

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)10-0093-05
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.10.019



黄芪健骨胶囊质量标准研究*

张岳阳, 黄晶, 陈国珍, 李宏阳, 顾卫[△]

(广州中医药大学惠州医院·广东省惠州市中医医院, 广东 惠州 516001)

摘要:目的 建立黄芪健骨胶囊的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中黄芪、山茱萸药材进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷的含量,色谱柱为 XSelect HSS T₃ 柱(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm),流动相为甲醇-0.3%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为 0.8 mL/min,检测波长为 240 nm,柱温为 25 °C,进样量为 10 μL。结果 黄芪、山茱萸的 TLC 图特征斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷质量浓度分别在 21.54~430.80 μg/mL ($R^2 = 0.9993$)、5.02~100.40 μg/mL ($R^2 = 0.9999$)、20.28~405.60 μg/mL ($R^2 = 0.9997$) 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%;平均加样回收率分别为 100.66%, 98.58%, 100.17%, RSD 分别为 1.70%, 2.36%, 1.98% ($n = 6$)。结论 该方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于黄芪健骨胶囊的质量控制。

关键词: 黄芪健骨胶囊; 黄芪; 山茱萸; 马钱苷; 毛蕊异黄酮苷; 柚皮苷; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 含量测定

Study on Quality Standard of Huangqi Jiangu Capsules

ZHANG Yueyang, HUANG Jing, CHEN Guozhen, LI Hongyang, GU Wei

(Huizhou Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine · Huizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huizhou, Guangdong, China 516001)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Huangqi Jiangu Capsules. **Methods** Astragali Radix and Corni Fructus in the preparation were identified qualitatively by the thin-layer chromatography (TLC) method. The contents of loganin, calycosin-7-O-β-D-glucoside and naringin in the preparation were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method; the chromatographic column was the XSelect HSS T₃ column (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), the mobile phase was methanol-0.3% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 240 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC chromatograms of Astragali Radix and Corni Fructus had clear characteristic spots, good resolution, and there was no interference from the negative reference. The linear ranges of loganin, calycosin-7-O-β-D-glucoside and naringin were in the range of 21.54-430.80 μg/mL ($R^2 = 0.9993$), 5.02-100.40 μg/mL ($R^2 = 0.9999$), 20.28-405.60 μg/mL ($R^2 = 0.9997$) respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rates of the above three components were 100.66%, 98.58%, 100.17%, with RSDs of 1.70%, 2.36%, 1.98% ($n = 6$) respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the quality control of Huangqi Jiangu Capsules. **Key words:** Huangqi Jiangu Capsules; Astragali Radix; Corni Fructus; loganin; calycosin-7-O-β-D-glucoside; naringin; TLC; HPLC; content determination

黄芪健骨胶囊为我院根据临床验方研制并采用现代制剂技术制备的院内中药复方制剂,由黄芪、山茱萸、党参、枸杞子、骨碎补、甘草等12味药材制得,有补益肝肾、强筋健骨功效,用于治疗骨质疏松、骨质增生等症。为有效控制制剂质量,保证临床疗效,本研究中建立了定性鉴别制剂中君药黄芪、臣药山茱萸的薄层色谱(TLC)法,并建立了同时测定组方中黄芪有效成分毛蕊异黄酮苷及山茱萸有效成分马钱苷和骨碎补有效成分柚皮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

LC-2030 Plus 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu

公司); Good Look-2000 型薄层色谱成像系统(上海科哲生化科技有限公司); PT-104/35S 型电子分析天平(美国康州 HZ 电子有限公司,精度为 0.01 mg); 202-OASB 型电热恒温干燥箱(龙口市电炉制造厂); G-060S 型超声波清洗机(深圳市歌能清洗设备有限公司); SF-200C 型高速粉碎机(上海中药机械厂); HH-6 型数显恒温水浴锅(常州智博瑞仪器制造有限公司); 3H16RI 型智能高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); 硅胶 G 预制薄层板(青岛海洋化工有限公司); Direct-Q5 UV 纯水/超纯水一体化系统(默克化工技术 <上海> 有限公司)。

*基金项目: 广东省中医药局科研项目[20242102]。

第一作者: 张岳阳, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为医院制剂研发, (电子信箱)zhangyueyang515@qq.com。

[△]通信作者: 顾卫, 女, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为中药制剂研发, (电子信箱)gw13927304271@163.com。

1.2 试药

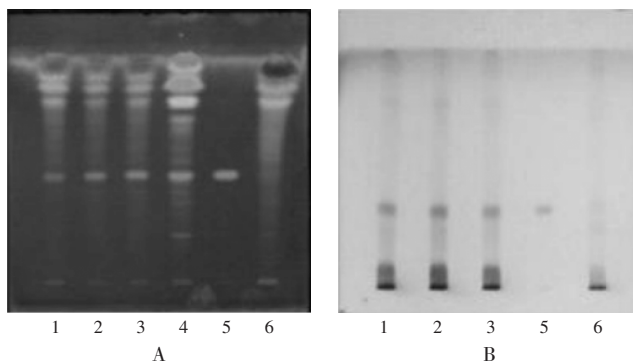
黄芪健骨胶囊[我院自制,批准文号:粤ZB20112427(Z),批号分别为211001,211002,211003,211004,211005,211006,规格为每粒0.36 g],其组方药材均购于广州至信中药饮片有限公司;黄芪对照药材(中国食品药品检定研究院,批号为120974-202013);马钱苷对照品(批号为AZ22041101),毛蕊异黄酮苷对照品(批号为AFBL1256),柚皮苷对照品(批号为AF21101953),黄芪甲苷对照品(批号为AFBD0526),均购于成都埃法生物科技有限公司,含量均不低于98%;甲醇、磷酸、正丁醇均为色谱纯,香草醛、氨水、甲醇、三氯甲烷、硫酸、无水乙醇、乙酸乙酯、冰醋酸均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

黄芪^{[1]315-316}:取3批样品各36粒(内容物),研细,加水饱和的正丁醇50 mL,超声(功率360 W、频率40 kHz,下同)处理30 min,滤过,滤液用氨试液洗涤2次(每次30 mL),弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水溶液洗涤2次(每次30 mL),分取正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取黄芪对照药材约1 g,同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。另取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按黄芪健骨胶囊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。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、阴性对照品溶液各10 μ L和对照品溶液1 μ L,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)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视结果。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱和对照品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。

山茱萸^{[1]29-30}:取3批样品各15粒(内容物),研细,加无水乙醇20 mL,超声处理15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取马钱苷对照品,加无水乙醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按黄芪健骨胶囊处方及工艺制备缺山茱萸的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各6 μ L和对照品溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-冰醋酸(50:10:1, V/V/V)^[2]为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸试液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光灯下检视。结果供



1 - 3. 供试品溶液(批号分别为211001,211002,211003)
4. 对照药材溶液 5. 对照品溶液 6. 阴性对照品溶液
A. 黄芪 B. 山茱萸

图1 薄层色谱图

1 - 3. Test solution (batch numbers:211001,211002,211003) 4. Reference medicinal material solution 5. Reference solution 6. Negative reference solution

A. Astragali Radix B. Corni Fructus

Fig. 1 TLC chromatograms

试品溶液色谱中,在与对照品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 B。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:XSelect HSS T₃柱(250 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m);流动相:甲醇(A) - 0.3% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~40 min时12.0%A \rightarrow 28.0%A, 40~55 min时28.0%A \rightarrow 37.0%A, 55~70 min时37.0%A \rightarrow 43.0%A, 70~90 min时43.0%A \rightarrow 59.0%A, 90~95 min时59.0%A \rightarrow 70.0%A, 95~110 min时70.0%A);流速:0.8 mL/min;检测波长:240 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

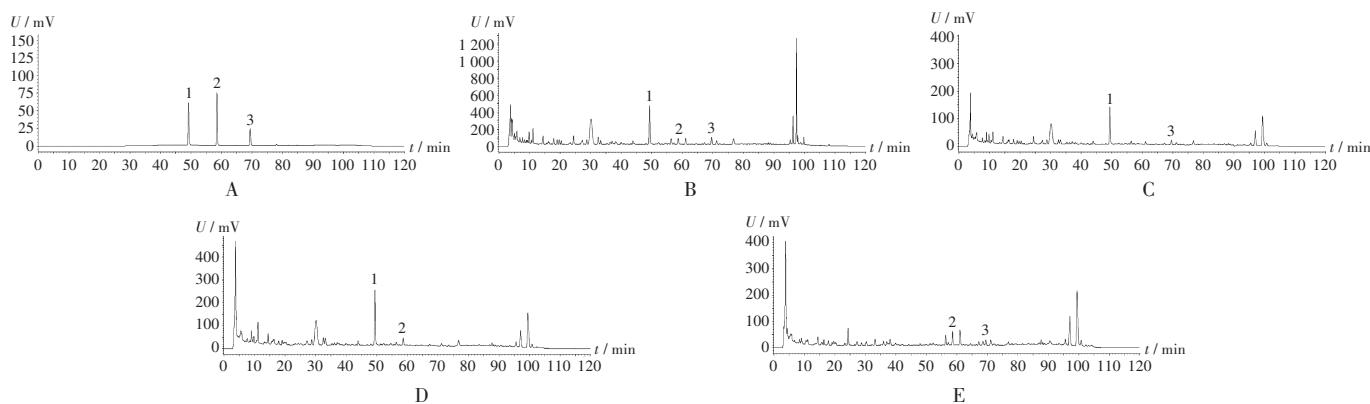
混合对照品溶液:取马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL分别含马钱苷2154 μ g、毛蕊异黄酮苷502 μ g、柚皮苷2028 μ g的混合对照品贮备液;精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,即得。

供试品溶液:取样品内容物约5.0 g,研细,精密称定,加甲醇50 mL,称定质量,超声处理60 min,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,5000 r/min离心10 min,精密量取上清液25 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:根据黄芪健骨胶囊处方和工艺制备分别缺黄芪、骨碎补^{[1]267-268}、山茱萸的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验:精密吸取2.2.2项下3种



1. 马钱苷 2. 毛蕊异黄酮苷 3. 柚皮苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - E. 阴性对照品溶液(分别缺黄芪、骨碎补、山茱萸)

图2 高效液相色谱图

1. Loganin 2. Calycosin - 7 - O - β - D - glucoside 3. Naringin

A. Mixed reference solution B. Test solution C - E. Negative reference solution (lacking Astragali Radix, Drynariae Rhizoma, Corni Fructus, respectively)

Fig. 2 HPLC chromatograms

溶液各 10 μ L, 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应位置有谱峰, 理论板数按马钱苷峰、毛蕊异黄酮苷峰、柚皮苷峰计分别应不低于 10 000, 3 000, 3 000^[1], 分离度均大于 1. 5, 且阴性对照无干扰。详见图 2。

线性关系考察: 精密量取 2. 2. 2 项下混合对照品贮备液 0. 1, 0. 2, 0. 4, 0. 5, 1. 0, 2. 0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 即得不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 分别精密吸取 10 μ L, 按 2. 2. 1 项下色谱条件进样测定, 以待测成分的质量浓度 (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, 马钱苷为 $Y_1 = 20\ 740. 5 X_1 - 17\ 716. 0 (R^2 = 0. 999\ 3)$, 毛蕊异黄酮苷为 $Y_2 = 42\ 702. 6 X_2 - 27\ 200. 6 (R^2 = 0. 999\ 9)$, 柚皮苷为 $Y_3 = 3\ 991. 27 X_3 + 14\ 014. 9 (R^2 = 0. 999\ 7)$ 。结果表明, 马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷质量浓度分别在 21. 54 ~ 430. 80 μ g / mL ($n = 6$), 5. 02 ~ 100. 40 μ g / mL ($n = 6$), 20. 28 ~ 405. 60 μ g / mL ($n = 6$) 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取 2. 2. 2 项下混合对照品溶液适量, 按

2. 2. 1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷峰面积的 RSD 分别为 0. 70%, 0. 68%, 0. 77% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 2. 2. 2 项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 时按 2. 2. 1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷峰面积的 RSD 分别为 1. 79%, 2. 86%, 2. 17% ($n = 6$), 表明供试品溶液室温下放置 48 h 内基本稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 211001)样品适量, 按 2. 2. 2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2. 2. 1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算样品含量。结果马钱苷、毛蕊异黄酮苷、柚皮苷的平均含量分别为 205. 55, 20. 24, 123. 46 μ g / g, RSD 分别为 1. 81%, 2. 16%, 2. 52% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取同一批(批号为 211001)已知含量的样品适量, 精密称定, 平行 6 份, 加入一定质量浓度的对照品溶液, 60 $^{\circ}$ C 烘干至恒定质量, 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, 并计算加样回收率。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(μ g)			加入量(μ g)			测得量(μ g)			回收率(%)			\bar{X} (%)			RSD (%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1029.14	101.34	618.13	935	100.4	732	1955.47	200.52	1342.62	99.07	98.78	98.97						
1026.68	101.09	616.65	935	100.4	732	1980.19	202.30	1375.46	101.98	100.81	103.66						
1026.92	101.12	616.80	935	100.4	732	1974.99	197.91	1352.83	101.40	96.40	100.55						
1029.14	101.34	618.13	935	100.4	732	1948.07	203.63	1336.91	98.28	101.88	98.19	100.66	98.58	100.17	1.70	2.36	1.98
1026.68	101.09	616.65	935	100.4	732	1986.77	198.04	1354.02	102.68	96.56	100.73						
1026.92	101.12	616.80	935	100.4	732	1966.96	198.53	1340.79	100.54	97.02	98.91						

注: A 为马钱苷, B 为毛蕊异黄酮苷, C 为柚皮苷。

Note: A refers to loganin, B refers to calycosin - 7 - O - β - D - glucoside, and C refers to naringin.

2.2.4 样品含量测定

取6批样品内容物各适量,精密称定,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。结果见表2。

表2 样品含量测定结果($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of three components in samples ($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

批号	马钱苷	毛蕊异黄酮苷	柚皮苷	批号	马钱苷	毛蕊异黄酮苷	柚皮苷
211001	206.39	20.12	121.19	211004	201.80	20.15	127.77
211002	199.10	20.08	125.45	211005	202.69	20.36	123.99
211003	206.92	19.75	119.65	211006	208.76	20.28	122.30

3 讨论

3.1 剂型改良与方解

骨质疏松症为慢性疾病,需长期持续治疗才能降低骨折风险^[3]。单用西药治疗效果欠佳,需辅以中医药治疗。黄芪健骨胶囊源自黄芪健骨方,后者为我院名医验方,治疗骨质疏松、骨质增生疗效显著,但煎煮过程烦琐,导致患者依从性较低。研究显示,采用中药现代剂型(滴丸剂、膜剂、软胶囊、气雾剂、中药配方颗粒)可提升患者的依从度、满意度^[4]。本院为适应患者需求,查阅相关文献,制订了水提醇沉的提取方法,矫正了药材的不良气味,且装入胶囊有利于提高便携性、服药依从性。方中君药黄芪补气升阳,臣药山茱萸补益肝肾、骨碎补补肾强骨,搭配其他药物可对骨质疏松症主要病因病机肝肾亏虚有的放矢,符合中医理论。有研究表明,此3种中药为抗骨质疏松中药组方常用药物^[5]。其中含有多重有效成分,如挥发性成分、鞣质、黄酮类、苷类、多糖类、三萜类等,可发挥提高免疫、抗肿瘤、抗氧化等药理作用,且骨碎补能抗骨质疏松,促进骨折愈合及软骨再生^[6-8]。选取此3味药材用于制剂的质量控制,贴合制剂功效主治,可保证药品质量。

3.2 TLC鉴别

TLC法为控制药品质量的常用方法,简单、经济、易操作。预试验中比较了不同种类、体积分数的提取溶剂(水、乙醇、甲醇、30%甲醇、70%甲醇、30%乙醇、70%乙醇等),以及不同的提取方法(超声^[9]、加热回流),结果显示,采用“加入正丁醇^[10]超声处理30 min,滤过,滤液用氨试液洗涤2次”的方法,黄芪甲苷TLC图斑点清晰,分离度高。山茱萸的乙醇处理方法环保、无污染、安全,且斑点清晰,分离度高。

3.3 含量测定

待测成分选择:黄芪为制剂中的君药,且为常用补气中药,其应用范围不断扩大,目前已被广泛用于高血压、糖尿病、骨质疏松症等慢性病的治疗^[11],但因黄芪甲苷在紫外末端有最大吸收,吸收较差^[12],紫外检测器

效果不佳,故本试验中采用毛蕊异黄酮苷作为黄芪的指标成分。山茱萸及骨碎补为制剂中的臣药,其中山茱萸临床用于治疗多系统疾病,药理作用广泛^[13],因其中莫诺苷色谱峰拖尾严重且峰面积较小,故本试验中采用马钱苷作为山茱萸的指标成分;骨碎补是具有补肾、壮骨、强筋、活血功效的补肾壮骨药代表药之一^[14],除有良好的抗骨质疏松作用外,还能促进骨折断端愈合^[15]。另有研究发现,毛蕊异黄酮苷达到一定浓度后可逆转5-氟尿嘧啶诱导的骨髓间充质干细胞氧化性损伤、生物活性物质改变,从而减少引起骨质疏松的可能^[16-17]。还有研究显示,柚皮苷是骨碎补的有效活性成分,柚皮苷具有抗肿瘤、抗氧化、抗骨质疏松等作用^[18]。可见,以上述3种成分为基础进行质量控制,可保证制剂的疗效。

色谱条件优化:预试验中,流动相考察不同成分、不同pH试剂(甲醇、乙腈、0.1%甲酸水溶液、0.05%磷酸水溶液、0.1%磷酸水溶液、0.2%磷酸水溶液、0.3%磷酸水溶液)^[1,19-20]的组合,发现以甲醇-0.3%磷酸水溶液为流动相时待测成分色谱峰分离效果好,可为下一步提高制剂质量标准提供数据基础。还考察了Shim-pack GIST C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),发现其分离效能较XSelect HSS T₃柱(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)差,色谱峰分离度不佳,理论板数不足,不能满足要求。故选择后者进行正式试验。

3.4 方法评价

本研究中所建立的方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于黄芪健骨胶囊的质量控制。

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, 2020.
- [2] 郑峙云, 张茂婷, 蒋晓静, 等. 山茱萸配方颗粒的质量研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 88-90.
- [3] 王永炫, 李梅, 章振林, 等. 《原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)》要点解读[J]. 协和医学杂志, 2023, 14(6): 1203-1207.
- [4] 郭伟萍, 钱杏仙, 张艳慧. 现代中药剂型应用发展初探[J]. 中医药管理杂志, 2022, 30(1): 196-197.
- [5] 王紫仰, 吴慧珍, 李安哲, 等. 山茱萸化学成分及药理作用研究[J]. 广州化工, 2023, 51(3): 20-22.
- [6] 陈晶晶. 基于网络药理学研究抗骨质疏松中药组合和药对的药理作用机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [7] 张施僊, 刘海龙, 王瑞琼, 等. 黄芪化学成分和药理作用及Q-marker预测分析[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(4): 410-419.
- [8] 周群, 曾弦, 黄丹, 等. 骨碎补化学成分和生物活性研究进展[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2021, 23(8): 2727-2741.
- [9] 宋京美, 龚韬, 杨薇, 等. HPLC测定益肾骨康颗粒中莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 841-844.