

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)07-0069-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.07.014



复方首乌补液质量标准提升研究*

余平, 范晓磊, 李恒, 陆海涛[△]

(湖北省武汉药品医疗器械检验所, 湖北 武汉 430075)

摘要:目的 提升复方首乌补液的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中黄芪、五味子进行定性鉴别; 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-葡萄糖苷的含量, 色谱柱为GL Science Inc ODS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(20:80, V/V), 流速为1.0 mL/min, 柱温为30℃, 检测波长为320 nm, 进样量为10 μL。结果 黄芪、五味子的薄层色谱斑点显色清晰, 且阴性对照无干扰。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的质量浓度在3.428~171.398 μg/mL范围内与峰面积积分值线性关系良好($r=1.0000, n=6$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均低于2.0%; 平均加样回收率为99.70%, RSD为1.06% ($n=18$)。样品中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量为0.208~0.642 mg/mL ($n=9$)。结论 该方法操作简便, 专属性、重复性均良好, 结果准确, 可用于复方首乌补液的质量控制。

关键词: 复方首乌补液; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 黄芪; 五味子; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

Quality Standard Improvement of Compound Shouwu Fluid Infusion

YU Ping, FAN Xiaolei, LI Heng, LU Haitao

(Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan, Hubei, China 430075)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Compound Shouwu Fluid Infusion. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of Astragali Radix and Schisandrae Chinensis Fructus in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for content determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside in the preparation, the chromatographic column was GL Science Inc ODS-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (20:80, V/V), the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 30℃, the detection wavelength was 320 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of Astragali Radix and Schisandrae Chinensis Fructus were clear and the negative control had no interference. The linear range of 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside was 3.428-171.398 μg/mL ($r=1.0000, n=6$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recovery of 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside was 99.70% with an RSD of 1.06% ($n=18$). The content of 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside in the sample was 0.208-0.642 mg/mL ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, specific, reproducible, and accurate, which can be used for the quality control of Compound Shouwu Fluid Infusion.

Key words: Compound Shouwu Fluid Infusion; TLC; HPLC; Astragali Radix; Schisandrae Chinensis Fructus; 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside

复方首乌补液由制何首乌、黄芪、女贞子、五味子等9味药材组方, 具有滋补肝肾、益养气血、健脾和胃功效, 主要用于治疗肝肾亏损、脾胃虚弱、气血不足、头晕目眩等症。其现行标准为《国家卫生部标准: 中药成方制剂(第五册)》^[1], 但仅有鉴别项和检查项, 缺乏含量测定项。方中, 制何首乌为君药, 具有滋补肝肾、益养精血、乌须黑发、强壮筋骨、化浊调脂功效, 其所含二苯乙烯苷类成分具有保肝作用, 可减轻高脂饮食导致的非酒精性脂肪肝引起的肝脏肿大, 缓解肝脏脂肪变性, 还有调节血脂代谢、抗脂质过氧化、减少自由基毒副作用等功效, 从而保护心血管系统^[2-5]; 黄芪具有补气升阳、

固表止汗、利水消肿、生津养血等功效, 有抗肿瘤、保护心血管系统、增强免疫功能、抗衰老等活性^[6-13]; 五味子具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心功效, 有保护脑组织, 增强记忆力, 保护心血管系统、内分泌系统, 保护肝脏等作用^[14-15]。为全面控制复方首乌补液的质量, 本研究中建立了黄芪、五味子的薄层色谱(TLC)鉴别法及测定2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000型HPLC仪[美国Thermo Fisher公司,

*基金项目: 2022年度国家药品标准制修订研究课题[2022Z007]。

第一作者: 余平, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)912487624@qq.com。

[△]通信作者: 陆海涛, 男, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为中药学, (电子信箱)lht.75@163.com。

配有二极管阵列检测器(DAD)];1260型HPLC仪(美国Agilent公司,配有DAD);Xs205Bdu型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);VISUALTZER型TLC照相机(瑞士Camag公司);硅胶G薄层板、硅胶GF₂₅₄薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 试药

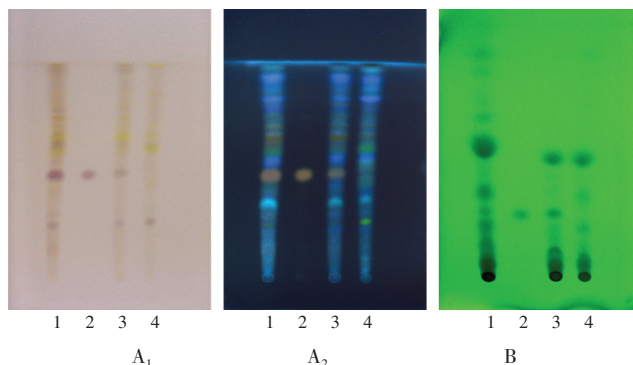
复方首乌补液(A厂家,批号分别为20220603, 20220701, 20220702, 20221002, 20221003, 20221004, 编号为S1-S6;B厂家,批号分别为2206011, 2207012, 2207013, 编号为S7-S9);黄芪甲苷对照品(批号为110781-202219),五味子醇甲对照品(批号为110857-201815),2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品(批号为10844-202116,含量以94.8%计),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

黄芪:取样品(编号为S1,S9)20 mL,加水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次30 mL,合并正丁醇液,加氨试液洗涤2次,每次30 mL,弃氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加水5 mL使溶解,通过D101大孔吸附树脂柱(内径为1.5 cm,柱高为15 cm),加水50 mL洗脱,弃水液,加40%乙醇50 mL洗脱,弃洗脱液,加70%乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液^{[16]1215}。按样品处方与工艺制备缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备缺黄芪的阴性对照品溶液。取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。取上述3种溶液各10 μL,点于同一硅胶G薄层板上,展开剂为三氯甲烷-甲醇-水(7:3:0.5, V/V/V),喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰,分别于日光及365 nm波长紫外光灯下检视。结果供试品溶液色谱中均检出与对照品溶液色谱相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 A₁、图1 A₂。

五味子:取样品(编号为S1,S9)50 mL,置分液漏斗中,加三氯甲烷振摇提取2次,用量分别为50,30 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液^{[16]595}。按样品处方与工艺制备缺五味子的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备缺五味子的阴性对照品溶液。取五味子醇甲对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。分别取对照品溶液5 μL、供试品溶液和阴性对照品溶液各10 μL,点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,展开剂为石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲醇(15:5:0.3, V/V/V),于254 nm波长紫外光灯下检视。结果供试品溶液色谱中均检出与对照品溶液色谱相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 B。



1,3. 供试品溶液(编号分别为S1,S9) 2. 对照品溶液 4. 阴性对照品溶液(分别缺黄芪、五味子)
A₁, A₂. 黄芪(日光、365 nm) B. 五味子(254 nm)

图1 薄层色谱图

1,3. Test solution (numbered S1,S9) 2. Reference solution
4. Negative reference solution (lacking Astragali Radix and Schisandrae Chinensis Fructus respectively)
A₁, A₂. Astragali Radix (fluorescent lamp, 365 nm) B. Schisandrae Chinensis Fructus (254 nm)

Fig. 1 TLC chromatograms

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:GLScience Inc ODS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(20:80, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。理论板数按2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰计应不低于3 000。

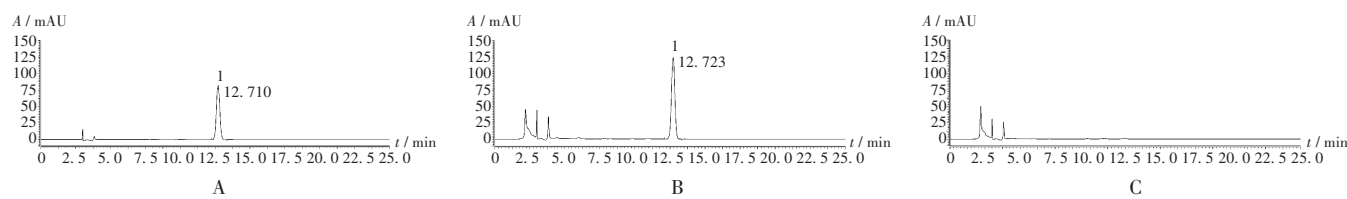
2.2.2 溶液制备

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50%乙醇制成每1 mL含30 μg的溶液,即得对照品溶液。精密量取样品2 mL,置25 mL容量瓶中,加50%乙醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按样品处方与工艺制备缺制何首乌的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2.2项下供试品溶液、对照品溶液、阴性对照品溶液各10 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处检出色谱峰,该色谱峰与其他色谱峰的分度良好,前后无杂峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图2。

线性关系考察: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,精密称定,加50%乙醇制成质量浓度分别为3.428,6.856,17.140,34.280,68.560,171.398 μg/mL的系列对照品溶液,精密吸取上述系列对照品溶液各10 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、



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(编号为S1) C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1,2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside
A. Reference solution B. Test solution (numbered S1) C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.6705X - 0.5978 (r = 1.0000, n = 6)$ 。结果表明,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的质量浓度在3.428 ~ 171.398 μg/mL范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:取对照品溶液(质量浓度为34.280 μg/mL)适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录保留时间和峰面积。结果的RSD分别为0.10%,0.70% (n=6),表明仪器精密度良好。

中间精密度试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,在不同时间采用不同仪器按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果RSD为0.39%,表明中间精密度良好。

重复性试验:取样品(编号为S1)1,2,3 mL,各3份,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,并计算含量。结果的RSD为1.39% (n=9),表明样品取样量在规定取样量的50%~150%范围内时,方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,分别于室温下0,2.5,5.0,9.5,14.5,27.0,53.0,61.0 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果峰面积的RSD为1.58% (n=8),表明供试品溶液室温下放置61.0 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(编号为S1,质量浓度为0.6407 mg/mL)1.0 mL,分别精密加入对照品溶液(质量浓度为0.1247 mg/mL)1.0,5.0,9.0 mL,使其相当于供试品溶液中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量的60%,100%,140%,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,每个质量浓度平行6份,按2.2.1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1,表明方法准确度良好。

2.2.4 样品含量测定

取2个厂家提供的药材,按处方与工艺自制样品,精密吸取9批样品(编号为S1-S9)和自制样品各2.0 mL,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱

表1 加样回收试验结果(n=18)

Tab. 1 Result of the recovery test (n=18)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
0.6407	0.1247	0.7676	101.76		
0.6407	0.1247	0.7647	99.44		
0.6407	0.1247	0.7645	99.28		
0.6407	0.1247	0.7668	101.12		
0.6407	0.1247	0.7678	101.92		
0.6407	0.1247	0.7637	98.64		
0.6407	0.6233	1.2630	99.84		
0.6407	0.6233	1.2633	99.89		
0.6407	0.6233	1.2582	99.07		
0.6407	0.6233	1.2641	100.02	99.70	1.06
0.6407	0.6233	1.2651	100.18		
0.6407	0.6233	1.2658	100.29		
0.6407	1.1220	1.7535	99.18		
0.6407	1.1220	1.7543	99.25		
0.6407	1.1220	1.7419	98.15		
0.6407	1.1220	1.7463	98.54		
0.6407	1.1220	1.7510	98.96		
0.6407	1.1220	1.7533	99.16		

条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量。结果2个厂家的样品中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量差异较大,且自制样品的含量均高于2个厂家的成品。详见表2。

2.2.5 含量限度拟订

由表2可知,厂家A较厂家B的样品含量高,但实验室自制样品的含量均高于2个厂家的成品。分析原因,一方面是实验室小试样品与工业化大生产间的差异;另一方面是原标准无含量测定项,企业可能对原料药材质量、相关工艺控制等环节存在漏洞。因此,应完善该制剂的定量标准,以促进企业关注制何首乌投料药材的质量,控制相关生产环节,以期提高产品质量。本次增修订暂以9批样品含量的平均值作为含量限度,即本品每1 mL含制何首乌以2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(C₂₀H₂₂O₉)计不得少于0.41 mg。

表2 样品含量测定结果(mg/mL)

Tab.2 Results of the content determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside in samples (mg/mL)

生产企业	批号	含量	\bar{X}	生产企业	批号	含量	\bar{X}	
厂家A	20220603	0.642	0.493	厂家B	2206011	0.208*	0.243	
	20220701	0.641			2207012	0.282*		
	20220702	0.514			2207013	0.238*		
	20221002	0.387*		自制样品	厂家A	1.330		1.366
	20221003	0.388*			厂家B	1.401		
	20221004	0.384*						

注:*为不符合拟订含量限度。

Note:* indicates non-compliance with the proposed content limits.

3 讨论

3.1 TLC 鉴别

本研究中考察了复方首乌补液方中黄芪、五味子、白术、党参、甘草的TLC鉴别法,但白术、党参、甘草的阴性样品存在不同程度干扰,未找到合适的TLC鉴别方法,最终仅建立黄芪和五味子的TLC鉴别方法。黄芪和五味子的TLC预试验中,分别考察了不同硅胶G(GF₂₅₄)薄层板[手铺板(化学纯,青岛海洋化工厂),预制板(青岛海洋化工厂),高效板(德国Merck KGaA公司)]及不同温湿度[低温(8℃,58%),高湿(20℃,72%),低湿(20℃,32%)],结果供试品溶液色谱中均检出与对照品溶液色谱相同颜色的斑点,样品斑点均分离良好,且阴性对照无干扰,表明方法专属性及耐用性良好,故最终选择2.1项下TLC条件。另外,筛查了五味子甲素、五味子乙素、五味子醇甲、五味子酯甲4种化学成分,供试品溶液TLC图中检出五味子醇甲的斑点,故对照品选择五味子醇甲。

3.2 含量测定

由于制何首乌主要成分为二苯乙烯苷类和蒽醌类,其中蒽醌类中的大黄素在原标准中已采用TLC法进行定性鉴别,故选择2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷为含量测定指标。分别考察了不同色谱柱[GL Science Inc ODS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Zafex AQ-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Grace Alltima C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)],流动相比例[乙腈-水(20:80, 25:75, 22:78, 18:82, V/V)],柱温(25, 30, 35℃),流速(0.9, 1.0, 1.1 mL/min)对分离效果的影响,记录理论板数或峰面积。结果相对平均偏差小于5%或RSD为0.91%,表明方法专属性、耐受性均良好,采用DAD对2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液进行全波长扫描,结果显示,320 nm为该化合物的最大吸收波长。故最终确定2.2.1项下色谱条件。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便,专属性、重复性均良好,结果准确,可用于复方首乌补液的质量控制。

参考文献

- [1] WS₃-B-0976-91, 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂(第五册)[S].
- [2] LOU ZH, XIA BH, SU J, et al. Effect of a stilbene glycoside-rich extract from *Polygoni Multiflori Radix* on experimental non-alcoholic fatty liver disease based on principal component and orthogonal partial least squares discriminant analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5):4958-4966.
- [3] LI FJ, ZHANG T, HE YR, et al. Inflammation inhibition and gut microbiota regulation by TSG to combat atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 247:112232.
- [4] 陈子卓, 徐宇航, 赵九洲, 等. 二苯乙烯苷抗氧化和抗炎作用的机制研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2020, 32(2):101-111.
- [5] 徐东川, 杨宗统, 苏敏. 何首乌的现代药理作用及机制研究进展[J]. *西安文理学院学报(自然科学版)*, 2022, 25(2):79-83.
- [6] LI SS, SUN Y, HUANG J, et al. Anti-tumor Effects and Mechanisms of *Astragalus Membranaceus* (AM) and its specific immunopotential: Status and Prospect[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258:112797.
- [7] LI WF, SONG KD, WANG SP, et al. Anti-tumor potential of *Astragalus polysaccharides* on breast cancer cell line mediated by macrophage activation[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 98:685-695.
- [8] YANG X, ZHU XX, TANG XY, et al. *Astragalus polysaccharides* meliorate cardiovascular dysfunction in iron-overloaded thalassemic mice[J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2019, 244(14):1202-1209.
- [9] FENG SB, DING HY, LIU LH, et al. *Astragalus polysaccharide* enhances the immune function of RAW264.7 macrophages via the NF-κB/p65/MAPK signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(1):20.
- [10] 唐石欢, 张先平, 彭露, 等. 黄芪多糖对衰老小鼠造血干细胞凋亡的影响[J]. *黑龙江中医药*, 2021, 50(3):448-449.
- [11] 朱嵩岳, 伯乐, 杨光照, 等. 黄芪改善衰老小鼠生殖功能的抗氧化机制研究[J]. *中国药业*, 2020, 29(13):44-47.
- [12] 李柠, 孙志伟, 吕丹, 等. 黄芪注射液治疗成人原发性肾病综合征低蛋白血症的疗效与安全性的Meta分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2022, 23(5):411-416.
- [13] 向璐, 张巧艳, 赵琦明, 等. 黄芪-当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(7):2196-2213.
- [14] 王艳丽, 宁宇, 丁莹, 等. 五味子化学成分、现代药理及临床研究进展[J]. *中医药信息*, 2023, 40(7):82-85.
- [15] 马艳春, 冯天甜, 韩宇博, 等. 五味子的化学成分和药理研究进展[J]. *中医药学报*, 2020, 48(11):67-71.
- [16] 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.

(收稿日期:2024-01-31;修回日期:2024-09-14)