

大黄廑虫丸动物药质量标志物的含量测定

吴丽¹, 付传奎¹, 张子蒙¹, 许珂嘉¹, 黄艳² (1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 安徽医科大学炎症免疫性疾病安徽省实验室, 安徽 合肥 230032)

摘要: **目的** 建立衍生化高效液相色谱(HPLC)法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法测定大黄廑虫丸7种动物药质量标志物的含量。**方法** 选取10批次市售大黄廑虫丸, 采用酸水解法、正己烷提取法, 提取其中的氨基酸和脂肪酸成分, 衍生化HPLC法测定谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸及色氨酸的含量, 衍生化GC-MS法测定油酸、亚油酸及硬脂酸的含量。**结果** 该方法经线性范围、加样回收率、精密度、稳定性和重复性等考察确证适合用于大黄廑虫丸中7种动物药质量标志物的测定。两种方法的加样回收率分别为99.17%~101.53%, 95.18%~98.07%; 精密度的RSD分别为1.22%~2.72%, 1.87%~2.92%; 稳定性的RSD分别为1.17%~2.48%, 1.58%~2.95%; 重复性的RSD分别为1.12%~1.68%, 1.20%~2.65%。**结论** 所建立的方法精密度、稳定性、重复性符合测定要求, 可用于大黄廑虫丸动物药质量标志物的含量测定。

关键词: 大黄廑虫丸; 质量标志物; 高效液相色谱; 气相色谱-质谱联用

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1720-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.018

Determination of Quality Markers in *Dahuang Zhechong* Pills

WU Li¹, FU Chuankui¹, ZHANG Zimeng¹, XU Kejia¹, HUANG Yan² (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China; 2. Inflammation and Immune Mediated Diseases Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032 Anhui, China)

Abstract: **Objective** To establish a derivatization HPLC and GC-MS method for the determination of seven animal drug quality markers in *Dahuang Zhechong* pills (DHZCP). **Methods** Ten batches of commercial DHZCP were selected. Amino acids and fatty acids were extracted by acid hydrolysis and *n*-hexane extraction. The contents of glutamic acid, valine, leucine and tryptophan were determined by derivatization HPLC, and the contents of oleic acid, linoleic acid and stearic acid were determined by derivatization GC-MS. **Results** The linear ranges, recoveries, precisions, stabilities and reproducibility of the method were confirmed to be suitable for the determination of the above components in DHZCP. The recoveries were 99.17%–101.53%, 95.18%–98.07%, RSDs of precisions were 1.22%–2.72%, 1.87%–2.92%, RSDs of stabilities were 1.17%–2.48%, 1.58%–2.95%, RSDs of reproducibility were 1.12%–1.68%, 1.20%–2.65%. **Conclusion** The method has good precision, stability and repeatability, and can be used for the determination of quality markers of DHZCP.

Keywords: *Dahuang Zhechong* pills; quality marker; HPLC; GC-MS

《金匮要略》有云:“五劳极虚羸瘦,腹满不能饮食,食伤、忧伤、房事伤、饥伤、劳伤、经络荣卫气伤,内有干血,肌肤甲错,两目暗黑。缓中补虚,大黄廑虫丸主之”^[1]。大黄廑虫丸以大黄、廑虫

收稿日期: 2021-05-04

作者简介: 吴丽,女,博士,副教授,研究方向: 中药复方治疗慢性肝病机制及物质基础。Email: wuli@njucm.edu.cn。通信作者: 黄艳,女,博士,教授,研究方向: 中药治疗慢性肝病机制。Email: 839466463@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873287); 江苏省高校自然科学研究重点项目(18KJA360009); 安徽医科大学炎症免疫性疾病安徽省实验室开放课题(IMMDL202009)。

为君药,水蛭、虻虫、蛭螭、桃仁和干漆为臣药,佐以黄芩、白芍、苦杏仁和地黄,再加以甘草而制成。临床上,凡辨属五劳极虚,内有干血之证,均可应用该方治疗。近年来,该方的抗肝癌作用逐渐引起关注,被《中药新药治疗恶性肿瘤临床研究技术指导原则》推荐使用。所以有必要开展大黄廑虫丸的抗癌机制及物质基础研究。目前研究多集中于大黄中的蒽醌类成分、黄芩中的黄酮类成分、甘草中的三萜皂苷类成分^[2-4],但包括君药廑虫、臣药水蛭、虻虫、蛭螭等虫类药的有效成分及作用机制尚待进一步研究。历版《中国药典》所记载的大黄廑虫丸质量标准在不断提高,但含量测定项下仍仅关注植物药中的大黄素、大黄酚等成分,缺少与方中动物药相关的成分研究。在 2020 版《中国药典》也仅有君药廑虫的性状、显微鉴别及薄层鉴别^[12],不能全面评价其内在质量。多项研究^[5-11]表明,氨基酸、脂肪酸等化学成分是动物药发挥抗肿瘤作用的重要物质基础,其含量高低是影响药效的重要因素。本课题组前期在全面鉴定分析大黄廑虫丸化学成分基础上,利用“谱效相关”的研究方法,探讨了大黄廑虫丸抗肝癌作用的物质基础。预试验结果显示,处方动物药中的谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、色氨酸、油酸、亚油酸及硬脂酸含量高,且与整方的抗肝癌作用有关。本研究在建立上述物质检测方法的基础上,定量分析了 10 批市售大黄廑虫丸中 7 种动物药成分的含量,可为完善大黄廑虫丸的质量标准提供参考。

1 实验材料

1.1 仪器 Water E2695 高效液相色谱仪、Empower 色谱工作站、2998 紫外检测器(美国 Waters 公司);色谱柱:Kromasil 100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); ATY124 型分析天平(日本 SHIMADZU 公司); BT125D 型分析天平(德国 Sartorius 科学仪器有限公司); Millipore 超纯水仪(美国 Millipore 公司); HH 型数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)。Agilent 7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦科技有限公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 1736R 离心机(韩国 Gene 公司)。

1.2 试药与试剂 大黄廑虫丸来源见表 1。对照品谷氨酸(批号: G-002-171216)、缬氨酸(批号: X-056-171216)、亮氨酸(批号: L-037-171216)、色氨酸(批号: S-083-180408),纯度均大于 98.0%,成都瑞芬思生物科技有限公司;油酸(批号: Y-114)、亚

油酸(批号: Y-096),纯度>98%,成都瑞芬思生物科技有限公司;硬脂酸(批号: DS0255),纯度>98.0%,南京良纬生物科技有限公司。乙腈(美国 Tedia 公司);三乙胺(批号: C12029657)、异硫氰酸苯酯(批号: C11944155),均为色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司;甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);浓盐酸(批号: 20191023)、正己烷(批号: 20201125)、氢氧化钾(批号: 20201016)、硫酸(批号: 20191203),均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;无水硫酸钠(分析纯,西陇化工股份有限公司,批号: 141012)。

表 1 10 批大黄廑虫丸信息

Table 1 Information of 10 batches of DHZCP

编号	剂型	批号	生产商
S1	大蜜丸	20111043	广盛源中医药有限公司
S2	大蜜丸	17013417	北京同仁堂股份有限公司
S3	大蜜丸	4110005	天津中新药业集团股份有限公司
S4	小蜜丸	200701	西安正大制药有限公司
S5	水丸	2007042008	同药集团大同制药有限公司
S6	水丸	2004013	广盛源中医药有限公司
S7	水蜜丸	20030011	北京同仁堂股份有限公司
S8	水蜜丸	20191211	回春堂药业股份有限公司
S9	水蜜丸	20201004	广东恒诚制药有限公司
S10	水蜜丸	200802	江苏颐海药业

2 方法与结果

2.1 氨基酸类成分的含量测定

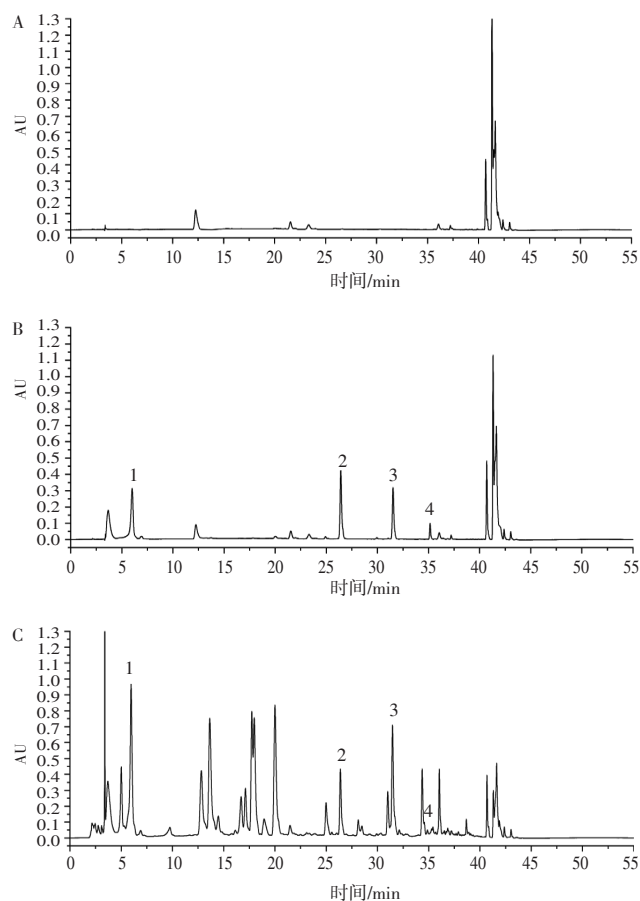
2.1.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil 100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A: 乙酸钠缓冲溶液(pH6.5)-乙腈(97:3), 流动相 B: 乙腈-水(4:1), 梯度洗脱(0~2 min, 100%A; 2~10 min, 100%~93%A; 10~30 min, 93%~70%A; 30~35 min, 70%~50%A; 35~40 min, 50%~0%A; 40~50 min, 0%~100%A; 50~55 min, 100%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35℃; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL。大黄廑虫丸 HPLC 色谱图见图 1。

2.1.2 供试品溶液制备及衍生化 称取大黄廑虫丸约 0.2 g, 精密称定, 置于 5 mL 西林瓶中, 加入 6 mol·L⁻¹ 盐酸水溶液 5 mL, 抽真空充氮气, 100℃水解 6 h。精确移取 2 mL 过滤好的上清液, 蒸发皿中蒸干, 残渣加入 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸水溶液 3 mL 溶解, 制成供试品储备液。取 1 mL 供试品储备液于 5 mL 离心管中, 加入 1 mol·L⁻¹ 三乙胺乙腈溶液 0.5 mL, 并加入 0.1 mol·L⁻¹ 苯基异硫氰酸酯乙腈溶液 0.5 mL, 涡旋混匀 1 min, 35℃水浴加热反应 0.5 h, 待反应完全后

加入 2 mL 正己烷溶液, 涡旋 1 min; 静置沉淀 15 min, 取下层清液, 经 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后备用。

2.1.3 对照品溶液制备及衍生化 精密称量各个对照品, 分别加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液, 配制成单一对照品溶液(谷氨酸 3.272 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 缬氨酸 1.284 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 亮氨酸 1.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 色氨酸 0.262 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。各取 1 mL 单一对照品混合, 得混合对照品溶液, 按照 2.1.2 项下方法进行衍生化处理。

2.1.4 空白溶液制备及衍生化 取 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液 1 mL, 按照“2.1.2”项下方法进行衍生化处理。



注: A. 空白溶液; B. 混合标准品; C. 大黄廑虫丸。1. 谷氨酸; 2. 缬氨酸; 3. 亮氨酸; 4. 色氨酸

图1 大黄廑虫丸4种氨基酸的高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of 4 amino acids in DHZCP

2.1.5 线性关系考察 取“2.1.3”项下的混合对照品溶液 2 mL, 2 倍逐级稀释得系列混合对照品溶液。分别取上述各混合对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定。以质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 计算线性回归方程。结果表明, 各标准品在线性范围内线性关系良

好, 见表 2。

表 2 大黄廑虫丸 4 种氨基酸线性关系

Table 2 Linear relationships of 4 amino acids in DHZCP

成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
谷氨酸	$Y=30\ 235X+628.54$	0.999 7	25.57 ~ 818.13
缬氨酸	$Y=58\ 031X+160\ 161$	0.999 5	10.03 ~ 320.83
亮氨酸	$Y=53\ 801X-23\ 586$	0.999 8	7.97 ~ 255.00
色氨酸	$Y=48\ 314X-10\ 764$	1.000 0	2.04 ~ 65.40

2.1.6 精密度考察 取 S1 批次的大黄廑虫丸供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果显示各峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明仪器的精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取 S1 批次的大黄廑虫丸, 按“2.1.2”项平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样, 记录峰面积。结果显示各峰面积的 RSD 均小于 2%, 表明实验方法重复性良好。

2.1.8 稳定性实验 取 S1 批次的大黄廑虫丸供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录峰面积。结果显示各峰面积的 RSD 均小于 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取 S1 批次大黄廑虫丸约 0.1 g, 精密称定 6 份。分别精密加入相当量于样品含量的对照品, 按“2.1.2”项下制备方法, 按照“2.1.1”项下条件进样分析, 记录峰面积, 计算回收率和 RSD。结果平均回收率范围为 99% ~ 102%, RSD 均小于 3%。见表 3。

2.1.10 含量测定 取 10 个批次的大黄廑虫丸约 0.2 g, 精密称定, 每批次 2 份。按照“2.1.2”项下方法制备, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 每个批次平行 2 份。记录峰面积, 根据标准曲线计算 4 种氨基酸的含量。结果见表 4。

2.2 脂肪酸类成分的含量测定

2.2.1 GC-MS 色谱条件 气相色谱条件: 色谱柱为 Agilent19091S-433 石英毛细管柱(30 $\text{m}\times 0.2\ \text{mm}\times 0.25\ \mu\text{m}$); 升温程序: 起始温度 140 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 190 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min; 再以 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 210 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min; 最后以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 260 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。载气为高纯氮气, 载气流量为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 1 μL , 分流进样, 分流比为 10:1; 进样口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件: EI 离子源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$; 四极杆质量监测器, 温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 扫描

表 3 大黄廑虫丸 4 种氨基酸加样回收率试验结果($n=6$)

Table 3 Results of recovery tests in DHZCP($n=6$)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测定值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
谷氨酸	0.101 3	0.266 4	0.292 0	0.559 3	100.31	101.53	0.75
	0.100 1	0.263 3	0.292 0	0.559 6	101.47		
	0.099 6	0.262 0	0.292 0	0.559 8	101.99		
	0.100 1	0.263 3	0.292 0	0.559 8	101.54		
	0.099 4	0.261 4	0.292 0	0.561 0	102.60		
	0.100 2	0.263 6	0.292 0	0.559 3	101.27		
缬氨酸	0.101 3	0.117 7	0.116 0	0.230 1	96.90	99.25	2.97
	0.100 1	0.116 3	0.117 0	0.229 0	96.32		
	0.099 6	0.115 7	0.115 0	0.234 8	103.57		
	0.100 1	0.116 3	0.116 0	0.235 0	102.33		
	0.099 4	0.115 5	0.116 0	0.229 2	98.02		
	0.100 2	0.116 4	0.116 0	0.230 6	98.45		
亮氨酸	0.101 3	0.216 7	0.213 0	0.428 1	99.25	99.17	1.26
	0.100 1	0.214 1	0.213 0	0.427 3	100.09		
	0.099 6	0.213 0	0.213 0	0.424 5	99.30		
	0.100 1	0.214 1	0.213 0	0.420 9	97.09		
	0.099 4	0.212 6	0.213 0	0.422 7	98.64		
	0.100 2	0.214 3	0.213 0	0.428 8	100.70		
色氨酸	0.101 3	0.017 8	0.017 0	0.034 3	97.06	100.73	2.11
	0.100 1	0.017 5	0.017 0	0.034 4	99.41		
	0.099 6	0.017 5	0.017 0	0.035 0	102.94		
	0.100 1	0.017 5	0.017 0	0.034 8	101.76		
	0.099 4	0.017 4	0.017 0	0.034 8	102.35		
	0.100 2	0.017 6	0.017 0	0.034 7	100.59		

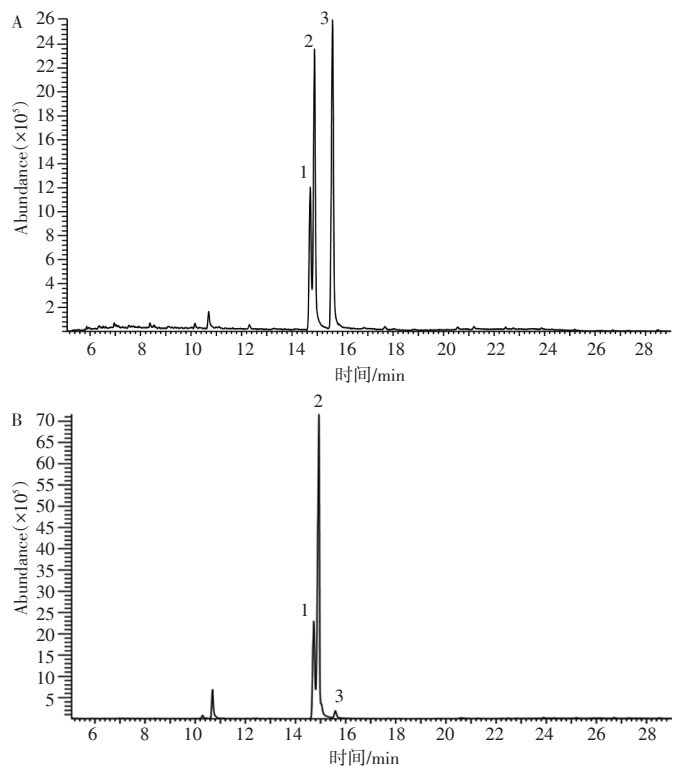
表 4 10 批大黄廑虫丸中 4 种氨基酸含量测定结果($n=4$)

Table 4 Quantitative analysis of 4 amino acids in DHZCP from 10 batches($n=4$)

批次	含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
	谷氨酸	缬氨酸	亮氨酸	色氨酸
S1	13.45	3.35	6.74	4.56
S2	13.21	3.02	6.35	4.45
S3	12.43	3.14	5.53	4.62
S4	14.35	3.45	5.48	4.63
S5	15.24	3.47	6.39	4.46
S6	13.65	3.56	7.21	4.55
S7	15.33	3.21	6.05	4.56
S8	14.26	3.05	5.34	4.47
S9	13.75	3.24	7.54	4.58
S10	14.32	3.55	6.32	4.53

范围(m/z): 40~500 amu; 溶剂延迟 5 min; 载气为氦气(纯度 99.999%)。大黄廑虫丸的 3 种脂肪的总离子流图见图 2。

2.2.2 供试品溶液制备及衍生化 称取大黄廑虫丸粉



注: A. 混合标准品; B. 大黄廑虫丸。1. 亚油酸; 2. 油酸; 3. 硬脂酸

图 2 大黄廑虫丸 3 种脂肪酸总离子流色谱图

Figure 2 TIC of 3 fatty acids in DHZCP

末(剪碎、研磨成粉)约 2 g, 精密称定, 置于锥形瓶中; 加入 20 mL 正己烷, 静置 30 min 后, 超声 40 min; 以 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液用旋转蒸发器回收正己烷, 得到脂肪油。精密称取样品脂肪油 0.2 g, 置具塞试管中, 加入 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH-甲醇溶液 5 mL, 摇匀, 于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中皂化 20 min, 至油滴全部消失。冷却后, 加入 5% 硫酸-甲醇溶液 5 mL, 于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酯化 15 min; 冷却后加入 5 mL 正己烷 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 min, 摇匀; 取出冷却至室温, 加入超纯水 5 mL, 振摇 4 min, 分液漏斗萃取; 正己烷层加入无水硫酸钠干燥后, 过 0.22 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液制备及衍生化 精密称量各个对照品, 分别加入正己烷, 配制成单一对照品溶液(亚油酸 7.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 油酸 17.66 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 硬脂酸 10.21 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。各取 1 mL 单一对照品溶液混合, 得混合对照品溶液, 并按照“2.2.2”项下方法进行衍生化处理, 得到甲酯化的对照品储备溶液。

2.2.4 线性关系考察 取“2.2.3”项下的对照品储备溶液 2 mL, 2 倍逐级稀释得系列混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下方法测定。以质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,

计算线性回归方程。结果表明,各标准品在线性范围内线性关系良好,见表5。

表5 大黄廑虫丸3种脂肪酸线性关系

Table 5 Linear relationships of 3 fatty acids in DHZCP

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
亚油酸	$Y=23\ 862X+10\ 000\ 000$	0.999 5	72.92 ~ 2 333.33
油酸	$Y=56\ 938X-40\ 000\ 000$	0.999 9	183.96 ~ 5 886.67
硬脂酸	$Y=45\ 838X-4\ 490\ 000$	0.999 4	106.35 ~ 3 403.33

2.2.5 精密度试验 取S1批次的大黄廑虫丸供试品溶液,按“2.2.1”项下方法连续进样6次,记录峰面积,计算RSD。结果显示各峰面积的RSD均小于3%,表明仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取S1批次的大黄廑虫丸,按“2.2.2”项平行制备6份供试品,按“2.2.1”项下方法进样,记录峰面积。结果显示各峰面积的RSD均小于3%,表明实验方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取S1批次的大黄廑虫丸供试品溶液,按“2.2.1”项下方法分别于0、2、4、8、12 h进样,记录峰面积。结果显示各峰面积的RSD均小于3%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取S1批次大黄廑虫丸约0.1 g,精密称定6份。分别精密加入相当量于样品含量的对照品,按照“2.2.2”方法制备,“2.2.1”项下方法进样,记录峰面积,计算回收率和RSD。平均回收率范围为97%~102%,RSD均小于2%。见表6。

2.2.9 含量测定 取10个批次的大黄廑虫丸约2 g,精密称定,每批次2份。按照“2.2.2”项下方法制备,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,每个批次平行2份。记录峰面积,根据标准曲线计算3种脂肪酸的含量。结果见表7。在大黄廑虫丸3种脂肪酸中,油酸含量相对较高,亚油酸次之,而硬脂酸含量相对较低。

3 讨论

本研究对大黄廑虫丸中动物药质量标志物进行了含量测定。

3.1 氨基酸检测条件考察

3.1.1 料液比考察 酸水解是氨基酸检测实验中的常用方法,但酸度过高易导致氨基酸成分破坏,因此,首先要考察料液比,以优化提取方法。分别称取样品粉末0.2 g、0.5 g置于西林瓶中,加入5 mL

表6 大黄廑虫丸3种脂肪酸加样回收率试验($n=6$)

Table 6 Results of recovery tests($n=6$)

成分	编号	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测定值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
亚油酸	1	1.002 3	35.212 4	35.212 0	70.131 2	98.17	98.07	0.76
	2	1.006 5	35.293 4	35.212 0	70.034 8	98.67		
	3	1.003 2	35.522 8	35.212 0	70.223 6	98.56		
	4	1.004 5	35.636 5	35.212 0	69.959 4	97.51		
	5	1.012 7	35.796 8	35.212 0	70.564 4	98.76		
	6	1.003 1	36.251 5	35.212 0	71.138 9	99.10		
油酸	1	1.002 3	85.904 9	85.905 0	166.561 9	93.89	95.18	1.67
	2	1.006 5	86.102 5	85.905 0	167.074 5	94.27		
	3	1.003 2	86.662 1	85.905 0	169.538 2	96.50		
	4	1.004 5	86.939 5	85.905 0	171.319 1	98.25		
	5	1.012 7	87.330 7	85.905 0	169.792 1	96.06		
	6	1.003 1	88.439 8	85.905 0	170.492 5	95.64		
硬脂酸	1	1.002 3	7.191 6	7.192 0	14.190 9	97.32	97.72	1.47
	2	1.006 5	7.208 1	7.192 0	14.186 4	97.04		
	3	1.003 2	7.255 0	7.192 0	14.218 4	96.85		
	4	1.004 5	7.278 2	7.192 0	14.312 3	97.83		
	5	1.012 7	7.310 9	7.192 0	14.568 2	100.89		
	6	1.003 1	7.403 8	7.192 0	14.576 2	99.74		

表7 10批大黄廑虫丸中脂肪酸含量测定结果($n=4$)

Table 7 Quantitative analysis of 3 fatty acids in DHZCP from 10 batches($n=4$)

批次	含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			批次	含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	亚油酸	油酸	硬脂酸		亚油酸	油酸	硬脂酸
S1	265.35	298.36	14.56	S6	245.36	356.45	12.98
S2	207.36	275.63	12.36	S7	201.36	347.21	14.32
S3	356.45	289.36	15.39	S8	278.69	289.74	14.79
S4	287.54	274.35	17.56	S9	245.31	321.56	15.68
S5	298.86	286.12	15.89	S10	325.69	277.54	17.56

盐酸水溶液($6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),按“2.1.2”项下方法制备供试品。结果表明,0.2 g大黄廑虫丸中加入5 mL盐酸水溶液即可达到各成分检测浓度,且提取效果较好,因此选择料液比为1:25开展后续实验。

3.1.2 水解温度及时间考察 水解温度及时间是影响水解效果及实验安全的重要因素。本实验考察了大黄廑虫丸在100℃下分别酸水解6、12 h后各氨基酸含量的差异。结果发现,酸水解6、12 h氨基酸含量无显著性差异,为保证水解完全及提取效率,最终确定水解条件为100℃下用 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸水解6 h。

3.2 脂肪酸检测条件考察

3.2.1 提取溶剂的选择 脂肪酸检测常选择极性较低的溶剂作为提取溶剂,正己烷和石油醚极性小,脂

肪酸成分在其中溶解度较高,且正己烷和石油醚毒性较小,作为溶剂容易去除,残留少,得率高,操作简单,成本低。因此,本实验考察了正己烷和石油醚对大黄廑虫丸中脂肪酸的提取效果。结果表明,使用正己烷的提取效果较好,峰形明显且分离效果好,因此在含量测定实验中选择正己烷作为提取溶剂。

3.2.2 升温程序的优化 在摸索分离条件时,发现硬脂酸与亚油酸和油酸的分离效果较好,但亚油酸与油酸不易分离。通过不断调节升温梯度及温度维持时间后,发现本实验所用升温程序能基本实现亚油酸、油酸和硬脂酸的分离,且缩短检测时间,保证峰形完美。

综上所述,本研究所建立的衍生化 HPLC、GC-MS 法,可用于测定大黄廑虫丸中 7 种动物药标志物含量,并利用该方法分析了 10 批不同来源、不同剂型大黄廑虫丸中动物药质量标志物的含量,方法重复性、稳定性良好,可为大黄廑虫丸的整体质量评价及临床用药提供参考。

参考文献:

- [1] 李可. 李可老中医急危重症疑难病经验: 专辑四[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2005: 126-129.
- [2] 郑婕. 葱醌类衍生物 C3 通过 ERK1/2-ERCC1 信号通路对结肠癌细胞

- 影响的研究[D]. 太原: 山西大学, 2019: 46-50.
- [3] 朱晓芹, 郑雅, 刘志强, 等. 半枝莲主要黄酮类成分抗癌协同机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(9): 1037-1044.
- [4] 项振锋, 许清遥, 程宏, 等. 微波辐射预处理提取细风轮菜三萜皂苷工艺及生物活性研究[J]. 丽水学院学报, 2020, 42(2): 24-32.
- [5] 王亮, 张林凡, 何玉琼, 等. 动物药中氨基酸药理活性及含量研究概况[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(2): 165-169.
- [6] 房凤玲, 丁劲松. L-谷氨酸的胃肠道保护作用机制及药物开发[J]. 药科学报, 2017, 52(4): 517-523.
- [7] 舒奕, 臧佳辰, 郭艾, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸分离纯化以及生理功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(14): 115-119.
- [8] 杨金伟, 张莹. 猫爪草提取部位及有效成分抗肿瘤作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 446-451.
- [9] 沈丹丹, 徐慧鲜, 邓国孙. n-3 多不饱和脂肪酸在食管癌细胞增殖和凋亡中的作用机制探讨[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(1): 22-26.
- [10] 宋亮, 邓有才, 李晓辉. 心脏脂肪酸代谢抑制在孕期炎症刺激致子代小鼠心脏损伤中的作用及机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10): 812.
- [11] 杨立刚. n-6/n-3 多不饱和脂肪酸比值对内皮细胞功能及氧化应激的作用及其机制研究[D]. 南京: 东南大学, 2017: 114-118.
- [12] 边学峰, 李晶峰, 金力群, 等. 对 2020 年版《中国药典》中动物药质量标准的商榷[J]. 吉林中医药, 2021, 41(6): 809-816.

(编辑: 梁进权)