

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0078-05
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.018



春生丸质量标准提升研究*

宿曼筠, 傅超, 杨晓云, 王友兰, 卢京光[△]

(山东省青岛市食品药品检验研究院·国家药品监督管理局海洋中药质量研究与评价重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:目的 提升春生丸的质量标准。方法 对制剂中的枸杞子、黄芪、黄芩进行显微鉴别;采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的菟丝子、何首乌、淫羊藿进行定性鉴别;采用超高效液相色谱(UPLC)法测定制剂中王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷的含量,色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,检测波长分别为280 nm(黄芩苷)、320 nm(王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷)、360 nm(金丝桃苷),进样量为2 μL。结果 枸杞子、黄芪、黄芩显微特征明显。菟丝子、何首乌、淫羊藿的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷质量浓度分别在0.008~0.032 mg/mL、0.074~0.296 mg/mL、0.015~0.060 mg/mL、0.263~1.054 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.999 0$);精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%;平均加样回收率分别为100.87%, 100.43%, 98.43%, 98.78%, RSD分别为1.66%, 2.44%, 2.08%, 1.49%($n = 6$)。结论 所建方法操作简便,可用于春生丸的质量控制。

关键词:春生丸;质量标准;显微鉴别;薄层色谱法;超高效液相色谱法

Improvement of Quality Standard of Chunsheng Pills

SU Manyun, FU Chao, YANG Xiaoyun, WANG Youlan, LU Jingguang

(Qingdao Research Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Marine Chinese Medicine, Qingdao, Shandong, China 266071)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Chunsheng Pills. **Methods** Lycii Fructus, Astragali Radix and Scutellariae Radix in the preparation were identified by the microscope. Cuscutae Semen, Polygoni Multiflori Radix, Epimedii Folium in the preparation were identified qualitatively by the thin-layer chromatography (TLC) method. The flavonoids in Vaccariae Semen, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, hyperoside and baicalin contents in the preparation were determined by the ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) method; the chromatographic column was the Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, and the detection wavelengths were 280 nm (baicalin), 320 nm (flavonoids in Vaccariae Semen, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside), 360 nm (hyperoside), and the injection volume was 2 μL. **Results** The microscopic characteristics of Lycii Fructus, Astragali Radix and Scutellariae Radix were obvious. The TLC chromatograms of Cuscutae Semen, Polygoni Multiflori Radix, Epimedii Folium had clear spots, good resolution, and there was no interference from the negative reference. The linear ranges of flavonoids in Vaccariae Semen, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, hyperoside and baicalin were 0.008-0.032 mg/mL, 0.074-0.296 mg/mL, 0.015-0.060 mg/mL, 0.263-1.054 mg/mL, respectively ($r > 0.999 0$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of flavonoids in Vaccariae Semen, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, hyperoside and baicalin were 100.87%, 100.43%, 98.43%, 98.78%, with RSDs of 1.66%, 2.44%, 2.08%, 1.49% respectively ($n = 6$). **Conclusion** The established method is easy, which can be used for the quality control of Chunsheng Pills.

Key words: Chunsheng Pills; quality standard; microscopic identification; TLC; UPLC

春生丸由枸杞子^[1]、菟丝子^[2]、淫羊藿^[3]、制何首乌^[4]、黄芩、黄芪、人参、巴戟天^[5]、肉苁蓉^[6]、炒王不留行等19味药材组方,有补肾益气、生精养血、活血化瘀功效,用于男性不育、性功能障碍、下焦湿热的治疗^[7]。春生丸为青岛市京山医院的医院制剂^[8],原质量标准中

仅收录了黄芩的薄层色谱(TLC)鉴别。为了更全面地控制该制剂的质量,本研究中对枸杞子、黄芪、黄芩进行了显微鉴别,对菟丝子、制何首乌、淫羊藿进行了TLC鉴别,并采用超高效液相色谱(UPLC)法测定了王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-

*基金项目:中国药品监管科学行动计划第二批重点项目[NMPAJGKX-2023-061;NMPAJGKX-2023-0062]。

第一作者:宿曼筠,女,硕士,主管药师,研究方向为中药检验及质量标准,(电子信箱)Su_manyun@163.com。

[△]通信作者:卢京光,女,硕士,主任药师,研究方向为药物制剂及质量分析,(电子信箱)lujingguangsy@qd.shandong.cn。

葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290型超高效液相色谱仪(美国Agilent公司); BP211D型电子天平(德国Sartorius公司,精度0.1 mg); AUTO SCIENCE AS10200BT型超声波清洗器(杭州汇尔仪器设备有限公司); ZF7-C型三用紫外分析仪(上海康华生化仪器制造有限公司); BX51型生物显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 试剂

春生丸(实验室自制,批号分别为221202,221203,221204);黄芩苷对照品(批号为110715-202223,含量97.2%)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品(批号为110844-202317,含量97.9%)、金丝桃苷对照品(批号为111521-202310,含量94.7%)、淫羊藿苷对照品(批号为110737-202017,含量98.1%)、王不留行黄酮苷对照品(111853-202205,含量97.1%)、黄芩对照药材(批号为120955-201810)、菟丝子对照药材(批号为121232-202104)、何首乌对照药材(批号为120934-202111),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板、聚酰胺薄膜(青岛海洋化工厂);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取样品1丸,剪碎,置显微镜下观察。可见种皮石细胞表面观呈不规则多角形,壁厚,波状弯曲,层纹清晰(枸杞子)^{[9]260};韧皮纤维淡黄色,梭形,壁厚,孔沟细(黄芩)^{[9]314};纤维成束或散离,壁厚,表面有纵裂纹,两端断裂成须状或较平截(黄芪)^{[9]315}。详见图1。

2.2 TLC鉴别

何首乌:取样品2丸,剪碎,加硅藻土10 g,研匀,加乙醇50 mL,加热回流1 h,滤过,滤液浓缩至3 mL,作为供试品溶液。取2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-

β -D-葡萄糖苷对照品适量,加乙醇制成每1 mL含1 mg的对照品溶液。另取何首乌对照药材0.25 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按春生丸处方和工艺制备缺何首乌的阴性样品,同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取上述溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(7:3.5, V/V)为展开剂,展开3.5 cm,取出,晾干,再以三氯甲烷-甲醇(20:1, V/V)为展开剂,展开至约7 cm,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^{[9]183}。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的位置上显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰(见图2 A)。

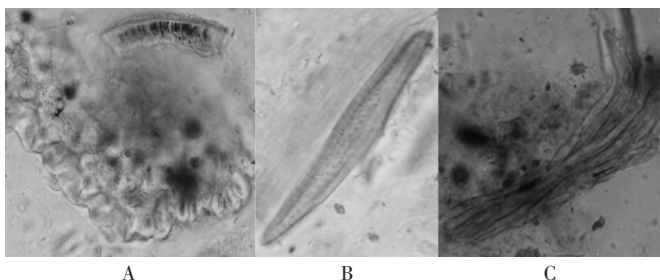
菟丝子:取样品2丸,剪碎,加70%乙醇40 mL,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水10 mL使溶解,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次20 mL,合并乙酸乙酯液,浓缩至2 mL,作为供试品溶液^[10-11]。取金丝桃苷对照品适量,加乙酸乙酯制成每1 mL含1 mg的对照品溶液。另取菟丝子对照药材0.5 g,加乙酸乙酯30 mL,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,滤过,滤液浓缩至2 mL,作为对照药材溶液。按春生丸处方和工艺制备缺菟丝子的阴性样品,同供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。吸取上述溶液各2 μ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以甲醇-冰醋酸-水(5.5:1:3.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液溶液,置紫外光灯(365 nm)下检视^{[9]322}。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱和对照品溶液色谱相应的位置上显相同颜色荧光斑点,且阴性对照无干扰(见图2 B)。

淫羊藿:取样品2丸,剪碎,加硅藻土10 g,研匀,加乙酸乙酯20 mL,超声处理15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的对照品溶液。按春生丸处方和工艺制备缺淫羊藿的阴性样品,同供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。吸取上述溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-水(14:7:3, V/V/V)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,热风吹干,在紫外光灯(365 nm)下检视^{[9]1068, [12]}。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应的位置上,显相同的黄色荧光斑点,且阴性对照无干扰(阴性对照品溶液在与对照品溶液色谱相近位置处仅有绿色斑点,与对照品颜色不一致;见图2 C)。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相:甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液B,梯度

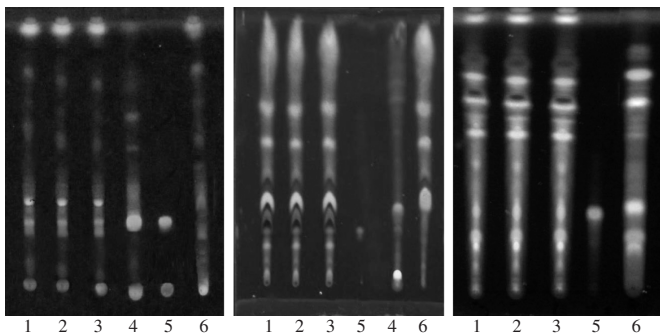


A. 枸杞子 B. 黄芩 C. 黄芪

图1 显微鉴别图($\times 200$)

A. Lycii Fructus B. Scutellariae Radix C. Astragali Radix

Fig. 1 Microscopic identification ($\times 200$)



1 - 3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 对照品溶液
6. 阴性对照品溶液
A. 何首乌 B. 菟丝子 C. 淫羊藿

图2 薄层色谱图

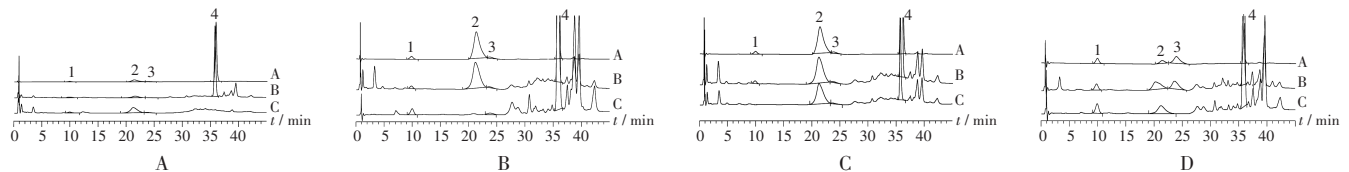
1 - 3. Test solution 4. Reference medicinal herbal solution
5. Reference solution 6. Negative reference solution
A. Polygoni Multiflori Radix B. Cuscutae Semen
C. Epimedii Folium

Fig. 2 TLC chromatograms

洗脱 (0~25 min 时 10%A, 25~40 min 时 10%A→30%A, 40~45 min 时 30%A); 流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 280 nm (黄芩苷), 320 nm (王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷), 360 nm (金丝桃苷); 柱温: 35℃; 进样量: 2 μL。

2.3.2 溶液制备

取4种对照品各适量, 精密称定, 加70%乙醇制成每1 mL含王不留行黄酮苷0.40 mg, 2,3,5,4'-四羟基



1. 王不留行黄酮苷 2. 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 3. 金丝桃苷 4. 黄芩苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 超高效液相色谱图

1. Flavonoids in Vaccariae Semen 2. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside 3. Hyperoside 4. Baicalin
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 3 UPLC chromatograms

表1 线性关系考察结果 (n=6)

Tab. 1 Results of the linear relation test (n=6)

待测成分	回归方程	r	线性范围 (mg/mL)
a	$Y_1 = 10\,572 X_1 + 2.7$	0.999 1	0.008~0.032
b	$Y_2 = 21\,235 X_2 - 99.8$	0.999 2	0.074~0.296
c	$Y_3 = 11\,674 X_3 - 4.3$	0.999 4	0.015~0.060
d	$Y_4 = 24\,293 X_4 - 313.5$	1.000 0	0.263~1.054

注: a为王不留行黄酮苷, b为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, c为金丝桃苷, d为黄芩苷。下同。

Note: a refers to flavonoids in Vaccariae Semen, b refers to 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, c refers to hyperoside, and d refers to baicalin (for Tab. 1-3).

二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 3.80 mg, 金丝桃苷 0.81 mg, 黄芩苷 13.54 mg 的对照品贮备液; 分别精密吸取 1 mL, 至同一 25 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇定容, 即得混合对照品溶液。取样品适量, 剪碎, 取 12 g, 精密称定, 置 250 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再次称定质量, 以 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按春生丸处方和工艺制备缺黄芩、制何首乌、炒王不留行、菟丝子的单一阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备单一阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验: 取 2.3.2 项下 3 种溶液各适量, 按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果理论板数按各色谱峰计应不低于 5 000。阴性对照在与混合对照品溶液色谱峰保留时间相同处无干扰峰, 表明专属性良好。详见图 3。

线性关系考察: 分别精密吸取对照品贮备液 0.5, 0.7, 1.0, 1.3, 1.5, 2.0 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇定容, 制成系列对照品溶液。精密取量适量, 按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度 (X, mg/mL) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程和线性范围。结果见表 1。

精密度试验: 取 2.3.2 项下混合对照品溶液适量, 按 2.3.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。

结果王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷对照品峰面积的 RSD 分别为 0.72%, 0.22%, 0.58%, 0.89% (n=6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取供试品溶液 (批号为 221202) 适量, 分别于室温放置 0, 6, 15, 19, 24 h 时按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.98%, 0.98%, 0.23%, 0.56% (n=5), 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

表2 加样回收试验结果($n = 6$)
Tab. 2 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(%)			
a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0.258	2.813	0.534	8.137	0.250	2.250	0.521	8.100	0.514	5.021	1.065	16.200	102.51	98.15	101.87	99.55								
0.261	2.848	0.541	8.240	0.250	2.250	0.521	8.100	0.511	5.123	1.054	16.390	99.92	101.10	98.45	100.62								
0.269	2.931	0.557	8.479	0.250	2.250	0.521	8.100	0.526	5.223	1.066	16.332	102.90	101.88	97.75	96.95	100.87	100.43	98.43	98.78	1.66	2.44	2.08	1.49
0.266	2.899	0.551	8.386	0.250	2.250	0.521	8.100	0.512	5.163	1.049	16.264	98.47	100.63	95.65	97.25								
0.269	2.938	0.558	8.499	0.250	2.250	0.521	8.100	0.520	5.122	1.066	16.592	100.23	97.07	97.49	99.91								
0.266	2.902	0.551	8.394	0.250	2.250	0.521	8.100	0.519	5.236	1.069	16.364	101.17	103.75	99.39	98.39								

重复性试验:取样品(批号为221202)适量,按2.3.2项下方法制备供试品溶液6份,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.85%,1.01%,0.85%,0.78%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:将已知含量的样品(批号为221202)适量,剪碎,取6g,共6份,精密称定,精密加入一定质量浓度的混合对照品溶液,称定质量,加热回流1h,放冷,再次称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,作为供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果见表2。

2.3.4 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按2.3.2项下方法制备供试品溶液,再按2.3.1项下色谱条件进样,平行测定3次,记录峰面积并计算其含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, $n = 3$)

Tab. 3 Results of content determination of four components in samples (mg/g, $n = 3$)

批号	a	b	c	d
221202	0.042	0.458	0.087	1.325
221203	0.053	0.520	0.103	1.253
221204	0.058	0.587	0.115	1.208

3 讨论

预试验中,菟丝子TLC薄层鉴别时,以药典菟丝子项下供试品制备方法制备,但TLC图分离度较差,而采用乙酸乙酯提取供试品,供试品背景干扰少,斑点清晰,且阴性对照无干扰。淫羊藿TLC薄层鉴别时,以药典淫羊藿项下供试品制备方法制备,供试品干扰严重,但采用药典补白颗粒[鉴别](4)项下方法制备,供试品斑点分离较好,同时用二氯甲烷代替三氯甲烷,并对展开剂的比例稍作调整,该条件下展开效果较好。巴戟天的阴性样品对其TLC鉴别有干扰,且改变展开剂比例无法消除干扰,故未列入质量标准。人参在处方中占比较低,供试品在与人参皂苷相应的位置未能显示出清

晰的斑点,故未列入质量标准中。

本制剂药味较多,因此选择药材含量占比较大或为君药的药材进行研究。菟丝子(金丝桃苷)、淫羊藿(淫羊藿苷)、黄芩(黄芩苷)、何首乌(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷)、王不留行(王不留行黄酮苷)、酒苁蓉(松果菊苷)均符合上述标准,但在预试验中发现淫羊藿苷和松果菊苷阴性样品均有干扰,故未将此2种成分列入质量标准中。由于以上4种成分的最大吸收波长不同,建立了多波长的含量测定方法,所选波长均在最大吸收峰附近,且阴性对照无干扰。供试品溶液制备中,提取溶剂选择了70%乙醇,乙醇,50%乙醇,结果70%乙醇提取供试品的峰面积最大。流动相考察了水-乙腈^[13],0.1%磷酸水溶液-乙腈^[14]、0.2%磷酸水溶液-甲醇,结果选择文中所用流动相时,4种成分的色谱峰峰形和分离度均较好。

根据药典成分规定的限度,转移率以65%计算,王不留行黄酮苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、黄芩苷的限度分别为0.021 mg/g、0.15 mg/g、0.021 mg/g、1.12 mg/g,3批样品均超过,提示上述药味投料情况较好。

综上所述,本研究所建立的方法专属性强,精密度、重复性、回收率好,可用于春生丸的质量控制。

参考文献

- [1] 苏保洲. 枸杞子活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2022, 54(3): 78-81.
- [2] 刘亚芳, 刘毅, 丁婉悦, 等. 菟丝子补肾药理作用研究进展[J]. 宜春学院学报, 2021, 43(9): 22-25.
- [3] 李康梅, 黎明星, 陈浪铸, 等. 淫羊藿对生殖系统影响的研究进展[J]. 西部中医药, 2022, 35(4): 143-146.
- [4] 李建平. 何首乌药理作用研究近况[J]. 中国药业, 2003, 12(10): 74-75.
- [5] 靳 鸽, 冯志海. 补肾温阳药抗骨质疏松症研究进展[J]. 中医临床研究, 2021, 13(30): 97-100.
- [6] 侯 蕾, 王 波, 厉广辉, 等. 肉苁蓉研究进展与产业化现状[J]. 山东农业科学, 2020, 52(12): 133-140.
- [7] 牟汝春. 春生丸治疗肾阳虚型男性不育100例临床分析[J].