

益肾强骨合剂质量标准研究

饶俊珍, 程璐, 熊鑫, 徐宏峰

武汉市第一医院药学部 (武汉 430022)

【摘要】目的 建立益肾强骨合剂的质量控制标准。**方法** 采用 TLC 法对益肾强骨合剂中的补骨脂和仙茅进行定性鉴别; 采用 HPLC 法测定制剂中丹酚酸 B 的含量, 采用依利特 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.5% 甲酸水 (23:77), 柱温: 25 °C, 检测波长: 286 nm, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 进样量: 10 μL。**结果** 在补骨脂和仙茅的薄层鉴别中, 供试品与对照品 (对照药材) 相应位置上均显示相同颜色的特征斑点, 分离度良好, 阴性对照无干扰; 丹酚酸 B 在 16.48~527.50 μg · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好 ($r=1.000\ 0$), 平均加样回收率为 97.07%, RSD 为 0.94% ($n=6$), 3 批次样品平均含量为 2.146 0 mg · mL⁻¹。**结论** 本试验所建立的 TLC 法和 HPLC 法操作简单, 重复性高, 专属性强, 可用于益肾强骨合剂的质量控制。

【关键词】 益肾强骨合剂; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

Study on the quality standard of Yishen Qianggu mixture

Jun-Zhen RAO, Lu CHENG, Xin XIONG, Hong-Feng XU

Department of Pharmacy, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Hong-Feng XU, Email: 282215830@qq.com

【Abstract】Objective To establish quality control standards for Yishen Qianggu mixture. **Methods** The TLC was used to identify *Psoralea corylifolia* L. and *Curculigo orchioides* Gaertn in Yishen Qianggu mixture; the content of salvianolic acid B was determined by HPLC, the chromatographic method of this experiment is an C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) of Elite, mobile phase was acetonitrile-0.5% acetonitrile-formic acid (23:77), column temperature was 25 °C, the detection wavelength was 286 nm, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the injection volume was 10 μL. **Results** Spots with the same color characteristics were displayed on the corresponding positions of the test substance and the control substance (the control medicinal material), the separation degree was satisfactory, and the negative control substance had no interference; the salvianolic acid B had a good linear relationship within the range of 16.48-527.50 μg · mL⁻¹ ($r=1.000\ 0$). The average recovery rate was 97.07% and RSD was 0.94% ($n=6$), the average content of three batches of samples was 2.146 0 mg · mL⁻¹. **Conclusion** The TLC and HPLC methods established in this experiment have simple operation, high repeatability and strong specificity, which could be used for quality control of Yishen Qianggu mixture.

【Keywords】 Yishen Qianggu mixture; TLC; HPLC; Quality standards

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种与年龄相关的以骨量减低、骨组织微结构损坏而导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。2018 年国家卫生健康委发布的我国首次骨质疏松症的流行病学调查结果显示, OP 已经成为我国 50 岁以上人群的重要健康问题, 50 岁以上人群 OP 患病率为 19.2%, 65 岁以上人群 OP 患病率达到 32.0%^[2-3], 随着人口老龄化的加重, OP 对人们生活将会产生更多的影响。目前对于 OP 的治疗有化学治疗和中药治疗, 但化药的长期使用其不良反应在临床中日益显现, 因此, 标本兼治的中药治疗受到更多的关注与研究。

益肾强骨合剂是武汉市第一医院院内经方, 由党参、丹参、淫羊藿、仙茅、盐补骨脂等八味药材组方而成。用于肢体及关节肌肉无力、疼痛、麻木、重着、屈伸不利, 甚或筋脉抽掣、萎枯不用、腰脊酸软、瘦削伴见神疲乏力、面目虚浮无华等。在 OP 等疾病的治疗中, 经过规范的临床观察试验, 证明该方具有良好的治疗效果, 为了扩大其临床使用范围, 拟开发成传统制剂医疗机构中药备案制剂。本研究采用 TLC 法对合剂中的补骨脂和仙茅进行定性鉴别, 采用 HPLC 法测定君药丹参的指标成分丹酚酸 B 的含量, 为益肾强骨合剂的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1260HPLC 仪 (美国安捷伦公司); ME215S 型电子天平 (德国赛多利斯公司感量: 0.01 mg); UPT-II-20T 型超纯水仪 (上海惠分科学分析仪器有限公司); SK8200HP 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 薄层硅胶板 (青海海洋化工厂分厂)。

1.2 试药

益肾强骨合剂 (武汉市第一医院制剂中心, 批号: 21051200、21051300、21051400); 丹酚酸 B 对照品 (批号: 111562-201917, 含量以 96.6% 计)、补骨脂素对照品 (批号: 110739-201918, 含量以 99.6% 计)、异补骨脂素对照品 (批号: 110738-202016, 含量以 99.4% 计) 和仙茅对照药材 (批号: 121505-202104) 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 TEDIA 公司), 甲酸为分析纯 (天津市白世化工有限公司), 其他试

剂均为分析纯, 水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 补骨脂的 TLC 鉴别

2.1.1 供试品溶液制备

取本品, 摇匀, 取 50 mL, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并乙酸乙酯液, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液制备

分别取补骨脂素对照品、异补骨脂素对照品, 加乙酸乙酯分别制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 阴性对照溶液制备

取不含补骨脂药材的制剂样品 50 mL, 按供试品溶液制备的相同方法, 制成阴性对照溶液。

2.1.4 鉴别方法

照薄层色谱法 (中国药典 2020 年版四部通则 0502) 试验^[4], 吸取上述 4 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯 (4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液。置紫外灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的两个荧光斑点, 且阴性对照无干扰, 见图 1。

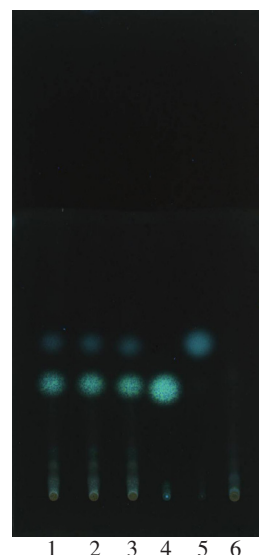


图1 益肾强骨合剂中补骨脂薄层色谱鉴别 (紫外灯下检视)

Figure 1. TLC identification of *Psoralea corylifolia* L. (viewed under ultraviolet light)

注: 1. 益肾强骨合剂 (批号: 21051200); 2. 益肾强骨合剂 (批号: 21051300); 3. 益肾强骨合剂 (批号: 21051400); 4. 补骨脂素对照品; 5. 异补骨脂素对照品; 6. 缺补骨脂阴性对照溶液

2.2 仙茅的TLC鉴别

2.2.1 供试品溶液制备

取本品, 摇匀, 取 50 mL, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并乙酸乙酯液, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.2.2 对照药材溶液制备

取仙茅对照药材粉末 2 g, 加水 30 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 取 25 mL 滤液, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 25 mL, 合并乙酸乙酯液, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。

2.2.3 阴性对照溶液制备

根据该制剂生产工艺制备不含仙茅药材的制剂样品 50 mL, 按“2.2.1”项下方法, 制成阴性对照溶液。

2.2.4 鉴别方法

照薄层色谱法(中国药典 2020 年版四部通则 0502)试验^[4], 吸取供试品溶液、对照药材溶液、阴性对照溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-丙酮-甲酸(5:2:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以 3% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 日光下显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰, 见图 2。

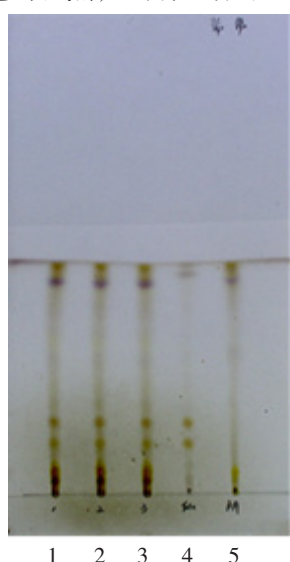


图2 益肾强骨合剂中仙茅薄层色谱鉴别
(日光下检视)

Figure 2. TLC identification of *Curculigo orchoides* Gaertn (viewed under daylight)

注: 1. 益肾强骨合剂(批号: 21051200); 2. 益肾强骨合剂(批号: 21051300); 3. 益肾强骨合剂(批号: 21051400); 4. 仙茅对照药材; 5. 缺仙茅阴性对照

2.3 益肾强骨合剂中丹酚酸B的含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈分析柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.5% 甲酸水(23:77); 检测波长: 286 nm; 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样: 10 μ L; 理论塔板数按丹酚酸 B 峰计算应不低于 3 000^[5-11]。

2.3.2 丹酚酸B对照品溶液制备

精密称取丹酚酸 B 10.92 mg, 分别置 20 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液(0.527 5 mg \cdot mL⁻¹), 再精密取 2 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(105.50 μ g \cdot mL⁻¹)。

2.3.3 供试品溶液制备

取本品, 摇匀, 分别精密量取 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 过滤, 取续滤液, 即得。

2.3.4 阴性样品溶液制备

按处方量比例, 取除丹参以外其余 7 味药材, 按制法制成丹参阴性样品, 再按“2.3.3”项下的方法制备即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性

吸取丹酚酸 B 对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μ L, 进样检测, 结果见图 3。丹酚酸 B 对照品、供试品溶液在 14.5 min 左右出现丹酚酸 B 色谱峰, 阴性样品溶液无干扰。

2.4.2 线性关系试验

精密称取丹酚酸 B 10.92 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液(527.50 μ g \cdot mL⁻¹), 以 80% 甲醇依次作等体积稀释, 得到 527.50, 263.75, 131.88, 65.94, 32.97, 16.48 μ g \cdot mL⁻¹ 的系列浓度样品, 按上述色谱条件进样 10 μ L 测定丹酚酸 B 色谱峰峰面积。以对照品浓度(X , μ g \cdot mL⁻¹)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算得线性回归方程: $Y=12.354 1X-1.213 1$, $r=1.000 0$, 表明丹酚酸 B 在 16.48~527.50 μ g \cdot mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度试验

取本品(批号: 21051200)摇匀, 精密量取 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并

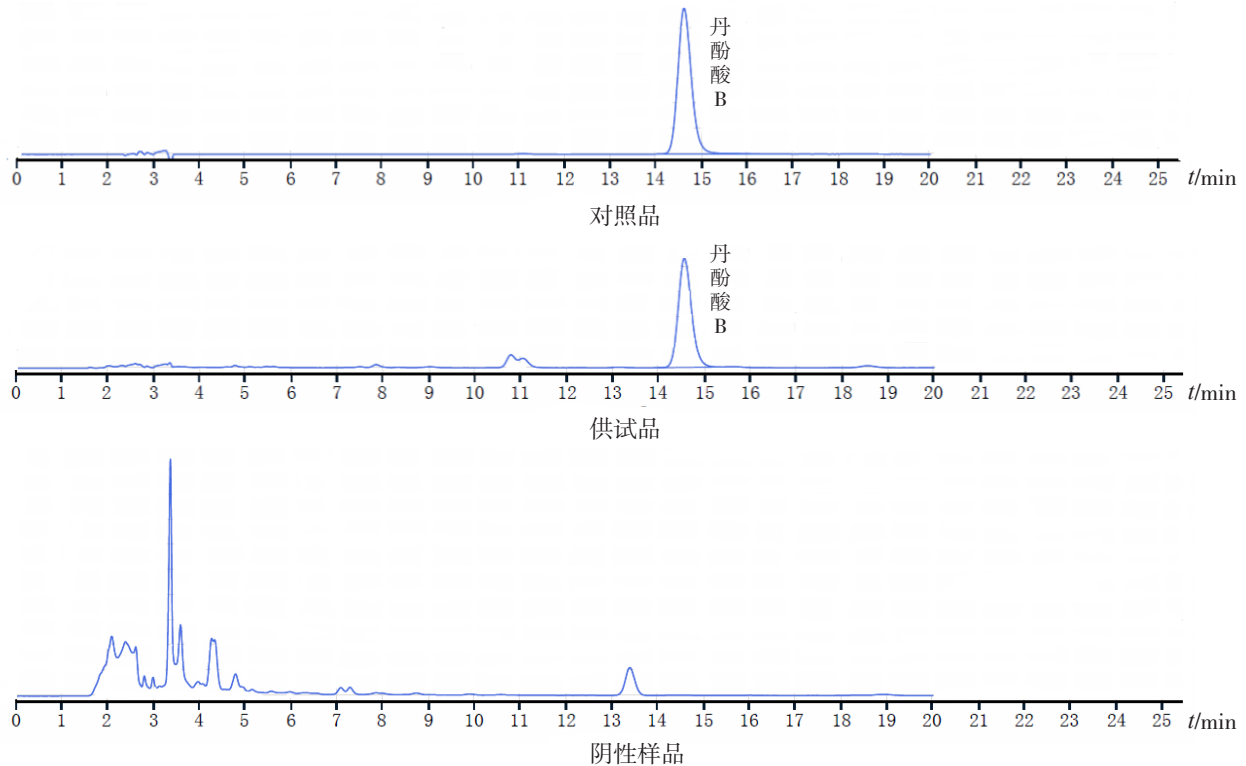


图3 益肾强骨合剂HPLC色谱图

Figure 3. HPLC chromatograms of Yishen Qianggu mixture

稀释至刻度，摇匀，过滤，取续滤液即得，进样 10 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积，计算其 RSD 为 1.27% ($n=6$)，表明精密度良好。

2.4.4 稳定性试验

取本品（批号：21051200）摇匀，精密量取 1 mL，置 25 mL 量瓶中，加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，过滤，取续滤液即得。分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样 10 μL ，其峰面积的 RSD 为 1.04% ($n=6$)，表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验

取本品（批号：21051200）样品，摇匀，分别精密量取 1 mL，分别置于 25 mL 量瓶中，加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，过滤，取续滤液即得，分别进样 10 μL ，计算出丹酚酸 B 的平均含量为 2.009 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， RSD 为 1.19% ($n=6$)，表明方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验

精密吸取已知含量的同一批样品（批号：21051200）0.5 mL，共 6 份，分置于 25 mL 量瓶，备用。精密称取丹酚酸 B 对照品 10.13 mg，以 80% 甲醇溶液溶解定容至 5 mL 量瓶，各精密加入 0.5 mL 丹酚酸 B 对照品溶液到上述 6 份样品溶

液瓶中，再以 80% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，精密吸取 10 μL ，注入液相色谱仪，按“2.3.1”项下色谱条件测定指标峰峰面积，并计算出平均回收率为 97.07%， RSD 为 0.94% ($n=6$)，表明方法回收率良好。

2.4.7 3批大生产样品含量测定

取 3 批大生产样品，摇匀，分别精密吸取 1 mL，按供试品溶液制法所得溶液，按上述色谱条件测定，进样 10 μL ，计算，结果见表 1。

通过以上方法学的研究表明，用 HPLC 法测定丹酚酸 B 含量准确、方法稳定可行。3 批大生产样品的平均含量为 2.146 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表1 3批益肾强骨合剂含量测定结果
($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=3$)

Table 1. Results of the content determination of three batches of of Yishen Qianggu mixture ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=3$)

批号	含量
21051200	2.039 0
21051300	2.202 0
21051400	2.197 0

3 讨论

3.1 HPLC测定指标的选择

益肾强骨合剂有丹参、仙茅两味君药，且用量最大，重点考虑这两味药材作为含量测定的主药，以体现中药制剂以君臣佐使为配伍的指导原则和思想。其中丹参药材的含量测定方法成熟、普遍，丹酚酸 B 作为其主要成分，是丹参的主要水溶性复合物之一，是丹参总酚酸含量最高、活性最强的成分^[12-13]，便于在复方中药制剂中作为检测指标。根据参考文献的分析，建立了益肾强骨合剂的 HPLC 方法，并进行了方法学的考察和 3 批大生产样品的验证，结果显示该方法操作简单，适用性强，能作为益肾强骨合剂的定量测定方法。

3.2 TLC测定指标的选择

TLC 首选仙茅药材进行试验，根据中国药典 2020 年版一部仙茅药材项下的指导，选取了仙茅苷和仙茅对照药材作为对照品，结果显示仙茅苷在优选的 TLC 鉴别条件下没有显示，仙茅对照药材与供试品在相应的位置上，日光下显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰，故选取了仙茅对照药材作为仙茅薄层鉴别的对照。补骨脂为益肾强骨合剂的臣药之一，有补骨脂素和异补骨脂素作为其 TLC 鉴别指标，其分离度好，供试品在与对照品色谱相应的位置上，显相同的两个荧光斑点，且阴性对照无干扰，故将补骨脂的鉴别纳入了益肾强骨合剂的 TLC 鉴别标准。

3.3 波长的选择

益肾强骨合剂由丹参、党参、补骨脂等药材组成，将供试品溶液进行全波长扫描，且中国药典 2020 年版丹参中丹酚酸 B 的测定波长为 286 nm，结合 HPLC 图谱分析，在此波长处，供试品色谱峰典型，目标成分的色谱峰吸收强，干扰少，最后确定本试验中供试品及对照品的测定波长为 286 nm。

3.4 流动相的选择

本试验选取了甲醇-甲酸水，乙腈-甲酸水的不同甲酸浓度系统，对益肾强骨合剂供试品进行了流动相的选择，在摸索流动相的过程中，考虑到制剂今后的日常检验需求，将分离度、峰型和出峰时间作为首要的考虑因素。在乙腈-0.5% 甲酸水的等度条件下，供试品主峰峰形无前沿和

拖尾，分离度良好，且出峰时间合适，故选择作为益肾强骨合剂的流动相。

3.5 小结

本试验所建立的 HPLC 和 TLC 方法简单，易操作，能够用于益肾强骨合剂的日常检验及质量标准的控制。

参考文献

- 1 于龙, 王亮. 老年骨质疏松症现状及进展 [J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(1): 6-11. [Yu L, Wang L. Status and progress of osteoporosis in the elderly[J]. Chinese Journal of Clinical Healthcare, 2022, 25(1): 6-11.] DOI: 10.3969 / J.issn.1672-6790.2022.01.002.
- 2 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318. DOI: 10.3969/j.issn.1674-2591.2019.04.001.
- 3 夏荣林. 中医药防治老年骨质疏松骨折的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(4): 135-137. [Xia RL. Research progress in prevention and treatment of senile osteoporosis fracture with traditional Chinese medicine[J]. Inner Mongolia Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 41(4): 135-137.] DOI: 10.16040/j.cnki.cn15-1101.2022.04.055.
- 4 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 195, 106.
- 5 陈静萍, 熊鑫, 张耕, 等. 一测多评法测定灵丹片中丹参 5 种指标成分的含量 [J]. 医药导报, 2017, 36(6): 679-682. [Cheng JP, Xiong X, Zhang G, et al. Determination of five index components of Salvia miltiorrhiza in Lingdan tablets by one test and multiple evaluation[J]. Herald of Medicine, 2017, 36(6): 679-682.] DOI: 10.3870 / j.issn.1004-0781.2017.06.020.
- 6 郝振明, 张轶欧, 谢君, 等. 丹参配方颗粒中丹参酮 II_A、丹酚酸 B、丹参素和原儿茶醛的含量研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 605-607. [Hao ZM, Zhang YO, Xie J, et al. Study on the contents of tanshinone II_A, salvianolic acid B, Danshensu and protocatechuic aldehyde in Salvia miltiorrhiza dispensing granules[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2022, 33(3): 605-607.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.03.26.
- 7 李垚, 杨德智, 苏斌, 等. 超 HPLC 法同时检测丹参中 14 种水溶性成分 [J]. 医药导报, 2019, 38(12): 1624-1629. [Li Y, Yang DZ, Su B, et al. Simultaneous detection

- of 14 hydrophilic components in *Salvia miltiorrhiza* by UPLC[J]. *Herald of Medicine*, 2019, 38(12): 1624-1629.] DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.12.018.
- 8 王文晓, 杨诺, 高欢, 等. HPLC 法同时测定冠心丹参片中 10 种成分 [J]. *中成药*, 2021, 43(5): 1141-1144. [Wang WX, Yang N, Gao H, et al. Simultaneous determination of ten constituents in Guanxin Danshen Tablets by HPLC[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2021, 43(5): 1141-1144.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.005.
- 9 管小军, 厉君, 黄娜娜, 等. HPLC 同时测定紫丹参药材中 8 种成分含量 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(9): 82-86. [Guan XJ, Li J, Huang NN, et al. Simultaneous determination of 8 components in purple *Salviae Miltiorrhizae* et *Rhizoma* by HPLC[J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2020, 27(9): 82-86.] DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.202002080.
- 10 李燕, 同晓霞. RP-HPLC 同时测定丹膝颗粒中丹酚酸 B、丹皮酚和丹参素含量 [J]. *食品与药品*, 2019, 21(4): 309-312. [Li Y, Tong XX. Simultaneous determination of salvianolic acid b, paeonol and tanshinol in Danxi granules by RP-HPLC[J]. *Food and Drug*, 2019, 21(4): 309-312.] DOI: 10.3969/j.issn.1672-979X.2019.04.014.
- 11 姜晓燕, 张琳, 窦志华, 等. 反相 HPLC 法同时测定丹参中 5 种成分含量 [J]. *医药导报*, 2016, 35(9): 997-1000. [Jiang XY, Zhang L, Dou ZH, et al. A simultaneous determination of five components in *Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae* by RP-HPLC[J]. *Herald of Medicine*, 2016, 35(9): 997-1000.] DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2016.09.023.
- 12 任正肖, 张颖颖. 丹酚酸 B 的化学成分及药理作用的研究进展 [J]. *山东化工*, 2019, 48(13): 74-75, 82. [Ren ZX, Zhang YY. Research progress on salvianolic acid B of the chemical composition and pharmacological effects[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2019, 48(13): 74-75, 82.] DOI: 10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2019.13.030.
- 13 魏西羽, 杨婷, 刘厚汝, 等. 丹酚酸 B 的药理作用研究进展 [J]. *药学研究*, 2021, 40(11): 748-752. [Wei XY, Yang T, Liu HR, et al. Research progress on pharmacological effects of salvianolic acid B[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2021, 40(11): 748-752.] DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2021.11.011.

收稿日期: 2022 年 08 月 12 日 修回日期: 2023 年 05 月 12 日
本文编辑: 周璐敏 钟巧妮