

HPLC 法同时测定牛黄抱龙片中 7 种成分

邹 敏¹, 农志飞^{2*}, 罗 花¹, 彭悠悠¹, 叶渊渊¹

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530001)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定牛黄抱龙片(牛黄、茯苓、麝香等)中 7 种成分的含有量。**方法** 分析采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A) -0.05% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱; 体积流量 0.8 mL/min; 夏佛托苷和异夏佛托苷的检测波长为 270 nm, 去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸为 210 nm; 进样量 20 μL。**结果** 夏佛托苷、异夏佛托苷、去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸分别在 2.88 ~ 57.60 μg/mL ($r = 0.999\ 4$)、2.42 ~ 48.40 μg/mL ($r = 0.999\ 1$)、3.17 ~ 63.40 μg/mL ($r = 0.999\ 9$)、2.36 ~ 47.20 μg/mL ($r = 0.999\ 6$)、2.18 ~ 43.60 μg/mL ($r = 0.999\ 7$)、3.12 ~ 62.40 μg/mL ($r = 0.999\ 9$)、3.46 ~ 69.20 μg/mL ($r = 0.999\ 8$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率(RSD)分别为 98.89% (1.30%)、97.74% (1.16%)、99.33% (1.15%)、98.57% (1.25%)、97.08% (0.58%)、99.44% (1.12%)、98.09% (1.66%)。**结论** 该方法简便、快速、准确, 可用于牛黄抱龙片的质量控制。

关键词: 牛黄抱龙片; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)08-1732-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.015

Simultaneous determination of seven constituents in Niu Huang Baolong Tablets by HPLC

ZOU Min¹, NONG Zhi-fei^{2*}, LUO Hua¹, PENG You-you¹, YE Yuan-yuan¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. The First Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of contents of seven constituents in Niu Huang Baolong Tablets (a paediatric antipyretic and tranquilizer containing *Bovis Calculus*, *Poria*, *Moschus*, etc.). **METHODS** The analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile (A) -0.05% phosphate acid (B) flowing at 0.8 mL/min for gradient elution. and the injection volume was 20 μL. And the detection wavelengths were set at 270 nm for schaftoside and isoschaftoside, and 210 nm for dehydrotumulosic acid, tumulosic acid, 3-epidehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid and pachymic acid. **RESULTS** Schaftoside, isoschaftoside, dehydrotumulosic acid, tumulosic acid, 3-epidehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid and pachymic acid showed good linear relationships with in the ranges of 2.88 – 57.60 μg/mL ($r = 0.999\ 4$), 2.42 – 48.40 μg/mL ($r = 0.999\ 1$), 3.17 – 63.40 μg/mL ($r = 0.999\ 9$), 2.36 – 47.20 μg/mL ($r = 0.999\ 6$), 2.18 – 43.60 μg/mL ($r = 0.999\ 7$), 3.12 – 62.40 μg/mL ($r = 0.999\ 9$) and 3.46 – 69.20 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), whose average recoveries (RSDs) were 98.89% (1.30%), 97.74% (1.16%), 99.33% (1.15%), 98.57% (1.25%), 97.08% (0.58%), 99.44% (1.12%) and 98.09% (1.66%), respectively. **CONCLUSION** This simple and accurate method can be used for the rapid quality control of Niu Huang Baolong Tablets.

KEY WORDS: Niu Huang Baolong Tablets; chemical constituents; HPLC

收稿日期: 2016-01-07
作者简介: 邹 敏 (1989—), 男, 硕士, 从事中医儿科学研究。Tel: 18696456136
* 通信作者: 农志飞 (1965—), 女, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医儿科学研究。E-mail: 1527877285@qq.com

牛黄抱龙片具有清热镇惊，祛风化痰之功效，主要用于治疗小儿风痰壅盛、高热神昏、惊风抽搐等症状，是儿科常用药，该制剂由 10 味中药材加工而成，分别是胆南星、茯苓、牛黄、麝香、朱砂、雄黄、琥珀、全蝎、天竺黄、僵蚕（炒），收载于《卫生部颁药品标准》（中药成方制剂第 13 册）^[1]。但现标准仅规定了性状、理化鉴别及制剂通则检查项^[1-2]，尚无成分定量测定报道，无全面控制该药物的质量。本实验以胆南星中夏佛托苷和异夏佛托苷及茯苓中去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸为指标成分，采用 HPLC 波长切换法同时测定牛黄抱龙片这 7 种成分的含有量，为该药物质量标准的提高提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Empower Pro 色谱工作站、G1315B 可变波长检测器（美国安捷伦科技公司）；AE240 电子天平（十万分之一，瑞士 Mettler-Toledo 公司）；KQ-100DB 数控超声仪（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试剂 乙腈为色谱纯；磷酸为分析纯；水为超纯水；

1.3 对照品 夏佛托苷（51938-32-0，含有量 98.0%）、异夏佛托苷（52012-29-0，含有量 98.0%）对照品购自成都曼思特生物科技有限公司；去氢土莫酸（6754-16-1，含有量 98.0%）、土莫酸（508-24-7，含有量 98.0%）对照品购自成都普瑞法科技开发有限公司；3-表去氢土莫酸（167775-54-4，含有量 99.0%）、去氢茯苓酸（77012-31-8，含有量 98.0%）、茯苓酸（29070-92-6，含有量 98.0%）对照品购自上海融禾医药科技发展有限公司。

1.4 样品 牛黄抱龙片购自上海雷允上药业有限公司（批号分别为 141105、141217、150221）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；体积流量 0.8 mL/min；进样量 20 μL；流动相乙腈（A）-0.05% 磷酸溶液（B），梯度洗脱（0 ~ 19 min，16% A；19 ~ 29 min，16.0% → 33.0% A；29 ~ 63 min，33.0% → 72.0% A；63 ~ 70 min，72.0% → 16.0% A）^[3-8]；0 ~ 29 min 在 270 nm^[9-11] 波长下检测夏佛托苷、异夏佛托苷，29 ~ 70 min 在 210 nm^[12-13] 波长下检测去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸。

2.2 供试品溶液的配制方法 取本品适量，研成细粉，精密称取 6.0 g，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声 40 min，放冷，加甲醇至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.3 混合对照品溶液的制备方法 精密称取夏佛托苷、异夏佛托苷、去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸适量，甲醇溶解并稀释成 0.576、0.484、0.634、0.472、0.436、0.624、0.692 mg/mL，摇匀，即得对照品贮备液。再量取 5.0、2.5、5.0、2.5、2.5、2.5、5.0 mL，置于同一 100 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4 阴性对照的制备及专属性实验 称取除胆南星和茯苓外的药材各 1 份，按照生产工艺配制胆南星、茯苓空白样品，按“2.2”项下方法制得胆南星、茯苓空白对照溶液。取空白、混合对照品和供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进行测定。结果，在与对照品色谱峰相应的保留时间处，样品溶液有相应色谱峰，阴性无干扰，具体见图 1。

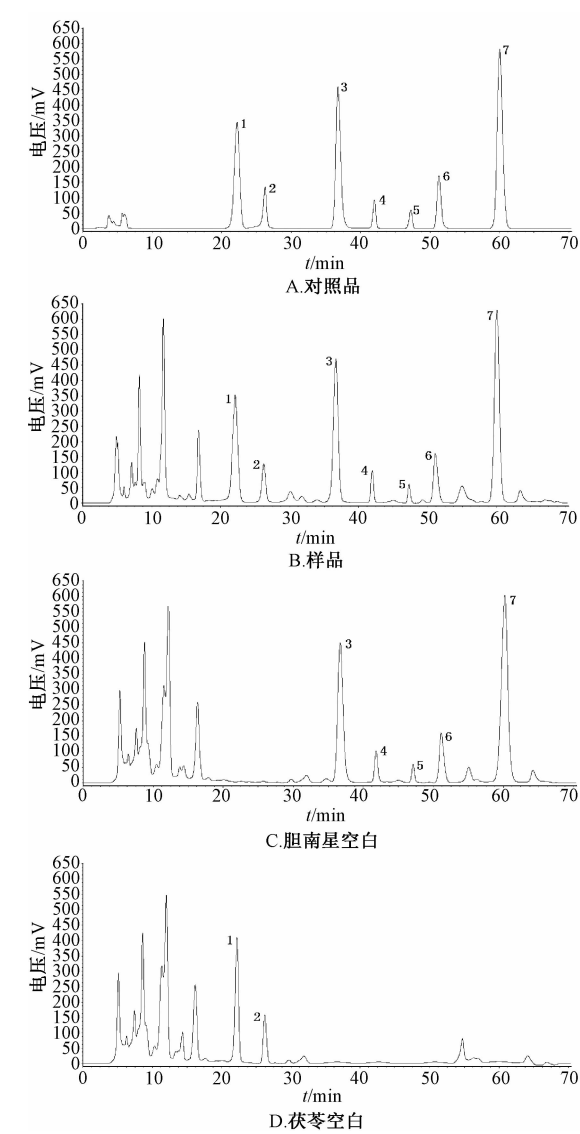
2.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.3”项下对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL，置于 20 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列质量浓度的混合对照品溶液。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，结果见表 1，可知各成分线性关系良好。

表 1 7 种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of seven constituents			
成分	回归方程	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	r
夏佛托苷	$Y = 9.1673 \times 10^5 X + 409.1$	2.88 ~ 57.60	0.999 4
异夏佛托苷	$Y = 6.0246 \times 10^5 X - 236.5$	2.42 ~ 48.40	0.999 1
去氢土莫酸	$Y = 1.1706 \times 10^6 X - 182.9$	3.17 ~ 63.40	0.999 9
土莫酸	$Y = 4.3197 \times 10^5 X + 275.6$	2.36 ~ 47.20	0.999 6
3-表去氢土莫酸	$Y = 2.5583 \times 10^5 X - 361.1$	2.18 ~ 43.60	0.999 7
去氢茯苓酸	$Y = 7.9405 \times 10^5 X - 288.5$	3.12 ~ 62.40	0.999 9
茯苓酸	$Y = 1.5319 \times 10^6 X + 167.4$	3.46 ~ 69.20	0.999 8

2.6 稳定性试验 取“2.2”项下供试品溶液，在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h，在“2.1”项色谱条件下测定，测得夏佛托苷、异夏佛托苷、去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸峰面积 RSD 分别为 0.42%、0.95%、1.08%、0.96%、1.14%、1.07% 和 0.83%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 按“2.2”项下方法制备 6 份



1. 夏佛托苷 2. 异夏佛托苷 3. 去氢土莫酸 4. 土莫酸
5. 3-表去氢土莫酸 6. 去氢茯苓酸 7. 茯苓酸
1. schaftoside 2. isoschaftoside 3. dehydrotumulosic acid 4. tumu-
losic acid 5. 3-epidehydrotumulosic acid 6. dehydropachymic acid
7. pachymic acid

图1 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms

供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，测得夏佛托苷、异夏佛托苷、去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸含有量 RSD 分别为 0.61%、1.03%、1.16%、0.99%、1.18%、1.14% 和 0.93%，表明该方法重复性良好。

2.8 精密度试验 取“2.3”项下混合对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样 6 次，测得夏佛托苷、异夏佛托苷、去氢土莫酸、土莫酸、3-表去

氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸峰面积 RSD 分别为 0.95%、1.01%、0.48%、0.82%、1.07%、1.13% 和 0.89%，表明仪器精密度良好。

2.9 加样回收率试验 将样品（批号 141105）研成细粉，精密称取 6 份，每份 3.0 g，置于 50 mL 量瓶中，精密加入混合对照品溶液（夏佛托苷 0.028 8 mg/mL、异夏佛托苷 0.012 1 mg/mL、去氢土莫酸 0.031 7 mg/mL、土莫酸 0.011 8 mg/mL、3-表去氢土莫酸 0.010 9 mg/mL、去氢茯苓酸 0.015 6 mg/mL、茯苓酸 0.034 6 mg/mL）和甲醇各 25 mL，称定质量，超声 40 min 后放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，在“2.1”项色谱条件下计算加样回收率，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果
Tab. 2 Results of recovery tests

成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
夏佛托苷	2.998 3	0.671 6	0.720 0	1.385 3	99.13	98.89	1.30
	3.000 5	0.672 1	0.720 0	1.366 4	96.43		
	3.001 9	0.672 4	0.720 0	1.390 7	99.76		
	2.989 2	0.669 6	0.720 0	1.380 8	98.78		
	2.996 7	0.671 3	0.720 0	1.391 1	99.97		
异夏佛托苷	3.002 5	0.672 6	0.720 0	1.387 4	99.28	97.74	1.16
	2.998 3	0.323 8	0.302 5	0.618 6	97.45		
	3.000 5	0.324 1	0.302 5	0.626 1	99.83		
	3.001 9	0.324 2	0.302 5	0.619 5	97.62		
	2.989 2	0.322 8	0.302 5	0.617 4	97.39		
去氢土莫酸	2.996 7	0.323 6	0.302 5	0.615 2	96.40	99.33	1.15
	3.002 5	0.324 3	0.302 5	0.619 9	97.72		
	2.998 3	0.812 5	0.792 5	1.608 3	100.42		
	3.000 5	0.813 1	0.792 5	1.588 2	97.80		
	3.001 9	0.813 5	0.792 5	1.590 5	98.04		
土莫酸	2.989 2	0.810 1	0.792 5	1.600 7	99.76	98.57	1.25
	2.996 7	0.812 1	0.792 5	1.600 8	99.52		
	3.002 5	0.813 7	0.792 5	1.609 5	100.42		
	2.998 3	0.275 8	0.295 0	0.569 3	99.49		
	3.000 5	0.276 0	0.295 0	0.565 6	98.17		
3-表去氢土莫酸	3.001 9	0.276 2	0.295 0	0.570 0	99.59	97.08	0.58
	2.989 2	0.275 0	0.295 0	0.563 8	97.90		
	2.996 7	0.275 7	0.295 0	0.560 7	96.61		
	3.002 5	0.276 2	0.295 0	0.570 2	99.66		
	2.998 3	0.260 9	0.272 5	0.525 9	97.25		
去氢茯苓酸	3.000 5	0.261 0	0.272 5	0.525 2	96.95	99.44	1.12
	3.001 9	0.261 2	0.272 5	0.523 7	96.33		
	2.989 2	0.260 1	0.272 5	0.526 6	97.80		
	2.996 7	0.260 7	0.272 5	0.523 9	96.59		
	3.002 5	0.261 2	0.272 5	0.527 1	97.58		
茯苓酸	2.998 3	0.413 8	0.390 0	0.805 5	100.44	98.09	1.66
	3.000 5	0.414 1	0.390 0	0.800 2	99.00		
	3.001 9	0.414 3	0.390 0	0.795 7	97.79		
	2.989 2	0.412 5	0.390 0	0.806 0	100.90		
	2.996 7	0.413 5	0.390 0	0.801 3	99.44		
	3.002 5	0.414 3	0.390 0	0.800 6	99.05		
	2.998 3	0.914 5	0.865 0	1.770 1	98.91		
	3.000 5	0.915 2	0.865 0	1.749 9	96.50		
	3.001 9	0.915 6	0.865 0	1.789 0	100.97		
	2.989 2	0.911 7	0.865 0	1.753 7	97.34		
	2.996 7	0.914 0	0.865 0	1.759 6	97.76		
	3.002 5	0.915 8	0.865 0	1.755 5	97.08		

2.10 样品含有量的测定 取 3 批样品（批号 141105、141217、150221），按“2.2”项下方法 制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，结果见表 3。

表 3 含有量测定结果 (mg/g, n=3)
Tab. 3 Results of content determination (mg/g, n=3)

批号	夏佛托苷	异夏佛托苷	去氢土莫酸	土莫酸	3-表去氢土莫酸	去氢茯苓酸	茯苓酸
141105	0.224	0.108	0.271	0.092	0.087	0.138	0.305
141217	0.228	0.113	0.276	0.099	0.092	0.146	0.301
150221	0.216	0.102	0.265	0.088	0.083	0.133	0.295
平均值	0.223	0.108	0.271	0.093	0.087	0.139	0.300

3 讨论

为能兼顾牛黄抱龙片中这 7 种成分对提取溶剂的要求，参考文献资料，选择甲醇作为提取溶剂。同时，考察了超声提取和水浴回流 30、40、50 min 的提取效果，发现超声提取 40 min 时，成分含有量相对较高，而且操作简便，快速。因此，样品溶液制备的提取方式为甲醇超声，提取 40 min。

本实验得到了牛黄抱龙片生产厂家的大力支持，提供了阴性样品药材，由于同一批药材按照相关质量标准项下的同一工艺生产，故所测各成分色谱峰的差异较小。同时，预实验测定了各成分的含有量范围，发现其与样品溶液基本一致，可能是混合对照品溶液色谱峰和样品峰的峰型、峰宽、峰高及出峰时间存在一定差异，但图谱相似的原因。

牛黄抱龙片为儿科常用药，处方中人工牛黄清热解毒、豁痰开窍、息风止痉，为君药；胆南星、天竺黄清热化痰、清心凉肝、息风定惊，全蝎、僵蚕息风止痉，为臣药；以茯苓健脾利湿、宁心安神，朱砂、琥珀清热镇心安神，麝香辛香走窜、开窍醒神，雄黄祛痰定惊，为佐药。诸药合用，共奏清热镇惊，祛风化痰之功。同时，胆南星在方中处方量最大，茯苓次之，故以胆南星中夏佛托苷、异夏佛托苷及茯苓中去氢土莫酸、土莫酸、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸为指标成分，采用梯度洗脱联合波长切换 HPLC 法同时测定其含有量，为进一步完善牛黄抱龙片的质量标准提供参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 卫生部颁药品标准（中药成方制剂）：第 13 册[S]. 北京：中国医药科技出版社，1997：33
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部

[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：附录 7，附录 30，附录 34.
[3] 杜树山，雷 宁，吴 明，等. 高效液相色谱法测定天南星中夏佛托苷和异夏佛托苷的含量[J]. 中国药学杂志，2005，40(1)：21-23.
[4] 黄 蛟，易进海，刘玉红，等. 天南星、半夏、白附子中 8 种核苷成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(16)：59-62.
[5] 张靓琦，贾 英，罗 洁，等. 超高效液相色谱法同时测定茯苓中去氢土莫酸等 6 种活性成分的含量[J]. 中国药学杂志，2012，47(13)：1080-1083.
[6] 邬 兰，王金波，邓媛媛，等. HPLC-ELSD 法测定不同产地茯苓中茯苓酸的含量[J]. 中国药师，2011，14(11)：1568-1570.
[7] 夏 烨，杨春华，刘静涵，等. RP-HPLC 法测定中药茯苓皮中茯苓酸 A 和 3-表去氢土莫酸的含量[J]. 药学进展，2009，33(6)：271-273.
[8] 沈玉萍，杨 欢，陈 斌，等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中 4 种三萜酸的含量[J]. 中国药学杂志，2011，46(5)：388-390.
[9] 谢 巍，杨立佼，周伟娥，等. HPLC 法测定白背叶中 3 个黄酮碳苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志，2015，35(7)：1205-1208.
[10] 匡艳辉，梁 斯，姚小华，等. HPLC 法测定纤花线纹香茶菜中异夏佛塔苷、夏佛塔苷和迷迭香酸[J]. 中成药，2013，35(3)：570-573.
[11] 杜树山，张文生，徐艳春，等. 中药材天南星中夏佛托苷的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志，2002，22(6)：440-443.
[12] 王 坚，徐 菁，李 鹏，等. HPLC 法同时测定补益资生丸中白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ、去氢土莫酸、猪苓酸 C 和茯苓酸[J]. 中成药，2015，37(8)：1718-1722.
[13] 高晓霞，于治国，赵云丽，等. HPLC 法同时测定茯苓中去氢茯苓酸和茯苓酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报，2010，27(4)：295-298.