

马霞, 张国祖, 张继臣, 等. 自拟催情微粉的质控及药效学研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 35-40.

MA X, ZHANG G Z, ZHANG J C, et al. Study on the quality standards and pharmacodynamics of self-formulated aphrodisiac micropowder [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 35-40.

自拟催情微粉的质控及药效学研究

马霞^{1,2}, 张国祖^{1,2}, 张继臣², 韩焯², 王林¹, 王兴涛¹,
马仲彬¹, 王德云³, 郭振环^{1,2*}

(1. 河南省康星药业股份有限公司, 河南 郑州 451464;

2. 河南牧业经济学院, 河南 郑州 450046;

3. 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在制定自拟催情微粉的质量标准并验证其促进生殖系统发育的药效学。采用薄层色谱法对样品中的当归、 α -香附酮进行鉴别; 采用高效液相色谱法对淫羊藿苷的含量进行测定; 采用小鼠子宫重量法测定自拟催情微粉的药效学。结果: 自拟催情微粉供试品的色谱中, 样品与当归、 α -香附酮对照品相应的位置上均显示相同颜色的斑点, 阴性对照品则无, 专属性强, 建立了当归、 α -香附酮的鉴别方法; 淫羊藿苷含量测定显示呈线性关系良好 ($R^2=0.9975$), 平均加样回收率为 98.87%, 10 批中试产品的淫羊藿苷平均含量为 0.15%, 将自拟催情微粉含量限度定为淫羊藿苷不得少于 0.12%; 与空白对照组比较, 每天给药自拟催情微粉 24、8 g/kg 剂量组可以显著提高小鼠子宫器官系数。综上, 建立的检测方法可行、稳定, 可用于自拟催情微粉的质量控制, 自拟催情微粉具有促进小鼠生殖系统发育的作用。

关键词: 自拟催情微粉; α -香附酮; 鉴别; 淫羊藿苷; 含量测定; 药效

中图分类号: S816 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)12-0035-06

Study on the quality standards and pharmacodynamics of self-formulated aphrodisiac micropowder

MA Xia^{1,2}, ZHANG Guozu^{1,2}, ZHANG Jichen², HAN Ye², WANG Lin¹, WANG Xingtao¹,
MA Zhongbin¹, WANG Deyun³, GUO Zhenhuan^{1,2*}

(1. Henan Kangxing Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 451464, China;

2. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study was to establish a quality standard of self-formulated aphrodisiac powder and verify its pharmacological effects in promoting reproductive system development. The thin layer chromatography method was used to determine the content of angelica sinensis and α -cyperone. The content of icariin was determined by High-performance liquid chromatography. And pharmacodynamics of self-formulated aphrodisiac powder was determined using the mouse uterine weight method. The results showed that, in chromatography, the test samples had the same color with angelica sinensis and α -cyperone, while the negative control samples did not. The content determination results showed that icariin had good linearity ($R^2=0.9975$), at an average recovery rate of 98.87%. The content of icariin in 10 batches was at an average of 0.15%. The content limit of icariin was no less than 0.12%. Compared with the blank control group, daily administration of micropowder at doses of 24 g/kg and 8 g/kg could significantly improve the uterine organ coefficient of mice. The results indicated that the detection method was accurate and reliable, and it could be used for the quality evaluation of self-formulated aphrodisiac powder. It had the effect of promoting the development of the reproductive system in mice. The established detection method was feasible and stable, and self-formulated aphrodisiac powder had the effect of promoting the development of the mouse reproductive system.

Keywords: self-formulated aphrodisiac micropowder; α -cyperone; identification; icariin; content determination

收稿日期: 2023-12-04; 修回日期: 2024-10-22

基金项目: 校企合作项目 (L6010036); 河南牧业经济学院兽医学重点学科项目 (XJXK202202)

第一作者: 马霞, 女, 博士, 教授

* 通信作者: 郭振环, 博士, 讲师, 研究方向: 中兽药新制剂的研究, E-mail: guozhenhuan126@126.com。

目前蛋鸡生产中的主要问题是产蛋性能低和蛋品质下降, 产蛋性能低通常表现为开产日龄推迟, 产蛋高峰期未达到预定指标或攀升时间较长、高峰期短^[1]。奶(母)牛发情周期停止循环导致牛出现乏情现象, 导致不发情, 延长了产犊间隔, 降低牛场经济效益。鉴于《中华人民共和国兽药典》2020年版二部中的收录方剂催情散剂型为散剂^[2], 该产品靶动物为猪, 且其中阳起石没有被中华人民共和国兽药典收载且无统一的质量标准, 使该方剂的标准化生产受到一定的限制。另外, 鉴于目前产蛋/奶期能使用的药物较少, 因此有必要对原药典方剂催情散进行二次开发, 研制畜禽用催情中药新制剂。

本试验在催情散基础上改进组方, 由淫羊藿、当归、香附组成, 并制备成微粉, 试验分别对制剂中 α -香附酮、当归的薄层鉴别, 对淫羊藿苷的含量测定以及对小鼠子宫增重率的影响进行了研究, 旨在为制定自拟催情微粉的质量标准以及后期药物药效确定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

自拟催情微粉样品由河南省康星药业股份有限公司生产, 全部过300目筛; 淫羊藿苷(批号: 110737-200415), α -香附酮(批号: 110712-201111), 当归对照药材(批号: 110773-201012)标准品购自中国药品生物制品检定所; 尼尔雌醇片购自上海新华联制药有限公司; 环己烷、甲醇、乙酸乙酯、乙醚、冰醋酸、二氯甲烷、无水乙醇均为分析纯均购自上海化学试剂有限公司试剂一厂; 色谱级乙腈购自天津市四友精细化学品有限公司; 硅胶GF254及硅胶G薄层板均购自青岛海洋化工有限公司。

1.2 当归样品的制备

《中华人民共和国兽药典》二部项下当归的称样量为0.2 g, 按照当归在自拟催情微粉中所占比例折算后确定自拟催情微粉的称样量为1.0 g, 乙醚浸泡10 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇1.0 mL使溶解, 作为供试品溶液。取当归对照药材0.2 g, 同法制成对照药材溶液。制备自拟催情微粉不含当归的阴性对照, 称取0.8 g, 按供试品溶液制备的步骤操作, 作为阴性对照溶液。

1.3 当归测定法

吸取上述溶液, 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, 置紫外灯(365 nm)下检视^[3]。

1.4 当归的薄层鉴定方法

分别吸取阴性对照品溶液及对照药材溶液各

10 μ L, 分别点板, 展开检视作为阴性干扰试验。分别吸取对照药材溶液1、5、10、15 μ L, 样品溶液10 μ L点板, 展开检视作为灵敏度检测试验。分别吸取对照药材溶液10 μ L, 同一样品溶液10 μ L 4份, 点板, 展开检视作为重复性试验。

1.5 香附样品的制备

取自拟催情微粉1.5 g, 加乙醚10 mL, 浸渍1 h, 时时振摇, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙酸乙酯0.5 mL使溶解, 作为供试品溶液^[4]。取 α -香附酮对照品, 加乙酸乙酯制成每1 mL含0.5 mg的溶液。按自拟催情微粉生产工艺制备不含香附的阴性对照, 称取1 g, 按供试品溶液制备的步骤操作, 作为阴性对照溶液。

1.6 香附测定法

样品分别点于同一硅胶GF254薄层板上, 以二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(80:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视。喷以二硝基苯肼试液, 放置片刻, 检视。

1.7 香附的薄层鉴定方法

分别吸取阴性对照品溶液10 μ L, α -香附酮5、10 μ L及样品1、2、4 μ L点板, 展开检视作为阴性干扰试验。分别吸取 α -香附酮1、2、4、8 μ L, 样品溶液2 μ L点板, 展开检视作为灵敏度检测试验。分别吸取 α -香附酮5 μ L, 同一样品溶液5 μ L 4份, 点板, 展开检视作为重复性试验。

1.8 淫羊藿苷含量测定的色谱行为

色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 柱温为30 $^{\circ}$ C, 乙腈-水(30:70)为流动相, 检测波长270 nm^[5]。理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于1500。精密称取淫羊藿苷对照品, 加甲醇制成1 mL含0.1 mg的对照品溶液。取自拟催情微粉约0.7 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇20 mL, 称定重量, 超声处理1 h, 再称定重量, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取滤液, 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。按照按自拟催情微粉生产工艺制备不含淫羊藿的样品, 按供试品溶液制备的步骤操作, 作为阴性对照溶液。精密吸取各溶液10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 测定即得。

1.9 淫羊藿苷线性关系考察

分别精密取对照品溶液2、5、8、10、12 μ L, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以对照品进样体积为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。

1.10 淫羊藿苷检测试验

精密试验取同浓度对照品溶液10 μ L, 连续进样6次测定峰面积, 计算平均峰面积和相对标准偏差

(*RSD*)。重复性试验取同一批样品重复6份按含量测定方法进行提取测定,计算含量及*RSD*。稳定性试验精密量取同一供试品溶液10 μL ,分别于1、3、6、9、12、24 h进样测定,计算平均含量和*RSD*。加样回收试验为精密称取已知含量的自拟催情微粉0.35 g(经计算其中淫羊藿苷含量为0.525 mg),共9份,每3份为1组,每组每份分别加入淫羊藿苷对照品0.42(80%加入量)、0.53(100%加入量)和0.63 mg(120%加入量),按供试品溶液的制备及样品测定项下操作,测定含量,计算回收率。回收率=(测得含量-已知含量)/加入对照品量 $\times 100\%$ 。

1.11 淫羊藿苷样品测定

精密吸取10批供试品溶液10 μL ,注入液相色谱仪测定,计算淫羊藿苷含量。

1.12 自拟催情微粉的药效学试验

出生20 d健康KM断乳雌性小鼠(体重9~12 g)购自郑州大学试验动物中心,合格证号SCXK(豫)2010-0002。试验期间饲喂小鼠全价饲料,室温控制在19~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为30%~70%。将小鼠按体重均衡和随机原则分组,每组15只,高、中、低试验组按照每天总量24、8、2.7 g/kg剂量灌胃(1 d内

分3次给药),阳性对照组每天总量1.7 mg/kg灌胃,空白对照组灌胃等体积生理盐水,连续3 d,第4天,各组小鼠称重后,脱颈椎处死,解剖摘取子宫称重,计算子宫器官系数^[6]。子宫器官系数=子宫重/体重 $\times 100\%$ 。

1.13 数据统计与分析

试验数据以“平均数 \pm 标准差”表示,用SPSS软件进行Duncan's多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 当归的薄层鉴别

供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,样品分离度较好,无当归阴性对照在对照品色谱相应的位置上没有斑点(图1A);检测灵敏度试验显示,各点样量的对照药材溶液均显清晰斑点(图1B);重复性试验结果显示,同一样品溶液重复点样,斑点大小显色一致(图1C)。研究表明,此方法阴性无干扰,检测灵敏度较高,重复性较好。

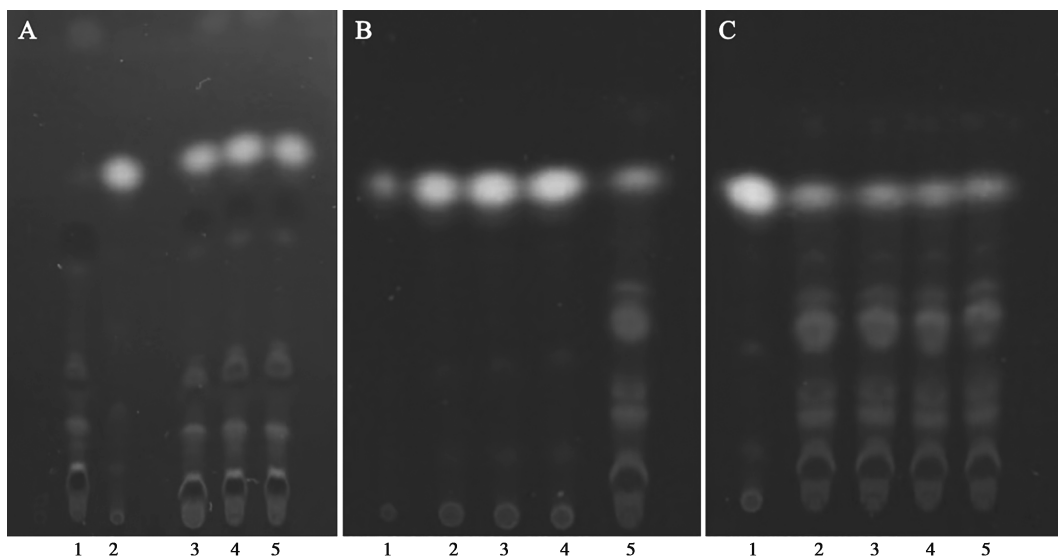


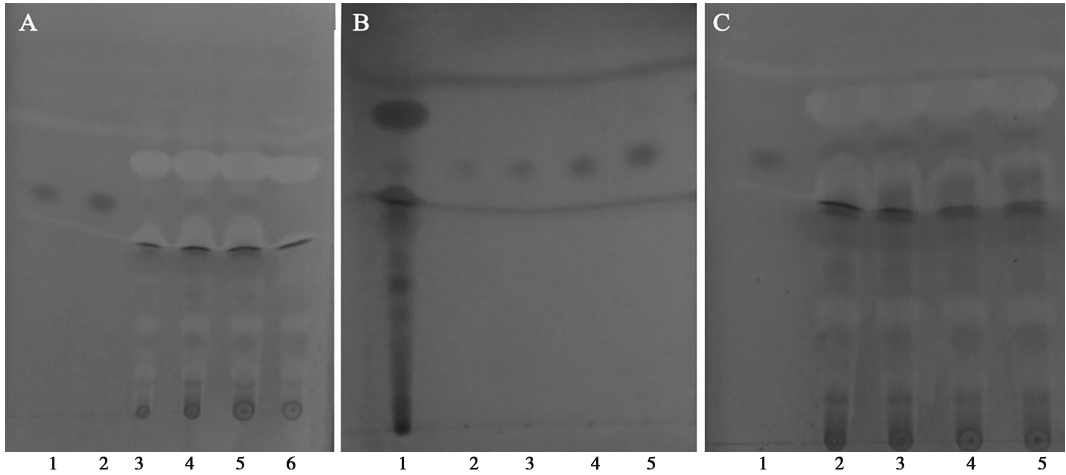
图1 当归鉴别的薄层色谱
A. 1为阴性对照,2为当归对照药材,3~5为自拟催情微粉样品;B. 1~4分别为当归对照药材1、5、10和15 μL ,5为自拟催情微粉样品;C. 1为当归对照药材,2~5为自拟催情微粉样品。

图1 当归鉴别的薄层色谱

2.2 香附的薄层鉴别

供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点。无香附阴性对照在对照品色谱相应的位置上没有斑点(图2A),各点样量的对照品溶液

均显清晰斑点,对照品5 μL 与样品4 μL 斑点相近,(图2B);重复性试验结果显示,同一样品溶液重复点样,斑点显色一致(图2C)。研究表明,此方法阴性无干扰,检测灵敏度较高,重复性较好。



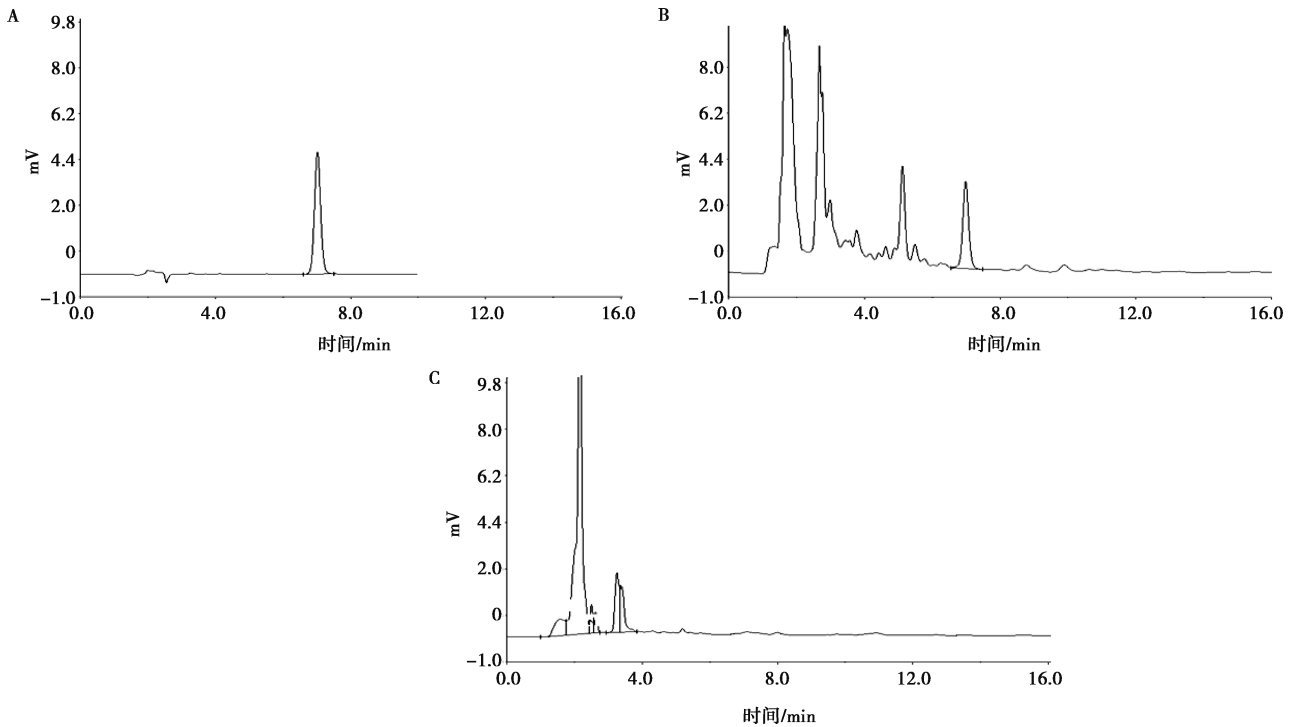
A. 1~2 分别为 α -香附酮 5、10 μL , 3~5 分别为自拟催情微粉样品 1、2、4 μL , 6 为阴性对照; B. 1 为自拟催情微粉样品, 2~5 分别为 α -香附酮 1、2、4 和 8 μL ; C. 1 为 α -香附酮对照品, 2~5 为自拟催情微粉样品。

图 2 香附鉴别的薄层色谱

2.3 淫羊藿苷色谱行为与线性关系

图 3 可见, 自拟催情微粉样品中淫羊藿苷分离完全, 峰形尖锐; 无淫羊藿阴性样品在此处无杂质峰干扰。

以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标回归方程为: $y=57.05x+9.51$ ($R^2=0.9975$), 结果表明进样量在 0.12~0.72 μg 范围内线性关系良好。



A. 淫羊藿苷对照品液相色谱; B. 自拟催情微粉样品; C. 无淫羊藿阴性对照。

图 3 淫羊藿苷含量测定高效液相色谱

2.4 淫羊藿苷的精密度

淫羊藿苷对照品溶液重复进样 6 次, 测得的峰面

积在 604.01~616.89 ($\text{mV} \cdot \text{s}$) 范围内, 平均峰面积为 611.29 ($\text{mV} \cdot \text{s}$), RSD 为 0.82%, 表明精密度

良好。

表1 精密度试验情况

对照品进样号	峰面积/ (mV·s)	平均峰面积/ (mV·s)	RSD/%
1	604.01	611.29±3.81	0.82
2	607.81		
3	610.65		
4	616.60		
5	611.81		
6	616.89		

2.5 淫羊藿苷的重复性

表2结果显示,淫羊藿苷平均含量为0.139%,RSD为0.82%,表明方法的重复性良好。

表2 重复性试验情况

样品进样号	峰面积/ (mV·s)	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	426.49	0.141	0.139	0.82
2	417.25	0.138		
3	420.47	0.139		
4	422.43	0.140		
5	420.65	0.139		
6	417.44	0.138		

2.6 淫羊藿苷的稳定性

表3结果所见,淫羊藿苷在1、3、6、9、12、24 h测定的含量RSD为1.12%,表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定。

表3 稳定性试验情况

进样时间/h	峰面积/ (mV·s)	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	420.47	0.139	0.138	1.12
3	420.40	0.139		
6	422.55	0.140		
9	413.41	0.137		
12	413.2	0.137		
24	409.98	0.136		

2.7 淫羊藿苷的加样回收

表4结果显示,淫羊藿苷平均回收率为98.87%。

表4 加样回收试验测定情况

试验号	理论量/ mg	加入量/ mg	应测量/ mg	实测量/ mg	回收率/ %	平均回收率/%
1				0.940	98.81	98.87
2		0.42	0.945	0.940	98.81	
3				0.938	98.33	
4		0.53	1.055	1.047	98.49	
5	0.525			1.047	98.49	
6				1.051	99.25	
7		0.63	1.155	1.151	99.36	
8				1.150	99.21	
9				1.149	99.05	

2.8 淫羊藿苷的样品含量

10批样品测定淫羊藿苷含量在0.13%~0.168%之间,总平均含量为0.15%。

2.9 自拟催情微粉药效

与空白对照组比较,自拟催情微粉高、中剂量组的子宫系数显著提高($P<0.05$),低剂量组子宫系数有所提高但差异不显著($P>0.05$);阳性对照组的子宫系数最大,显著高于自拟催情微粉高、中剂量组($P<0.05$) (表5)。

表5 自拟催情微粉对小鼠子宫重量的影响

组别	子宫器官系数/%
微粉高剂量	0.351±0.035 ^b
微粉中剂量	0.369±0.025 ^b
微粉低剂量	0.104±0.032 ^c
阳性对照	0.704±0.041 ^a
空白对照	0.086±0.007 ^c

注:同列数据不同字母上标表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

香附具有疏肝解郁、调经止痛的功效,有“气病之总司、女科之主帅”之称。有研究证实香附酮类挥发油为香附的主要药效活性成分^[7],并在良附丸七味葡萄散等复方中 α -香附酮为指标进行薄层鉴别研究^[8-9]。当归具有补血活血和调经止痛的功效,有“血中之气药”“补血之要药”“妇科之良药”等称号,在大七厘散、明目十六味丸等方剂中均采用薄层色谱法对当归进行定性鉴别研究^[10-11]。本试验中自拟催情微粉经过样品的前处理,当归与 α -香附酮成分可与其他成分有效分离开,并分别与当归对照药材、 α -香附酮对照品相同的位置上出现清晰的斑点,

两种薄层鉴别方法检测灵敏度较高,重复性较好,说明此法用于自拟催情微粉中 α -香附酮的鉴别是切实可行的。

淫羊藿具有温肾壮阳、强健筋骨及祛风湿等功效,其中淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分之一,能促进骨髓的造血功能和骨代谢,具有抗衰老、补肾壮阳、增强生殖功能等功效^[12-13]。也有研究报道淫羊藿苷能够显著升高肾阳虚小鼠的增重率,显著降低小鼠肾组织 NO 含量,降低氧化应激情况,改善小鼠体质^[14]。多数益肾成方中均采用淫羊藿苷含量作为中药方剂的质量监测指标^[15-16]。

本试验采用高效液相色谱法测定淫羊藿苷含量,结果表明此方法线性关系良好,阴性对照无干扰,重复性、回收率、精密度试验结果均良好,该方法可作为自拟催情微粉中淫羊藿苷含量测定。用此方法测得 10 批样品平均含量为 0.15%,考虑到药材产地来源、炮制加工、生产及贮存等因素,将质量要求在 10 批样平均含量基础上下降 20%,故暂定淫羊藿苷含量不得少于 0.12%。

子宫增重试验是一种筛选中药具有提高动物生殖系统机能或植物雌激素作用的重要方法。子宫质量的增加受到雌激素、孕激素和一些生物因子的调控^[17]。雌激素具有同化作用,可促进蛋白质合成,使子宫血管扩张,通透性改变,水摄取增加,从而子宫质量与体质量比值上升,因此常用子宫增重来考察药物是否具有雌激素样作用。在本试验中,自拟催情微粉具有提高雌性小鼠子宫系数的作用,表明其具有提高小鼠生殖机能的潜力。可能与方中淫羊藿具有补肾阳、当归补血养血、香附疏肝解郁等功效,均是调理生殖系统或妇科的常用药物,具有植物雌激素作用,是其发挥调理生殖系统机能的作用机理之一^[18]。

综上所述,本研究建立的自拟催情微粉中当归、 α -香附酮薄层色谱检测方法和淫羊藿苷的含量检测方法均无阴性干扰,稳定性重复性好,可有效地控制自拟催情微粉的质量。自拟催情微粉具有提高雌性小鼠子宫系数的药理作用,可以作为调节动物生殖系统

机能的药物开发。

参考文献:

- [1] 周帅帅,刘家言,赵鹏宇,等. 槲皮万寿菊素对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质、抗氧化和脂质沉积的影响 [J]. 中国饲料, 2023 (21): 27-35.
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 (二部) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 764.
- [3] 苏捷,杨贤海,付大清,等. 痹痛散的质量标准研究 [J]. 中医药导报, 2023, 29 (6): 51-54.
- [4] 媛媛. 柔肝养血丸质量标准的研究 [J]. 中国药物经济学, 2021, 16 (8): 111-115.
- [5] 祝清灿,孙宜春,罗倩,等. 提高黔淫羊藿的质量标准研究 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37 (6): 17-22.
- [6] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1539.
- [7] 宋晓,袁芮,许晶晶,等. HPLC 法比较 4 种醋香附中黄酮类成分含量研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45 (1): 120-124.
- [8] 包庆格乐吐,赵萨茹拉. 蒙药七味葡萄散中 α -香附酮薄层鉴别的探讨 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28 (3): 42-43.
- [9] 丁平,田友清. 对《中国药典》2010 年版一部含香附制剂质量控制的探讨 [J]. 中成药, 2015, 37 (8): 1862-1866.
- [10] 温馨,江耀伦,陈素珍,等. 大七厘散中大黄及当归薄层色谱鉴别方法改进 [J]. 中国药业, 2017, 26 (14): 7-9.
- [11] 娜仁图雅,包顺茹,韩塔娜,等. 明目十六味丸质量标准研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28 (5): 55-58.
- [12] 赵天池. 淫羊藿苷药理活性研究进展 [J]. 中国民康医学, 2021, 33 (12): 84-85.
- [13] 廖玉玲,莫镇涛,李文娜,等. 淫羊藿苷的药理学研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (8): 139-142.
- [14] 何丽君,张增弟,郑婉玉,等. 淫羊藿苷对肾阳虚小鼠肾保护作用的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (2): 236-240.
- [15] 程伟,赵群涛,裴罡,等. HPLC 法同时测定益肾汤中 7 种成分的含量 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37 (4): 40-44.
- [16] 曹宝帅,薛刚强,颜维民,等. 回春育子颗粒质量标准研究 [J]. 中国药业, 2022, 31 (1): 66-70.
- [17] 李旋旋,马红. 中药促子宫增重机制实验研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21 (8): 908-910.
- [18] 席思思,白文佩. 植物类药物治疗围绝经期综合征的研究进展 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2016, 17 (6): 574-576.