

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.19.017

牛麝开窍散质量标准初探*

崔妮¹, 卫向锋^{1△}, 张红², 孙婷婷², 陈霄¹, 杜晓刚¹

(1. 西安中医脑病医院, 陕西 西安 710032; 2. 陕西省中医药研究院中药研究所, 陕西 西安 710031)

摘要:目的 建立牛麝开窍散的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对方中当归、黄芪、人工牛黄、石菖蒲的特征成分进行定性鉴别, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法测定人工牛黄中主要有效成分胆酸含量。结果 建立的TLC法重复性好, 特征斑点清晰, 且阴性对照无干扰; 胆酸进样量在0.87~2.03 μg范围内, 进样量的对数值与峰面积的对数值线性关系良好($r=0.999\ 8, n=5$); 平均加样回收率为101.78%, RSD为3.33%($n=6$)。结论 所建立的方法简单可行、结果准确、专属性强, 可用于牛麝开窍散的质量控制。

关键词:牛麝开窍散; 薄层色谱法; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法; 胆酸; 质量标准

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)19-0081-04

Quality Standard of Niushekaiqiao Powder

CUI Ni¹, WEI Xiangfeng¹, ZHANG Hong², SUN Tingting², CHEN Xiao¹, DU Xiaogang¹

(1. Xi'an TCM Hospital of Encephalopathy, Xi'an, Shaanxi, China 710032; 2. Chinese Medicine Research Institute of Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710031)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Niushekaiqiao Powder. **Methods** The characteristic components in Angelicae Sinensis Radix, Astragali Radix, Bovis Calculus Artificatus and Acori Tatarinowii Rhizoma in the prescription were qualitatively identified by the thin-layer chromatography (TLC) method, and the content of cholic acid, the main effective component in Bovis Calculus Artificatus, was determined by the high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). **Results** The established TLC had good repeatability, clear characteristic spots and no interference from the negative reference. The linear range of cholic acid was 0.87-2.03 μg ($r=0.999\ 8, n=5$). The average recovery of cholic acid was 101.78% with an RSD of 3.33% ($n=6$). **Conclusion** The established method is simple, feasible, accurate and specific, which can be used for the quality control of Niushekaiqiao Powder.

Key words: Niushekaiqiao Powder; TLC; HPLC-ELSD; cholic acid; quality standard

牛麝开窍散是西安中医脑病医院的院内中药复方制剂, 由人工牛黄、人工麝香、冰片、当归、黄芪、石菖蒲、桃仁、郁金、肉桂、甘草等中药组方。为了有效控制其质量, 确保临床疗效, 本研究中建立了定性鉴别牛麝开窍散中当归、黄芪、人工牛黄、石菖蒲的薄层色谱(TLC)法^[1], 以及测定人工牛黄中主要有效成分胆酸含量的高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法, 为其质量控制提供客观的定性定量分析方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UP3200H型超声波清洗机(熊猫集团南京电子计量有限公司); JM-B20001型电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司, 精度为0.1 g); SQP型电子分析天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司, 称量范围1 mg至120 g、10 mg至220 g); Agilent1260型高效液相

色谱仪(美国安捷伦公司), 配有1260LC工作站; Alltech3300型蒸发光散射检测器(上海宸乔生物科技有限公司); 硅胶G(青岛海洋化工有限公司, 批号为02101029)。

1.2 试药

胆酸对照品(批号为078-9312, 供含量测定用), 黄芪甲苷对照品(批号为110781-200613), 石菖蒲对照药材(批号为121098-201406), 当归对照药材(批号为120927-201315), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯; 牛麝开窍散(西安中医脑病医院院内制剂, 批号分别为20200401, 20200402, 20200403)。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

黄芪: 取样品9 g, 置锥形瓶中, 加甲醇30 mL, 超声处理40 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水50 mL使溶解,

*基金项目: 中国民族医药学会科研项目[2020ZY116-410601]; 中医药传承创新暨“秦药”开发重点科学研究项目[2021-02-22-019]。

第一作者: 崔妮, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院中药制剂研发, (电子信箱)cuini0925@163.com。

△通信作者: 卫向锋, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为医院中药学与中药制剂, (电子信箱)w478333954@163.com。

用水饱和的正丁醇振摇提取3次,依次提取50,30,30 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤2次,每次40 mL,弃去氨试液,正丁醇液蒸干,加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液;同法制备缺黄芪的阴性对照品溶液;取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。分别吸取上述3种溶液各15 μ L,点于同一硅胶G板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)在10 $^{\circ}$ C下放置的下层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液显色,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰^[2]。供试品溶液色谱中,与对照品溶液色谱有相应斑点出现,且阴性对照无干扰,详见图1 A。

当归:取样品7 g,置锥形瓶中,加乙醚30 mL,超声处理10 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为供试品溶液;同法制备缺当归的阴性对照品溶液;取当归对照药材0.5 g,加乙醚20 mL,超声处理10 min,滤过,滤液蒸干,加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为对照药材溶液。分别吸取上述3种溶液各10 μ L,点于同一硅胶G板上,以正己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,置紫外光灯(365 nm)下检视^[3]。供试品溶液色谱中,与对照药材溶液色谱有相应斑点出现,且阴性对照无干扰,详见图1 B。

人工牛黄:取样品9 g,置锥形瓶中,加甲醇30 mL,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液;同法制备缺人工牛黄的阴性对照品溶液;取胆酸对照品,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。分别吸取上述3种溶液各2 μ L,点于同一硅胶G板上,以正己烷-乙酸乙酯-醋酸(36%乙酸)-甲醇(20:25:2:3, V/V/V/V)的上层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液显色,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视^[4]。供

试品溶液色谱中,与对照品溶液色谱有相应斑点出现,且阴性对照无干扰,详见图1 C。

石菖蒲:取样品2 g,置锥形瓶中,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)20 mL,超声处理40 min,滤过,滤液蒸干,残渣加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)1 mL使溶解,作为供试品溶液;同法制备缺石菖蒲的阴性对照品溶液;取石菖蒲对照药材0.2 g,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)20 mL,超声处理40 min,滤过,滤液蒸干,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)1 mL使溶解,作为对照药材溶液。分别吸取上述3种溶液各5 μ L,点于同一硅胶G板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[5]。供试品溶液色谱中,与对照药材溶液色谱有相应斑点出现,且阴性对照无干扰,详见图1 D。

2.2 胆酸含量测定^[6]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(1~10 min时15%A~32%A, 10~20 min时32%A~50%A, 20~28 min时50%A~68%A);流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;检测器:ELSD。

2.2.2 溶液制备

取胆酸对照品7.25 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得质量浓度为0.145 mg/mL的对照品溶液。取样品17.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声提取30 min,放冷,用溶剂补足减失的质量,摇匀,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例及制备工艺制备缺人工牛黄的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

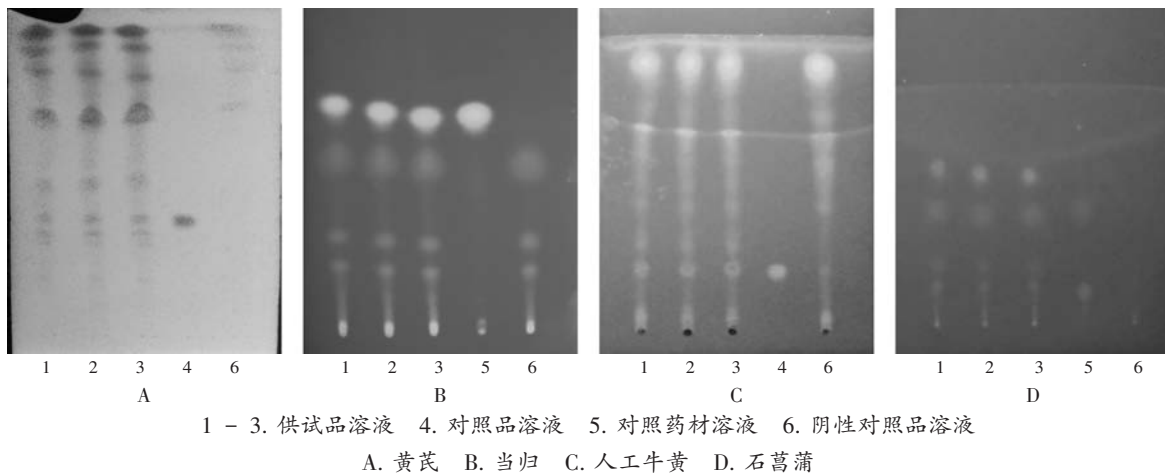
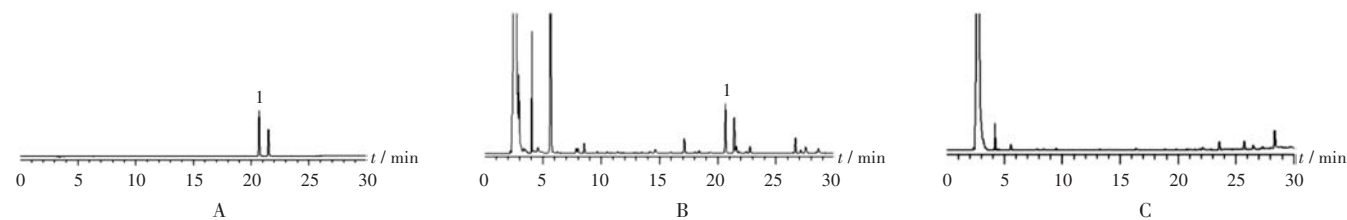


图1 薄层色谱图

1 - 3. Test solution 4. Reference solution 5. Reference solution of medicinal materials 6. Negative reference solution
A. Astragali Radix B. Angelicae Sinensis Radix C. Bovis Calculus Artificatus D. Acori Tatarinowii Rhizoma

Fig.1 TLC chromatograms



1. 胆酸
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Cholic acid

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2.2项下3种溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果阴性对照无干扰,色谱图见图2。

线性关系考察:取2.2.2项下对照品溶液适量,分别进样6,8,10,12,14 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录相应峰面积。以进样量($X, \mu\text{g}$)的对数值为横坐标、色谱峰面积(Y)的对数值为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.6048X + 2.5502$, $r = 0.9998$ ($n = 5$)。结果表明,胆酸进样量在0.87~2.03 μg 范围内,进样量的对数值与峰面积的对数值线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液10 μL ,重复进样测定6次。结果的RSD为0.27% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为20200401)17.6 g,精密称定,共6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL 进样测定。结果胆酸平均含量为0.5083 mg/g, RSD为1.04% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为20200401)17.6 g,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL ,分别于0,2,4,6,8,10,12 h时进样测定。结果的RSD为0.64% ($n = 7$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

加样回收试验:分别精密称定6份已知含量的样品(批号为20200401),置100 mL容量瓶中,分别精密加入胆酸对照品4.40 mg,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL 进样测定,计算加样回收率。结果见表1。

2.2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20200401,20200402,20200403)样品各适量,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,进样测定,并计算含量。结果见表2。

3 讨论

神昏病属于一种特殊的意识障碍,是由于各种原

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
8.8977	4.5672	4.40	9.1293	103.68	101.78	3.33
8.8975	4.5671	4.40	9.1793	104.82		
8.8966	4.5666	4.40	8.7966	96.14		
8.8968	4.5667	4.40	8.9295	99.15		
8.8922	4.5644	4.40	9.1322	103.81		
8.8929	4.5647	4.40	9.1012	103.10		

表2 3批样品中胆酸含量测定结果(mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of cholic acid in the three batches of samples (mg/g)

批号	1	2	$\bar{X}$
20200401	0.5236	0.5115	0.518
20200402	0.5224	0.5277	0.525
20200403	0.4764	0.4724	0.474

因造成脑严重损害后出现的一种没有感知的觉醒状态。中医学的“神昏”常表现为神昏、昏厥、昏蒙、昏迷、不省人事及外感热病、痰证、中风、脱证等,多继发痴呆、中风、外感热病、毒邪犯脑、脑外伤等病^[7]。牛麝开窍散组方是在李东垣《内外伤辨惑论》所创造的当归补血汤基础上,合用人工牛黄、人工麝香等醒神开窍之品形成的协定方。该制剂从中医对神昏病(持续植物状态)的病机痰、瘀为标,气血虚为本,本虚标实证出发立法,具有补气养血、活血化瘀、豁痰化浊、醒神开窍、明蒙启闭之功效,用于治疗因气血逆乱产生痰、瘀、气虚、血虚导致脑络不通、脑窍失养、神明蒙蔽的长期神昏窍闭。

牛麝开窍散中含贵重药材人工牛黄、人工麝香,根据《陕西省医疗机构应用传统工艺配制中药制剂备案管理实施细则(试行)》^[8]要求,贵重中药应建立含量测定方法。人工牛黄由胆酸、猪去氧胆酸、牛胆粉、牛磺酸、胆固醇、胆红素等加工制成。本研究预试验中欲将胆酸、猪去氧胆酸作为人工牛黄药材的含量测定指标^[9],结果测定猪去氧胆酸含量时有干扰,故最终仅以胆酸作为人工牛黄的含量测定指标。牛麝开窍散1 kg