

# 牛黄上清微丸定性及定量分析

杨立新, 王锦玉\*, 仝燕, 刘岱, 李建荣, 王智民  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立牛黄上清微丸定性及定量分析方法。方法: 采用薄层色谱法对制剂中的人工牛黄、栀子、赤芍、连翘、黄连、黄柏、黄芩、大黄和冰片进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定制剂中的黄芩苷、大黄素和大黄酚的含量。结果: 薄层色谱显色清晰, 重复性好, 阴性对照无干扰; 黄芩苷线性范围为 0.091 6 ~ 0.916 0  $\mu\text{g}$ ,  $r=0.999 7$ , 回收率和 RSD 分别为 98.48% 和 2.05%; 大黄素线性范围为 0.034 ~ 0.272  $\mu\text{g}$ ,  $r=0.999 9$ , 回收率和 RSD 分别为 97.45% 和 2.16%; 大黄酚线性范围为 0.055 ~ 0.44  $\mu\text{g}$ ,  $r=0.999 9$ , 回收率和 RSD 分别为 98.55% 和 2.26%。结论: 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 牛黄上清微丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0069-05

牛黄上清微丸由人工牛黄, 栀子, 黄连, 黄柏, 黄芩, 大黄, 连翘, 赤芍, 冰片等 19 味药材组成。具有清热泻火、散风止痛之功效, 临床用于热毒内盛、风火上攻所致的头痛眩晕, 目赤耳鸣, 咽喉肿痛, 口舌生疮, 牙龈肿痛, 大便燥结<sup>[1]</sup>。方中黄芩、大黄具有清热燥湿, 泻火解毒, 泻热通肠, 凉血解毒的功效, 故选择黄芩中黄芩苷, 大黄中大黄素、大黄酚的功效成分作为牛黄上清微丸定量分析的质控指标, 采用高效液相色谱法进行含量测定。对制剂中的人工牛黄、栀子、赤芍、连翘、黄连、黄柏、黄芩、大黄和冰片进行定性鉴别。

## 1 仪器与试药

美国 HP1100 高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315A 二极管矩阵检测器及 HPCHEM 色谱工作站; Xtimate-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; 甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为高纯水; 对照品: 黄芩苷 (0715-9506)、大黄素 (756-8902)、大黄酚 (0796-9404)、胆酸 (078-9211)、猪去氧胆酸 (9304)、栀子苷 (0749-200007)、盐酸小檗碱对照品 (0713-9906)、连翘苷对照品 (821-9401)、芍药苷对照品

(0736-9811)、龙脑对照品 (881-200001)、人工牛黄对照药材 (1197-200101)、黄连对照药材 (0913-0301)、黄柏对照药材 (0937-20004)、黄芩对照药材 (0955-9904)、大黄对照药材 (902-9002)、连翘对照药材 (0908-0301) 均由中国药品生物制品检定所提供; 牛黄上清微丸。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层鉴别

**2.1.1 人工牛黄** 取牛黄上清微丸 4.5 g, 研细, 加三氯甲烷 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液, 另取人工牛黄对照药材 0.1 g, 同法制成对照药材溶液。再取胆酸、猪去氧胆酸对照品, 加乙醇制成每 1 mL 含 2 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以异辛烷-醋酸乙酯-冰醋酸 (15 : 7 : 5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105  $^{\circ}\text{C}$  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、对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

**2.1.2 赤芍** 取牛黄上清微丸 9 g, 研细, 加乙醇 50 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用乙醚提取 3 次, 每次 20 mL, 弃去乙醚液, 再用水饱和正丁醇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并提取液, 蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 拌入少许中性氧化铝, 水浴上拌匀干燥, 加于中性氧化铝柱 (100 ~ 200 目, 1 g, 内径约 10 mm) 顶部, 用甲醇 50 mL 洗脱, 收集洗脱液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为

[收稿日期] 20100705(004)

[基金项目] “重大新药创制” (2009ZX09301-005), (2009ZX09308-003)

[第一作者] 杨立新, 主管技师, 研究方向: 中药制剂分析, Tel: 13371753316

[通讯作者] \* 王锦玉, 助理研究员 研究方向: 中药新剂型, Tel: 13683284092, E-mail: dgzwjy@126.com

供试品溶液。另取芍药苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 2 种溶液各 4,2  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 自制薄层板上,以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40 5 10 0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝紫色斑点。

**2.1.3 栀子** 取 2.1.2 项下的供试品溶液,作为供试品溶液。另取栀子苷对照品加乙醇制成每 1 mL 含 4 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 2 种溶液各 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水(5 5 1 1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以硫酸乙醇(5 10)溶液,在 110  $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

**2.1.4 连翘** 取 2.1.2 项下的供试品溶液,作为供试品溶液。另取连翘对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。再取连翘苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法<sup>[2]</sup>试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液各 10  $\mu$ L,对照品溶液 2  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-冰醋酸(85 10 5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

**2.1.5 黄连、黄柏** 取牛黄上清微丸 2 g,研细,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取黄连、黄柏对照药材各 1 g,分别同法制成对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取供试品溶液 5  $\mu$ L,黄连、黄柏对照药材溶液各 1,5  $\mu$ L,对照品溶液 1  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓氨试液(6 3 1.5 1.5 0.5)为展开剂,展开箱一侧槽中加入展开剂,另槽加入展开剂等体积的浓氨试液,共同预平衡 15 min,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与黄连、黄柏对照药材色谱相应的位置上,显相同的两个黄色荧光斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同的黄色荧光斑点。

**2.1.6 黄芩** 取 2.1.5 项下的供试品溶液,作为供

试品溶液。另取黄芩对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。再取黄芩苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 1  $\mu$ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 36% 乙酸为展开剂,预平衡 20 min,展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的暗绿色斑点。

**2.1.7 大黄** 取牛黄上清微丸 2 g,研细,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,取滤液 5 mL,蒸干,加水 10 mL 使溶解,再加盐酸 1 mL,置水浴中加热 30 min,立即冷却,用乙醚分 2 次提取,每次 20 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取大黄对照药材 0.2 g,同法制成对照药材溶液。再取大黄酸对照品加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30 ~60  $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15 5 1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的 5 个橙黄色荧光主斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的橙黄色荧光斑点,置氨蒸气中熏后,日光下检视,斑点变为红色。

**2.1.8 冰片** 取牛黄上清微丸 1.5 g,研细,置圆底烧瓶中,加水 175 mL,连接挥发油测定器,自测定器上端加水使充满刻度,并溢流入烧瓶时为止,再加入乙酸乙酯 2 mL,回流 15 min,放置至室温,取乙酸乙酯层作为供试品溶液。另取冰片加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 10 mg 的溶液,作为对照药材溶液。再取龙脑对照品加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 1  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60 ~90  $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(9 1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 磷钼酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

## 2.2 黄芩苷含量测定

**2.2.1 色谱条件** 流动相甲醇-水-磷酸(45 55 0.2);检测波长 280 nm;流速 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,柱温 30  $^{\circ}$ C,理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 2 500。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 60 μg 的溶液, 即得。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取牛黄上清微丸适量, 研细, 取 0.2 g 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 20 kHz) 30 min, 放置至室温, 加 70% 乙醇溶

液补足减失的质量, 滤过, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 即得。

**2.2.4 空白试验** 按处方中药味比例, 自制不含黄芩的群药, 按其工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备并测定, 结果空白溶液在与黄芩苷对照品相同保留时间处未见明显色谱峰, 无干扰。见图 1。

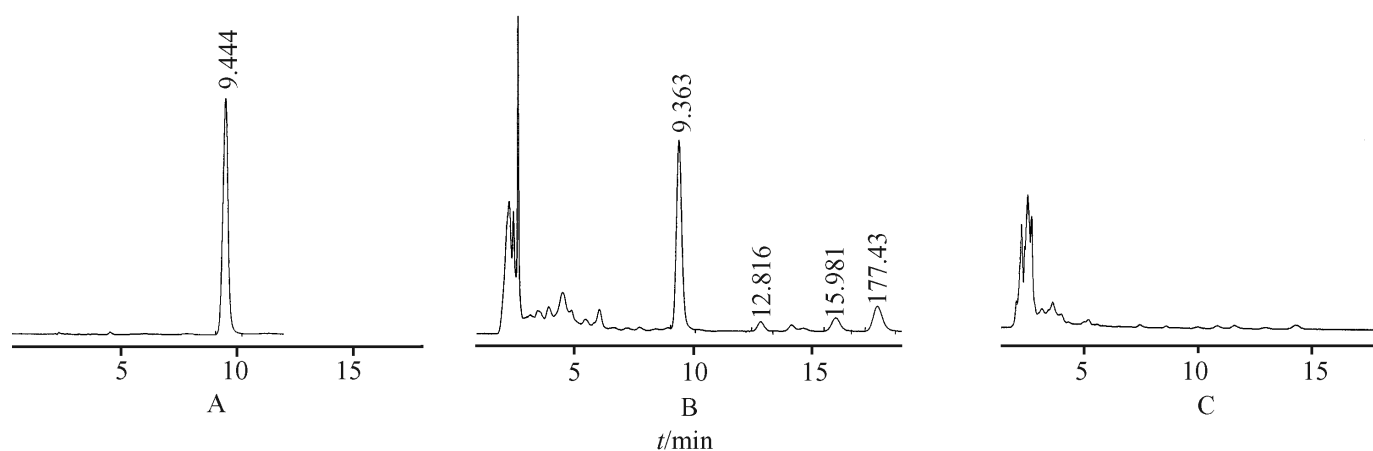


图 1 牛黄上清微丸中黄芩苷含量测定 HPLC

A 对照品; B 样品; C 缺黄芩空白样品

**2.2.5 线性关系考察** 取干燥至恒重的黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 91.6 μg 的溶液。分别精密吸取 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 注入液相色谱仪, 连续进样 2 次, 测定峰面积, 以对照品进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 黄芩苷在 0.091 6 ~0.916 0 μg 线性良好。其回归方程为  $Y = 0.672 6 + 2 974.367 9X$ ,  $r = 0.999 7$ 。

**2.2.6 精密度试验** 精密吸取供试品溶液, 重复进样 6 次, RSD 0.34%。

**2.2.7 重复性试验** 精密称取同一批号的供试品 6 份, 依 2.2.3 项方法制备, 测定结果 RSD 2.11%。

**2.2.8 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 5 μL, 分别于配制后 0, 1, 2, 4, 6, 24 h, 依法测定, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定, RSD 0.81%。

**2.2.9 加样回收率** 精密称取已知含量同一批号的牛黄上清微丸 0.1 g, 分别精密加入黄芩苷对照品溶液(30 mg·L<sup>-1</sup>) 各 50 mL, 按 2.2.3 方法制备, 依法测定, 结果见表 1。

**2.2.10 样品测定结果** 牛黄上清微丸依法制备, 测定, 结果 3 批中黄芩苷含量为 9.68, 10.88, 10.59 mg/袋。

## 2.3 大黄素和大黄酚

**2.3.1 色谱条件** 流动相甲醇-0.1% 磷酸(85

15); 检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温: 35 °C, 理论板数按大黄素及大黄酚峰计算应不低于 1 500。

表 1 黄芩苷回收率测定

取样量 /g	制剂中含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.126 8	1.227 4	1.500 0	2.702 5	98.34	98.48	2.05
0.121 9	1.180 0	1.500 0	2.706 9	101.79		
0.110 8	1.072 5	1.500 0	2.524 3	96.79		
0.110 8	1.072 5	1.500 0	2.538 3	97.72		
0.110 6	1.070 6	1.500 0	2.517 2	96.44		
0.112 7	1.090 9	1.500 0	2.587 9	99.80		

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取 110 °C 干燥至恒重的大黄素、大黄酚对照品各约 2 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取大黄素溶液、大黄酚溶液各 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取牛黄上清微丸适量, 研细, 取 0.4 g 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 20 kHz) 30 min, 放置至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 5 mL, 置 50 mL 锥形瓶中, 挥去甲醇, 加 2.5 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸 10 mL, 超声处理 5 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流

1 h, 冷却, 移至分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷液, 酸液用三氯甲烷提取 2 次, 每次约 8 mL, 合并三氯甲烷液, 以无水硫酸钠脱水, 三氯甲烷液蒸干, 残渣加甲醇定量转移至 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 即得。

**2.3.4 空白试验** 按处方中药味比例, 自制不含大黄的群药, 按其工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备并测定, 结果空白溶液在与大黄素和大黄酚对照品相同保留时间处未见明显色谱峰, 无干扰。见图 2。

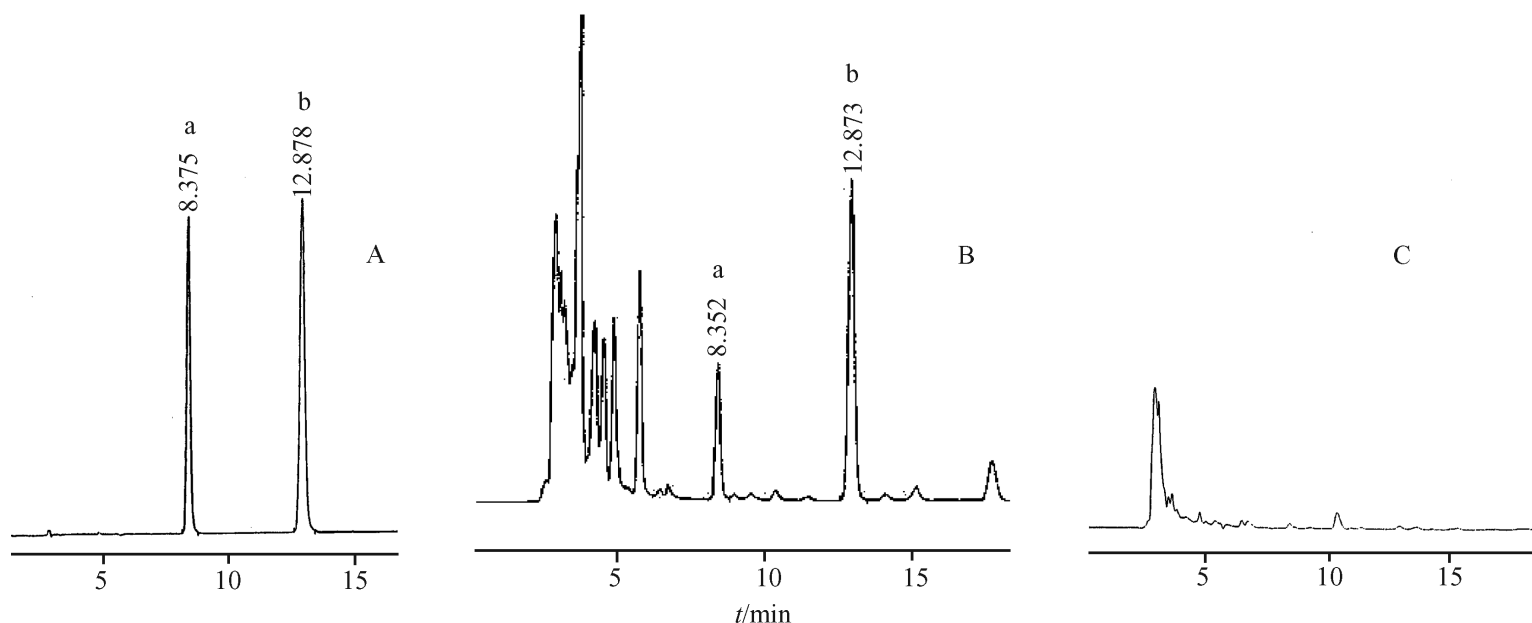


图 2 牛黄上清微丸中大黄素、大黄酚含量测定 HPLC

A. 对照品; B. 样品; C. 缺大黄空白样品; a. 大黄素; b. 大黄酚

**2.3.5 线性关系考察** 精密称取大黄素、大黄酚对照品 3.4, 5.5 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.034, 0.055 mg 的混合溶液, 精密吸取 1, 2, 4, 6, 8 μL 注入液相色谱仪, 连续进行 2 次, 测定峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 结果表明大黄素在 0.034 ~0.272 μg 之间呈一条直线; 大黄酚在 0.055 ~0.44 μg 呈线性。回归方程大黄素  $Y = 3403.4847X - 6.3808$ ,  $r = 0.9999$ ; 大黄酚  $Y = 3116.9244X - 12.0005$ ,  $r = 0.9999$ 。

**2.3.6 精密度试验** 精密吸取供试品溶液, 重复进样 6 次, 大黄素及大黄酚峰面积相对标准偏差分别为 0.32% 和 0.16%。

**2.3.7 重复性试验** 精密称取同一批号的供试品 6 份, 依 2.3.3 项方法制备, 测定结果, 大黄素和大黄酚的 RSD 分别为 2.44% 和 1.75%, 说明方法重复性良好。

**2.3.8 稳定性试验** 密吸取同一供试品溶液 5 μL, 分别于配制后 0, 1, 2, 4, 6, 24 h, 依法测定, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 大黄素和大黄酚的 RSD 分别为 1.92% 和 0.50%。

**2.3.9 加样回收率** 采用加样回收法, 精密称取已知含量同一批号的牛黄上清微丸约 0.2 g, 精密加入等量大黄素及大黄酚对照品溶液, 按 2.3.3 项下方

法制备, 依法测定, 结果见表 2, 3。

表 2 大黄素回收率测定

取样量 /g	制剂中含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.1977	0.0830	0.0890	0.1679	95.39	97.45	2.16
0.2021	0.0849	0.0890	0.1733	99.32		
0.1952	0.0820	0.0890	0.1682	96.85		
0.2000	0.0840	0.0890	0.1705	97.19		
0.2015	0.0846	0.0890	0.1695	95.39		
0.2011	0.0845	0.0890	0.1785	100.56		

表 3 大黄酚回收率测定

取样量 /g	制剂中含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.1977	0.2372	0.1900	0.4310	102.00	98.55	2.26
0.2021	0.2425	0.1900	0.4281	97.68		
0.1952	0.2342	0.1900	0.4230	99.36		
0.2000	0.2400	0.1900	0.4231	96.36		
0.2015	0.2418	0.1900	0.4246	96.21		
0.2011	0.2413	0.1900	0.4307	99.67		

**2.3.10 样品测定结果** 牛黄上清微丸依法制备, 测定, 结果 3 批中大黄素含量为 0.42, 0.45, 0.43 mg/袋, 大黄酚含量为 1.20, 1.18, 1.19 mg/袋。

### 3 讨论

牛黄上清微丸所含药味较多,除本实验已经鉴别的药味外,还进行了其他药味如薄荷、川芎、当归、甘草、菊花、桔梗、荆芥穗、白芷的鉴别研究,但都因空白试验有干扰而未列入质量标准。

牛黄上清微丸中人工牛黄为君药,本应选择人工牛黄中胆酸、胆红素作为人工牛黄上清微丸含量测定的质控指标,人工牛黄的部颁标准中胆酸、胆红素的含量测定均采用分光光度法,但因本方为复方制剂,用分光光度法测定其含量,空白有干扰,故又采用 HPLC 测定胆酸、胆红素,分别考察了 605 nm, 453 nm, 210 nm 不同的吸收波长,及甲醇-水(85

15)、甲醇-乙腈-1% 醋酸溶液(88 10 2)及甲醇-水(65 35)不同的流动相,均因有干扰,未达到满意的分离效果,最终只对人工牛黄中的有效成分进行了薄层鉴别。

含量测定试验中对不同提取方法(超声处理 30 min、加热回流 1 h、冷浸 24 h)及提取时间进行了比较研究,结果显示黄芩苷、大黄素及大黄酚超声提取 30min 即可提取完全并具有快速简便等优点。

#### [参考文献]

[1] 中国药典[S].一部.2010:378.

[责任编辑 仝燕]

(上接第 68 页)

### 3 讨论

比较加热回流提取<sup>[6]</sup>和超声处理提取<sup>[7]</sup>,在使用等量相同溶剂的基础上,分别将等量的样品用回流法和超声法提取相同时间后,测定橙皮苷含量,结果表明超声法提取法效果好,回收率高,且超声 50 min 已经能将样品中的橙皮苷提取完全,故将提取方法定为超声提取 50 min。

超声提取后的供试品溶液储藏在冰箱中冷藏 24 h 后,有结晶析出,此结晶溶于石油醚,样品经石油醚索式提取 2 h 后,弃去石油醚(除去挥发油),药渣挥干加甲醇再超声提取 50min,滤过,取续滤液进行测定,结晶对测定结果无影响。

#### [参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中药成方制剂

[S].卫生部药品标准,1989,1:33.

[2] 中国药典[S].一部.2005:132.

[3] 黄加龙,杨武亮,周道根.枳壳研究概况[J].食品与药品,2006,8(11A):1.

[4] 邓茂芳,潘燕.HPLC 测定四制香附丸中橙皮苷的含量[J].安徽医药,2005,9(3):206.

[5] 张小琼,何燕.HPLC 测定珍珠胃安丸中橙皮苷的含量[J].中成药,2006,28(3):447.

[6] 刘志红,马德平,朱瑞龙.HPLC 测定乳痛消 号中橙皮苷的含量[J].中成药,2003,25(3):244.

[7] 黄慧成.高效液相色谱法测定复方止咳化痰颗粒中橙皮苷的含量[J].江西中医学院学报,2001,13(4):179.

[责任编辑 顾雪竹]