

藿芪灌注液质量标准研究^①

杨洪早^{1,2}, 王东升¹, 苗小楼¹, 张世栋¹, 董书伟¹,
闫宝琪¹, 桑梦琪¹, 那立冬^{1,2}, 严作廷¹

1. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所/中国农业部兽用药物创制重点实验室, 兰州 730050;

2. 甘肃农业大学 动物医学院, 兰州 730070

摘要: 目的 建立藿芪灌注液质量标准. 方法 采用薄层色谱法对方中淫羊藿、红花、丹参与益母草进行 TLC 定性鉴别; 使用 WondaSil C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈-水(28:72), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长 270 nm, 进样量 10 μ L, 流速 1.0 mL/min 测定淫羊藿苷的含量; 使用 ZORBAX SB-C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μ m), 漂移管温度为 90 $^{\circ}$ C, 载气流速为 2.5 L/min, 流动相: 甲醇-水(65:35), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 流速 1 mL/min, 用蒸发光散射检测器测定黄芪甲苷的含量. 结果 TLC 鉴别色谱图分离效果好, 阴性对照无干扰, 专属性强, 重复性好; 测定淫羊藿苷与黄芪甲苷含量表明, 分别在 2.336~58.4 μ g/mL ($r=0.999\ 9$) 和 0.047 8~0.478 mg/mL ($r=0.999\ 6$) 范围内与峰面积成较好的线性关系; 其平均加样回收率分别为 100.2%, $RSD=0.45\%$ 和 99.26%, $RSD=1.46\%$. 结论 所建立的特征图谱专属性强、准确可行、简便、可快速用于定性鉴别、定量检测, 可有效地用于该制剂的质量控制方法.

关键词: 藿芪灌注液; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 红花; 丹参; 益母草; 淫羊藿苷; 黄芪甲苷

中图分类号: S853.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)03-0001-09

藿芪灌注液是由淫羊藿、丹参、益母草等中药组成的子宫灌注剂, 其功能为催情助孕、益气壮阳、补血养阴, 在临床中运用于奶牛持久性黄体不孕症和卵巢静止^[1]. 已有研究表明, 该制剂工艺稳定可行^[2], 无刺激性^[3], 能增强动物发情调节作用, 提高雌孕激素受体基因的表达量和雌性小鼠机体雌激素水平^[4]. 为了控制本品的质量, 便于药效学研究, 本课题组采用薄层色谱法(TLC)对藿芪灌注液中的淫羊藿、丹参、红花和益母草等进行了鉴别, 用高效液相色谱法(HPLC)对本品中主要成分淫羊藿苷和黄芪甲苷进行了含量测定.

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20AD HPLC, SPD-20A 紫外检测器; LabSolutions 工作站, WondaSil C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)【岛津(中国)有限公司】; Agilent 1260 HPLC, Alltech ELSD2000ES 检测器; ChemStation 工作站和 CSChrom Plus 工作站, ZORBAX SB-C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μ m)(安捷伦科技有限公司).

1.2 试剂

淫羊藿苷、黄芪甲苷(均购自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号分别为 110737-200415,

① 收稿日期: 2017-06-02

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-LIHPS-03); “十二五”国家科技支撑计划重点课题(2012BAD12B03).

作者简介: 杨洪早(1992-), 男, 云南临沧人, 硕士研究生, 主要从事中兽药研究.

通信作者: 严作廷, 博士, 研究员, 博士研究生导师.

110781-200613); 藿苳灌注液(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制, 批号 20120801, 20120802, 20120803, 20120804, 20120805, 20120901, 20120902, 20120903, 20120904, 20120905); 乙腈、甲醇均为色谱纯(购自天津市四友精细化学品有限公司); 正丁醇、乙酸乙酯、丁酮、甲酸、乙醚、盐酸、硫氰酸铬铵和丙酮等试剂均为分析纯, 水为超纯水.

2 方法与结果

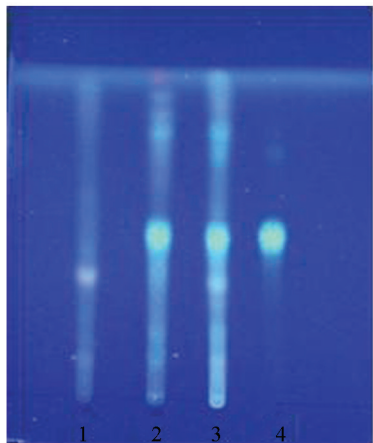
2.1 TLC 鉴别

2.1.1 淫羊藿

量取本品 10 mL, 蒸干; 残渣加 70%乙醇 30 mL, 用 1 h 进行超声, 过滤, 滤液蒸干; 用 30 mL 水溶解残渣, 振摇萃取 3 次(水饱和的正丁醇溶液作为溶剂), 每次 20 mL, 合并正丁醇萃取液; 洗涤 3 次(1%氢氧化钠溶液), 每次 20 mL, 弃去洗液; 再洗涤 2 次(正丁醇饱和的水溶液), 每次 15 mL, 蒸干正丁醇洗涤液, 用甲醇 1 mL 使残渣溶解, 作为供试液; 另取淫羊藿对照药材 1 g, 加 30 mL 70%乙醇, 用 1 h 进行超声, 过滤, 同样方法制成对照药材溶液; 再取对照品淫羊藿苷, 加甲醇制成 0.3 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液. 按照 0502 薄层色谱法试验, 吸取上述 3 种溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开剂为乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:1:1), 展开, 取出, 晾干, 喷显色剂(5%三氯化铝乙醇溶液), 加热 3 分钟(105 $^{\circ}$ C), 置紫外光灯(365 nm)下检视. 供试品、对照药材和对照品色谱在相应的位置上, 具有同种颜色的荧光斑点(图 1).

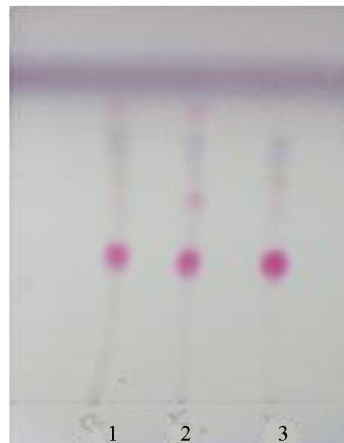
2.1.2 丹 参

量取本品 20 mL, 振摇提取 1 次(20 mL 水饱和的正丁醇溶液作为溶剂), 有机层弃去, 用稀盐酸调水层 pH 值至 2.0; 水层振摇提取 2 次(乙醚溶液), 每次 20 mL, 合并有机层, 挥干; 用 2 mL 甲醇使残渣溶解, 作为供试液. 取对照药材丹参 1 g, 加水 20 mL 并加热回流 1 h, 滤过, 滤液加水至 20 mL, 用同样方法制成对照液. 按照 0502 薄层色谱法试验, 吸取供试液 1 μ L、对照液 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开剂为甲苯-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(2:3:4:0.5:2), 展开, 取出, 晾干, 喷显色剂(含 5%香草醛的 10%硫酸乙醇溶液), 105 $^{\circ}$ C 加热显色至斑点清晰. 供试品与对照药材色谱在相应的位置上, 显同种颜色的斑点(图 2).



1. 阴性对照溶液; 2. 淫羊藿药材溶液;
3. 供试品溶液; 4. 对照品溶液.

图 1 淫羊藿 TLC 色谱图



1. 供试液; 2. 丹参药材溶液; 3. 对照液.

图 2 丹参 TLC 色谱图

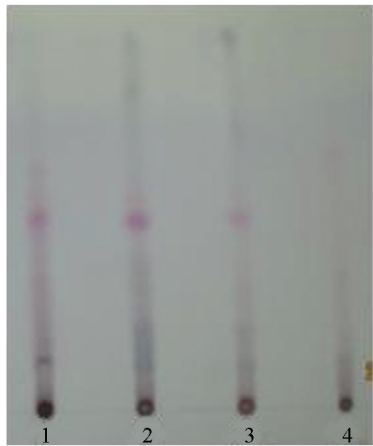
2.1.3 红 花

量取本品 20 mL, 振摇提取 3 次(水饱和正丁醇溶液作为溶剂), 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 蒸干; 加甲醇 5 mL 使残渣溶解, 将溶解液加入中性氧化铝柱(100~200 目, 4 g, 内径 1.5 cm), 用 20 mL 甲醇进行洗脱, 收集洗脱液, 蒸干; 加甲醇 4 mL 使残渣溶解, 作为供试液. 取不含红花药材的本品阴性对照

液, 按供试液同样方法制得阴性对照品溶液. 另取对照药材红花 1 g, 加水 200 mL, 加热回流 1 h, 过滤, 滤液浓缩至 20 mL, 同样方法制成对照液. 按照 0502 薄层色谱法试验, 吸取供试液 5 μ L, 对照液 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开剂为环己烷-乙酸乙酯(5 : 3), 展开, 取出, 晾干, 喷显色剂(含 5% 香草醛的 10% 硫酸乙醇溶液), 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰. 供试品与对照药材色谱在相应的位置上, 显同种颜色的斑点(图 3).

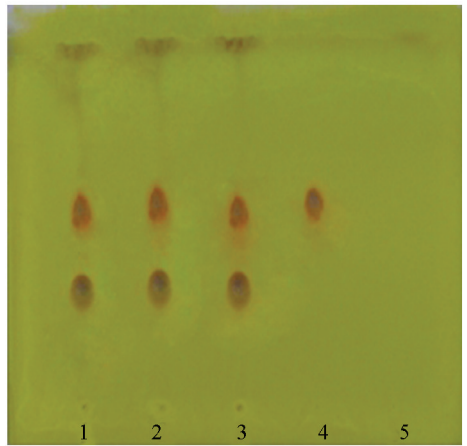
2.1.4 益母草

量取本品 10 mL, 加浓盐酸调 pH 值至 2.0, 离心除去沉淀, 少量水洗涤沉淀, 洗液合并入上清液; 上清液中加入新鲜配制的 2% 硫氰酸铬铵溶液 10 mL, 冰浴中放置 1 h 后离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀用少量冰水洗涤后, 加入 2 mL 丙酮溶解; 丙酮液中滴加 0.5% 硫酸银溶液 6 mL, 离心 10 min, 倾出上清液, 沉淀用少量丙酮洗涤; 合并洗液与上清液并浓缩至约 1 mL, 滴加 1% 氯化钡溶液 2 mL, 离心 10 min, 倾出上清液, 沉淀用 50% 乙醇洗涤; 合并上清液与洗液并蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 溶解, 作为供试液. 另取盐酸水苏碱对照品, 加无水乙醇制成 1 mL/mg 的溶液, 作为对照液. 取不含益母草药材的本品阴性对照液, 按供试液同样制得阴性对照品溶液. 按照 0502 薄层色谱法试验, 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, 展开剂为丙酮-无水乙醇-盐酸(10 : 6 : 1), 展开, 取出, 晾干, 105 $^{\circ}$ C 加热 15 min, 放冷, 喷显色剂(稀碘化铋钾试液-三氯化铁试液(10 : 1))至斑点显色清晰. 供试品与对照药材色谱在相应的位置上, 显同种颜色的斑点(图 4).



1. 供试液; 2. 红花药材溶液; 3. 对照液; 4. 阴性对照液.

图 3 红花 TLC 色谱图



1、2、3. 三批供试液; 4. 对照液; 5. 阴性对照液.

图 4 益母草 TLC 色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 淫羊藿苷

(1) 色谱条件

色谱柱: WondaSil C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈-水(28 : 72), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 270 nm, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 进样量: 10 μ L, 以淫羊藿苷计理论塔板数不低于 1 500.

(2) 样品溶液的制备

对照品溶液: 精密称取对照品淫羊藿苷 11.68 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 用色谱甲醇定容至刻度, 摇匀, 制得 233.6 μ g/mL 的对照品储备溶液. 精密移取储备液 5 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制得 116.8 μ g/mL 的对照液①, 吸取对照液① 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得质量浓度为 11.68 μ g/mL 的对照液②.

供试品溶液: 精密量取本品 1 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试液.

阴性对照溶液: 取按处方比例并以相同工艺制备的缺淫羊藿药材的阴性对照供试品, 按供试品溶液制备法制得阴性对照溶液.

(3) 专属性试验

取 2.2.1(2)项下对照品、供试品和阴性对照溶液,过 0.22 μ 有机微孔滤头于 1 mL 进样瓶中,密封,按照 HPLC 测定法并按 2.2.1(1)项色谱条件自动进样测定,每个样品进样 2 次,记录色谱图.在与淫羊藿苷对照品溶液色谱峰对应的位置上,供试品与其对照品保留时间一致,且与其他组分分离度大于 1.5;阴性对照溶液在对照品与供试液相应的保留时间内未检出色谱峰,表明样品中其他成分不干扰淫羊藿苷的测定.

(4) 线性关系考察

吸取对照液①1 mL 分别于 50 mL,25 mL,10 mL,5 mL,2 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成质量浓度分别为 2.336 μ g/mL,4.672 μ g/mL,11.68 μ g/mL,23.36 μ g/mL,58.4 μ g/mL 的对照品溶液.按上述色谱条件,对照品溶液依次进样 10 μ L,记录峰面积.纵坐标为峰面积,横坐标为对照品质量浓度,绘制标准曲线,得 $y=23\,054.98x+1\,386.77$, $r=0.999\,9$,表明淫羊藿苷对照品在 2.336~58.4 μ g/mL 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系.

(5) 定量限与检测限确定

精取对照品溶液,用甲醇逐级稀释定容,按上述色谱条件进样 10 μ L,记录色谱图.信噪比为 10:1 时测得淫羊藿苷定量限为 2.026 ng/mL,信噪比为 3:1 时测得检测限为 0.506 5 ng/mL.

(6) 重复性试验

按 2.2.1(2)项下供试品液制备法制备同一批次(批号:20120802)的供试品溶液 6 份,按上述色谱条件进样,记录峰面积并计算含量、RSD 值.得淫羊藿苷的含量均值为 0.232 mg/mL, $RSD=0.521\%$,表明本方法重复性良好.

(7) 精密度试验

(a) 日内精密度试验

取对照液②,按上述色谱条件重复进样 6 次,得淫羊藿苷平均峰面积为 277 594, $RSD=0.287\%$,结果表明日内精密度良好.

(b) 日间精密度试验

取对照液②10 μ L,按上述色谱条件连续 3 d 进样,每天重复进样 2 次.得淫羊藿苷平均峰面积为 275 099, $RSD=0.777\%$,结果表明日间精密度良好.

(8) 稳定性试验

精密量取供试液,在室温放置 0,1,2,3,6,9,12 h 后分次按上述色谱条件测定淫羊藿苷含量,计算 RSD.计算结果 7 次进样的淫羊藿苷含量平均值为 0.236 mg/mL, $RSD=0.969\%$ ($n=7$),表明供试液中淫羊藿苷的含量在 12 h 内保持稳定.

(9) 加样回收率试验

精密吸取同批次(批号:20120802)6 份已知含量的藿芪灌注液样品 1.0 mL,各精密加入 0.280 6 mg/mL 淫羊藿苷对照品溶液 1.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得加样回收供试液.按上述色谱条件测定淫羊藿苷含量并计算回收率和 RSD.其平均回收率为 100.2%, $RSD=0.45\%$,表明回收率良好(表 1).

表 1 淫羊藿苷加样回收率试验结果

序号	供试品量/ mg	对照品加入量/ mg	实测值/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
1	0.238 4	0.280 6	0.519 8	100.3	100.2	0.45
2	0.238 4	0.280 6	0.519 6	100.2		
3	0.238 4	0.280 6	0.520 1	100.4		
4	0.238 4	0.280 6	0.519 0	100.0		
5	0.238 4	0.280 6	0.521 6	100.9		
6	0.238 4	0.280 6	0.517 7	99.54		

注: $m=c\times v$;其中 m 为对照品加入量(mg); c 为对照品储备液质量浓度; v 为加入体积(mL).下同.

(10) 样品含量测定

分别取 10 批藿芪灌注液(批号 20120801, 20120802, 20120803, 20120804, 20120805, 20120901, 20120902, 20120903, 20120904, 20120905), 按 2.2.1(2)项供试液法每批次各平行制备 2 份供试液, 按色谱条件自动进样测定, 记录色谱图和峰面积, 并计算淫羊藿苷含量和 RSD 值. 得淫羊藿苷的平均含量为 0.242 mg/mL , $RSD=7.49\%$. 考虑到大规模生产中的各种损失和测量误差, 取其平均值的 80% 作为其含量限度, 即得 0.1936 mg/mL , 故暂定本品含淫羊藿按淫羊藿苷计不少于 0.20 mg/mL .

2.2.2 黄芪甲苷

(1) 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C18 柱($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 漂移管温度为 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 载气流速为 2.5 L/min , 流动相: 甲醇-水($65:35$), 流速: 1 mL/min , 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测用蒸发光散射检测器. 理论板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 3 000.

(2) 样品溶液的制备

对照品溶液: 精密称取对照品黄芪甲苷 11.95 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得 1.195 mg/mL 的对照品储备液, 精密量取对照品储备液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 0.239 mg/mL 的对照液.

供试品溶液: 精密量取本品 25 mL , 振摇提取 4 次(水饱和的正丁醇溶液作为溶剂), 每次 40 mL , 弃去水层, 合并正丁醇提取液; 洗涤 2 次(氨试液), 每次 25 mL , 弃去氨液, 取正丁醇液, 挥干溶剂, 用甲醇使残渣溶解并移至 5 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得.

阴性对照溶液: 取按处方比例并以相同工艺制备的缺黄芪的阴性对照供试品, 按供试品溶液制备法制备得阴性对照液.

(3) 专属性试验

取 2.2.2(2)项下对照品、供试品和阴性对照溶液, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机微孔滤头于 1 mL 进样瓶中, 密封, 按照 HPLC 测定法并按 2.2.2(1)项色谱条件自动进样测定, 每个样品进样 2 次, 记录色谱图. 在与黄芪甲苷对照品溶液色谱峰对应的位置上, 供试品与其对照品保留时间一致, 且与其他组分分离度大于 1.5; 阴性对照溶液在对照品与供试液相应的保留时间内未检出色谱峰, 表明样品中其他成分不干扰黄芪甲苷的测定.

(4) 线性关系考察

精密量取对照品储备溶液 1 mL , 1 mL , 1 mL , 2 mL , 分别于 25 mL , 10 mL , 5 mL , 5 mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 制成质量浓度分别为 0.0478 mg/mL , 0.1195 mg/mL , 0.239 mg/mL , 0.478 mg/mL 的对照品溶液. 按上述色谱条件, 对照品溶液依次进样 $10\text{ }\mu\text{L}$, 测定峰面积. 纵坐标用峰面积表示, 横坐标用对照品质量浓度表示, 绘制标准曲线. 得 $y=1.470\,039x+2.340\,902$, $r=0.999\,6$, 结果样品质量浓度在 $0.0478\sim 0.478\text{ mg/mL}$ 范围内, 峰面积线性关系良好.

(5) 定量限与检测限确定

精取对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 按上述色谱条件进样 $10\text{ }\mu\text{L}$, 记录色谱图. 信噪比为 $10:1$ 时测得黄芪甲苷定量限为 442 ng/mL , 信噪比为 $3:1$ 时测得检测限为 119.5 ng/mL .

(6) 重复性试验

按 2.2.2(2)项下供试品溶液制备法制备 6 份同批次样品(批号: 20120802), 按上述色谱条件进样, 记录峰面积, 并计算含量与 RSD 值. 测定得黄芪甲苷平均含量为 $84.31\text{ }\mu\text{g/mL}$, $RSD=1.97\%$, 表明该方法重复性良好.

(7) 精密度试验

(a) 日内精密度试验

取对照液, 按上述色谱条件重复进样 6 次. 结果供试液峰面积均值为 $516\,892.3$, $RSD=0.638\%$ ($n=6$), 表明仪器日内精密度良好.

(b) 日间精密度试验

取黄芪甲苷对照液和供试液,按上述色谱条件连续 3 d 进样,每天重复进样 2 次,记录峰面积并计算 *RSD*. 计算结果峰面积均值分别为 512 752.3,547 107.5, *RSD* 分别为 1.18%和 1.80%(*n*=6),表明仪器精密度良好.

(8) 稳定性试验

按 2.2.2 项下制备一份供试液(批号:20120802),将供试液分别于室温放置 0,1,2,3,5,8 h,精密吸取供试品溶液按上述色谱条件进样,测定黄芪甲苷含量并计算 *RSD*. 结果 6 次进样的黄芪甲苷含量平均为 56.52 μg/mL, *RSD*=0.926%(*n*=6),试验表明供试品溶液中黄芪甲苷的含量在 8 h 内保持稳定.

(9) 加样回收率试验

加样回收对照品液的制备:精密称定黄芪甲苷对照品 18.38 mg 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成 1.838 mg/mL 黄芪甲苷对照品储备液.

精密量取藁苳灌注液 25 mL,1.838 mg/mL 黄芪甲苷对照品储备液 1 mL,混匀,按 2.2.2 项供试液制备法制备同批次 6 份(批号:20120802)供试液.按上述色谱条件进样,测定黄芪甲苷含量并计算回收率和 *RSD*. 黄芪甲苷平均回收率为 99.26%, *RSD*=1.46%,表明其回收率良好(表 2).

表 2 黄芪甲苷加样回收率试验结果

序号	供试品量/ μg	对照品加入量/ μg	实测值/ μg	回收率/ %	平均回收率/ %	<i>RSD</i> / %
1	2 099.75	1 838	3 925.427	99.33	99.26	1.46
2	2 099.75	1 838	3 927.837	99.46		
3	2 099.75	1 838	3 883.954	97.07		
4	2 099.75	1 838	3 917.878	98.92		
5	2 099.75	1 838	3 962.757	101.4		
6	2 099.75	1 838	3 922.400	99.16		

注: $m_1=c_1\times v_1$; 其中 m_1 为供试品量, c_1 为供试溶液质量浓度(μg/mL), v_1 为供试品取样量(mL).

(10) 样品含量测定

分别取 10 批藁苳灌注液样品(批号 20120801,20120802,20120803,20120804,20120805,20120901,20120902,20120903,20120904,20120905),按 2.2.2(2)项下供试品溶液的制备方法制备样品,按以上色谱条件测定含量. 结果 10 批样品中黄芪甲苷的平均含量为 64.653 μg/mL, *RSD*=8.68%. 考虑到大规模生产中的各种损失,取其平均值的 80%作为其含量限度,即得 45.55 μg/mL,故暂定本品黄芪按黄芪甲苷计不少于 45.0 μg/mL.

3 讨 论

3.1 待测含量组分选择

淫羊藿和黄芪被广泛应用于多种制剂之中,在本制剂中也是作为君药发挥其药效药理作用. 淫羊藿苷与黄芪甲苷分别为淫羊藿和黄芪的主要成分^[5],都发挥主要药理活性作用,同时中国药典对其含量标准也有规定,故对其进行方法学研究,对完善本品的质量标准具有十分重要的作用,也进一步控制了本品的内在质量,对临床药效的发挥具有更重要的意义.

3.2 色谱条件选择

淫羊藿与黄芪作为传统中医保健用药,定量检测方法已比较成熟,众多报道采用 HPLC 对淫羊藿苷和黄芪甲苷的检测方法基本一致^[6-10],但在此试验上,本课题组用新方法进行研究并得到了良好的结果.

本品参考中国兽药典淫羊藿苷含量测定方法进行研究,考察了柱温、流速、流动相比例及波长的选择. 改变柱温,供试品溶液中淫羊藿苷含量的 *RSD* 为 8.18%,说明柱温对淫羊藿苷含量测定有一定的影响;在柱温 40 ℃条件下,改变流速,供试品溶液中淫羊藿苷含量的 *RSD* 为 1.04%,说明在柱温 40 ℃条件下,改变流速对样品中淫羊藿苷的测定无影响. 因此,试验证明以流动相乙腈-水(28:72)、检测波长 270 nm、柱温 40 ℃、流速 1.0 mL/min 的色谱条件对淫羊藿苷的测定具有较强的专属性,能达到基线平衡、分离度较高、具有对称的峰形、阴性对照无干扰且缩短了分析时间,便于作为指纹图谱鉴别^[11].

黄芪甲苷作为黄芪的主要成分之一,仅在 200 nm 左右有弱的紫外末端吸收,因而用紫外检测器(VWD)操作比较困难,且噪音对结果影响较大,灵敏度也较低,故 HPLC-VWD 法一直未能广泛用于黄芪甲苷的测定^[12-13]。蒸发光散射检测(ELSD)由被分析物质颗粒的数量和大小决定光散射检测器的响应大小,而不受流动相溶剂的干扰,此种检测器可用于非挥发性成分的检测^[14]。本研究采用 HPLC-ELSD 法对黄芪甲苷进行含量测定,考察了流动相比比例、流速及温度的变化,两个供试液中黄芪甲苷含量的 RSD 分别为 1.77%,1.40%,说明测定条件小范围变动,对样品中黄芪甲苷含量的测定无影响。综合考虑,最终确定色谱条件为漂移管温度 90℃,载气流速 2.5 L/min,柱温:40℃,流动相:甲醇-水(65:35),流速:1 mL/min,其所测得结果灵敏度高、分离度良好、重现性好,是一种良好的黄芪甲苷测定方法^[15-16]。

3.3 优化供试液前处理方法

中药化学成分复杂多样,加之本制剂是由多种中药混煎而得,因此供试液前处理是目前中药制剂主要组分含量测定必不可缺的步骤。从本试验研究可以看出,供试液的前处理可能显著影响其成分含量测定的结果及薄层色谱的鉴别。因此,在研究中药制剂质量标准时,不仅要考虑待测指标的含量,还应考察前处理方法对测定结果的影响^[17-18]。

含淫羊藿制剂的前处理方法一般使用超声、回流及溶剂直接定容^[19]。由于本制剂为液体剂型,不存在被检成分能否完全溶出的问题,因此在供试液制备时首选操作简便的直接溶剂稀释法,使用了甲醇、乙腈及超纯水定容稀释^[20]。研究表明,取 1 mL 样品进行适当稀释后,在线性范围内可对该制剂中的淫羊藿苷进行准确检测,且用超纯水与甲醇、乙腈相比较,其淫羊藿苷含量无明显差距。故建立淫羊藿苷的含量测定方法,可直接用超纯水定容,其方法具有高效省时、成本低廉、结果准确、重现性好的优点。在 TLC 鉴别时同样采用了原液点板的方法,但置紫外灯下检查干扰性大,均无结果,故采取了有机溶剂萃取法,且在喷显色剂后再置紫外灯下观察,其结果均无干扰,重复性好,图谱分离度高。

黄芪有效成分的提取多采用高速离心、超声波微波、超临界 CO₂ 萃取、高速逆流等技术^[21],但在 HPLC 法中测定黄芪甲苷含量时,使用这些方法使其提取的成分太多,干扰性太大,故选取萃取的方法处理^[22]。使用多种萃取剂后,最后选择了水饱和的正丁醇,较其他萃取剂相比其出峰效果良好,含量稳定。在其他相同条件下进行了提取次数的优选,分别振摇提取 3,4,5 次,试验表明用供试品提取 3 次与 4 次、5 次有较大差异,而 4 次、5 次时黄芪甲苷含量无明显差异,故选择用水饱和的正丁醇溶液振摇提取 4 次。所用氨试液,主要为了除去制剂中的极性成分,减少杂质干扰,进而增加系统分离能力^[23]。将提取液蒸干再用甲醇溶解进样,对系统 ELSD 分解度较好,能更好地分离黄芪甲苷,所得到的黄芪甲苷含量也更加可观,故使用该方法能够有效控制本制剂中黄芪甲苷的含量,对制定其质量标准提供了一定的指导作用^[24]。

作为复方中药制剂的鉴别,应根据其药材化学成分,寻找简便快速并具有专属性较强的方法,才能起到有效控制质量的目的^[25]。鉴别本品处方中丹参时,经过与之前研究比较得出样品与药材采用正丁醇除杂,乙醚提取后,斑点更为明显,更适合丹参有效成分的提取,但斑点分散,故进行展开剂比例调整,其后发现供试品色谱中与药材色谱相对应的斑点会随着展开剂的变化同步移动,药材色谱中比供试品色谱上方多一个斑点,疑似在样品的制备过程中采用了醇沉和灭菌工艺致使有效成分被破坏,故改用样品的制备工艺处理丹参药材,以确定供试品溶液与药材溶液斑点是否为同一成分,并比较硅胶 GF₂₅₄ 薄层板与硅胶 G 薄层板展开效果。结果表明醇沉、灭菌对丹参药材成分影响较大,供试品色谱中只能与药材色谱有一个相应斑点对应,原因是经醇沉、灭菌后所致,故最终选定与药材色谱下方斑点相对应即可达到鉴别效果。

鉴别本品处方中红花时,比较不同提取方法制备的药材溶液,结果表明药材溶液需通过中性氧化铝柱或 D101 型大孔吸附树脂柱方可出现粉红色斑点^[26],但中性氧化铝柱的操作方法比大孔树脂柱简单、省时,显色效果也更清晰,故选择中性氧化铝柱方法为本试验最终方法。

鉴别本品处方中益母草时,参考中国药典、中国兽药典方法处理供试液,且尝试用了 732 型强酸性阳离子交换树脂柱^[27-28],其供试品溶液、对照药材溶液在与对照品溶液相同位置上出现相应斑点,但是背景

有点干扰,其色谱图分离度不高,有拖尾现象,经查阅文献及多次试验筛选最终确定将其药液调整 pH 值后用硫氰酸铬铵试液进行处理,再用丙酮、硫酸银及氯化钡溶液依次进行洗涤溶解等,其显色效果更加清晰,分离度高,阴性对照无干扰^[29-30]。

4 结 论

通过以上方法研究的验证结果表明:所建立的特征图谱专属性强、准确可行、简便,可快速用于定性鉴别及定量检测,可广泛用于该制剂的质量控制方法之中。

参考文献:

- [1] 李世宏,严作廷,王东升,等. 纯中药催情助孕液治疗奶牛卵巢性不孕症试验 [J]. 中兽医医药杂志, 2010, 25(6): 52—53.
- [2] 王东升,张世栋,李世宏,等. 正交试验法优化催情助孕液制备工艺 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(29): 75—78.
- [3] 王东升,张世栋,苗小楼,等. 霍芪灌注液局部刺激性试验 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 303—305.
- [4] 张世栋,王旭荣,杨 峰,等. 催情助孕液对小鼠雌、孕激素水平及其受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(7): 1127—1131.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典 2015 版一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [6] HAN S, XIE Y Y, WANG Y M, et al. Comparative Study on Chemical Quality of Main Species of Epimedium [J]. YaoXue XueBao, 2012, 47(4): 502—507.
- [7] 俞 吉,朱 瑞,董妍君,等. 骨疏灵颗粒不同配伍对淫羊藿苷含量的影响 [J]. 中国药房, 2016, 27(1): 79—81.
- [8] 张 军,林传俊. 淫羊藿苷的高效液相色谱检测方法探讨 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 3027—3028.
- [9] DING F F, DENG Y R, ZHANG X J, et al. Simultaneous Determination of Five Astragalosides in Astragali Radix and Jinqi Jiangtang Tablet by HPLC-ELSD [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(1): 156.
- [10] 刘源焕,农毅清,陈洪涛,等. 无糖型扶芳参芪口服液质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(12): 2912—2914.
- [11] 徐作刚,段 萍,茅向军,等. 金乌骨通胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(22): 8—10.
- [12] 韩 宵,朱 磊,闫春风,等. HPLC-ELSD 法测定益心舒片中黄芪甲苷含量 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(1): 35—37.
- [13] SU B R, DENG H M, MA H L, et al. Quality Evaluation of Astragali Radix Through Chemical Pattern Recognition of Fingerprint by HPLC-dAD-ELSD [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(19): 3319—3323.
- [14] CHEN H, ZHOU X, ZHAO Y, et al. HPLC-DAD-ELSD Combined Pharmacodynamics and Serum Medicinal Chemistry for Quality Assessment of Huangqi Granule [J]. PLOS ONE, 2015, 10(4): 1524—1529.
- [15] PEI C, WANG Z, JIMING J A, et al. Determination of Astragaloside IV of Eight area in Astragali Radix is by HPLC-ELSD Internal Standard Method [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(14): 986—990.
- [16] 杨洪早,苗小楼,张世栋,等. 霍芪灌注液中淫羊藿苷和黄芪甲苷稳定性试验研究 [J]. 中国兽药杂志, 2017, 53(1): 19—24.
- [17] 吴 佳,张正锋,胡娟娟. HPLC-ELSD 法同时测定参芪颗粒中 6 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(1): 68—73.
- [18] 苗小楼,王东升,张世栋,等. 丹翘灌注液中连翘苷的含量测定 [J]. 中兽医医药杂志, 2013, 34(6): 45—46.
- [19] 白 荣,龚小倩,邱海蕴,等. 反相高效液相色谱法测定心脉康合剂中淫羊藿苷含量 [J]. 中国药业, 2015, 24(24): 158—160.
- [20] 吴春丽,覃春苑,张俊霞,等. 菌渣中截短侧耳素含量的高效液相色谱法测定 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2009, 44(1): 178—180.
- [21] MU Lu-xia, ZHU L, ZHAO A H, et al. Study on Extraction and Purification of Polysaccharides from Astragalus Membranaceus [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(11): 15—21.
- [22] XIA G P, LIU P, HAN Y M. Determination of the Total Content of Astragaloside IV in Radix Astragali [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(3): 66—72.
- [23] 梁慧敏,欧 妮. 高效液相色谱-电喷雾检测器法测定贞芪扶正颗粒中黄芪甲苷含量 [J]. 中国药业, 2016, 25(5): 55—56.

[24] 王东升, 严作廷, 李世宏, 等. 中兽药成方制剂质量控制的思考 [J]. 动物医学进展, 2008, 13(2): 109—111.

[25] 王东升, 尚小飞, 苗小楼, 等. 产复康中 5 种中药的薄层色谱鉴别 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 19(3): 155—157.

[26] 苏 强, 倪 艳, 王瑞明, 等. 祛斑洁颜胶囊的薄层鉴别和黄芩苷的含量测定 [J]. 中成药, 2003, 25(1): 30—32.

[27] 吴 宁, 胡俊杰, 郑国华, 等. 益母妇宁胶囊的薄层色谱鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 121—125.

[28] 贾永艳, 陈 波, 田效志, 等. 产妇康颗粒质量标准研究 [J]. 中医学报, 2013, 28(3): 382—384.

[29] 秦永平, 毛兴荣, 梁茂植, 等. RP-HPLC 测定产妇安口服液水中水苏碱的含量 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(4): 288—290.

[30] 王秋珍. 益母草颗粒的质量控制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.

Study on the Quality Standard of Huoqi Perfusion

YANG Hong-zao^{1,2}, WANG Dong-sheng¹, MIAO Xiao-lou¹,
ZHANG Shi-dong¹, DONG Shu-wei¹, YAN Bao-qi¹,
SANG Meng-qi¹, NA Li-dong^{1,2}, YAN Zuo-ting¹

1. Lanzhou Institute of Animal Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/
Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Discovery, Ministry of Agriculture, Lanzhou 730050, China;
2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To establish the quality standard for Huoqi perfusion. Methods TLC was used for qualitative identification of *Epimedium*, *Carthamus tinctorius*, *Salvia miltiorrhiza* and *Leonuri herba*. The separation of icariin was achieved by a WondaSil-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with a mobile phase composed of acetonitrile-water (28 : 72), a detection wavelength of 270 nm, a column temperature of 40 °C, an injection volume of 10 μL and a flow rate of 1.0 mL/min. The separation of the astragaloside was achieved by a ZORBAX SB-C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with a drift tube temperature of 90 °C, a carrier gas flow rate of 2.5 L/min and a mobile phase composed of methanol-water (65 : 35). The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 40 °C, with an evaporative light scattering detector. Results The spots on TLC plates were clear without interference by the blank reference and with good specificity and repeatability. The linear ranges of icariin and astragaloside were obtained between 2.336—58.4 μg/mL ($r=0.999\ 97$) and 0.047 8—0.478 mg/mL ($r=0.999\ 6$), the recovery averaging 100.2% ($RSD=0.45\%$) and 99.26% ($RSD=1.46\%$), respectively. Conclusion The determination method reported in this paper is specific, accurate, feasible, simple and convenient, and can be used for the determination of the active ingredients of the preparation, which provides a reference value for the quality standard of the preparation.

Key words: Huoqi perfusion; TLC; HPLC; *Carthamus tinctorius*; *Salvia miltiorrhiza*; *Leonuri herba*; icariin; astragaloside

责任编辑 夏 娟

