

# 芪珠升白口服液多指标成分测定及质量评价<sup>\*</sup>

梁卓菲<sup>1</sup> 丁超<sup>1</sup> 黄文丽<sup>1</sup> 姜祎<sup>1,2</sup> 宋蓓<sup>3</sup>张东东<sup>1</sup> 曹林林<sup>4</sup> 李玉泽<sup>1</sup> 宋小妹<sup>2\*\*</sup>

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046;

3. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712046; 4. 陕西中医药大学制药厂, 陕西 咸阳 712083)

**摘要:**目的 建立芪珠升白口服液质量评价方法, 为制定质量标准提供依据。方法 采用薄层色谱(TLC)法对黄芪、珠子参和当归进行定性鉴别, 采用 Waters e2695 型高效液相色谱仪, 选用 Inertsil ODS-3 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相梯度洗脱, 检测波长为 203 nm 测定方中主要药效成分特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸含量。结果 TLC 斑点分离度好, 阴性无干扰; 特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸质量浓度分别在 0.1708 ~ 1.7080 mg · mL<sup>-1</sup>、0.1000 ~ 1.0000 mg · mL<sup>-1</sup>、0.0856 ~ 0.8560 mg · mL<sup>-1</sup> 和 0.0856 ~ 0.8560 mg · mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好, 相关系数分别为 0.9996、0.9998、0.9998、0.9997, 平均加样回收率分别为 98.26%、95.90%、95.76%、98.09%, RSD 分别为 1.68%、2.78%、1.84%、2.58%。结论 所建立的定性定量方法稳定可行, 重复性好, 可用于芪珠升白口服液质量评价。

**关键词:** 芪珠升白口服液; 多指标成分; 质量评价; 薄层色谱法; 含量测定

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2022)04-0114-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.04.022

芪珠升白口服液是陕西中医药大学附属医院在长期临床实践基础上, 结合民间使用经验, 选用黄芪、女贞子、珠子参、当归、灵芝、甘草制成的一种用于放化疗致白细胞减少的复方中药制剂, 具有升高白细胞、增强机体免疫功能的作用<sup>[1-4]</sup>。目前对其研究主要包括升高白细胞和改善免疫功能等药效学的初步研究<sup>[5]</sup>, 未对其进行定性、定量分析, 难以准确控制其质量。本研究采用薄层色谱法对黄芪、珠子参、当归进行定性鉴别; 采用高效液相色谱(HPLC)法对女贞子中活性成分特女贞苷, 珠子参中活性成分人参皂苷 Ro 和竹节参皂苷 IVa, 甘草中活性成分甘草酸进行定量分析, 并参照 2020 年版《中国药典》(四部)对芪珠升白口服液的相对密度、pH 值等进行测定<sup>[6]</sup>, 以期芪珠升白口服液的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** Waters e2695 型高效液相色谱仪(包括自动进样器, 四元泵, 柱温箱, 2998PDA 检测器); SQ8200HD 型超声波清洗器(上海冠特超声仪

器有限公司); HH-2 型恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); GB204 型电子天平(万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); 远红外辐热炉(米技电子电器上海有限公司)。

**1.2 试药** 黄芪、珠子参、女贞子、当归、灵芝、甘草饮片均购自陕西兴盛德药业有限责任公司, 经检验均符合陕西省中药饮片标准; 特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸铵(批号分别为 HS19515S1、HS19115B2、HS19215B1、HM19115S2, 宝鸡辰光生物科技有限公司, 含量: 98%); 黄芪甲苷(批号: 0781-20008, 中国食品药品检定研究院); 色谱乙腈、磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯); D101 大孔树脂(批号: 170625, 上海蓝季科技发展有限公司); 硅胶 G 板(批号: 20190903, 青岛海洋化工有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

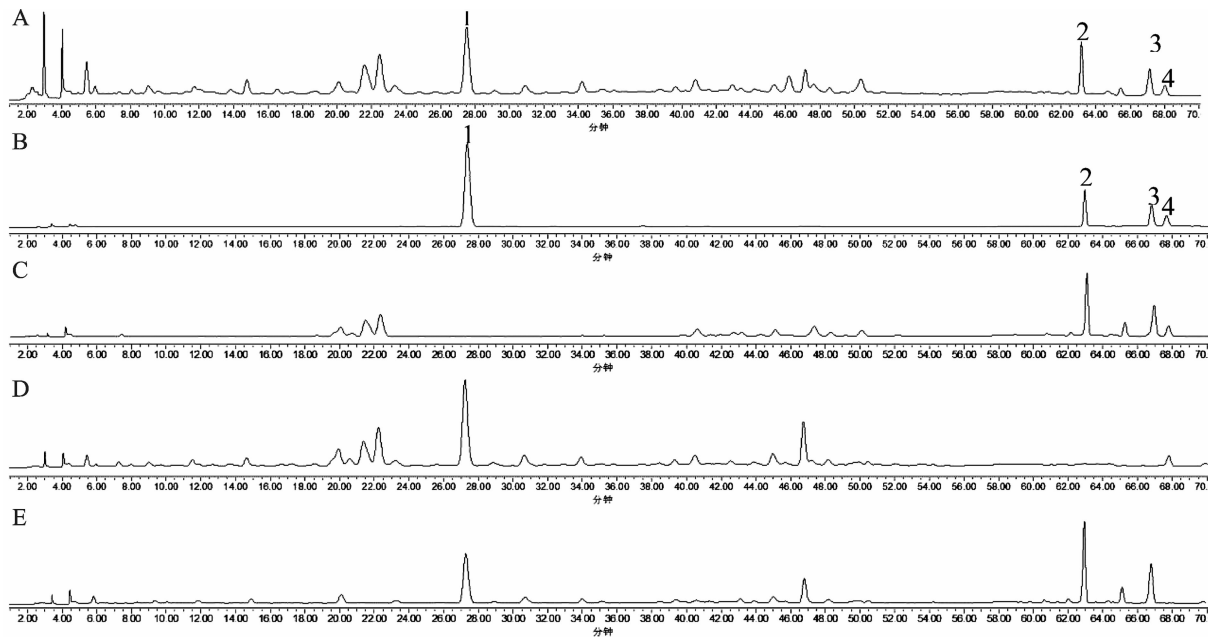
**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.1%

\* 基金项目: 陕西省科技厅项目(2019ZDLSF04-03-02); 陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL12)

\*\* 通讯作者: 宋小妹, 教授。E-mail: songxiaom@126.com

磷酸水(B),洗脱程序(0~25 min,15%~20% A; 25~37 min,20%~25% A;37~52 min,25%~30%;52~55 min,30%~35%,55~60 min,35%~40%;60~70 min,40%~42%);检测波长203 nm;流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量10 μL;柱温30℃。

**2.1.2 混合对照品溶液的制备** 分别取特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸对照品适量,精密称定,置棕色容量瓶中,加甲醇10 mL,制成特女贞苷1.708 mg·mL<sup>-1</sup>、人参皂苷 Ro 1.00 mg·mL<sup>-1</sup>、竹节参皂苷 IVa 0.856 mg·mL<sup>-1</sup>、甘草酸0.856 mg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。(10℃以下保存)。



A. 供试品溶液;B. 对照品溶液;C~E. 女贞子、珠子参、甘草阴性对照溶液;1. 特女贞苷;2. 人参皂苷 Ro;  
3. 竹节参皂苷 IVa;4. 甘草酸铵

图1 HPLC 色谱图

**2.1.6 线性关系考察** 精密吸取“2.1.2”项下制备好的混合对照品溶液2.0 mL、1.5 mL、1.0 mL、0.5 mL、0.2 mL置2 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度。在“2.1.1”项下条件测定峰面积,以对照品质量浓度(X)与峰面积(Y)作标准曲线,得回归方程,结果见表1。

表1 4种指标成分的线性范围考察结果

成分	回归方程	相关系数	线性范围 (mg·mL <sup>-1</sup> )
特女贞苷	$Y=8.403 \times 10^6 X-1.018 \times 10^5$	0.9996	0.1708~1.7080
人参皂苷 Ro	$Y=2.985 \times 10^6 X-1.846 \times 10^4$	0.9998	0.1000~1.0000
竹节参皂苷 IVa	$Y=2.848 \times 10^6 X-2.129 \times 10^4$	0.9998	0.0856~0.8560
甘草酸铵	$Y=1.611 \times 10^6 X-1.708 \times 10^4$	0.9997	0.0856~0.8560

**2.1.7 精密度实验** 精密吸取混合对照品溶液

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取口服液2 mL,通过D101大孔树脂(内径为1.5 cm,柱高为30 cm),依次用2BV水,3BV 20%乙醇,5BV 60%乙醇洗脱,收集60%乙醇洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解于5 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,备用。

**2.1.4 阴性样品溶液的制备** 按处方比例及生产工艺分别制备不含女贞子、珠子参、甘草药材的口服液阴性样品,按“2.1.3”项下方法制备,即得。

**2.1.5 专属性考察** 取供试品溶液、对照品溶液、阴性样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,阴性无干扰。结果见图1。

10 μL,连续重复进样6次,按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积,结果特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.41%、0.58%、0.98%、1.09%。表明该仪器精密度良好。

**2.1.8 重复性实验** 精密移取同一批口服液样品(批号:210301)2 mL,按“2.1.3”项下方法制备,平行6份,精密吸取10 μL,注入液相色谱仪测定,特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸铵平均含量分别为0.704 mg·mL<sup>-1</sup>、0.745 mg·mL<sup>-1</sup>、0.595 mg·mL<sup>-1</sup>、0.432 mg·mL<sup>-1</sup>,RSD分别为1.66%、2.06%、2.02%、1.79%,表明本方法重复性良好。

**2.1.9 稳定性实验** 取口服液(批号:210301),

按“2.1.3”项下方法制备,分别在 0,3,6,9,12 和 24 h 按“2.1.1”项下色谱条件测定,结果特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IV a、甘草酸铵峰面积的 RSD 为 1.44%、1.32%、1.87%、2.01%,表明本品 24 h 内稳定性良好。

2.1.10 加样回收率实验 取重复性试验项下的

样品 1 mL,平行 6 份,精密加入特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IV a、甘草酸铵对照品适量,再按“2.1.3”项下方法制备,测定含量,平均回收率分别为 98.26%、95.90%、95.76%、98.09%,RSD 分别为 1.68%、2.78%、1.84%、2.58%,表明回收率良好。结果见表 2。

表 2 回收率实验结果(n=6)

成分	取样量(mL)	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)
特女贞苷	1.0	0.704	0.854	1.534	97.19	98.26
	1.0	0.704	0.854	1.546	98.59	
	1.0	0.704	0.854	1.528	96.49	
	1.0	0.704	0.854	1.535	97.31	
	1.0	0.704	0.854	1.549	98.95	
	1.0	0.704	0.854	1.567	101.05	
人参皂苷 Ro	1.0	0.745	0.50	1.215	94.00	95.90
	1.0	0.745	0.50	1.240	99.00	
	1.0	0.745	0.50	1.213	93.60	
	1.0	0.745	0.50	1.217	94.40	
	1.0	0.745	0.50	1.243	99.60	
	1.0	0.745	0.50	1.219	94.80	
竹节参皂苷 IV a	1.0	0.595	0.428	0.999	94.39	95.76
	1.0	0.595	0.428	1.011	97.20	
	1.0	0.595	0.428	0.995	93.46	
	1.0	0.595	0.428	1.001	94.86	
	1.0	0.595	0.428	1.009	96.73	
	1.0	0.595	0.428	1.014	97.90	
甘草酸铵	1.0	0.432	0.428	0.847	96.96	98.09
	1.0	0.432	0.428	0.855	98.83	
	1.0	0.432	0.428	0.839	95.09	
	1.0	0.432	0.428	0.845	96.50	
	1.0	0.432	0.428	0.855	98.83	
	1.0	0.432	0.428	0.870	102.34	

2.1.11 耐用性实验 本实验考察了 Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)和 ThermoBDS Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm,4.6 mm×150 mm),各组均能够达到较理想分离度,该方法耐用性良好。

2.1.12 样品含量测定 取 8 批口服液,按“2.1.3”项下方法制备,按“2.1.1”项下条件测定。结果见表 3。计算 8 批样品中特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IV a、甘草酸铵的平均含量分别为 0.683 mg·mL<sup>-1</sup>、0.718 mg·mL<sup>-1</sup>、0.605 mg·mL<sup>-1</sup>、0.540 mg·mL<sup>-1</sup>。

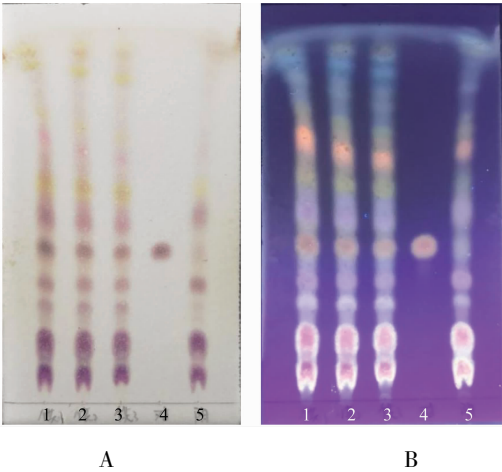
2.2 TLC 法定性鉴别

2.2.1 黄芪 TLC 鉴别 参照文献<sup>[7]</sup>和 2020 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法<sup>[8]</sup>,取口服液 20 mL,加水饱和正丁醇萃取 2 次,每次 20 mL,弃去下层水液,合并 2 次正丁醇液,再以氨试液洗

涤 2 次,每次 20 mL,弃去下层氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 溶解后,制成供试品溶液;按照处方比例取 5 g,相同口服液制备工艺制成缺黄芪的样品,同法制成阴性对照溶液;另取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。吸取上述三种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(15:7:2)10℃以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105℃加热至斑点显色清晰,分别在日光和紫外光(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,日光下显相同棕褐色斑点;紫外光下显相同颜色的橙黄色荧光斑点。结果见图 2。阴性无干扰,斑点分离较好。

表3 含量测定结果( $n=2$ )

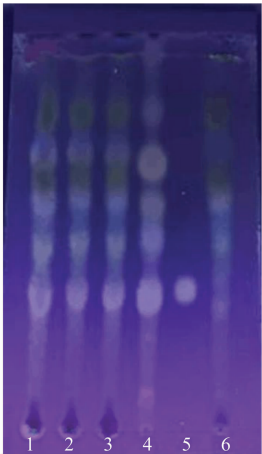
批号	特女贞苷 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	人参皂苷 Ro ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	竹节参皂苷 IVa ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	甘草酸铵 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
210301	0.703	0.745	0.597	0.435
210401	0.665	0.695	0.626	0.615
210501	0.677	0.699	0.594	0.528
210601	0.610	0.607	0.511	0.472
210701	0.774	0.846	0.693	0.583
210801	0.674	0.709	0.609	0.579
210901	0.686	0.740	0.615	0.569
211001	0.672	0.704	0.595	0.537



1~3. 供试品溶液;4. 黄芪甲苷;5. 阴性对照溶液

图2 黄芪 TLC 图(A 为日光、B 为紫外光)

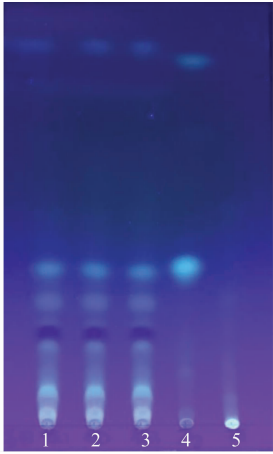
**2.2.2 珠子参 TLC 鉴别** 参照文献<sup>[9]</sup>和 2020 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法<sup>[8]</sup>,取口服液 5 mL,用水饱和正丁醇振摇提取 3 次,每次 15 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 5 mL 加热使溶解,作为供试品溶液;按照处方比例取 5 g,相同口服液制备工艺制成缺珠子参的样品,同法制成阴性对照溶液;对照药材 1 g,加水 30 mL 回流 1 h,滤过,滤液浓缩至 10 mL 同法制成对照药材溶液;另取人参皂苷 Ro 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的对照品溶液。吸取上述四种溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-甲醇-甲酸-水(15:10:0.5:0.3:2)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105  $^{\circ}\text{C}$  加热至斑点显色清晰,在紫外光(365 nm)下检视。结果见图 3。在与对照品色谱相应的位置上,紫外光下显相同颜色的荧光斑点,阴性无干扰,斑点分离较好。



1~3. 供试品溶液;4. 对照药材溶液;  
5. 人参皂苷 Ro;6. 阴性对照溶液

图3 珠子参 TLC 图

**2.2.3 当归 TLC 鉴别** 参照 2020 年版《中国药典》一部当归项下薄层色谱鉴别<sup>[10]</sup>和 2020 年版《中国药典》四部通则 0502 薄层色谱法<sup>[8]</sup>,取口服液 10 mL,用乙醚振摇提取两次,每次 20 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;按照处方比例取 5 g,相同口服液制备工艺制成缺当归的样品,同法制成阴性对照溶液;取当归对照药材 1 g,加水 30 mL 加热回流 1 h,滤过,滤液浓缩至 10 mL 同法制成对照药材溶液。吸取上述三种溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在紫外光(365 nm)下检视。结果见图 4。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,紫外光下显相同颜色的荧光斑点且阴性无干扰。



1~3. 供试品溶液;4. 对照药材溶液;  
5. 阴性对照溶液

图4 当归 TLC 图

2.3 检查

2.3.1 相对密度 照相对密度测定法(《中国药典》2020 版四部 0601)对 3 批样品进行测定。结果见表 4。

表 4 相对密度测定结果(n=3)

批号	210301	210401	210501
相对密度	1.09±0.23	1.09±0.12	1.10±0.10

2.3.2 pH 值 照 pH 值测定法(中国药典 2020 版四部 0631)对 3 批样品测定。结果见表 5。

表 5 pH 值结果(n=3)

批号	210301	210401	210501
pH 值	5.05±0.07	4.82±0.10	4.96±0.06

3 讨论

分别对芪珠升白口服液中黄芪、珠子参、当归进行薄层鉴别,黄芪参照文献<sup>[7]</sup>与 2020 年版《中国药典》(一部)确定采用正丁醇萃取后氨试液洗涤的方法鉴别黄芪甲苷,所得图谱斑点清晰分离度较好。珠子参与当归处理方法同 2020 年版《中国药典》(一部)所收录的方法,并对当归展开条件优化为正己烷-乙酸乙酯(2:1)使比移值适中,斑点清晰。

方中女贞子、珠子参、甘草在方中作为补益药,据报道其均具有免疫调节或升高白细胞的作用<sup>[11-13]</sup>,根据 2020 年版《中国药典》对特女贞苷、人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa、甘草酸铵进行定量分析<sup>[14]</sup>,分别考察不同流动相甲醇-水,乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水与乙腈-0.1% 磷酸水,最终选取乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱后图谱基线平稳,分离度较好。本方为含 6 味药材的水煎液,成分复杂且极性偏大,分别采用 50% 甲醇和稀乙醇稀释、正丁醇萃取、大孔树脂洗脱收集的样品处理方法,结果表明直接稀释与液液萃取的方法虽简单,可操作性好但样品杂质过多影响较大,目标成分与杂质峰较难达到有效分离,根据文献<sup>[15-20]</sup>与目标成分特点选择 D101 大孔树脂进行提取,经预实验确定以 2BV 水,3BV 20% 乙醇,5BV 60% 乙醇 2BV·h<sup>-1</sup>洗脱后收集 60% 乙醇洗脱液,此时供试品溶液提取充分且无干扰,重复性,稳定性与回收率均良好。本实验建立的薄层鉴别和含量测定方法可用于芪珠升白口服液的质量评价与控制,也可为含有本方药材的复方制剂含量测定提取方法提供参考。

参考文献

[1] 王文越,刘珊,吕琴,等. 黄芪-当归药对益气活血药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(6): 207-216.

[2] 刘婵婵,杨薪正,钱卫东,等. 中药女贞子的化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2021,33(2):37-39.

[3] 刘芳,张红,谢人明. 珠子参对环磷酰胺所致小鼠白细胞减少的影响[J]. 现代中医药,2015,35(5):164-168.

[4] 王钧楠,周永峰,崔园园,等. 甘草增强免疫的物质基础及其作用机制研究进展[J]. 中草药,2021,52(6): 1844-1850.

[5] 郭琳,张旋,范少敏,等. 芪珠升白口服液药效学研究[J]. 陕西中医,2012,33(12):1683-1685.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2020:26.

[7] 王艺璇,李海涛,刘顺,等. 参葵通脉颗粒的质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(8):984-989.

[9] 宋小妹,房方,蔡皓,等. 珠子参饮片质量标准研究[J]. 中成药,2010,32(5):800-803.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:139.

[11] 刘美红,李帅岚,张莲,等. 女贞属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药,2020,51(12): 3337-3348.

[12] 张红. 珠子参促进造血活性及其多糖分析研究[D]. 西安:西北大学,2015.

[13] 王钧楠,周永峰,崔园园,等. 甘草增强免疫的物质基础及其作用机制研究进展[J]. 中草药,2021,52(6): 1844-1850.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[15] 王薇,宋小妹,康亚国,等. 大孔吸附树脂富集纯化珠子参总皂苷的工艺研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(4):713-715.

[16] 沈燧,马利,张巧艳,等. 女贞子环烯醚萜总苷纯化工艺的优化[J]. 中成药,2018,40(6):1403-1406.

[17] 胡迎丽,夏璐,雷福厚. 大孔吸附树脂在天然产物的分离纯化中的应用进展[J]. 化工技术与开发,2021,50(11):29-34.

[18] 张玲忠,张贵华,段维杰. 大孔吸附树脂在中药活性成分分离纯化中的应用[J]. 中国民族民间医药,2019,28(14):51-56.

[19] 申美伦,梁业飞,刘广欣,等. 甘草黄酮提取分离方法的研究进展[J]. 中成药,2021,43(1):154-159.

[20] 彭依晴,刘爽,康泽鹏,等. 柴胡皂苷提取工艺及其含量测定研究[J]. 化学试剂,2021,43(12):1677-1682.

(修回日期:2022-03-15 编辑:崔春利)