中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)17－0087－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.17.020

补肺防感合剂质量标准提升研究

徐　江[1]，姚　晓[2]，李均艳[1]，刘　辉[1]，徐方铭[1]，何一琴[1△]

（1. 江苏省常州市武进中医医院，江苏 常州　213161；2. 江苏省常州市食品药品纤维质量监督检验中心，江苏 常州　213022）

摘要：目的　建立补肺防感合剂的质量标准。**方法**　采用薄层色谱法对制剂中的黄芪、甘草、陈皮进行定性鉴别；采用高效液相色谱法测定黄芪甲苷含量，色谱柱为 Waters Xbridge C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈－水（32∶68，*V*/*V*），流速为 1.0 mL/min，柱温为 35 ℃，检测器为蒸发光散射检测器，进样量为 20 μL（供试品溶液、阴性对照品溶液）和 10 μL（对照品溶液）。**结果**　薄层色谱图中，黄芪、甘草、陈皮的特征斑点显色清晰，分离度好，且阴性对照无干扰。黄芪甲苷的进样量在 0.584 3～5.842 8 μg 范围内与峰面积线性关系良好（r=0.999 7，n=7）；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2%；平均回收率为 92.68%，*RSD* 为 5.13%（n=6）。3 批样品中黄芪甲苷的平均含量分别为 44.22，42.31，41.01 μg/mL（n=4）。**结论**　所建立的方法操作简便、结果准确、重复性好，可用于补肺防感合剂的质量控制。暂订补肺防感合剂中每 1 mL 以黄芪甲苷计不得低于 29.76 μg。

关键词：补肺防感合剂；薄层色谱法；高效液相色谱法；黄芪甲苷

Improvement of Quality Standard of Bufei Fanggan Mixture

XU Jiang[1], YAO Xiao[2], LI Junyan[1], LIU Hui[1], XU Fangming[1], HE Yiqin[1]

(1. Changzhou Wujin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changzhou, Jiangsu, China 213161; 2. Changzhou Institute for Food, Drug and Fiber Control, Changzhou, Jiangsu, China 213022)

Abstract: Objective　To establish the quality standard of Bufei Fanggan Mixture. **Methods**　Thin－layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, and Citri Reticulatae Pericarpium in the preparation. High－performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of astragaloside Ⅳ. The chromatographic column was Waters Xbridge C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile－water (32∶68, *V*/*V*), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 ℃, the evaporative light scattering detector was adopted, the injection volume was 20 μL (test solution, negative reference solution) and 10 μL (reference solution). **Results**　In the TLC chromatograms, the characteristic spots of Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, and Citri Reticulatae Pericarpium showed clear color, good separation, and had no interference from the negative control. The linear range of astragaloside Ⅳ was 0.584 3－5.842 8 μg (r=0.999 7, n=7). The *RSD*s of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2%. The average recovery of astragaloside Ⅳ was 92.68% with an *RSD* of 5.13% (n=6). The average contents of astragaloside Ⅳ in the three batches of samples were 44.22, 42.31, and 41.01 μg/mL (n=4), respectively. **Conclusion**　The established method is simple, accurate, and has good reproducibility, which can be used for quality control of Bufei Fanggan Mixture. The content of astragaloside Ⅳ in every 1 mL of Bufei Fanggan Mixture should not be lower than 29.76 μg.

Key words: Bufei Fanggan Mixture; TLC; HPLC; astragaloside Ⅳ

补肺防感合剂为江苏省常州市武进中医医院的医院制剂，由黄芪、桂枝、茯苓、陈皮、甘草、太子参、龙骨、

第一作者：徐江，男，大学本科，药师，研究方向为药物分析与临床药学，（电子信箱）1401260822@qq.com。

△**通信作者：**何一琴，女，大学本科，主管药师，研究方向为药物分析与临床药学，（电子信箱）295530479@qq.com。

[9] 宋瑞雯，张丽萍. 温胆汤及其类方治疗情志病作用机制研究进展[J]. 山西中医学院学报，2016，17(1)：77－79.

[10] 梁诗敏，范靖琪，刘　鑫，等. 庄礼兴教授运用温胆汤从“痰”论治中风病的经验[J]. 天津中医药，2022，39(1)：15－18.

[11] 郭　冰，唐思琴，毛以林. 毛以林运用温胆汤化裁治疗心系疾病验案 4 则[J]. 山西中医，2021，37(12)：36－37.

[12] 程　掌，王　丹，何钰珺，等. 谢道俊运用温胆汤加减治疗脑病的经验[J]. 中医药临床杂志，2021，33(11)：2120－2123.

[13] 范靖琪，梁诗敏，庄礼兴. 庄礼兴基于“痰热”病机运用温胆汤经验举隅[J]. 广州中医药大学学报，2021，38(9)：1994－1998.

[14] 刘城鑫，张妙芬，谢铱子，等. 刘小虹运用温胆汤加减治疗肺系疾病验案举隅[J]. 辽宁中医杂志，2021，48(7)：45－47.

[15] 郑晓辉，时　乐，单兆伟. 单兆伟运用温胆汤经验[J]. 中国民间疗法，2021，29(12)：36－38.

[16] 魏　培，曹春泉，朱瑞娟，等. 高效液相色谱指纹图谱法结合化学模式识别评价脑安胶囊整体质量[J]. 中国药业，2023，32(3)：67－72.

（收稿日期：2023－07－26；修回日期：2024－01－08）

牡蛎8味中药材组方，有补肺益气、调节免疫、预防感冒等作用[1-8]，临床应用效果良好。方中，黄芪为君药，药用部位为豆科蒙古黄芪*Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Bge.)Hsiao或膜荚黄芪*Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.的干燥根[9]，能补气升阳、固表止汗、利水消肿。黄芪主要含有多糖类、皂苷类和黄酮类成分[10]，具有提高免疫力、抗炎、抗氧化、调节免疫、保护心肌等作用[11]。补肺防感合剂的原质量标准中仅以紫外-可见分光光度法鉴别黄芪甲苷，无法控制制剂的质量。为此，本研究中提升了补肺防感合剂的质量标准，采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的黄芪、甘草、陈皮进行定性鉴别，采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄芪甲苷[12]的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪、Waters 2424型蒸发光散射检测器(美国Waters公司)；KQ5200型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司，功率为200 W，频率为40 kHz)；XPR204/A型电子分析天平(精度为0.1 mg)，XP105DR型电子分析天平(精度为0.01 mg)，均购于梅特勒-托利多国际仪器有限公司；HH-4型电热恒温水浴锅(常州市凯航仪器有限公司)；中性氧化铝(100~200目，国药集团化学试剂有限公司，批号为20220523)；硅胶G薄层板(德国Merck公司)。

1.2 试药

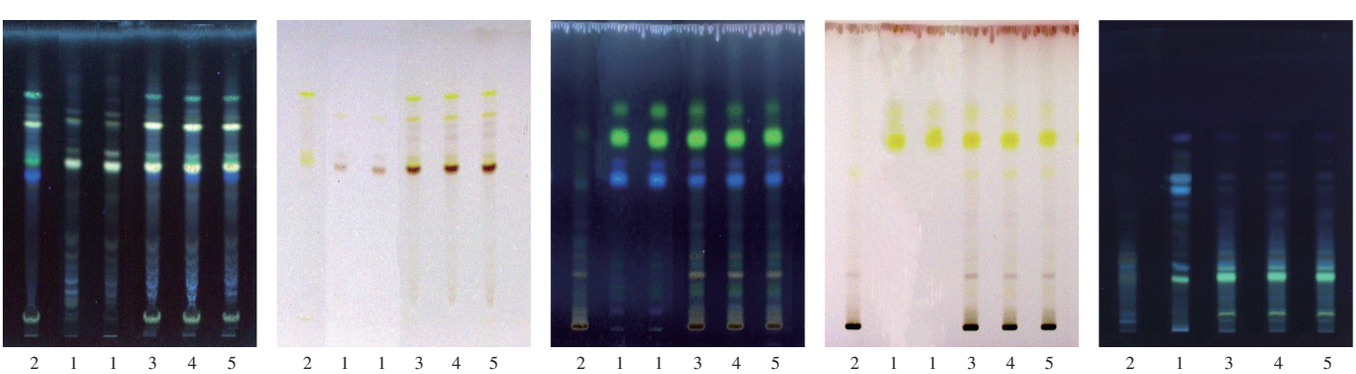
补肺防感合剂(医院制剂，批号分别为20220101，20220102，20220103)；黄芪甲苷对照品(批号为110781-202118，含量为96.8%)，蒙古黄芪对照药材(批号为120974-201813)，膜荚黄芪对照药材(批号为121462-201705)，陈皮对照药材(批号为120969-202011)，甘草对照药材(批号为120904-202021)，胀果甘草对照药材(批号为121303-201704)，均购于中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈(色谱纯，德国Merck公司)；水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

黄芪：取样品40 mL，加乙醚振摇提取2次，每次30 mL，水层加水饱和正丁醇振摇提取2次，每次40 mL，合并正丁醇液，加氨试液洗涤2次，每次40 mL，正丁醇液蒸干，残渣加10 mL乙醇使溶解，置中性氧化铝柱(100~200目，5 g，内径10 mm，乙醇湿法装柱)上，加40 mL乙醇洗脱，弃洗脱液，用40%甲醇溶液100 mL洗脱并收集，回收溶剂至干，残渣加2 mL甲醇使溶解，作为供试品溶液。按处方及工艺制备缺黄芪的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。另取蒙古黄芪、膜荚黄芪对照药材各1 g，加水30 mL，煎煮30 min，放冷，滤过，滤液浓缩至10 mL，按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验，吸取上述供试品溶液、阴性对照品溶液各4 μL及对照药材溶液2 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水(13∶7∶2，*V*/*V*/*V*)于10 ℃放置的下层溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷10%硫酸乙醇溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，置日光及紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中，在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰。详见图1 A和图1 B。

甘草：取样品50 mL，加乙醚振摇提取2次，每次30 mL，水层加水饱和正丁醇振摇提取2次，每次40 mL，



1. 对照药材溶液 2. 阴性对照品溶液 3-5. 供试品溶液(批号分别为20220101，20220102，20220103)
A. 黄芪(365 nm) B. 黄芪(日光) C. 甘草(365 nm) D. 甘草(日光) E. 陈皮(365 nm)

图1 薄层色谱图

1. Reference medicinal solution 2. Negative reference solution 3-5. Test solution (batch numbers: 20220101, 20220102, 20220103)
A. Astragali Radix(365 nm) B. Astragali Radix (sunlight) C. Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (365 nm) D. Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (sunlight)
E. Citri Reticulatae Pericarpium (365 nm)

Fig. 1 TLC chromatograms

合并正丁醇层，加氨试液洗涤 2 次，每次 40 mL，正丁醇液蒸干，残渣加 10 mL 乙醇使溶解，加中性氧化铝适量，搅匀，水浴蒸干，置中性氧化铝柱（100 ~ 200 目，10 g，内径 10 mm，70% 乙醇湿法装柱）上，加 70% 乙醇溶液 20 mL 洗脱，弃洗脱液，用水 30 mL 洗脱并收集，回收溶剂至干，残渣加 1 ~ 2 mL 甲醇使溶解，作为供试品溶液。按处方及工艺制备缺甘草的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。另取甘草、胀果甘草对照药材各 1 g，加水 100 mL，煎煮 30 min，放冷，滤过，滤液浓缩至 20 mL，用水饱和正丁醇振摇提取 2 次，按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按 2020 年版《中国药典（四部）》通则 0502　TLC 法试验，吸取上述供试品溶液、阴性对照品溶液 4 ~ 10 μL 及对照药材溶液 1 ~ 2 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯 - 甲酸 - 冰醋酸 - 水（15∶1∶1∶2，*V* / *V* / *V* / *V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷 10% 硫酸乙醇溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，置日光及紫外光灯（365 nm）下检视。供试品溶液色谱中，在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰。详见图 1 C 和图 1 D。

陈皮：取样品 20 mL，加乙醚振摇提取 2 次，每次 20 mL，水层加乙酸乙酯振摇提取 2 次，每次 30 mL，合并乙酸乙酯层，挥干，残渣加 2 mL 甲醇使溶解，作为供试品溶液。按处方及工艺制备缺陈皮的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。另取陈皮对照药材 0. 5 g，加甲醇 5 mL，超声处理 5 min，滤过，取滤液，作为对照药材溶液。按 2020 年版《中国药典（四部）》通则 0502 TLC 法试验，吸取上述供试品溶液、阴性对照品溶液各 4 μL 及对照药材溶液 2 μL，分别点于用 0. 5% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯 - 甲醇 - 水（100∶17∶13，*V* / *V* / *V*）为展开剂，展开至约 5 cm，取出，晾干，再以甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸 - 水（20∶10∶1∶1，*V* / *V* / *V* / *V*）的上层溶液为展开剂，展开至约 10 cm，取出，晾干，喷三氯化铝试液，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 1 E。

2. 2　HPLC 法测定黄芪甲苷含量

2. 2. 1　色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Waters Xbridge C_{18} 柱（250 mm × 4. 6 mm，5 μm）；流动相：乙腈 - 水（32∶68，*V* / *V*）；流速：1. 0 mL / min；柱温：35 ℃；检测器：蒸发光散射检测器；进样量：20 μL（供试品溶液、阴性对照品溶液），10 μL（对照品溶液）。理论板数按黄芪甲苷峰计为 28 272。

2. 2. 2　溶液制备

对照品溶液：取黄芪甲苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 0. 2 mg 的溶液，即得。

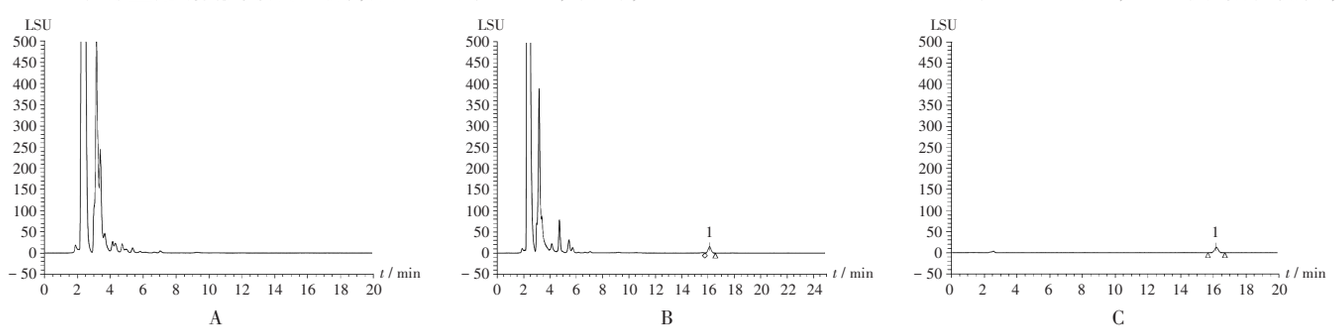
供试品溶液：精密量取样品 25 mL，用水饱和的正丁醇充分振摇提取 4 次，每次 25 mL，合并正丁醇液，加氨试液充分洗涤 2 次，每次 40 mL，弃洗液，蒸干正丁醇液，残渣加甲醇使溶解，转移至 10 mL 容量瓶中，加甲醇定容，振荡摇匀，滤过，取续滤液，即得。

阴性对照品溶液：精密量取缺黄芪的阴性样品 25 mL，按供试品溶液制备方法制备，即得。

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、阴性对照品溶液各 20 μL 及对照品溶液 10 μL，按 2. 2. 1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相同保留时间（16. 17 min）处有相应色谱峰出现，且阴性对照无干扰。详见图 2。

线性关系考察：取黄芪甲苷对照品 20. 12 mg，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并定容，作为对照品溶液。分别吸取 3，5，10，15，20，25，30 μL，按 2. 2. 1 项下色谱条件进样测定，以黄芪甲苷进样量（*X*，μg）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 *Y* = 226 338 *X* - 189 489（*r* = 0. 999 7，*n* = 7）。结果表明，



1. 黄芪甲苷

A. 阴性对照品溶液　B. 供试品溶液　C. 对照品溶液

图 2　高效液相色谱图

1. Astragaloside Ⅳ

A. Negative reference solution　B. Test solution　C. Reference solution

Fig. 2　HPLC chromatograms

黄芪甲苷的进样量在0.584 3～5.842 8 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：精密吸取2.2.2项下对照品溶液适量，按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果黄芪甲苷保留时间的*RSD*为0.28%（$n=6$），峰面积的*RSD*为0.74%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：精密吸取供试品溶液（批号为20220101）适量，分别于室温下放置0，1，2，4，6，8，12，16，20，24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液中黄芪甲苷含量的*RSD*为1.04%（$n=10$），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验：取样品（批号为20220101）6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2次。结果黄芪甲苷含量的*RSD*为1.96%（$n=12$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：精密量取已知含量的样品（质量浓度为44.22 μg/mL）13 mL，共6份，分别置分液漏斗中，精密加入黄芪甲苷对照品溶液（质量浓度为197.472 μg/mL）2.5 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，并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 1 Results of the recovery test（$n=6$）

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\overline{X}$(%)	*RSD*(%)
574.86	493.68	1 012.71	88.69	92.68	5.13
574.86	493.68	1 060.60	98.39		
574.86	493.68	1 015.76	89.31		
574.86	493.68	1 023.67	90.91		
574.86	493.68	1 017.57	89.68		
574.86	493.68	1 064.05	99.09		

2.2.4 样品含量测定

取3批样品，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4次，计算黄芪甲苷的含量（见表2）。结果3批样品中黄芪甲苷含量的*RSD*分别为2.37%，1.23%，1.52%（$n=4$）；平均含量为42.51 μg/mL，考虑药材种源、产地、炮制方法等因素，以平均含量的70%作为含量限度标准，暂订补肺防感合剂中每1 mL以黄芪甲苷计不得低于29.76 μg。

表2 样品中黄芪甲苷含量测定结果（μg/mL）

Tab. 2 Results of the content determination of astragaloside Ⅳ in samples（μg / mL）

批号	1	2	3	4	$\overline{X}$
20220101	44.99	42.79	44.07	45.01	44.22
20220102	42.18	41.64	42.58	42.83	42.31
20220103	40.75	40.26	41.62	41.40	41.01

3 讨论

3.1 TLC鉴别

参考2020年版《中国药典（一部）》及文献[13－17]，预试验中考察了黄芪、甘草、陈皮、桂枝、太子参、茯苓的TLC鉴别。其中，桂枝考察了以乙醚振摇萃取，以不同比例的石油醚（30～60 ℃）－正己烷－甲酸乙酯－甲酸为展开剂，置紫外光灯（254 nm）下检视；太子参考察了以乙醚提取，以不同比例环己烷－乙酸乙酯为展开剂，以5%硫酸乙醇溶液为显色剂，105 ℃加热的方式显色；茯苓考察了以乙醇提取，以不同比例石油醚（60～90 ℃）－乙酸乙酯为展开剂，置紫外光灯（365 nm）下检视。结果显示，桂枝、太子参、茯苓的特征斑点与阴性样品的区别不明显，无法满足TLC鉴别要求。故最终选择黄芪、陈皮、甘草3种中药材进行TLC鉴别。

黄芪的TLC鉴别中，过柱提取方法参考了2015年版《中国药典（一部）》，后续试验中对比了补肺防感合剂中黄芪提取方法制备的供试品溶液、阴性对照品溶液2，4，6 μL及对照药材溶液1，2，4 μL 3个水平的点样量。结果显示，当供试品溶液、阴性对照品溶液点样量为4 μL及对照药材溶液点样量为2 μL时，特征斑点显色清晰，比移值适中，且无拖尾，故选择供试品溶液、阴性对照品溶液的点样量为4 μL及对照药材溶液的点样量为2 μL。蒙古黄芪、膜荚黄芪的TLC图几乎一致，提示对照药材可选择任意1种。

甘草的TLC鉴别中，考察了未过中性氧化铝柱的提取方法[18]，但阴性对照有干扰，且主斑点分离度差，无法体现补肺防感合剂中甘草的特征，故提取方法选择中性氧化铝柱。甘草、胀果甘草的TLC图几乎一致，提示对照药材可选择任意1种。

黄芪、甘草、陈皮的TLC鉴别均考察了不同温度、不同相对湿度条件下的展开情况，TLC图显示主斑点清晰，且无干扰，提示2.1项下TLC条件能适应不同温湿度条件。

3.2 黄芪甲苷含量测定

耐用性试验中，分别考察了流动相乙腈－水的不同比例（34∶66，32∶68，30∶70，*V*/*V*），不同柱温（30，35，40 ℃），不同流速（0.8，1.0，1.2 mL/min）对测定结果的影响。结果显示，改变色谱条件，峰面积比值、理论板数等均稳定，故最终选择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、结果准确、重复性好，可用于补肺防感合剂的质量控制。

参考文献

[1] 何艳青，招志辉，张俊红，等. 不同来源黄芪化学成分及其抗疲劳价值分析[J]. 广州中医药大学学报，2023，40(5)：