

基于天然麝香-牛黄和4个植物药味的安宫牛黄丸特征图谱质量表征研究

彭平¹, 张蓓¹, 杜菁¹, 解素花¹, 范国强¹, 迟玉明^{1*}, 田瑞华^{2*}

1. 北京中研同仁堂医药研发有限公司, 北京 100079

2. 中国北京同仁堂(集团)有限责任公司, 北京 100079

摘要: **目的** 建立安宫牛黄丸特征图谱分析方法, 以全面整体表征安宫牛黄丸质量属性和特性, 并应用于10批次安宫牛黄丸成品质量检测分析。 **方法** 采用UPLC-PDA多波长分析方法, Waters Cortecs Shield RP₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.3%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量0.2 mL/min, 柱温38℃, 检测波长240、262、274、330、360、440 nm。 **结果** 所建立特征图谱分析方法稳定可行, 分析指认了安宫牛黄丸成品中35个特征峰, 其中包括可鉴别原料药材天然属性的天然麝香特征峰(峰6)、天然牛黄特征峰(峰33), 并同时测定了其中13个指标性成分(梔子苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷I、西红花苷II、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、表小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、姜黄素)含量, 10批次安宫牛黄丸中13个指标性成分质量分数均值依次为2.87、1.14、0.40、0.03、3.17、0.94、0.74、0.58、10.01、1.62、0.34、0.17、0.05 mg/g, RSD为4.19%~20.81%, 10批次安宫牛黄丸均可稳定检出35个特征峰, 其中天然麝香、天然牛黄特征峰相对峰面积均值分别为0.031、0.003, 各特征峰相对峰面积的RSD为1.5%~26.79%。 **结论** 特征图谱分析表明, 10批次安宫牛黄丸成品质量相对稳定, 均显示了天然麝香、天然牛黄、黄丝郁金原料药材的特异性质量表征; 指标性成分含量分析表明, 10批次样品中指标性成分含量波动较大的主要源于黄芩和黄丝郁金药材, 梔子药材中西红花苷I含量和黄连药材中4个生物碱成分含量较为稳定。

关键词: 安宫牛黄丸; 天然麝香; 天然牛黄; 黄丝郁金; 梔子苷; 京尼平龙胆双糖苷; 西红花苷I; 西红花苷II; 盐酸小檗碱; 盐酸黄连碱; 盐酸巴马汀; 表小檗碱; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 姜黄素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)14-3313-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.008

Quality characterization of Angong Niu Huang Pills based on characteristic spectrum of natural musk/bezoar and four herbal medicines

PENG Ping¹, ZHANG Bei¹, DU Jing¹, XIE Su-hua¹, FAN Guo-qiang¹, CHI Yu-ming¹, TIAN Rui-hua²

1. Beijing Zhongyan Tongrentang Medical Research Corporation, Beijing 100079, China

2. Beijing Tongrentang Group Co., Ltd., Beijing 100079, China

Abstract: Objective To establish an Angong Niu Huang Pills (ANP) characteristic spectrum analysis method, and to comprehensively characterize the quality properties and characteristics of ANP, and then to apply it to the quality detection and analysis of 10 batches of ANP, and to find out the specificity of the quality characterization of ANP. **Methods** The UPLC-PDA multi-wavelength was used in the method, and a Waters Cortecs shields RP₁₈ Column (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile and 0.3% phosphoric acid solution, the detection wavelength was set at 240, 262, 330, 360, 274, and 440 nm, the column temperature was kept at 38℃, and the flow rate was 0.2 mL/min. **Results** The results showed that the established analytical method can simultaneously determine 13 index components (including geniposide, genipin1-gentiobioside, crocin I, crocin II, berberine hydrochloride, coptis hydrochloride, palmatine chloride, epiberberine, baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and curcumin) in ANP, and a total of 35 characterstic peaks were identified in ANP. It included natural musk characteristic peak and natural bovis calculus characteristic peak which can identify the natural properties of raw materials. The mean values of the

收稿日期: 2019-03-12

基金项目: 国家中医药标准化项目: 安宫牛黄丸标准化建设(ZYB2H-C-BJ-03)

作者简介: 彭平, 女, 高级工程师, 研究方向为中药复方质量标准。Tel: 15210647038 E-mail: pengping2177@126.com

*通信作者 田瑞华, 男, 高级工程师。Tel: (010)87632521 E-mail: tianruihua@tongrentang.com

迟玉明, 男, 研究员。Tel: (010)87632503 E-mail: chi_yuming@hotmail.com

13 index components in 10 batches of ANP were 2.87, 1.14, 0.40, 0.03, 3.17, 0.94, 0.74, 0.58, 10.01, 1.62, 0.34, 0.17, 0.05 mg/g, respectively. The RSD values ranged from 4.19% to 20.81%. All the 10 batches of ANP could be detected with 35 characteristic peaks, the average area values of natural musk and natural bovis calculus characteristic peaks were 0.031 and 0.003, and the RSD values ranged from 1.5% to 26.79%. **Conclusion** According to the analysis of characteristic spectrum, the quality of finished products of 10 batches of ANP was relatively stable, and all showed the specific quality characterization of raw materials of natural musk, natural bovis calculus and *Curcumae Radix*; According to the analysis of the content of index components, the large fluctuation of the index components in 10 batches of samples mainly comes from *Scutellaria baicalensis* and *Curcumae Radix*, while the content of crocin I in *Gardeniae Fructus* and four alkaloids in *Coptidis Rhizoma* were relatively stable.

Key words: Angong Niu Huang Pills; natural musk; natural bovis calculus; *Curcumae Radix*; geniposide; genipin-1-gentiobioside; crocin I; crocin II; berberine hydrochloride; coptis hydrochloride; palmatine chloride; epiberberine; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; curcumin

安宫牛黄丸 (Angong Niu Huang Pills, ANP) 由牛黄、麝香、黄芩、黄连、栀子、郁金、冰片、水牛角浓缩粉、朱砂、雄黄、珍珠共计 11 味药物组成, 具有多种药理活性^[1-2], 是中医临床上用于热痹神昏证的首选治疗药物, 具有悠久的临床使用记载。ANP 复方成分复杂^[3], 成品质量的全面控制更为困难。其中, 水牛角浓缩粉、珍珠主要为氨基酸类成分, 目前原料质量研究主要通过总氮含量及氨基酸类成分特征图谱展开^[4]; 朱砂、雄黄为矿物类药, 主要通过原子吸收等方法进行研究^[5-6]; 冰片有合成冰片和天然冰片之分, 通过气相色谱对指标性成分进行含量控制^[7]; 黄连、黄芩、郁金、栀子、麝香、牛黄化学成分较为复杂, 常用液相色谱等方法开展研究, 本实验主要采用液相色谱法对 ANP 中 4 个植物药味和牛黄、麝香进行研究。

ANP 方中黄连、黄芩、郁金、栀子 4 味植物药, 由于不同基原、不同产地、不同质量等级的原料质量差异, 方中麝香有天然麝香与人工麝香原料差异, 天然牛黄与人工牛黄、体外培育牛黄原料差异, 使得市售 ANP 质量及价格差异巨大。目前 ANP 质量标准由《中国药典》2015 年版收载, 仅对胆酸、冰片、黄芩苷、盐酸小檗碱进行了薄层鉴别, 对 ANP 中盐酸小檗碱、黄芩苷、胆红素进行了含量测定, 对麝香酮进行了气相鉴别, 对猪去氧胆酸进行了检查鉴别。然而, 现有质量标准尚不能准确区分 ANP 关键质量要素麝香原料天然与非天然的质量表征差异性; 且缺乏对栀子、郁金等药味进行质量控制。曾有报道 ANP 特征图谱研究, 但由于 ANP 复方物质繁多, 成分干扰较大, 文献分析方法对栀子、郁金、麝香药味的质量差异分析尚有遗漏^[3,8-9], 因此笔者对 ANP 质量表征进行了系统研究。本实验采用 UPLC-PDA 多波长检测方法, 建立基于天然麝

香、天然牛黄以及 4 个植物药味质量的特征图谱和指标性成分含量分析方法, 并应用于 ANP 成品质量表征与评价, 为本品质量全面稳定控制提供分析方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity HClass 超高效液相色谱仪, 包括四元溶剂管理器, PDA 检测器, 在线温度控制器, 样品管理器, Empower 工作站; KQ-250 DE 型数控超声波清洗机, 昆山超声仪器有限公司; Mettler ML 204 型电子分析天平、Mettler XP 205 型电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利集团; 0.22 μm 微孔滤膜, 天津津腾实验设备有限公司。

1.2 材料

试药乙腈, 色谱纯, 默克公司; 磷酸, 分析纯, 天津光复精细化工研究所; 超纯水, Milli-Q 超纯水仪制备。

对照品盐酸小檗碱 (批号 110713-201613, 质量分数 86.8%)、盐酸巴马汀 (批号 110732-201611, 质量分数 86.8%)、盐酸黄连碱 (批号 112026-201601, 质量分数 95.1%)、栀子苷 (批号 110749-201718, 质量分数 97.6%)、黄芩苷 (批号 110749-201619, 质量分数 93.5%)、汉黄芩苷 (批号 112002-201702, 质量分数 98.5%)、黄芩素 (批号 111595-201306, 质量分数 97.8%)、汉黄芩素 (批号 111514-201605, 质量分数 100%)、姜黄素 (批号 110823-201405, 质量分数 98.9%)、绿原酸 (批号 110753-201716, 质量分数 99.3%) 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品表小檗碱 (批号 W06M8Z30708, 质量分数 98%)、京尼平龙胆双糖苷 (批号 ZM0507BA14, 质量分数 $\geq 98\%$)、西红花苷 I (批号 PO4M8F30582, 质量分数 $\geq 98\%$)、西红花苷 II (批号 P23M8F36647,

质量分数 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司; ANP 成品,北京同仁堂股份有限公司,批号 18017006~18017010,编号 S1~S5;北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号 18011406~18011410,编号 S6~S10)。

天然林麝麝香样品(批号 75441201)、天然牛黄样品(批号 600282556)、人工牛黄(批号 160304),北京同仁堂股份有限公司提供,由北京中研同仁堂医药研发有限公司检测中心鉴定,分别为鹿科动物林麝成熟雄体香囊的干燥分泌物、牛科动物牛的干燥胆石、人工牛黄;人工麝香,北京联鑫药业有限公司,批号 xx18010140004 (S1)、xx1801014002 (S2);体外培育牛黄,武汉健民大鹏药业有限公司,批号 xx18030150007。

2 方法与结果

2.1 样品处理

2.1.1 对照品溶液的制备 分别用甲醇配制供定量使用的对照品溶液,取京尼平龙胆双糖苷、梔子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、绿原酸、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、姜黄素对照品适量,精密称定,加甲醇制成含京尼平龙胆双糖苷 15 $\mu\text{g/mL}$ 、梔子苷 70 $\mu\text{g/mL}$ 、西红花苷 I 7 $\mu\text{g/mL}$ 、西红花苷 II 1 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 9 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 80 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩素 7 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩苷 15 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩素 5 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 75 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸黄连碱 14 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸表小檗碱 9 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸巴马汀 16 $\mu\text{g/mL}$ 、姜黄素 2 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液,即得对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 ANP 成品剪碎,取约 4 g,精密称定,精密加入等量硅藻土研细,精密称定约 0.9 g,置于具塞三角瓶中,精密加入 70%乙醇 50 mL,称定质量,超声(功率 250 W, 50 kHz)处理 45 min,放冷,用提取溶剂补足缺失的质量,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

取麝香样品约 45 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加入 70%乙醇,超声(功率 250 W, 50 kHz)处理 20 min,放冷,定容至刻度,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得麝香样品溶液。

取牛黄样品约 50 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加入 70%乙醇,超声(功率 250 W, 50 kHz)处理 20 min,放冷,定容至刻度,用 0.22 μm 微孔

滤膜滤过,取续滤液,即得牛黄样品溶液。

2.2 ANP 特征图谱分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Cortecs Shield RP₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μm),柱温 38 $^{\circ}\text{C}$,流动相为乙腈-0.3%磷酸水溶液,梯度洗脱: 0~5 min, 8%乙腈; 5~6 min, 8%~13%乙腈; 6~24 min, 13%~15%乙腈; 24~30 min, 15%~20%乙腈; 30~35 min, 20%~23%乙腈; 35~40 min, 23%~35%乙腈; 40~44 min, 35%~40%乙腈; 44~47 min, 40%~48%乙腈; 47~50 min, 48%~55%乙腈; 50~57 min, 55%~95%乙腈; 57~61 min, 95%乙腈; 61~62 min, 95%~8%乙腈; 62~65 min, 8%乙腈; 体积流量 0.2 mL/min, 全波长检测,分别在检测波长为 240 nm (1、2、17、32、34 号峰)、262 nm (6 号天然麝香特征峰)、274 nm (8~16、18、20、22、23、25、28、29 号色谱峰)、330 nm (3~5、7 号色谱峰)、360 nm (33 号天然牛黄色谱峰)、440 nm (19、21、24、26、27、30、31、35 号色谱峰)下分析,相对保留时间以盐酸小檗碱色谱峰为参比。ANP 特征图谱及色谱峰编号见图 1。

2.2.2 精密度考察 取同一 ANP (S3) 供试品,按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件进样 1 μL 分析测定,连续进样 6 针测定,记录 ANP 特征图谱中 35 个特征图谱峰面积和保留时间,得 ANP 供试品溶液特征图谱中 35 个特征峰保留时间和峰面积的精密度结果,各色谱峰保留时间和峰面积 RSD 值均小于 5%,表明仪器精密度符合要求。

2.2.3 稳定性考察 取同一 ANP (S3) 供试品溶液,按已建立的分析方法,分别于超声处理后 0、3、6、9、12、24 h 进样,记录 ANP 特征图谱中 35 个特征图谱峰面积和保留时间,得 ANP 供试品溶液特征图谱中 35 个特征峰保留时间和峰面积的稳定性结果,各色谱峰保留时间和峰面积 RSD 值均小于 5%,表明方法稳定性符合要求。

2.2.4 重复性考察 取 ANP 样品 (S3) 6 份,分别按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件进样 1 μL 分析测定,记录 ANP 特征图谱中 35 个特征图谱峰面积和保留时间,以盐酸小檗碱色谱峰保留时间和峰面积为参比,计算各特征峰相对峰面积和相对保留时间,得 ANP 供试品溶液特征图谱中 35 个特征峰相对峰面积和相对保留时间的重复性结果 RSD 值均小于 5%,表明重复性良好。

2.2.5 ANP 特征峰指认 分别取 ANP 处方 11 味药

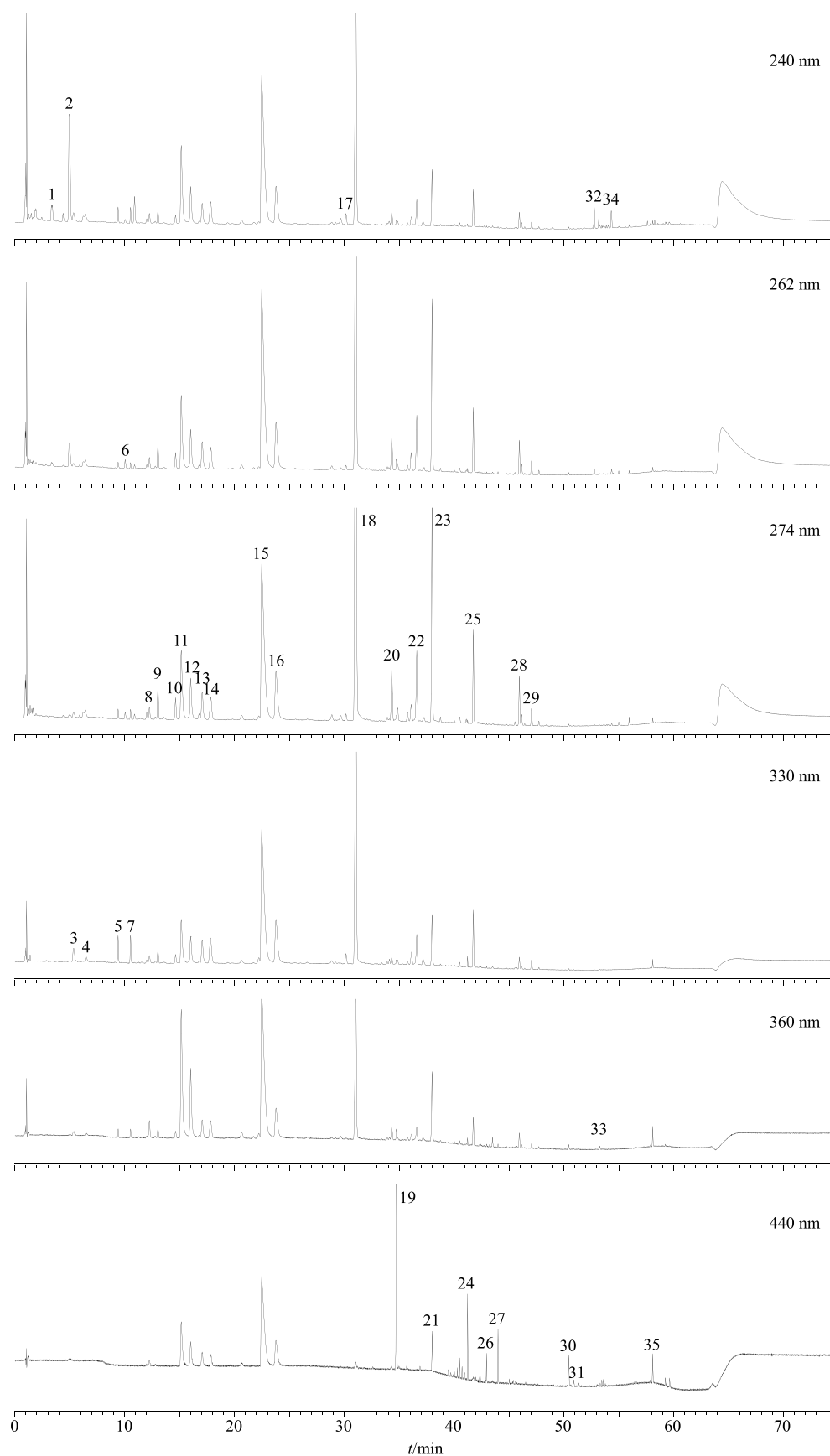


图 1 ANP 的特征图谱

Fig. 1 Characteristic chromatogram of ANP

材以及辅料蜂蜜,按照处方比例,采用已建立的样品处理方法和特征图谱分析方法进样测定,对 ANP 特征图谱中 15 个特征峰进行化学成分指认,并分析 35 个特征峰色谱峰来源。其中包括黄连药材特征峰 10 个,黄芩药材特征峰 9 个,栀子药材特征峰 9 个,郁金药材特征峰 4 个,牛黄特征峰 2 个,天然麝香特征峰 1 个。结果见表 1。

按“2.1.2”项下麝香样品溶液制备方法,处理天然麝香、人工麝香样品,采用已建立的 ANP 特征图谱分析方法进样测定,在检测波长为 210 nm 下得天然麝香和人工麝香色谱图对比图,见图 2。由图 2 可知,在色谱图 10 min 处天然麝香样品有 1 个最大吸收波长为 262 nm 的特征峰。可用于鉴别天然麝香。根据 ANP 处方配比配制 ANP 缺麝香阴性样品,采用已建立的分析方法在检测波长 262 nm 下测定,与 ANP 样品对比,由图 3 可知,该天然麝香特征峰无其他成分干扰,可作为 ANP 样品中天然麝香鉴别特征峰。

按照“2.1.2”项下牛黄样品溶液制备方法,处理天然牛黄、体外培育牛黄、人工牛黄样品,采用已建立的 ANP 特征图谱分析方法进样测定,在检测波长为 210 nm 下得天然牛黄、体外培育牛黄、

人工牛黄色谱图对比图,见图 4。由图 4 可知,在色谱图 53 min 处天然牛黄样品有 1 个最大吸收波长为 360 nm 的特征峰。可用于鉴别天然牛黄。根据 ANP 处方配比配制 ANP 缺牛黄阴性样品,采用已建立的分析方法,在检测波长 360 nm 下检测,与 ANP 样品对比,由图 5 可知,该天然牛黄特征峰无其他成分干扰,可作为 ANP 样品中天然牛黄鉴别特征峰。

2.3 指标性成分含量测定专属性考察

色谱条件同“2.2.1”项。

按照 ANP 处方配比,分别配制 ANP 缺栀子、缺黄芩、缺黄连、缺郁金阴性样品,按照 ANP 供试品处理方法处理各 ANP 阴性样品溶液,在 240、274、440 nm 下进行检测。在“2.2.1”项色谱条件下,检测波长为 240 nm 下,栀子药材中指标性成分栀子苷、京尼平龙胆双糖苷色谱峰处无明显干扰;检测波长为 440 nm 下,栀子药材中指标性成分西红花苷 I 色谱峰处无明显干扰;检测波长为 274 nm 下,黄连药材中指标性成分盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、表小檗碱色谱峰处无明显干扰;检测波长为 440 nm 下,郁金药材中指标性成分姜黄素色谱峰处无明显干扰;检测波长为 274 nm 下,

表 1 ANP 特征图谱中 35 个特征峰信息

Table 1 Information of 35 characteristic peaks in ANP characteristic chromatogram

峰号	t_R /min	化学成分或类型	检测波长/nm	来源	峰号	t_R /min	化学成分或类型	检测波长/nm	来源
1	0.152	京尼平龙胆双糖苷	240	栀子	19	1.519	西红花苷 I	440	栀子
2	0.222	栀子苷	240	栀子	20	1.537	黄酮	274	黄芩
3	0.239	酚类	330	黄连	21	1.619	西红花苷 II	440	栀子
4	0.290	酚类(绿原酸)	330	栀子/黄连	22	1.680	黄酮	274	黄芩
5	0.417	酚类	330	黄连	23	1.686	汉黄芩苷	274	黄芩
6	0.445	未知	262	天然麝香	24	1.821	二萜类	440	栀子
7	0.467	酚类	330	黄连	25	1.844	黄芩素	274	黄芩
8	0.543	生物碱	274	黄连	26	1.897	二萜类	440	栀子
9	0.578	黄酮	274	黄芩	27	1.944	二萜类	440	栀子
10	0.650	黄酮	274	黄芩	28	2.029	汉黄芩素	274	黄芩
11	0.673	盐酸黄连碱	274	黄连	29	2.078	黄酮	274	黄芩
12	0.711	表小檗碱	274	黄连	30	2.228	姜黄素	440	郁金
13	0.758	生物碱	274	黄连	31	2.248	去甲氧基姜黄素	440	郁金
14	0.793	生物碱	274	黄连	32	2.330	未知	240	郁金
15	1.000	盐酸小檗碱	274	黄连	33	2.352	未知	360	天然牛黄
16	1.058	盐酸巴马汀	274	黄连	34	2.398	未知	240	郁金
17	1.336	酚类	240	栀子	35	2.565	胆红素	440	牛黄
18	1.374	黄芩苷	274	黄芩					

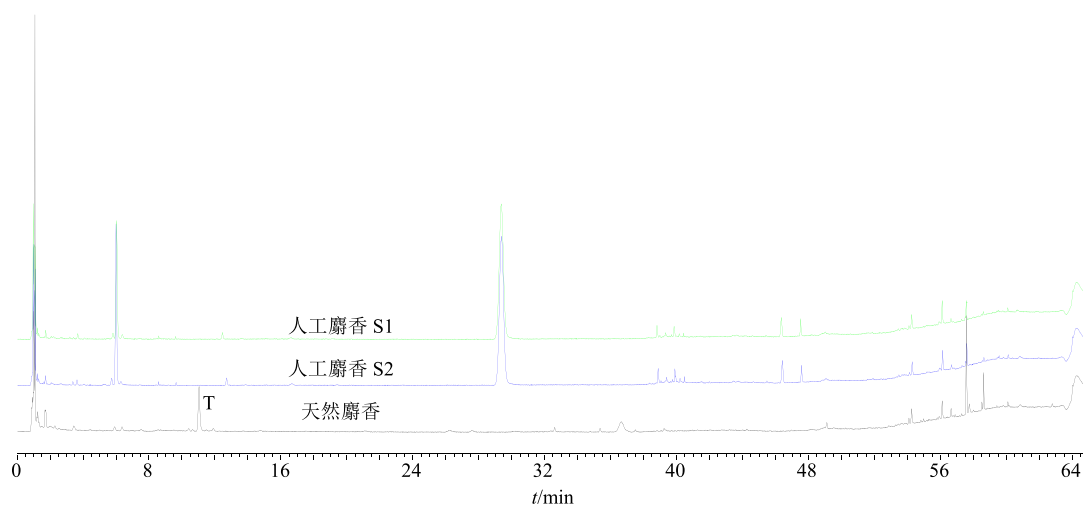


图 2 天然麝香和人工麝香色谱图对比图 (210 nm, T 为天然麝香特征峰)

Fig. 2 Chromatographic comparison of natural musk and artificial musk (210 nm, T is a characteristic peak of natural musk)

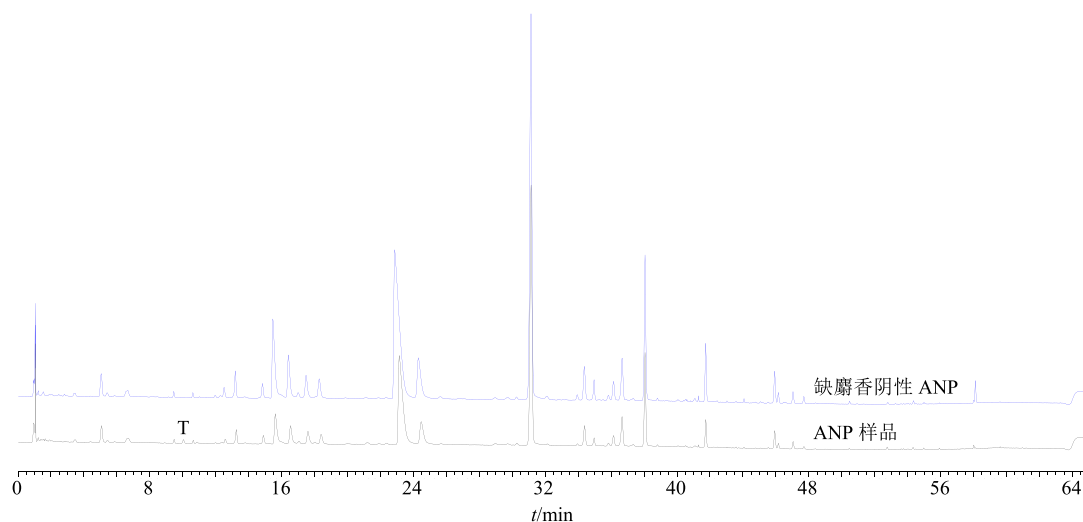


图 3 ANP 缺麝香阴性样品与 ANP 供试品色谱图对比图 (262 nm)

Fig. 3 Chromatographic comparison of ANP musk-deficient negative samples and ANP samples (262 nm)

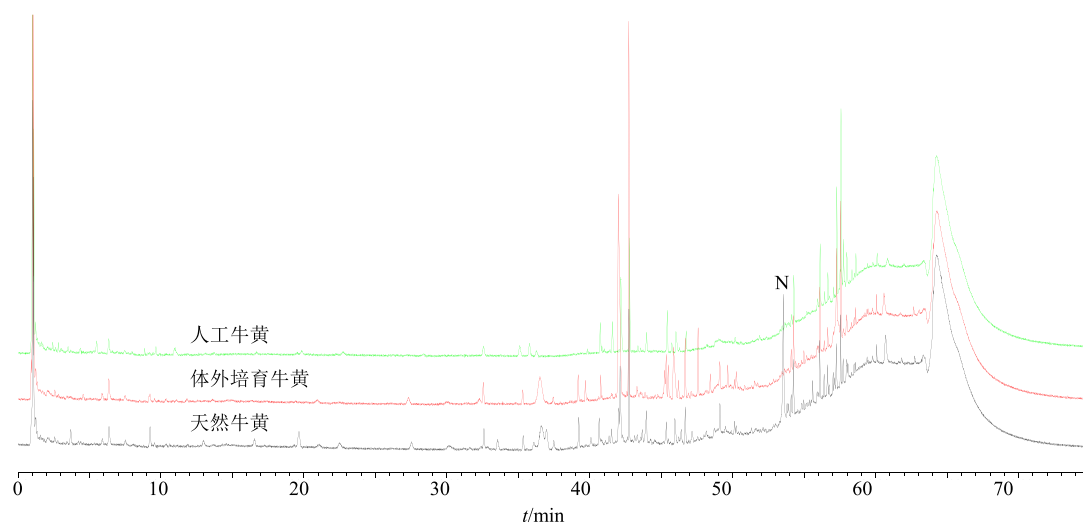


图 4 天然牛黄、人工牛黄和体外培育牛黄色谱图对比图 (210 nm, N 为天然牛黄特征峰)

Fig. 4 Chromatographic comparison of natural bezoar and artificial bezoar and cultured bezoar *in vitro* (210 nm, N is a characteristic peak of natural bezoar)

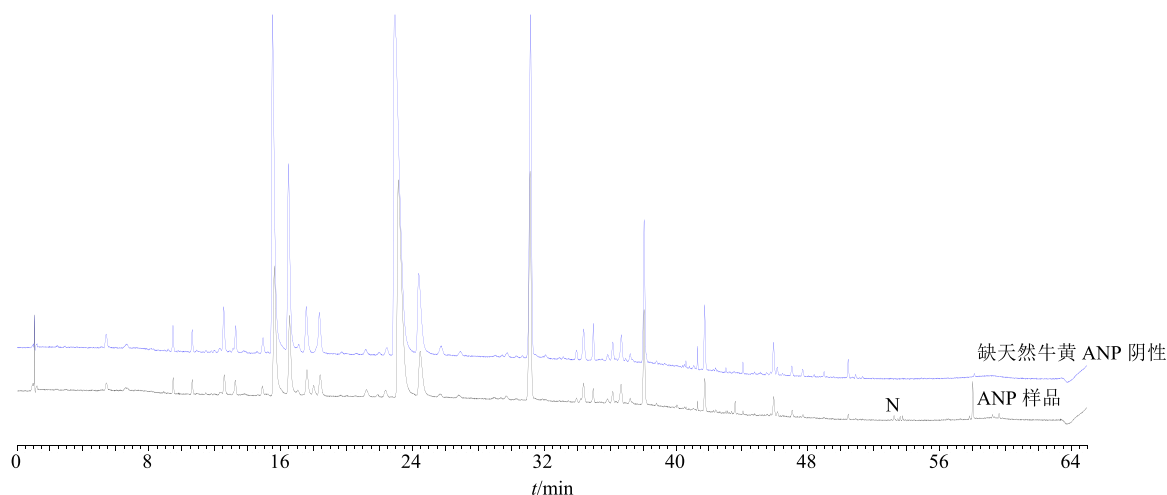


图 5 ANP 缺牛黄阴性样品与 ANP 供试品色谱图对比图 (360 nm)

Fig. 5 Chromatogram comparison between ANP deficient bezoar negative samples and ANP samples (360 nm)

黄芩药材中指标性成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素色谱峰处无明显干扰。

2.4 指标性成分含量测定方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别配制质量浓度为栀子苷 1.606 mg/mL、京尼平龙胆双糖苷 0.740 mg/mL、盐酸黄连碱 0.694 mg/mL、表小檗碱 0.376 mg/mL、盐酸小檗碱 1.127 mg/mL、盐酸巴马汀 0.812 mg/mL、汉黄芩苷 0.378 mg/mL、黄芩苷 0.164 mg/mL、黄芩素 0.576 mg/mL、汉黄芩素 0.437 mg/mL、姜黄素 0.052 mg/mL、西红花苷 I 0.051 mg/mL、西红花苷 II 0.050 mg/mL 的对照品溶液储备液，采用 70%乙醇溶液稀释进样，以进样量为横坐标 (X)，对照品峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线。建立色谱峰

面积对进样量的回归方程 (表 2)，结果表明，各成分在检测的质量浓度范围内线性关系良好，含量测定可采用外标一点法测定。

2.4.2 精密度考察 取 ANP 样品 (S3) 1 份，按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备，按“2.2.1”项色谱条件进样 1 μ L，连续进样 6 针测定，记录 ANP 特征图谱中 13 个指标成分峰面积值和保留时间，计算仪器精密度。结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、西红花苷 I、西红花苷 II、姜黄素峰面积值精密度 RSD 值分别为 1.22%、1.50%、0.71%、1.98%、0.35%、0.37%、1.83%、0.98%、1.16%、0.15%、0.39%、1.10%、

表 2 13 个指标性成分线性回归方程

Table 2 Linear regression equation of 13 index components

成分	回归方程	r	线性范围/ μ g
盐酸黄连碱	$Y=20\ 187\ 868.395\ 8\ X-12\ 334.176\ 0$	0.999 7	2.78~27.77
表小檗碱	$Y=18\ 689\ 667.642\ 5\ X-7\ 172.694\ 8$	0.999 5	1.50~15.04
盐酸小檗碱	$Y=20\ 178\ 395.685\ 8\ X-34\ 790.159\ 7$	0.999 6	9.02~180.32
盐酸巴马汀	$Y=21\ 760\ 615.762\ 2\ X-11\ 125.073\ 6$	0.999 1	3.25~32.48
黄芩苷	$Y=18\ 171\ 058.599\ 3\ X+21\ 388.205\ 2$	0.999 6	32.81~164.05
汉黄芩苷	$Y=233\ 333\ 794.178\ 5\ X+4\ 112.721\ 2$	0.999 4	0.14~1.36
黄芩素	$Y=24\ 471\ 989.655\ 3\ X+3\ 259.806\ 2$	0.999 4	0.58~11.51
汉黄芩素	$Y=31\ 339\ 264.137\ 0\ X+1\ 878.298\ 9$	0.999 5	0.44~4.37
京尼平龙胆双糖苷	$Y=3\ 783\ 434.337\ 3\ X+2\ 515.160\ 5$	0.999 1	5.92~59.21
栀子苷	$Y=7\ 718\ 134.839\ 0\ X+3\ 527.211\ 2$	0.999 7	6.64~106.17
西红花苷 I	$Y=17\ 589\ 783.780\ 5\ X+2\ 320.277\ 3$	0.999 2	1.22~10.19
西红花苷 II	$Y=35\ 246\ 402.039\ 0\ X+1\ 948.153\ 9$	0.999 6	0.20~4.98
姜黄素	$Y=42\ 904\ 109.085\ 2\ X-2\ 518.793\ 3$	0.999 4	0.21~7.31

1.17%，保留时间精密度 RSD 值分别为 0.22%、0.30%、0.31%、0.25%、0.29%、0.32%、0.31%、0.34%、0.18%、0.13%、0.11%、0.12%、0.08%，各色谱峰保留时间和峰面积 RSD 值均小于 5%，结果表明该方法精密度符合要求。

2.4.3 稳定性考察 取 ANP 样品 (S3) 1 份，按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备，按“2.2.1”项色谱条件进样 1 μL ，分别于样品制备后 0、1、3、6、9、12、24 h 记录峰面积，计算各指标性成分含量。结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、西红花苷 I、西红花苷 II、姜黄素含量稳定性 RSD 值分别为 1.85%、1.50%、0.70%、1.62%、0.39%、0.48%、3.45%、1.22%、1.59%、0.55%、0.35%、1.56%、1.07%，各指标性成分含量稳定性 RSD 值均小于 5%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取 ANP 样品 (S3) 6 份，分别按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备，按“2.2.1”项色谱条件进样 1 μL 分析测定，记录峰面积，计算各指标性成分含量。结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、西红花苷 I、西红花苷 II、姜黄素平均质量分数分别为 2.48、1.05、2.99、0.85、0.46、0.69、7.30、1.29、0.23、0.13、0.32、0.02、0.04 mg/g，RSD 值分别为 1.11%、1.46%、0.99%、0.76%、0.59%、0.60%、3.45%、1.30%、1.66%、0.94%、0.85%、1.10%、2.00%，RSD 值均小于 5%，结果明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率考察 取已知指标性成分含量的本品硅藻土处理粉末 6 份，每份 450 mg，按高、中、低 3 个质量浓度，每个质量浓度平行 3 份样品，加入相应对照品，加入 70%乙醇 50 mL，称定质量，超声 (250 W, 50 kHz) 45 min，放冷，用 70%乙醇溶液补足减失的质量，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，进样 1 μL 测定。根据测得的各成分的量，计算各成分的加样回收率和 RSD，结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、西红花苷 I、西红花苷 II、姜黄素平均回收率分别为 95.37%、100.58%、95.55%、96.54%、101.54%、102.30%、98.39%、90.12%、97.67%、99.94%、96.36%、98.00%、96.11%，RSD 值分别为

3.34%、4.65%、2.52%、4.96%、2.93%、2.58%、4.80%、2.98%、5.04%、2.84%、2.63%、3.27%、2.71%，13 个指标成分回收率范围 90.12%~101.54%，RSD 值均小于 5%，结果表明测定方法准确。

2.5 多批次 ANP 质量测定结果

2.5.1 ANP 中 13 个指标成分含量测定结果 采用已建立的分析方法，分析测定 10 批次 ANP 中 13 个指标性成分含量，结果见表 3。

2.5.2 ANP 特征图谱检测结果 采用已建立的分析方法，同时对 10 批次 ANP 进行分析测定，记录特征图谱中 35 个特征峰峰面积值，10 批次 ANP 中 35 个特征峰均可检出。以盐酸小檗碱色谱峰峰面积为参比，计算 10 批次 ANP 样品 35 个特征峰相对峰面积及 RSD 值，见表 4。

2.6 多批次 ANP 质量分析

以指标性成分含量进行分析，10 批次 ANP 中 13 个指标性成分含量 RSD 值在 4.19%~20.08%，其 RSD 值从小到大依次为盐酸巴马汀 (4.19%) < 盐酸小檗碱 (4.39%) < 京尼平龙胆双糖苷 (4.71%) < 盐酸黄连碱 (5.20%) < 西红花苷 I (8.00%) < 栀子苷 (8.99%) < 汉黄芩苷 (8.62%) < 表小檗碱 (9.56%) < 汉黄芩素 (9.42%) < 黄芩苷 (10.00%) < 西红花苷 II (14.87%) < 姜黄素 (15.08%) < 黄芩素 (20.08%)，其中 RSD > 10% 的指标性成分有西红花苷 II、姜黄素、黄芩素。

以特征色谱峰相对峰面积值进行分析，10 批次 ANP 中 35 个特征峰相对峰面积 RSD 值在 1.5%~26.79%，其中 RSD < 5% 的特征峰有 8 个：峰 16 (黄连-盐酸巴马汀)、峰 14 (黄连-生物碱)、峰 9 (黄芩-黄芩)、峰 19 (栀子-西红花苷 I)、峰 11 (黄连-盐酸黄连碱)、峰 31 (郁金-去甲氧基姜黄素)、峰 7 (黄连-酚类)、峰 10 (黄芩-黄酮)；其中 RSD 值在 5%~10% 的特征峰有 11 个：峰 3 (黄连-酚类)、峰 18 (黄芩-黄芩苷)、峰 1 (栀子-栀子苷)、峰 13 (黄连-生物碱)、峰 24 (栀子-二萜类)、峰 28 (黄芩-汉黄芩素)、峰 17 (栀子-酚类)、峰 21 (栀子-西红花苷 II)、峰 22 (黄芩-黄酮)、峰 4 (栀子/黄连酚类)、峰 26 (栀子-二萜类)；RSD > 10% 的特征峰有 11 个：峰 30 (郁金-姜黄素)、峰 2 (栀子-栀子苷)、峰 27 (栀子-二萜类)、峰 20 (黄芩-黄酮)、峰 34 (郁金-未知)、峰 29 (黄芩-黄酮)、峰 25 (黄芩-黄芩素)、峰 35 (牛黄-胆红素)、峰 6 (天然麝香)、峰 33 (天然牛黄)、峰 32 (郁金-未知)。

表 3 10 批次 ANP 中 13 个指标性成分含量测定结果
Table 3 Determination results of 13 index components in 10 batches of ANP

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	栀子苷	盐酸黄连碱	表小檗碱	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	黄芩苷	汉黄芩苷
S1	2.55	1.02	0.65	3.27	0.77	9.72	1.52
S2	2.69	1.00	0.65	3.29	0.77	10.08	1.60
S3	2.48	0.85	0.46	2.99	0.69	7.30	1.29
S4	2.64	0.99	0.62	3.24	0.74	9.80	1.52
S5	3.02	0.93	0.55	3.26	0.74	10.54	1.70
S6	3.03	0.91	0.57	3.03	0.72	10.49	1.70
S7	3.03	0.95	0.56	3.02	0.71	10.52	1.71
S8	3.23	0.91	0.59	3.04	0.70	10.40	1.70
S9	3.06	0.94	0.57	3.37	0.78	10.57	1.73
S10	3.02	0.93	0.55	3.26	0.74	10.54	1.70
均值	2.87	0.94	0.58	3.17	0.74	10.01	1.62
RSD/%	8.99	5.20	9.56	4.39	4.19	10.00	8.62

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	西红花苷 I	西红花苷 II	黄芩素	汉黄芩素	姜黄素	京尼平龙胆双糖苷
S1	0.44	0.03	0.41	0.16	0.06	1.08
S2	0.43	0.03	0.39	0.16	0.06	1.12
S3	0.32	0.02	0.23	0.13	0.04	1.05
S4	0.41	0.03	0.47	0.19	0.06	1.09
S5	0.41	0.03	0.30	0.18	0.05	1.16
S6	0.40	0.03	0.35	0.17	0.05	1.19
S7	0.40	0.03	0.34	0.17	0.05	1.19
S8	0.40	0.03	0.33	0.17	0.05	1.19
S9	0.41	0.03	0.31	0.17	0.05	1.21
S10	0.41	0.03	0.30	0.18	0.05	1.16
均值	0.40	0.03	0.34	0.17	0.05	1.14
RSD/%	8.00	14.87	20.08	9.42	15.08	4.71

3 讨论

3.1 ANP 特征图谱合多指标成分含量测定方法

在分析方法建立过程中,考察了不同色谱柱、不同流动相系统、不同温度、不同体积流量、不同酸度、不同进样量的色谱条件,发现 Waters Cortecs Shield RP₁₈ Column (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱分离效果最好,可同时满足酸性和碱性成分的分离,乙腈-酸水流动相系统分离效果较好,甲酸条件下基线干扰较大,所以优选磷酸水为流动相;在温度 34~45 ℃,栀子苷和汉黄芩素 2 个色谱峰的分离效果有相反趋势,最终确定为 38 ℃,各色谱峰均达到较好分离效果;在 0.2、0.3、0.4 mL/min 不同体积流量下考察发现,0.2 mL/min 的体积流量

可增加色谱峰响应值,提高 ANP 中多指标成分的测定准确性;不同酸度考察发现 0.25%~0.30%磷酸水可满足色谱峰分离条件;不同进样量考察发现大于 1 μL 的进样量溶剂效应明显,影响色谱峰峰形。

3.2 ANP 质量分析

综合以上质量分析:《中国药典》2015 年版中,对 ANP 处方原料药材栀子、黄芩、黄连进行了指标性成分含量控制,相应的指标性成分含量均较为稳定。①黄连-“味连”项下同时控制了小檗碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱 4 个生物碱类成分,因此 ANP 中源于黄连药材的指标性成分含量及特征峰相对含量均较为稳定;②栀子药材的西红花苷类成分含量比栀子苷成分含量更为稳定,由前期研究基

表 4 10 批次 ANP 特征图谱特征峰相对峰面积

Table 4 Ratio of characteristic peak to peak area of 10 batches of ANP characteristic chromatograms

峰号	相对峰面积										均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.062	0.064	0.063	0.063	0.064	0.074	0.074	0.073	0.067	0.067	0.067	7.08
2	0.296	0.311	0.309	0.309	0.311	0.379	0.381	0.403	0.344	0.351	0.339	11.18
3	0.047	0.048	0.047	0.047	0.048	0.054	0.055	0.053	0.049	0.051	0.050	6.14
4	0.006	0.008	0.007	0.005	0.007	0.007	0.006	0.007	0.007	0.008	0.007	10.30
5	0.042	0.043	0.041	0.041	0.043	0.048	0.047	0.045	0.042	0.045	0.044	5.47
6	0.027	0.024	0.024	0.024	0.023	0.036	0.036	0.035	0.038	0.039	0.031	22.03
7	0.049	0.051	0.049	0.049	0.050	0.054	0.054	0.053	0.049	0.049	0.051	4.51
8	0.032	0.033	0.031	0.031	0.033	0.034	0.036	0.035	0.033	0.030	0.033	5.42
9	0.081	0.084	0.082	0.082	0.086	0.084	0.085	0.083	0.079	0.078	0.082	3.16
10	0.062	0.062	0.061	0.061	0.062	0.061	0.066	0.061	0.056	0.056	0.061	4.92
11	0.266	0.260	0.260	0.260	0.265	0.257	0.269	0.257	0.239	0.245	0.258	3.60
12	0.160	0.160	0.154	0.154	0.152	0.153	0.150	0.156	0.137	0.136	0.151	5.47
13	0.107	0.109	0.111	0.111	0.106	0.096	0.096	0.096	0.093	0.098	0.102	7.14
14	0.078	0.081	0.082	0.082	0.082	0.078	0.079	0.078	0.076	0.077	0.079	2.80
15	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
16	0.237	0.237	0.231	0.231	0.232	0.240	0.236	0.232	0.232	0.229	0.234	1.50
17	0.028	0.028	0.029	0.029	0.028	0.032	0.025	0.030	0.028	0.034	0.029	8.45
18	2.135	2.202	2.174	2.174	2.186	2.488	2.502	2.458	2.273	2.323	2.292	6.23
19	0.133	0.129	0.124	0.124	0.133	0.132	0.132	0.129	0.122	0.126	0.128	3.26
20	0.114	0.125	0.118	0.118	0.119	0.161	0.158	0.161	0.149	0.151	0.137	14.65
21	0.019	0.019	0.018	0.018	0.020	0.016	0.018	0.017	0.015	0.016	0.018	10.04
22	0.189	0.199	0.190	0.190	0.194	0.238	0.234	0.236	0.222	0.230	0.212	10.11
23	0.461	0.481	0.463	0.463	0.461	0.554	0.561	0.553	0.507	0.517	0.502	8.36
24	0.032	0.035	0.033	0.033	0.033	0.032	0.032	0.032	0.027	0.028	0.032	7.71
25	0.158	0.150	0.183	0.183	0.194	0.146	0.139	0.135	0.113	0.116	0.152	18.38
26	0.006	0.008	0.007	0.005	0.007	0.007	0.006	0.007	0.007	0.008	0.007	10.30
27	0.033	0.033	0.036	0.036	0.034	0.033	0.033	0.032	0.025	0.024	0.032	13.01
28	0.069	0.071	0.082	0.082	0.088	0.079	0.079	0.078	0.071	0.079	0.078	7.73
29	0.023	0.021	0.026	0.026	0.023	0.031	0.031	0.031	0.021	0.029	0.026	15.63
30	0.040	0.038	0.039	0.039	0.032	0.031	0.034	0.031	0.030	0.032	0.035	11.07
31	0.007	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008	0.008	0.008	0.007	0.007	0.008	3.83
32	0.024	0.029	0.034	0.034	0.034	0.054	0.054	0.050	0.047	0.047	0.041	26.79
33	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	23.90
34	0.061	0.054	0.076	0.070	0.077	0.094	0.085	0.078	0.073	0.077	0.075	15.22
35	0.014	0.016	0.015	0.013	0.016	0.023	0.021	0.019	0.015	0.015	0.017	20.04

础可知, 梔子药材中梔子苷质量分数以 2%~6% 为常见, 但梔子药材的加工采收等关键因素及质量等级评价与西红花苷类成分含量更为密切相关^[10], 因此 10 批次 ANP 中梔子药材西红花苷 I 含量较为稳

定, 梔子药材质量等级较为稳定; ③郁金药材中姜黄素、32 号峰未知成分, 经研究发现为黄丝郁金特有成分峰, 可区别于其他基原郁金^[11], 黄丝郁金特征成分含量波动较大可与其质量控制标准尚未对

特征成分进行含量控制相关,由测定结果可知 10 批次 ANP 中所含郁金原料均为黄丝郁金,基原稳定;④黄芩药材中的黄芩素成分,20、29 号峰黄酮类成分的含量和相对含量均波动较大,由前期研究发现多批次黄芩药材汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量差异较大,由于黄芩素和汉黄芩素为黄芩苷、汉黄芩苷的苷元,黄芩饮片炮制需经过蒸制/煮制杀霉保苷的过程,对黄芩素和汉黄芩素含量可能有一定的影响。

本研究中天然麝香药材特征峰为首次在中成药制剂中发现,由于人工麝香研究资料无法查询,该天然麝香成分的药理及化学文献未检索到,在 ANP 中天然麝香特征峰的含量差异有待研究。另外,实验对 ANP 中胆红素成分进行了研究测定,由于 ANP 中胆红素成分含量与其他成分含量差异较大,无法同时测定,因此本分析方法对牛黄药味的分析测定主要为天然牛黄特征峰的鉴别,初步研究发现该色谱峰与文献报道不一致,有待进一步确定^[12]。

综上所述,由于 ANP 中包含 11 个处方药味,化学成分复杂,成分类型差异较大,在普通液相条件下难以分析测定,本实验采用 UPLC-PDA 多波长色谱法,对 ANP 中主要药味天然麝香、天然牛黄、栀子、黄芩、黄连、郁金进行了较为全面整体的分析,各特征峰通过排除阴性干扰,实现了对 ANP 成品进行原料药材的质量分析,并首次实现了以天然麝香为原料的成药制剂质量鉴别^[13-14]。

参考文献

- [1] 付 艳. 安宫牛黄丸联合神经节苷脂治疗儿童病毒性脑炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(3): 755-760.
- [2] 朱晓宇, 郭胜亚, 徐懿乔, 等. 安宫牛黄丸防治脑血管疾病作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1067-1072.
- [3] 徐 彤, 黄萌萌, 刘丽芳, 等. 安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式分析 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2448-2454.
- [4] 刘潇潇, 周颖仪, 杨立伟, 等. 清开灵系列制剂的氨基酸色谱指纹图谱 [J]. 中成药, 2014, 36(12): 2537-2542.
- [5] 贡庆欣, 李文君, 张 进. 原子吸收分光光度法测定安宫牛黄丸中雄黄和朱砂的含量 [J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(21): 89-91.
- [6] 李朝峰. 雄黄及含雄黄中成药的质量控制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [7] 李 佳, 张贵君, 于 萍. 安宫牛黄丸中麝香酮和右旋龙脑含量测定 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(3): 41-42.
- [8] 徐 彤, 黄萌萌, 陈家进, 等. 安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 14-19.
- [9] 马 群, 艾 路, 刘 勇, 等. 安宫牛黄丸中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2647-2648.
- [10] 肖日传, 苗 琦, 罗光明, 等. 栀子药材商品规格等级标准研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 663-668.
- [11] 刘雯雪, 王昭懿, 赵崇军, 等. 黄丝郁金挥发油含量测定及指纹图谱的建立 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5923-5928.
- [12] 杨仕珉, 詹雪艳, 冯 欣, 等. 基于牛黄特征峰的安宫牛黄丸特征指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2923-2926.
- [13] 张荣寰, 彭 平, 杜 菁, 等. 一种中药或中药组合物制剂的特征图谱建立方法与应用: 中国, CN201910339124.5 [P]. 2019-04-25.
- [14] 彭 平, 迟玉明, 张京彦, 等. 一种中药或中药组合物制剂的质量检验方法与鉴别应用: 中国, CN201910338749.X [P]. 2019-04-25.