

祛风壮骨颗粒浓缩工艺及质量评价研究^{*}李昕沛¹ 吕琴琴^{1**} 刘建峰² 刘军锋² 段海洁¹ 张红²
梁文¹ 王吉利¹ 党秋萍²

(1. 西安市第五医院, 陕西 西安 710082; 2. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003)

摘要:目的 研究祛风壮骨颗粒浓缩干燥工艺及质量评价。方法 以淫羊藿苷为主要含量测定指标, 计算各工序步骤的转移率, 对祛风壮骨颗粒浓缩干燥工艺进行技术改进; 采用 TLC 法对祛风壮骨颗粒中的熟地黄、鸡血藤、骨碎补、淫羊藿(油炙)、莱菔子(炒)进行定性鉴别, 采用 HPLC 法对方中所含的淫羊藿苷进行含量测定。结果 减压浓缩淫羊藿苷转移率约 93.40%, 常压浓缩淫羊藿苷转移率约 70.75%, 减压干燥淫羊藿苷转移率约 80.81%, 常压干燥淫羊藿苷转移率约 78.79%; 本品薄层色谱鉴别方法简便、灵敏、专属性强, 阴性无干扰; 淫羊藿苷在 0.138~1.242 μg ($r=0.999$) 范围内具有良好的线性关系, 平均回收率为 98.1%, RSD 为 0.86%。结论 减压浓缩和减压干燥可以提高淫羊藿苷的转移率; 建立的定性、定量方法简便、准确, 专属性强, 可有效控制祛风壮骨颗粒的质量。

关键词:祛风壮骨颗粒; 淫羊藿苷; 浓缩; 干燥; TLC; HPLC; 质量评价

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2022)06-0110-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.06.021

祛风壮骨颗粒具有补肾、强筋骨、止痛的功效, 主要用于骨关节炎病、骨质增生、骨质疏松症。祛风壮骨颗粒原剂型为糖浆剂, 在临床上应用取得了较满意的疗效, 获得了患者的好评, 取得了较好的社会效益和经济效益, 是我院骨性关节炎临床治疗的重要制剂^[1-2]。该方由熟地黄、鹿衔草、鸡血藤、骨碎补、肉苁蓉(炙)、淫羊藿(油炙)、莱菔子(炒)七味药组成, 其中淫羊藿的特征性成分为淫羊藿苷, 现代药理研究表明淫羊藿苷具有抗衰老、抗肿瘤、补肾壮阳等功效, 能增加心脑血管血流量, 促进造血功能、增强免疫功能及骨代谢^[3]。本研究以淫羊藿苷含量为指标, 考察祛风壮骨颗粒大生产中常用的浓缩和干燥方式对淫羊藿苷的影响, 为大生产中的工艺优化提供参考。对熟地黄、鸡血藤、骨碎补、淫羊藿(油炙)、莱菔子(炒)进行薄层色谱鉴别, 并采用 HPLC 法对淫羊藿苷进行含量测定, 以有效控制本品的内在质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); OSB-2100 旋转蒸发器(上海爱朗仪器

有限公司); 电热鼓风干燥箱(北京科伟永鑫实验仪器设备厂); ZKF040 型真空干燥箱(上海实验仪器厂有限公司); Waters2695 高效液相色谱仪(美国沃特斯, 包括自动进样器, 四元泵, 柱温箱, 2489 紫外检测器); GB204 电子天平(瑞士梅特勒托利多); SHB-II 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); SB-3200D 超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 硅胶 G 薄层板(烟台江友硅胶开发有限公司); 硅胶 G(青岛海浪硅胶干燥剂厂, 批号: 111101); 硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(烟台江友硅胶开发有限公司); 甲醇、乙腈(Fisher 公司, 色谱纯)。

1.2 试剂 淫羊藿苷(中国食品药品检定研究院, 批号: 110737-200413); 柚皮苷(中国药品生物制品检定所, 批号: 110722-200610); 熟地黄对照药材(中国食品药品检定研究院, 批号: 121196-201105); 鸡血藤对照药材(中国药品生物制品检定所, 批号: 1173-200001); 骨碎补对照药材(中国药品生物制品检定所, 批号: 1169-200001); 莱菔子对照药材(中国药品生物制品检定所, 批号: 120928-201007); 祛风壮骨颗粒(医院制剂室自制,

* 基金项目: 陕西省中医管理局中医药项目(13-ZY002)

** 作者简介: 吕琴琴, 主任药师, 研究方向: 中药制剂研究。E-mail: lvqqin@126.com

批号:1105211、1105212、1105213)。

2 浓缩工艺

2.1 复方提取液的制备 按处方比例称取熟地黄 15 g,鹿衔草 10 g,鸡血藤 10 g,骨碎补 10 g,肉苁蓉(炙) 10 g,淫羊藿(油炙) 10 g,莱菔子(炒) 10 g,其中莱菔子用布包和其余六味,加水煎煮三次,第一次加 8 倍量水,煎煮 2.5 小时;第二、第三次加 6 倍量水,煎煮 1.5 小时,合并煎煮液,滤过,得复方提取液备用。

2.2 淫羊藿苷含量测定方法^[1]

2.2.1 对照品溶液配制 精密称取淫羊藿苷对照品 1.38 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密移取复方提取液 2 mL,加 60% 乙醇稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,摇匀,取上清液过滤即得。

2.2.3 色谱条件及系统适应性实验 色谱柱:SunFire C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈-水溶液(30:70),等度洗脱 7.5 min;流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 270 nm;进样量 10 μL;柱温 20 ℃。

2.2.4 线性范围考察 分别精密吸取“2.2.1”项下制备好的对照品溶液 1、3、5、7、9 μL,在“2.2.3”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,得对照品淫羊藿苷的回归方程为 $Y = 2 \times 10^6 X + 3002.4$, $r = 0.999$,在 0.138 ~ 1.242 μg 范围内峰面积与对照品质量浓度呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 1 份,连续重复进样 6 次,按“2.2.3”项下条件测定峰面积,结果淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 1.40%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 按“2.2.3”项下色谱条件测定峰面积,结果淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 1.71%,表明本品 12 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批处方量药材 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备,在“2.2.3”项下条件测定,结果淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 1.8%,表明本方法重复性好。

2.2.8 加样回收试验 称取处方量药材 6 份,每份加淫羊藿苷适量,按“2.2.2”项下方法制备,再

按“2.2.3”项下条件测定峰面积,计算回收率,淫羊藿苷的平均回收率为 98.5%,RSD 为 1.06%。

2.3 浓缩工艺的考察 将复方提取液平均分为 3 份,第一份不做处理,第二份置于旋转蒸发仪中 60 ℃ (-0.07 MPa ~ -0.08 MPa) 条件下浓缩到 60 mL,第三份置于 100 ℃ 水浴条件下浓缩到 60 mL,备用。分别取提取液适量,置 10 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇至刻度,摇匀,得供试品溶液,测定淫羊藿苷的含量,并计算淫羊藿苷的转移率(见表 1)。

表 1 浓缩条件考察结果表

组别	淫羊藿苷含量(%)	转移率(%)
浓缩前	0.0106	—
常压浓缩	0.0075	70.75
减压浓缩	0.0099	93.40

常用的浓缩方法包括常压浓缩和减压浓缩,常压浓缩由于操作时间较长,容易破坏成分,转移率比减压浓缩低,因此选用减压浓缩。

2.4 干燥工艺的考察 将上述减压浓缩的稠膏,分成 2 份,第一份置于 80 ℃ 电热鼓风干燥箱中干燥,第二份置于 60 ℃ 真空干燥箱中干燥,备用。取稠膏适量用 60% 乙醇溶解后,置 10 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇至刻度,摇匀,得供试品溶液,测定淫羊藿苷的含量,并计算淫羊藿苷的转移率(见表 2)。

表 2 干燥条件考察结果表

组别	淫羊藿苷含量(%)	转移率(%)
干燥前	0.0099	—
常压干燥	0.0078	78.79
减压干燥	0.0080	80.81

实验表明,在 60 ℃、-0.08 MPa ~ -0.09 MPa 条件下干燥较佳。

3 质量评价

3.1 鉴别

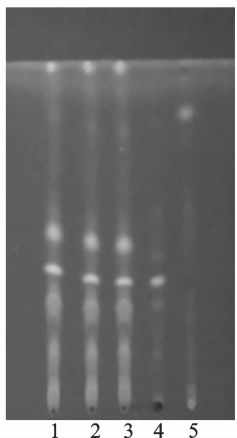
3.1.1 熟地黄的薄层鉴别^[1,4] 取本品 5 g,熟地黄对照药材 0.5 g 和熟地黄阴性样品 5 g,加 20 mL 乙醇超声提取 30 min,滤液蒸干后加 2 mL 甲醇溶解,分别制成供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照溶液。参照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述三种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(10:1)作为展开剂,展开,取出,晾干后在紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材薄层色谱相应的位置显相同颜色荧光斑点,阴性无干扰(见图 1)。



1,2,3-供试品溶液;4-熟地黄对照药材溶液;5-熟地黄阴性对照溶液

图 1 熟地黄薄层色谱图

3.1.2 鸡血藤的薄层鉴别^[1,5] 取本品 5 g,鸡血藤对照药材 0.5 g 和鸡血藤阴性样品 5 g,加水 50 mL 溶解后用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL,合并萃取液,蒸干后加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,制取供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照溶液。参照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述三种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂,展开,取出晾干,放入含浓氨水的展开缸中约 3 min 后取出,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材薄层色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,阴性无干扰(见图 2)。



1,2,3-供试品溶液;4-鸡血藤对照药材溶液;5-鸡血藤阴性对照溶液

图 2 鸡血藤薄层色谱图

3.1.3 骨碎补的鉴别^[1,6] 取本品 5 g,骨碎补对照药材 0.5 g 和骨碎补阴性样品 5 g,加 20 mL 乙醇,70 $^{\circ}$ C 水浴温浸 30 min,滤液蒸干,残渣加 2 mL 乙醇溶解,即得供试品溶液、对照药材溶液和阴性

对照溶液。另取柚皮苷对照品 0.1 g,加 2 mL 甲醇溶解,作为对照品溶液;参照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述三种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以水饱和正丁醇溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材和对照品薄层色谱相应位置上,显相同颜色荧光斑点,阴性无干扰(见图 3)。



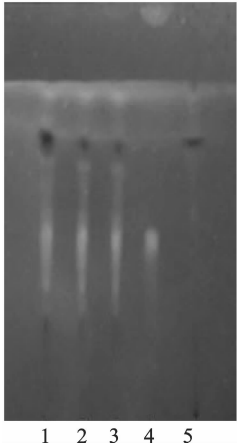
1,2,3-供试品溶液;4-骨碎补对照药材溶液;5-柚皮苷;6-骨碎补阴性对照溶液

图 3 骨碎补薄层色谱图

3.1.4 淫羊藿的鉴别^[1,7-8] 称取本品 5 g,淫羊藿阴性样品 5 g,加 50 mL 水溶解后用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL,合并萃取液,蒸干,残渣加 1 mL 乙酸乙酯溶解,制取供试品溶液、阴性对照溶液。另取淫羊藿苷对照品 0.1 g,加 2 mL 甲醇溶解,即得对照品溶液。参照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述三种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(6.5:3.5:1)10 $^{\circ}$ C 以下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,于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品薄层色谱相应位置显相同颜色荧光斑点,阴性无干扰(见图 4)。

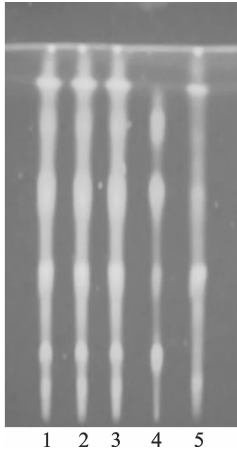
3.1.5 莱菔子的鉴别^[1,9] 取本品 5 g,对照药材 0.5 g 和阴性样品 5 g,加 20 mL 乙醇,70 $^{\circ}$ C 水浴温浸 30 min,滤液蒸干,残渣加 2 mL 乙醇溶解,制取供试品溶液,对照药材溶液和阴性对照溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述三种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯

甲烷-甲醇-水(6.5:3.5:1) 10 ℃ 以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出后晾干,置于有浓氨水的展开缸中约 3 min 后取出,在紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材薄层色谱相应位置显相同颜色荧光斑点,阴性无干扰(见图 5)。



1,2,3-供试品溶液;4-淫羊藿对照品溶液;5-淫羊藿阴性对照溶液

图 4 淫羊藿薄层色谱图



1,2,3-供试品溶液;4-莱菔子对照药材溶液;5-莱菔子阴性对照溶液

图 5 莱菔子薄层色谱图

3.2 含量测定

3.2.1 对照品溶液配制 精密称取淫羊藿苷 1.38 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

3.2.2 供试品溶液制备 取本品约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 乙醇 10 mL,密塞,摇匀,称定重量,超声处理 40 min,放至室温,再称重,用 60% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过即得。

3.2.3 色谱条件及系统适应性实验 色谱柱:

SunFire C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);柱温 20 ℃;流动相乙腈-水溶液(30:70),等度洗脱 7.5 min;流速 1 mL · min⁻¹;检测波长 270 nm;进样量 10 μL;对照品溶液和供试品溶液色谱图如图 6 所示。

3.2.4 线性范围考察 分别精密吸取对照品溶液 1、3、5、7 和 9 μL,按“3.2.3”项下色谱条件进样,测定峰面积。以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得淫羊藿苷回归方程 $Y = 2 \times 10^6 X + 3002.4$, $r = 0.999$,在 0.138 ~ 1.242 μg 范围内峰面积与对照品质量浓度呈良好线性关系。

3.2.5 精密度试验 取对照品溶液 1 份,连续重复进样 6 次,按“3.2.3”项下色谱条件测定峰面积,测得淫羊藿苷 RSD 为 1.3%,表明该仪器精密度良好。

3.2.6 稳定性试验 取“3.2.2”项下供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样,按“3.2.3”项下色谱条件测定,结果淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 1.2%,表明供试品溶液 12 h 内稳定性良好。

3.2.7 重复性试验 取同一批祛风壮骨颗粒 6 份,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.2.3”项下色谱条件测定,结果淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 2.0%,表明该方法重复性良好。

3.2.8 加样回收试验 称取同一批祛风壮骨颗粒 6 份约 0.50 g,精密称定,每份加已知量的淫羊藿苷,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,参照“3.2.3”项下色谱条件分别测定峰面积,计算回收率,结果淫羊藿苷的平均回收率为 98.1%,RSD 为 0.86%,结果见表 3。

表 3 加样回收试验结果

取样量(g)	制剂中淫羊藿苷含量(mg)	添加淫羊藿苷量(mg)	测得淫羊藿苷量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.5256	0.473	0.276	0.740	96.7	98.1	0.86
0.5081	0.484	0.276	0.755	98.2		
0.4910	0.474	0.276	0.748	99.3		
0.5299	0.482	0.276	0.752	97.8		
0.5148	0.471	0.276	0.743	98.6		
0.5066	0.470	0.276	0.741	98.2		

3.2.9 含量测定 称取 3 批祛风壮骨颗粒适量,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.2.3”

项下方法测定峰面积,计算祛风壮骨颗粒中淫羊藿苷的含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),结果见表 4。

由三批祛风壮骨颗粒含量测定结果可知,本品每批样品含淫羊藿苷较为均匀,表明产品质量稳定。

表 4 样品含量测定结果

样品批号	淫羊藿苷平均含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1105211	0.473
1105212	0.471
1105213	0.474

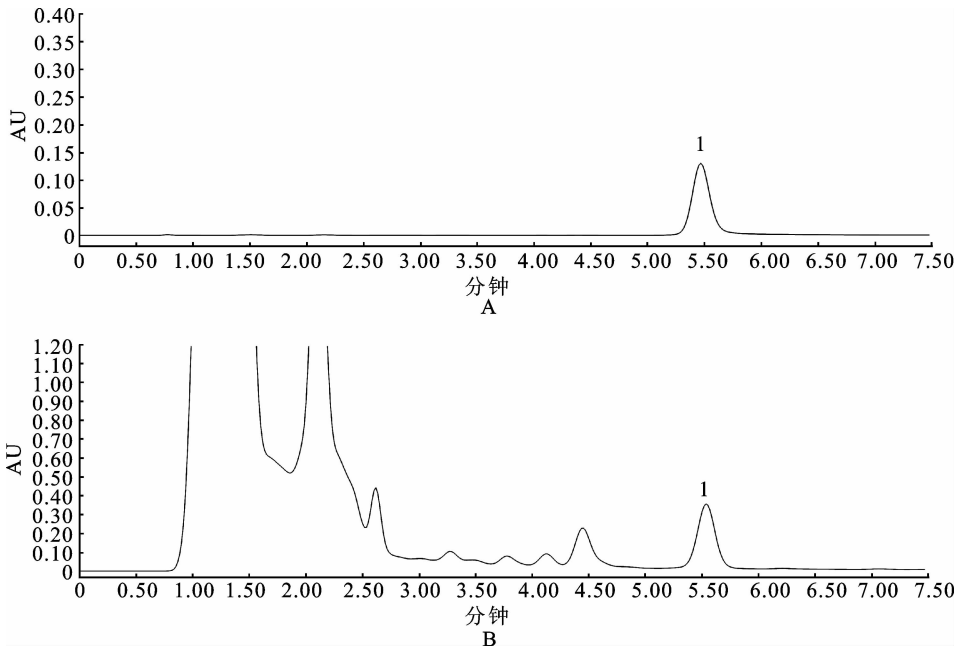


图 6 对照品及样品的高效液相色谱图

A. 淫羊藿苷高效液相色谱图;B. 祛风壮骨颗粒高效液相色谱图;1. 淫羊藿苷对照品

4 讨论

从表 1 和表 2 可见,减压浓缩、干燥时淫羊藿苷转移率高于常压浓缩、干燥,故采用减压浓缩、干燥法进行复方的浓缩及干燥有利于防止活性成分的损失。常压浓缩和常压干燥下,淫羊藿苷的转移率相对较低,可能是因为淫羊藿苷在温度较高的环境中不稳定造成的^[10],因此,为了确保活性成分最大限度的被保留,建议在合适温度条件下进行。

建立了 5 味中药材熟地黄、鸡血藤、骨碎补、淫羊藿(油炙)、莱菔子(炒)的 TLC 鉴别方法,该法简便,重现性好。采用 HPLC 法测定了祛风壮骨颗粒中淫羊藿苷的含量,该法准确灵敏、快速简便。本实验建立的薄层鉴别和含量测定方法可用于祛风壮骨颗粒的质量控制^[11-14]。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 黄肖华,喻辉. 膝骨关节炎发病机与中药专方治疗发展概况[J]. 贵阳中医学院学报,2014,36(5):51-52.

[3] 郭海玲,赵咏芳,王翔,等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖及 OPG 蛋白表达的实验研究[J]. 中国骨伤,2011,24(7):585-588.

[4] 欧阳露,李文强. 补肾化瘀颗粒的 TLC 定性研究[J]. 现

代中西医结合杂志,2012,21(36):4087-4088.

[5] 韦娟. 鸡血藤薄层鉴别方法改进[J]. 中国现代药物应用,2009,3(7):170.

[6] 邓莹,李宁,郭兴杰,等. 骨疏丹胶囊的薄层鉴别和含量测定[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(3):186-191,204.

[7] 李彩东,张伟,王信. 参芪心舒胶囊中 6 种药物的薄层鉴别[J]. 中国现代中药,2013,15(10):891-894.

[8] 龙卿,刘贺之,裴保香,等. 鹿羊乳癖康颗粒的薄层鉴别和淫羊藿苷含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志,2005,25(6):711-714.

[9] 陈丽,陈华. 胃肠宁片的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2011,20(23):19-20.

[10] 吴涛,徐俊昌,南开辉,等. 淫羊藿苷促进羊骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(19):3725-3729.

[11] 徐波,韩剑. 蠲痹抗生丸质量标准研究[J]. 中国中医药科技,2014,21(3):269-271.

[12] 刘湘豫,彭词艳,胡焰,等. 抗骨增生片制备工艺及质量标准研究[J]. 中南药学,2013,11(8):572-576.

[13] 刘会东,王新建,化宏伟. 舒筋定痛片质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(6):1448-1449.

[14] 舒毕琼,朱如彩,杨花朵,等. 骨松宝分散片的质量标准研究[J]. 中成药,2007,29(5):693-697.

(修回日期:2022-05-24 编辑:崔春利)