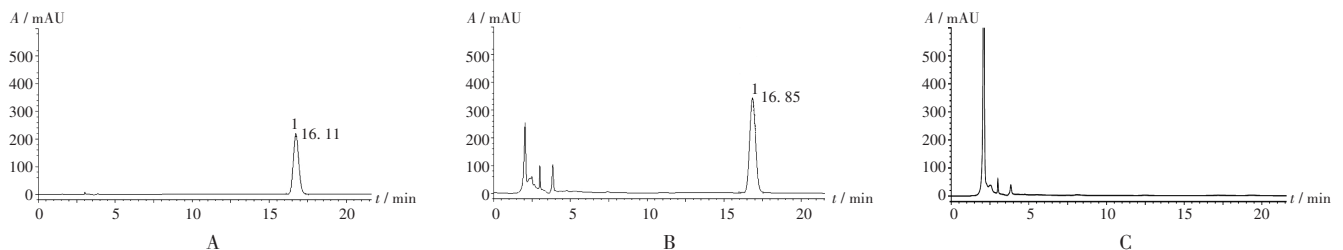


1 - 10. 供试品溶液 11 - 12. 对照药材溶液(分别为何首乌和制何首乌) 13 - 14. 对照品溶液(分别为大黄素和大黄素甲醚) 15. 阴性对照品溶液

图3 何首乌薄层色谱图(365 nm)

1 - 10. Test solution 11 - 12. Reference medicinal material solution (Polygoni Multiflori Radix and Polygoni Multiflori Radix Preparata)
13 - 14. Reference solution (emodin, and emodin methyl ether, respectively) 15. Negative reference solution

Fig. 3 TLC chromatogram of Polygoni Multiflori Radix (365 nm)



1, 2, 3, 5, 4' - 四羟基二苯乙烯 - 2 - O - β - D - 葡萄糖苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图4 高效液相色谱图

1, 2, 3, 5, 4' - tetrahydroxystilbene - 2 - O - β - D - glucoside
A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 4 HPLC chromatograms

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 4 μm);
流动相:乙腈 - 水(19:81, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.2.2 溶液制备

取样品粉末0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加稀乙醇25 mL,密塞,称定质量,超声(功率为100 W,频率为40 kHz)处理45 min,放冷,再次称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取缺何首乌的阴性样品适量,按供试品溶液制备方法制备缺何首乌阴性对照品溶液。取二苯乙烯苷对照品适量,精密称定,加稀乙醇制成每1 mL含30 μg 的溶液,即得对照品溶液。取二苯乙烯苷对照品5.693 mg,精密称定,置250 mL容量瓶中,加稀乙醇定容,摇匀,即得质量浓度为20.7225 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的二苯乙烯苷稀乙醇溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验^[14-15]:分别吸取2.2.2项下对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各10 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,二苯乙烯苷色谱峰保留时间与对照品溶液一致,与其他各峰达到基线分离,且阴性对照无干扰,理论板数大于5000。详见图4。

线性关系考察:取二苯乙烯苷对照品3.307 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,加稀乙醇定容,摇匀,即得质量浓度为150.468 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件分别进样3, 5, 10, 15, 20, 25 μL 测定;再精密吸取对照品溶液1 mL,置10 mL容量瓶中,得质量浓度为15.047 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样2, 5, 10, 15, 20 μL 测定。以二苯乙烯苷进样量(X, ng)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 18.453X - 244$ ($r = 1.000, n = 11$)。结果表明,二苯乙烯

昔进样量在 30.094 ~ 3 761.7 ng 范围内与峰面积积分线性关系良好。

精密度试验:精密量取对照品溶液(质量浓度为 28.620 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果二苯乙烯苷峰面积的 *RSD* 为 0.06% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 B09013)粉末 0.5 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 8 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算样品中二苯乙烯苷的含量。结果二苯乙烯苷平均含量为 2.215 mg/g ,*RSD* 为 0.43% ($n = 8$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 B07011)粉末 0.5 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果二苯乙烯苷峰面积的 *RSD* 为 0.40% ($n = 7$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 B09013,含二苯乙烯苷 2.215 mg/g)0.25 g,精密称定,平行 8 份,精密加入 2.2.2 项下二苯乙烯苷稀乙醇溶液 25 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n = 8$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 8$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	<i>RSD</i> (%)
0.2512	0.5564	0.5181	1.0848	101.99		
0.2533	0.5611	0.5181	1.0953	103.12		
0.2523	0.5588	0.5181	1.0877	102.08		
0.2501	0.5540	0.5181	1.0863	102.74	102.88	0.59
0.2534	0.5613	0.5181	1.0971	103.42		
0.2524	0.5591	0.5181	1.0913	102.72		
0.2529	0.5602	0.5181	1.0961	103.44		
0.2532	0.5608	0.5181	1.0973	103.55		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 B07009, B07010, B07011)样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品中二苯乙烯苷含量。结果 3 批样品中二苯乙烯苷的含量分别为 1.83, 1.85, 1.86 mg/g ,均符合规定,且无明显差异。

2.2.5 含量限度确定

康寿丸生产厂家目前有广州白云山敬修堂药业股份有限公司和河南省百泉制药有限公司 2 家。测定 2 家生产厂家各 10 批样品的含量结果发现,二苯乙烯苷的含量介于 1.14 ~ 3.32 mg/g 。参考 2020 年版《中国药典(一部)》,何首乌中二苯乙烯苷不得少于 1.0%,制何首

乌中二苯乙烯苷不得少于 0.70%。结合康寿丸处方中何首乌的用法用量,考虑实际生产损耗下浮 20%,以测定的最低含量值计算得康寿丸中二苯乙烯苷不得少于 0.90 mg/g 。因此,将含量测定限度规定为每 1 g 含何首乌以二苯乙烯苷计不得少于 0.90 mg 。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别条件选择

曾对方中的茯苓、熟地黄和地黄、天冬、麦冬的 TLC 鉴别方法进行了考察,均未发现专属性斑点或阴性对照有干扰,故暂未建立其 TLC 鉴别项。

人参、地骨皮和何首乌的 TLC 鉴别过程中,分别对点样量、点样后的温度和相对湿度进行了考察。鉴别人参时,供试品溶液、对照药材溶液和对照品溶液点样量为 1 μL 时均能检视;鉴别地骨皮时,供试品溶液及对照药材溶液点样量为 4 μL 时较清晰,对照品溶液为 2 μL 时能检视;鉴别何首乌时,供试品溶液和对照品溶液点样量为 2 μL 时斑点明显。改变温度和相对湿度时发现,3 种药材分离效果无显著差异。故最终确定 2.1 项下 TLC 鉴别条件。

3.2 含量测定指标选择

何首乌为康寿丸的君药,具有益精血、强筋骨功效,其主要活性成分为二苯乙烯苷,具有抗衰老、增强机体免疫等药理学作用^[14],这与康寿丸的功能主治密切相关,且 2020 年版《中国药典(一部)》中何首乌药材也以该成分作为含量测定指标。故含量测定指标选择二苯乙烯苷。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法专属性强、重复性好、准确度高,可用于康寿丸的质量控制。暂订每 1 g 康寿丸含何首乌以二苯乙烯苷计不得少于 0.90 mg 。

参考文献

- [1] WS₃-B-2231-96, 中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂(第 11 册)[S].
- [2] 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: 21-22, 114.
- [3] 黄天山, 杨洁瑜, 顾利红. HPLC-ELSD 法同时测定康寿丸人参皂苷 R_g₁、R_e、R_b₁ 的含量[J]. 药品评价, 2020, 17(15): 27-30.
- [4] 梁记芯, 周本宏. 康寿丸质量标准的修订研究[J]. 海峡药学, 2009, 21(9): 52-53.
- [5] 崔业波, 王振远, 马晓静. 人参须药材薄层色谱鉴别法研究[J]. 中国药物评价, 2018, 35(2): 94-97.
- [6] 卢秋梅, 黎倩, 黄艳霞, 等. 益肾化湿颗粒质量标准提高研究[J]. 中国药业, 2020, 29(13): 80-84.
- [7] 马莉, 唐健元, 李祖伦, 等. 薄层扫描法测定胃康胶囊中人参皂苷 R_g₁ 和人参皂苷 R_b₁[J]. 中草药, 2006, 37(5): 705-707.