

麝香牛黄丸质量标准研究

刘恩荔¹, 张美玉¹, 梁泰刚¹, 李青山^{1,2*}

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 山西省中医药现代工程技术研究中心, 太原 030001)

[摘要] 目的: 提高麝香牛黄丸的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对麝香牛黄丸中的防风、冰片、黄连、黄柏、金银花、当归进行定性鉴别, 并采用高效液相色谱法对大黄中的大黄素和大黄酚进行含量测定, 色谱柱为 Kromasil ODS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液 (75:25), 检测波长为 254 nm。结果: 防风、冰片、黄连、黄柏薄层色谱分离度好, 斑点清晰可见, 阴性无干扰; 大黄素和大黄酚含量分别在 0.041 8 ~ 0.209 0 μg, 0.075 9 ~ 0.379 2 μg 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.63% (RSD 2.94%, n=6), 99.63% (RSD 1.83%, n=6), 精密度 RSD 分别为 0.85%, 0.80%。结论: 该质量标准收录的方法结果准确, 重复性好, 可有效控制本品质量, 可作为该制剂的质量控制方法。

[关键词] 麝香牛黄丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 大黄素; 大黄酚

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0075-04

Studies on Quality Standard of Shexiang Niu Huang Pills

LIU En-Li¹, ZHANG Mei-yu¹, LIANG Tai-gang¹, LI Qing-shan^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Taiyuan 030001; 2. Shanxi Medical University, Shanxi Province Chinese Medicine Modern Engineering Technology Research Center, Shanxi Taiyuan 030001)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Shexiang Niu Huang pill. **Method:** *Angelica sinensis* Diels, *borneolum* Syntheticum, *Coptis chinensis* Franch and *Phellodendron chinense* Cortex were identified by TLC, The content of emodin and chrysophanol in Shexiang Niu Huang pill was determined by HPLC, The separation was performed on Kromasil ODS column with methanol -0.1% phosphoric acid (75:25) as mobile phase; The UV detector was set at 254 nm. **Result:** The spots in the TLC were clear and identified without the interference of negative control. The linear range of Emodin was 0.0418-0.2090 μg and which of Chrysophanol was 0.0759-0.3792 μg ($r=0.9999$). **Conclusion:** The average recovery of Emodin was 99.63% with RSD of 2.94% ($n=6$), and which of Chrysophanol was 99.63% with RSD of 1.83% ($n=6$).

[Key words] Shexiang Niu Huang pill; TLC; HPLC; emodin; chrysophanol

麝香牛黄丸收载于中药部颁标准十三册 (WS3-B-2646-97), 由牛黄、麝香、防风、赤芍、黄连、大黄、钩藤、连翘、黄柏、栀子、金银花、麦冬、桔梗、当归、黄芩(煮)、甘草、石膏、雄黄、朱砂、冰片、薄荷脑等 21 味药组成, 具有清热解毒之功效。用于头晕目赤, 咽干咳嗽, 风火牙疼, 大便秘结。原标准仅收录了牛

黄、大黄 TLC 定性鉴别及朱砂中硫化汞含量测定方法, 标准尚不完善。为了提高质量标准, 加强对本品的质量控制, 本文对防风、当归、冰片、黄连、黄柏、金银花等进行了 TLC 定性鉴别, 并采用 HPLC 对大黄中大黄素、大黄酚的含量进行了测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (依利特 P200); 紫外-可见分光光度计 (日本岛津 UV-2450 型)。

1.2 试剂与药品 甲醇为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯, 大黄素 (含量测定用, 批号 6015504) 和大黄酚对照品 (含量测定用, 批号

[收稿日期] 20100111(001)

[通讯作者] * 李青山, 教授, 博士生导师, 研究方向天然药物化学, Tel: 0351-4690322, E-mail: qingshanli@yahoo.com.cn

110796-200514)、防风对照药材(批号 20050301)、当归(批号 0927-9705)、冰片(批号 743-8902)、黄连(批号 110715-200514)、黄柏(批号 121510200501)购于中国药品生物制品检定所。金银花(批号 121060-200303)、绿原酸对照品(批号 0753-200212)。

2 薄层色谱鉴别

2.1 防风的薄层色谱鉴别 取本品大蜜丸 6 g, 剪碎, 加硅藻土 4 g, 研匀, 加浓氨试液 1 mL, 三氯甲烷 20 mL, 加热回流 1 h, 取三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。再取防风对照药材 0.5 g, 同法制成对照药材溶液。另取除防风外的药味, 同法制成阴性样品溶液。照薄层色谱法^[1]试验, 吸取上述 3 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(10:1)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, 显相同颜色的斑点。阴性对照品则无此斑点。

2.2 连翘的薄层色谱鉴别 取本品大蜜丸 6 g, 剪碎, 加硅藻土 4 g, 研匀, 加水 20 mL, 加热回流 1 h, 趁热用纱布过滤, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 20 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取连翘对照药材 1 g, 加水 10 mL, 同法制成对照药材溶液。再取除连翘外的药味, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。照薄层色谱法^[1]试验, 吸取上述 3 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-乙酸乙酯-甲醇-酸(40:5:14:0.2)为展开剂, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇, 100 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰。在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。阴性对照品则无此斑点。

2.3 金银花的薄层色谱鉴别 取本品大蜜丸 6 g, 剪碎, 加硅藻土 4 g, 研匀, 加甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另金银花对照药材, 同法制成对照药材溶液; 取绿原酸对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取除金银花外的药味, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法^[1]试验, 吸取上述供试品溶液, 对照药材溶液、对照品溶液各 10 μ L, 阴性溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)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, 显相同颜色的主斑点, 缺金银花的阴性样品无干扰。

2.4 当归的薄层色谱鉴别 取本品大蜜丸 6 g, 剪碎, 加硅藻土 4 g, 研碎, 加甲醇 25 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 50 mL 使溶解, 再加盐酸 5 mL, 水浴加热 30 min, 立即冷却, 置分液漏斗中, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 挥干, 残渣加 1 mL 乙酸乙酯溶解, 作为供试品溶液。另取当归对照药材 0.5 g, 加甲醇 15 mL, 同法制成对照药材溶液。再取除当归外的药味, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。照薄层色谱法^[1]试验, 吸取上述供试品溶液 10 μ L, 对照品溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(6:1)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, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的主斑点。缺当归的阴性样品无干扰。

2.5 冰片的薄层色谱鉴别 取本品小蜜丸或大蜜丸 6 g, 剪碎, 加硅藻土适量 3 g, 研匀, 或取水蜜丸 4 g, 研碎, 加三氯甲烷 25 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 低温挥干, 加乙酸乙酯 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取冰片对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取除冰片外的药味, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。照薄层色谱法^[1]试验, 吸取供试品溶液、阴性溶液各 2 μ L, 对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(4:18:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 的香草醛硫酸溶液, 100 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的主斑点, 缺冰片的阴性样品无干扰。

2.6 黄连和黄柏的薄层色谱鉴别 取本品小蜜丸或大蜜丸 6 g, 剪碎, 水蜜丸 4 g, 研碎, 加甲醇 30 mL, 置水浴上加热回流 1h, 放冷, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另分别取黄连、黄柏对照药材, 同法分别制成对照药材溶液; 另取盐酸小檗碱对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取除黄连和黄柏外的药味, 加甲醇 20 mL, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。照薄层色谱法^[1]试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-醋酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓

氨试液(9 6 3 3 1)为展开剂,预饱和 15 min,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的一个黄色荧光斑点;在与黄连对照药材色谱相应位置上,显相同的 4 个黄色斑点;在与黄柏对照药材色谱相应位置上,显相同的 2 个黄色斑点。

3 大黄素和大黄酚的含量测定

3.1 供试溶液的制备 取质量差异项下的大蜜丸,剪碎,混匀。取大蜜丸 3 g,精密称取适量,置锥形瓶中,精密加乙醇 25 mL,密塞,称定质量,置水浴上加热回流 1 h,放冷,用乙醇补足减失的质量,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置烧瓶中,挥干溶剂,加 30%乙醇-盐酸(10 1)溶液 15 mL,置水浴中加热回流 1 h,立即冷却,三氯甲烷振摇提取 4 次,每次 15 mL,合并三氯甲烷液,回收溶剂,残渣用无水乙醇-乙酸乙酯(2 1)混合溶液溶解,移置 25 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

3.2 对照品溶液的制备 分别精密称取大黄素对照品和大黄酚对照品适量,加无水乙醇-乙酸乙酯(2 1)混合溶液制成每 1 mL 含大黄素 8 μg 、大黄酚 15 μg 的混合溶液,即得。

3.3 空白溶液的制备 取处方除大黄的全部药味,按成品工艺及供试品溶液的制备方法制备空白对照品溶液。

3.4 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱采用迪马 Kromasil ODS C_{18} (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm),能达基线分离;以 254 nm 作为检测波长;流动相以甲醇-0.1% 磷酸溶液(75 25)作为流动相,主峰保留时间适宜,主峰与其他色谱峰分离度大于 1.5,理论塔板数按大黄素计不得少于 3 000。

3.5 专属性试验 取处方除大黄的全部药味,按成品工艺及供试品溶液的制备方法制备空白对照品溶液,按正文拟定方法进行测定,结果表明阴性无干扰,本法专属性强,见图 1。

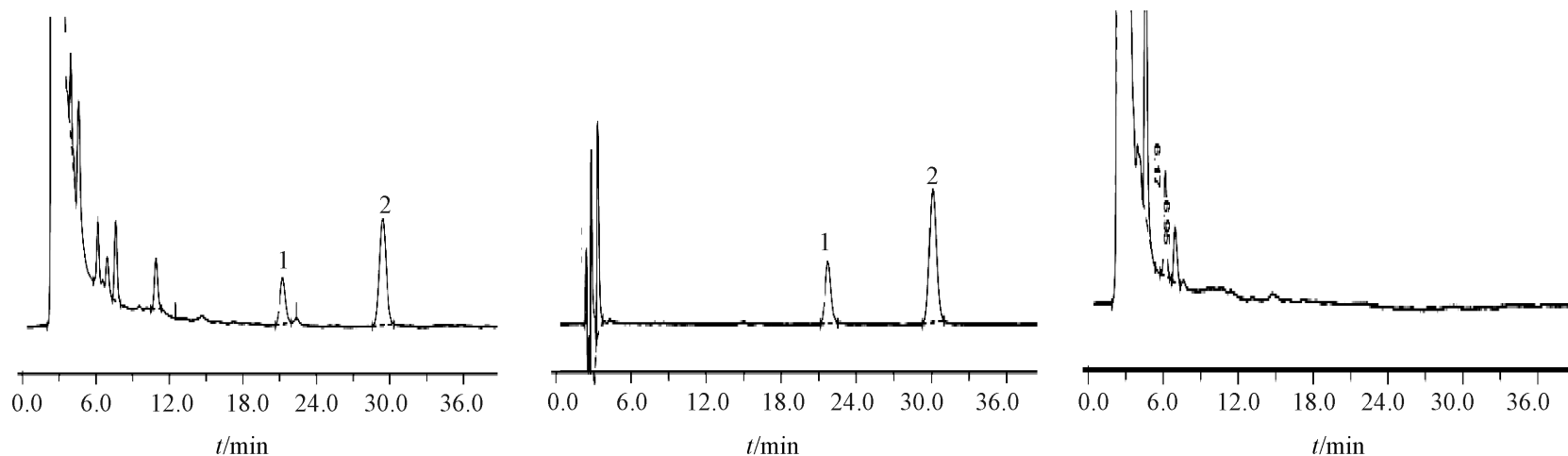


图 1 大黄素、大黄酚 HPLC 图

A. 麝香牛黄丸; B. 大黄素、大黄酚对照品; C. 阴性对照; 1. 大黄素; 2. 大黄酚

3.6 线性范围考察 分别精密称取大黄素和大黄酚对照品适量,加无水乙醇-乙酸乙酯(2 1)制成 0.083 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.151 7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别量取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL 至 10 mL 量瓶中,用无水乙醇-乙酸乙酯(2 1)稀释至刻度,分别进样 10 μL ,测定。大黄素和大黄酚进样量(μg)对峰面积作图,得直线,其大黄素回归方程为 $Y=70.937+48.357X$, $r=0.9999$; 大黄酚回归方程为 $Y=191.03+137.3X$, $r=0.9999$; 结果表明,大黄素和大黄酚分别在 0.041 8 ~ 0.209 0 μg , 0.075 9 ~ 0.379 2 μg 进样量与峰面积之间呈良好线性关系。

3.7 精密度考察 精密吸取同一份供试品溶液 20 μL (批号 081001),在上述色谱条件下重复进样 5 次,结果大黄素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 0.85%, 0.80%,表明仪器精密度良好。

3.8 稳定性考察 取同一份供试品溶液(批号 081001),分别在制备后 0, 2, 6, 12, 24 h 后依法测定大黄素和大黄酚的峰面积,结果大黄素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 0.51%, 0.98%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

3.9 重复性试验 取同批样品(批号 081001),依法平行测定 6 份,分别计算大黄素和大黄酚的总量,结果大黄素含量为 0.151 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.211%; 大黄酚含量为 0.287 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.164%,表明该方法重复性良好。

3.10 回收率试验 采用加样回收方法,精密称取已知含量的样品(批号 081001, 0.438 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)适量,分别加入一定量的大黄素和大黄酚对照品,参照 3.1 项下方法制备供试品溶液,依法测定,计算回收率,结果表明该法具有良好的回收率。见表 1, 2。

表 1 大黄素回收率试验

取样量 /g	测得量 /mg	样品含量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	回收率 /%	RSD/%
1.513	20.460	9 0.229	6 0.23	100.60		
1.501	10.467	4 0.227	7 0.23	104.19		
1.507	30.459	2 0.228	7 0.23	100.22		
1.498	60.455	6 0.227	3 0.23	99.25	99.63	2.94
1.502	0.453	7 0.227	9 0.23	98.21		
1.510	60.448	4 0.229	2 0.23	95.32		

表 2 大黄酚回收率试验

取样量 /g	测得量 /mg	样品含量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	回收率 /%	RSD/%
1.513	20.848	8 0.432	9 0.43	96.07		
1.501	10.861	4 0.429	4 0.43	100.59		
1.507	30.861	4 0.431	2 0.43	99.75		
1.498	60.860	6 0.428	7 0.43	100.73	99.63	1.83
1.502	0.858	2 0.429	7 0.43	99.72		
1.510	60.868	4 0.432	2 0.43	100.95		

3.11 大黄药材的含量测定 精密称取大黄药材 0.15 g, 精密称取适量, 置锥形瓶中, 精密加乙醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 置水浴上加热回流 1h, 放冷, 用乙醇补足减失的重量, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置烧瓶中, 水浴蒸干, 加 30% 乙醇-盐酸(10:1) 溶液 15 mL, 置水浴中加热回流 1 h, 立即冷却, 用三氯甲烷强力振摇提取 4 次, 每次 15 mL, 合并三氯甲烷液, 回收溶剂, 残渣用无水乙醇-乙酸乙酯(2:1) 混合溶液溶解, 移置 25 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

按正文中的供试品含测条件进行实验, 结果均符合药典要求的药材含量限度。见表 3。

表 3 大黄药材中大黄素、大黄酚含量测定

No.	大黄素 /mg·g ⁻¹	大黄酚 /mg·g ⁻¹	总含量 /mg·g ⁻¹	百分含量/%
1	1.485	9.515	11	1.10
2	1.553	9.947	11.5	1.15
3	1.536	9.864	11.4	1.14

3.12 样品测定 按正文拟定含量测定方法, 分别对 10 批样品进行测定, 结果见表 4。参考表 4 中 10 批样品的含量测定结果, 大蜜丸平均每丸含量为 1.305 mg/丸。结合药材指标成分转移率等因素, 同时保证产品质量, 规定本品每丸含大黄以大黄素和大黄酚之和计不得少于 1.0 mg。

4 讨论

本品中防风、当归、冰片、黄连、黄柏、金银花、当归等均为主要药味, 大黄素和大黄酚为大黄的主要

表 4 麝香牛黄丸中大黄素、大黄酚含量测定 (n=2)

No.	大黄素 /mg·g ⁻¹	大黄酚 /mg·g ⁻¹	总含量 /mg·g ⁻¹	含量/(mg/丸)
071101	0.149	0.264	0.431	1.293
071102	0.151	0.286	0.437	1.311
071103	0.150	0.284	0.434	1.302
071104	0.149	0.283	0.432	1.295
081001	0.150	0.283	0.433	1.300
081002	0.151	0.287	0.438	1.313
081003	0.152	0.287	0.439	1.318
081004	0.151	0.286	0.437	1.311
081005	0.151	0.286	0.437	1.310
090501	0.149	0.283	0.432	1.295

有效成分, 方法学研究结果表明采用专属性较强的薄层色谱法对防风、当归、冰片、黄连、黄柏、金银花、当归等进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定大黄中大黄素和大黄酚, 可一定程度上控制麝香牛黄丸的质量, 为保证用药的有效性提供技术支持。

本文在进行 TLC 鉴别研究时, 增加了相应药材的供试品溶液, 以求保证本品质量的同时, 监控投料药材的质量, 可作为一种中成药 TLC 鉴别的一种思路, 从源头控制产品质量。

方中金银花药材的检测发现, 若以绿原酸作为对照品, 则阴性有干扰。而以金银花对照药材作为对照, 则除绿原酸以外的其他斑点仍具有鉴定意义。同样, 针对黄连、黄柏两味药材, 虽然都具有盐酸小檗碱, 但其在与黄连对照药材色谱相应位置上, 显相同的 4 个黄色斑点; 在与黄柏对照药材色谱相应位置上, 显相同的 2 个黄色斑点。通过以对照药材作为对照, 可以准确检测黄连、黄柏两味药的存在。故当处方中有一味以上药材同时含有待鉴别成分时, 增加对照药材对照比选单一的化学成分(即对照品)更合理、科学, 更有利于提高专属性, 加强中药复方质量控制。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 10.
- [2] 国家药典委员会. 部颁标准中药成方制剂第十三册 WS3-B-2646-97 麝香牛黄丸质量标准[S]. 1997: Z13-227.

[责任编辑 顾雪竹]