

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.012

骨质增生丸质量标准提升研究

蒲志强, 陈 华, 金伟华, 于波涛, 宋宗辉

(中国人民解放军成都军区总医院药剂科, 四川 成都 610083)

摘要:目的 提高骨质增生丸的质量标准。方法 以薄层色谱(TLC)法定性鉴别制剂中骨碎补、鹿衔草、熟地黄;以高效液相色谱法测定柚皮苷的含量,色谱柱为 YMC-Triart C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(19:81, V/V),流速为 1 mL/min,检测波长为 283 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 骨碎补、鹿衔草、熟地黄 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰,精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 3%;平均回收率为 99.97%,RSD 为 1.90%(n=9)。结论 所建立的标准操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性好,可用于骨质增生丸的质量控制。

关键词:骨质增生丸;薄层色谱法;高效液相色谱法;柚皮苷;质量标准

中图分类号:R927

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)10-0035-03

Improvement of Quality Standard of Guzhi Zengsheng Pills

PU Zhiqiang, CHEN Hua, JIN Weihua, YU Botao, SONG Zonghui

(Department of Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu, Sichuan, China 610083)

Abstract:Objective To improve the quality standard of Guzhi Zengsheng Pills. Methods TLC method was used for qualitative identification for *Drynariae Rhizoma*, *Pyrola calliantha* and *Rehmanniae Radix* *Preparata*. HPLC method was used for the content determination of naringin, the chromatographic column was YMC-Triart C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(19:81, V/V), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 283 nm, the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μL. Results The TLC spots of *Drynariae Rhizoma*, *Pyrola calliantha* and *Rehmanniae Radix* *Preparata* were clear and well separated, the negative control had no interference, the RSDs of precision, repeatability and stability test were less than 3%. The average recovery rate was 99.97% and RSD was 1.90%(n=9). Conclusion The established standard is simple, accurate, it has good precision, stability and repeatability, which can be used for the quality control of Guzhi Zengsheng Pills.

Key words: Guzhi Zengsheng Pills; TLC; HPLC; naringin; quality standard

骨质增生丸为我院非标准制剂,由于原质量标准检测方法简单、不可控,且仅有骨碎补和熟地黄的薄层色谱(TLC)鉴别方法,因此需要提高制剂的质量标准。骨质增生丸由鸡血藤、熟地黄、骨碎补、狗脊、独活等 11 味中药组方,为临床使用多年的经验方,有滋补肝肾、强筋壮骨、驱风散邪、助阳化湿、活血化痰功效,多用于颈椎病、肥大性腰椎炎、退行性关节炎、腰肌劳损、慢性腿病等的治疗。本研究中对方中骨碎补、鹿衔草、熟地黄等成分进行定性鉴别,对柚皮苷进行含量测定^[1]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AL204 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-500E 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);硅胶 G 板(青岛海浪硅胶干燥剂有限公司);硅胶 H 板(青岛海洋化工厂分厂)。

1.2 试剂

柚皮苷对照品(批号为 110722-200610,纯度>98%),鹿衔草对照药材(批号为 121211-201202),熟地黄对照药材(批号为 121196-201105),均购自中国食品药

品检定研究院;骨质增生丸(批号分别为 141101, 141102, 141103,规格为每袋 6 g)及阴性样品均由医院制剂中心提供。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 骨碎补^[2]

取样品 10 g,研细,加甲醇 50 mL,超声(功率 240 W,频率 40 kHz,下同)处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的对照品溶液。另取缺骨碎补的阴性样品 10 g,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 4 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲酸-水(1:12:2.5:3, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图 1 A。

2.1.2 鹿衔草^[3]

取样品 10 g,研细,加乙醇 40 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶

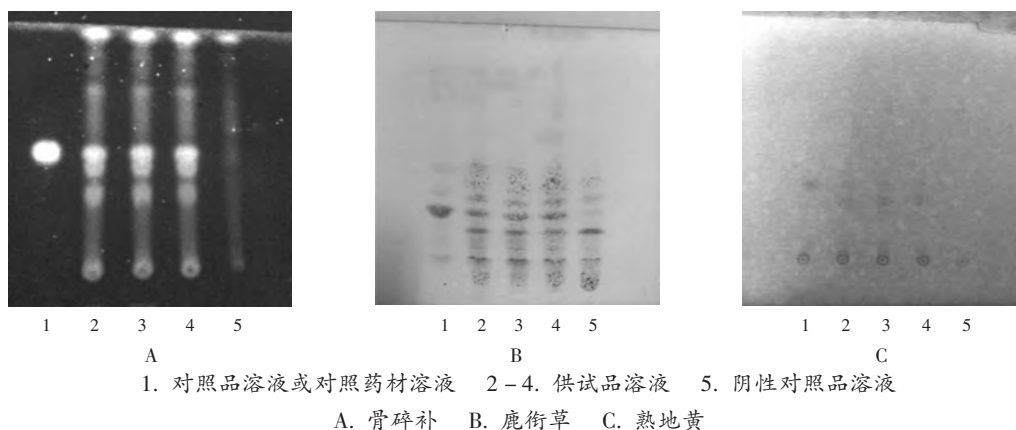


图1 薄层色谱图

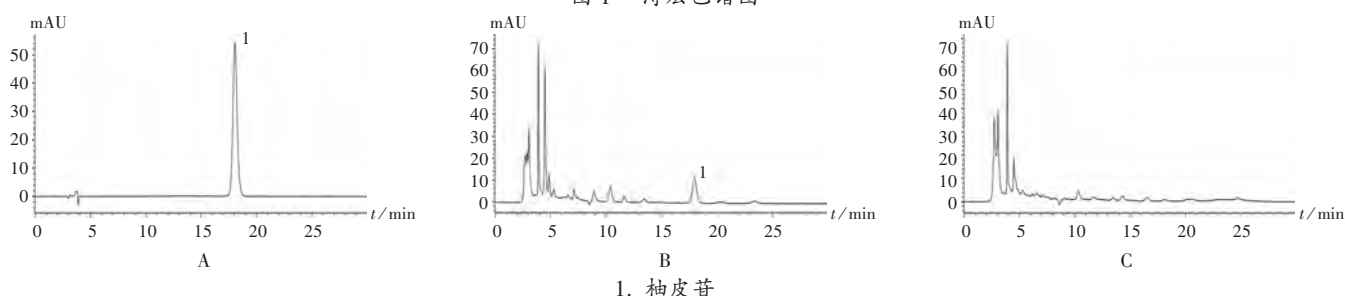


图2 高效液相色谱图

液。取鹿衔草对照药材 1 g, 加乙醇 20 mL, 按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。另取缺鹿衔草的阴性样品 10 g, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 H 薄层板上, 以环己烷-甲酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置日光灯下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 详见图 1 B。

2.1.3 熟地黄^[4]

取样品 10 g, 研细, 加水 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液置分液漏斗中, 加乙酸乙酯 25 mL, 振摇提取, 分取乙酸乙酯层, 水浴蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取熟地黄对照药材 1 g, 置锥形瓶中, 加水 30 mL, 煎煮 1 h, 滤过, 即得对照药材溶液。另取缺熟地黄的阴性样品 10 g, 同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯(1:1, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2,4-二硝基苯肼试液, 显色至斑点清晰, 置日光灯下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 详见图 1 C。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[5-7]

色谱柱: YMC-Triart C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);

流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(19:81, V/V); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 283 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2.2 溶液制备

取柚皮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 30 μ g 的对照品溶液。取样品适量, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 20 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 离心, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。取不含骨碎补的阴性样品, 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

系统适用性试验: 取 2.2.2 项下供试品溶液、对照品溶液各适量, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图 2。结果理论板数按柚皮苷峰计应不低于 3 000, 分离度均大于 1.5, 基线分离良好。

专属性试验: 取 2.2.2 项下对照品溶液、阴性对照品溶液各适量, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图 2。结果阴性对照品溶液色谱在与对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰, 表明专属性良好。

线性关系考察: 取对照品各适量, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 中含柚皮苷 2.9, 5.8, 11.6, 23.2, 46.4, 92.8 μ g 的系列对照品溶液, 按拟订色谱条件进样, 记录峰面积。以柚皮苷质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 12.643X - 2.804$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明, 柚皮苷质量浓度

在 2.9 ~ 92.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:取对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.37% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为 141101)适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 2.16% ($n=6$),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品(批号为 141101)适量,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定 6 次,记录峰面积并计算样品含量。结果柚皮苷平均含量为 0.779 mg/g, RSD 为 2.16% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品适量,共 6 份,分别加入一定质量浓度的柚皮苷对照品溶液,同法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n=9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.5015	0.391	0.312	0.698	98.40		
0.5030	0.392	0.312	0.708	101.28		
0.4991	0.389	0.312	0.692	97.12		
0.5019	0.391	0.390	0.773	97.95		
0.5011	0.391	0.390	0.777	98.97	99.97	1.90
0.5006	0.390	0.390	0.790	102.56		
0.5023	0.392	0.468	0.861	100.21		
0.5014	0.391	0.468	0.866	101.50		
0.5021	0.392	0.468	0.868	101.71		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品各适量,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,平行测定 3 次,记录峰面积并计算样品含量。结果批号为 141101, 141102, 141103 的 3 批样品中柚皮苷的含量分别为 0.736, 0.751, 0.771 mg/g。

3 讨论

骨质增生可发生于全身各部位,临床表现也错综复杂^[8]。骨质增生属于无菌性炎症,治疗时应控制骨质增生引起的局部组织充血、水肿、炎症等一系列症状和体征。该组方从补肾健骨、扶正祛邪、活血化瘀、疏通经络的角度配伍,方中熟地黄滋阴益肾、养肝补脾,鸡血藤补血活血、舒筋活络,独活祛风除湿、驱散风邪,生麦芽、生谷芽益脾补肾,诸药协同发挥疗效,制备为骨质增生丸,更能满足广大骨质增生患者的用药需求。

骨碎补 TLC 显色后,薄层板需放置足够时间,荧光才够清晰,同时展开剂应选择环己烷-乙酸乙酯-甲酸-水(1:12:2.5:3, $V/V/V/V$)的上层溶液^[9]。药典中骨碎补和鹿衔草的薄层鉴别展开剂均使用了甲苯,但甲苯

为易制毒化学品,属于管制品,所以该两味药材的鉴别中用环己烷替代了甲苯。

柚皮苷检测波长的选择,以甲醇为溶剂,称取柚皮苷对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇溶解,使用紫外可见分光光度计在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行紫外扫描^[10],结果柚皮苷在 283 nm 波长处有最大吸收峰,通过系统适用性试验验证,结果分离度良好,样品中柚皮苷与对照品保留时间一致,阴性无干扰。

处方中熟地黄为生地黄的炮制加工品,具有清热生津、凉血止血作用,《中国药典》建立了其活性成分梓醇、毛蕊花糖苷的含量测定方法,试验时由于缺少对照品,故未将其作为含量测定指标。肉苁蓉含有松果菊苷、毛蕊花糖苷等指标成分。狗脊中含有原儿茶酸,但《中国药典》中其药材的含量限度比较低。独活含有蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯,《中国药典》也建立了相应含量测定方法。《中国药典》中鹿衔草质量标准项下建立了水晶兰苷的含量测定方法。《中国药典》中骨碎补以柚皮苷为含量测定指标,本品按干燥品计算,含柚皮苷应不得少于 0.50%。经过筛选,本研究中采用柚皮苷为指标成分进行含量测定。进一步研究时可以考虑增加毛蕊花糖苷、蛇床子素、水晶兰苷等指标成分的含量测定^[11]。

综上所述,本研究中所建立的标准操作简便、准确,精密密度、稳定性、重复性好,可用于骨质增生丸的质量控制。

参考文献:

- [1] 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, 2015: 256.
- [2] 单秀明, 杨晓, 邱学伟. 跌打片质量标准提高研究[J]. 中国药业, 2015, 24(19): 41-43.
- [3] 王学农, 张绍轩. 中成药颈康片中鹿衔草的薄层色谱鉴别[J]. 中国民族民间医药, 2008, 17(11): 18-21.
- [4] 崔小敏, 李芳, 李凡, 等. 双参胶囊的质量标准提高研究[J]. 中国药房, 2016, 27(12): 1677-1679.
- [5] 伍奕, 蒋晓煌, 蒋孟良, 等. 骨碎补中柚皮苷含量测定方法的优化研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(3): 48-50.
- [6] 薛标强, 袁洁丽. HPLC 法测定抗骨增生片中柚皮苷的含量[J]. 轻工科技, 2014, 30(1): 105-106.
- [7] 范兴, 杨成梓, 曾伟生, 等. HPLC 法测定烫骨碎补中柚皮苷的含量[J]. 海峡药学, 2013, 25(11): 74-76.
- [8] 刘永刚. 骨肽片与抗骨增生片结合用于骨质增生症治疗临床比较[J]. 北方药学, 2017, 14(8): 16.
- [9] 许思华, 宋英光, 陈繁华. 固肾壮骨片质量标准研究[J]. 今日药学, 2017, 27(2): 91-93.
- [10] 刘淑娟, 张妮瑜, 辛秀, 等. 抗骨增生片定性定量方法研究[J]. 中南药学, 2014, 12(6): 574-576.
- [11] 陈素娟, 聂静, 张旗, 等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2173-2177.

(收稿日期: 2018-10-12)