

参芪益气散质量标准的研究

王晓斌¹, 郝素平², 陈欢², 刘洁², 马爱团^{1*}

(1. 河北农业大学动物医学院, 河北保定 071000; 2. 河北省兽药监察所, 河北石家庄 050035)

摘要: 目的 建立参芪益气散(黄芪、党参、陈皮等)的质量标准。方法 TLC法对黄芪和陈皮进行定性鉴别, HPLC法对毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量进行定量测定。结果 TLC斑点分离清晰, 阴性无干扰。毛蕊异黄酮葡萄糖苷在32.1~256.8 μg/mL范围内线性关系良好($R^2=0.9993$), 平均回收率99.86% (RSD=1.84%)。结论 该方法简便, 重复性良好, 可为参芪益气散的质量控制提供科学依据。

关键词: 参芪益气散; 黄芪; 陈皮; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; TLC; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2180-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.017

Quality standard for Shenqi Yiqi Powder

WANG Xiao-bin¹, HAO Su-ping², CHEN Huan², LIU Jie², MA Ai-tuan^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Hebei Provincial Institute of Veterinary Drug Control, Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quality standard for Shenqi Yiqi Powder (a herbal tonic containing *Astragali Membranacei Radix*, *Codonopsis Pilosulae Radix*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, etc.). **METHODS** TLC was adopted in the qualitative identification of *Astragali Membranacei Radix* and *Citri Reticulatae Pericarpium*. HPLC was applied to the quantitative determination of calycosin-7-O-β-D-glucoside content. **RESULTS** The TLC spots were clear and without intervention from negative control. Calycosin-7-O-β-D-glucoside had a good linear relationship within the range of 32.1 – 256.8 μg/mL ($R^2=0.9993$), whose average recovery was 99.86% with the RSD of 1.84%. **CONCLUSION** This simple and reproductive method provides a scientific basis for the quality control of Shenqi Yiqi Powder.

KEY WORDS: Shenqi Yiqi Powder; *Astragali Membranacei Radix*; *Citri Reticulatae Pericarpium*; calycosin-7-O-β-D-glucoside; TLC; HPLC

参芪益气散由黄芪、党参、白术、五味子、麦冬、陈皮、附子、炙甘草组成, 具有补气养血、健脾行气、增强机体免疫力等功效。为了更好地控制临床用药质量标准, 保证用药安全性, 同时为其临床应用提供可靠依据, 本实验通过TLC法对参芪益气散中的黄芪、陈皮进行定性鉴别, 采用HPLC法对方剂中君药黄芪的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量进行定量测定, 该方法简便, 重复性好, 可为该制剂质量标准的建立提供了科学依据。

1 仪器与材料

Waters2695 高效液相色谱仪, 配置 Waters2489 紫外检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线脱气机; AUW120D 电子天平 (十万分之一, 日本岛津公司); HH-ZK2 恒温水浴锅 (上海百申仪器设备有限公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 硅胶 G 板 (青岛海洋化工厂分厂)。甲醇、乙酸乙酯、甲酸均为分析纯; 乙腈、甲醇为色谱纯 (德国 Merck 公司); 水

收稿日期: 2016-01-24

基金项目: 河北农业大学科研发展基金计划项目 (1509012)

作者简介: 王晓斌 (1988—), 女, 硕士生, 从事中药药理研究。Tel: 15933486285, E-mail: wangxiaobin@126.com

* 通信作者: 马爱团 (1968—), 女, 博士, 教授, 从事中药药理研究与应用。Tel: 13472250262, E-mail: maaituan@126.com

为超纯水。

黄芪、陈皮均购自河北省保定康华医药药材有限责任公司，经专家鉴定均达到《中国药典》2010版相关项下要求。黄芪甲苷（批号110781-201314）、橙皮苷（批号110721-201316）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号111920-201505）对照品均购自中国食品药品检定研究院。参芪益气散（200 g/瓶）由某药厂提供。

2 方法与结果

2.1 TLC法定性鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备

2.1.1.1 黄芪 称取参芪益气散10.0 g，加入氯仿-正丁醇混合溶液（2:1）75 mL，水浴回流30 min，冷却至室温，滤过，蒸干，残渣加50 mL 2% 氢氧化钾-甲醇溶液溶解，加热回流1 h，倒入蒸发皿中加热蒸干，残渣加30 mL 蒸馏水溶解，移至分液漏斗中，加入氯仿-正丁醇混合溶液（2:1）50 mL 振摇提取，分取氯仿-正丁醇层，加入50 mL 新配1% 磷酸二氢钾溶液，洗涤，静置，弃去磷酸二氢钾液层，蒸干，残渣加1 mL 甲醇溶解，即得。

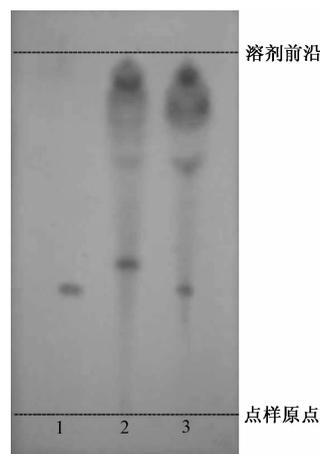
2.1.1.2 陈皮 称取参芪益气散5.0 g，加入石油醚（60~90℃）50 mL，超声（250 W、40 kHz）20 min，过滤，挥干石油醚，加入甲醇60 mL，超声40 min，静置至室温，漏斗过滤，滤液蒸干，残渣加适量水溶解，倒入处理好的D-101大孔树脂柱（内径1~1.5 cm，柱高5~10 cm），蒸馏水洗脱至流出液澄清，依次用100 mL 50% 乙醇和100 mL 75% 乙醇洗脱，收集75% 乙醇洗脱液，倒入蒸发皿内蒸干，残渣加甲醇1 mL 溶解，即得。

2.1.2 阴性溶液的制备 根据参芪益气散的组方比例，制备不含黄芪、陈皮的对照品，按“2.1.1”项下方法制备阴性溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量，加甲醇制成每1 mL 含1 mg 该成分的溶液。再精密量取甲醇1 mL，加入橙皮苷对照品适量至饱和状态，即得。

2.1.4 鉴定方法 按照《中国药典》2010版一部附录薄层色谱法（VIB）^[1]，精密吸取适量供试品、对照品、阴性溶液，点于同一硅胶G薄层板上，展开剂分别为10℃以下放置过夜的氯仿-乙酸乙酯-甲醇-水（10:20:11:5）下层溶液（黄芪）和氯仿-甲醇-水（30:7:1）下层溶液（陈皮）。将已点样的薄层板放入展开缸内展开，取出，晾干，分别喷以10% 硫酸乙醇溶液（黄芪）和5% 三氯化

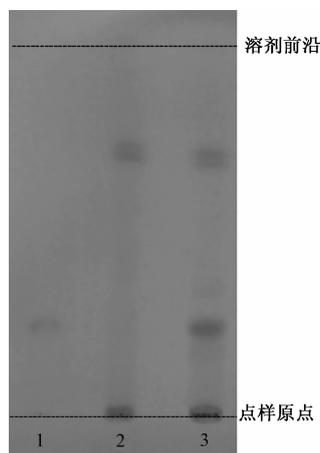
铁乙醇溶液（陈皮），晾干。陈皮在常温下斑点既已显现，而黄芪在110℃下加热后斑点方可显现，日光下检视，结果见图1~2。



1. 黄芪甲苷 2. 阴性样品 3. 参芪益气散
1. astragaloside A 2. negative sample 3. Shenqi Yiqi Powder

图1 黄芪 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram for *Astragali Membranacei Radix*



1. 橙皮苷 2. 阴性样品 3. 参芪益气散
1. hesperidin 2. negative sample 3. Shenqi Yiqi Powder

图2 陈皮 TLC 色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram for *Citri Reticulatae Pericarpium*

2.2 HPLC法定量测定

2.2.1 色谱条件 Waters XTerra-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；柱温25℃；检测波长260 nm；体积流量1.0 mL/min；进样量10 μL；流动相乙腈（A）-0.2% 甲酸（B），梯度洗脱（程序见表1）。

2.2.2 溶液的制备

2.2.2.1 对照品溶液 精密称取一定量毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品，加甲醇制成529.0 μg/mL 贮

备液，4℃冰箱保存。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

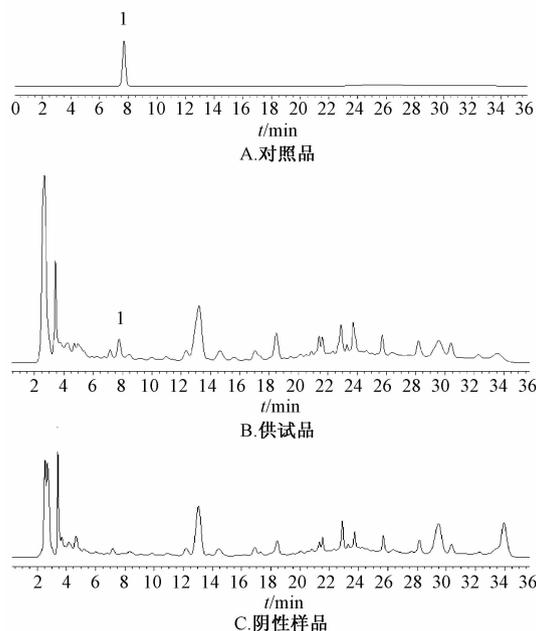
时间/min	A 乙腈/%	B 0.2%甲酸/%
0~20	20~40	80~60
20~30	40	60
30~36	20	80

2.2.2.2 供试品溶液 精密称取参芪益气散（过40目筛）8.0 g，置于圆底烧瓶中，精密加入甲醇50 mL，称定质量，加热回流4 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取滤液25 mL，蒸干，残渣加甲醇溶解，转移至5 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，0.45 μm微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2.2.3 阴性溶液 取不含黄芪的参芪益气散，按相同处方比例制备阴性样品，按“3.1.2.2”项下方法制备阴性溶液。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 系统适应性 在“3.1.1”项色谱条件下进样分析供试品、对照品、阴性溶液，发现制剂中其他成分对待测峰无干扰，保留时间一致，理论塔板数大于3 500，色谱图见图3。



1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷
1. calycosin-7-O-β-D-glucoside

图3 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms

2.2.3.2 线性关系 精密称取对照品贮备液适量，制成每1 mL含256.8 μg对照品的溶液，稀释至2182

32.1、52.9、64.2、128.5、256.8 μg/mL，进样10 μL测定。以对照品溶液质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 34\ 157X - 41\ 413$ ($R^2 = 0.999\ 3$)，表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在32.1~256.8 μg/mL范围内呈良好的线性关系。

2.2.3.3 检测限及定量限 以信噪比(S/N)3:1计，对照品溶液检测限为0.097 μg/mL；以10:1计，其定量限为0.250 μg/mL。

2.2.3.4 精密度的试验 精密量取同一对照品溶液，在“3.1.1”项色谱条件下连续进样5次，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积RSD为2.31%，表明仪器精密度的良好。

2.2.3.5 稳定性考察 精密量取参芪益气散8.0 g，按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液，于0、4、8、12、24、48 h进样6次，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积RSD为1.75%，表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.2.3.6 重复性试验 精密称取同批次参芪益气散6份，每份8 g，按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“3.1.1”项色谱条件下测定，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷含有量RSD为2.92%，表明该方法重复性良好。

2.2.3.7 加样回收率试验 精密称取同批次含有量已知的参芪益气散6份，每份8 g，精密加入对照品溶液(69.0 μg/mL)适量，按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“3.1.1”项色谱条件下进样，计算回收率，结果见表2。

表2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)

称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
8.008 0	0.435 6	0.422 1	0.869 8	102.87		
8.007 9	0.435 6	0.422 1	0.813 6	99.03		
8.007 8	0.435 6	0.422 1	0.779 3	100.38		
8.003 0	0.435 3	0.422 1	0.857 6	100.04	99.86	1.84
8.004 5	0.435 4	0.422 1	0.855 7	99.57		
8.005 9	0.435 5	0.422 1	0.846 0	97.26		

2.2.3.8 含有量测定 取3批参芪益气散，每批3份，按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“3.1.1”项色谱条件下测定含有量，结果见表3。

3 讨论

中药鉴别方法主要是通过眼观、鼻闻、手摸、口尝等手段进行鉴别^[2]，近年来随着新技术的应用和发展，相关方法也随之提高，其中显微^[3]、

表3 含量测定结果 (n=3)

Tab. 3 Results of content determination (n=3)

批号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均值/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
XJ150316	59.89	
XJ150421	77.80	68.94
XJ150520	69.12	

色谱^[4-7]、质谱^[8]及近年来发展的DNA分子鉴别^[9]等技术在中药质量控制上作出了巨大贡献。TLC鉴别黄芪时,以黄芪甲苷^[10-11]为对照品,首先采用《中国药典》方法对单味药进行鉴别,可检出该成分,再对参芪益气散进行鉴别,发现在对照品处的斑点为棕褐色,而供试品在相应位置上为蓝色,并且阴性有干扰,经过多次改进后采用本实验鉴别方法,发现主斑点清晰,分离效果好,阴性对照无干扰,耐用性理想。TLC鉴别陈皮时,以橙皮苷^[12]为对照品,采用《中国药典》方法,发现效果不理想,而本实验方法阴性无干扰,分离效果明显。

参芪益气散的定量测定方法最初是按照《中国药典》检测黄芪中的黄芪甲苷,但样品制备过程复杂繁琐,而毛蕊异黄酮葡萄糖苷在黄芪中的含量较高^[13],为该药材主要成分^[14],而且供试品制备方法简便易行,《中国药典》新增其为黄芪的检测成分^[1],故最终选择测定该成分的含量。

制备供试品溶液时,首先采用《中国药典》方法加热回流4 h。为了简化操作,本实验尝试超声后再加热回流,比较了5、10、15、20、30、40、50、60 min 超声时间,结果发现其对毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量影响不大,故选定超声10 min。再考察了0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6 h 加热回流时间,发现在0.5~3 h 之间含量呈上升趋势,3 h 后变化不大。虽然超声10 min 后再加热回流3 h 时,该成分含量与《中国药典》基本

一致,但由于需要操作2次,故最终选择《中国药典》方法进行提取。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 191, 281-282, 302.

[2] 李海滨, 李春日, 张志星. 中药鉴别方法探析[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(5): 41-42.

[3] 张丽丽, 孙宝惠, 张隶涛, 等. 《中国药典》成方制剂显微鉴别问题规范的商榷[J]. 中成药, 2015, 37(4): 909-912.

[4] 林德晖. 戒瘾解毒胶囊的质量标准研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.

[5] 李桂本, 王海波, 李振国. 知柏地黄胶囊质量标准研究[J]. 中国药品标准, 2015, 16(2): 96-99.

[6] 邢建华, 翟红莉, 罗朝利. 健肾颗粒制备工艺及质量控制的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 653-654.

[7] 潘国庆, 冯学梅, 华青措. HPLC测定藏成药九味青鹏散中没食子酸的含量[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1391-1393.

[8] 李雪, 王倩倩, 徐晨, 等. 中药质谱分析方法及应用研究[J]. 中国科学, 2014, 44(5): 701-709.

[9] 张南平, 张文娟, 魏锋, 等. 中药DNA分子鉴别标准研究方法[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 2066-2070.

[10] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.

[11] 孙安武. 黄芪薄层色谱法探讨[J]. 中国中医药现代远程教育, 2007, 5(8): 40-41.

[12] 李湘平, 李槎樑, 李汶. 薄层色谱法定性鉴别胃可舒片中的陈皮、甘草、木香[J]. 中国医药指南, 2014, 12(10): 51-53.

[13] 姚雪莲, 裴彩云, 王宗权. 不同产地、不同采收期黄芪药材及饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素含量测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 797-805.

[14] 张中华, 郭敏, 杨丽霞, 等. HPLC测定芪卫颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量[J]. 中医研究, 2014, 27(4): 63-65.