

名贵中药材牛黄中总磷脂含量测定

黄凤萍¹, 梁芳瑜¹, 何健², 杜华洲³, 黄可¹, 李华翔¹, 余婧婧¹, 肖凤霞^{1*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006;

2. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110;

3. 广州采芝林药业有限公司, 广东 广州 510360)

【摘要】目的 建立牛黄中总磷脂含量测定方法, 对不同牛黄样品中总磷脂的含量进行测定及比较分析, 补充牛黄的真伪鉴别方法, 完善质量评价体系。**方法** 收集天然牛黄、体外培育牛黄、人工牛黄及网购牛黄等样品; 采用 Folch 试剂超声提取、强酸消化、钼蓝显色, UV-VIS 法在 824 nm 测定吸光度, 计算总磷脂含量, 统计学比较分析。**结果** 不同样品中总磷脂含量差异较大, 其中两个天然牛黄为 0.810% 和 1.118%, 一个体外培育牛黄为 0.076%, 5 个人工牛黄在 0.553%~0.689% 之间, 7 个网购样品中 6 个样品均为 0。与天然牛黄总磷脂含量相比, 人工牛黄差异显著 ($P < 0.01$), 体外培育牛黄差异极显著 ($P < 0.001$)。**结论** 所建立测定牛黄药材总磷脂含量的方法, 操作简便、稳定可靠; 牛黄中总磷脂含量可反映牛黄药材的质量差异。该方法可作为企业内控标准, 完善牛黄质量评价体系提供参考依据。

【关键词】 牛黄; 总磷脂测定; 钼蓝比色法; 质量评价

DOI:10.70976/j.1008-0805.SZGYGY-2025-0512

CSTR:32392.14.j.1008-0805.SZGYGY-2025-0512

【中图分类号】R284.1;R927.2 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1008-0805(2025)05-0879-06

牛黄是我国传统名贵中药材,《神农本草经》中列为上品,临床药用历史悠久。据《中华人民共和国药典》,牛黄(Bovis Calculus)为牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin 的干燥胆结石(即天然牛黄),其性味甘凉,入心、肝二经,既有清心豁痰开窍之功,又有凉肝定惊清热解毒之效,用于热病神昏、中风痰迷、惊痫抽搐、癫痫发狂、咽喉肿痛、口舌生疮、痈肿疔疮^[1,2]。天然牛黄稀缺昂贵,产量远不能满足传统中成药生产的需求量,为缓解牛黄资源市场供应短缺现象,我国已批准体外培育牛黄、人工牛黄药用^[1],最近拟允许其试点进口牛黄(指天然牛黄)用于中成药生产^[3],《中华人民共和国药典》对不同牛黄药材的含量测定指标均为胆酸和胆红素类成分,但不同产地和初加工以及不同制备工艺的牛黄中化学成分含量存在区别^[4],其科学性尚待进一步确证。近年来,天然牛黄价格飙升,市场上出现了多种造假牛黄,导致牛黄的质量更加参差不齐^[5]。

已有研究证明,动物类中药含有磷脂类成分,并认为鹿茸^[6]、金钱白花蛇^[7]等药材中总磷脂均可作为质量评价依据。有学者提出了基于化学全息成分建立牛黄质量评价控制的思路^[8],但目前尚无牛黄中总磷脂

含量相关研究。本文建立了牛黄总磷脂含量测定方法,测定并比较分析了不同牛黄(含网购)样品的总磷脂含量,以期完善牛黄药材的质量评价体系。

1 仪器与材料

1.1 仪器

T2602S 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂);BSA224S-CW 电子天平(广东正一仪器有限公司)。

1.2 试剂

磷酸二氢钾(99.5%,批号:20190102,福晨(天津)化学试剂有限公司),钼酸铵(98%,批号:C15413796,上海麦克林生化科技股份有限公司),无水醋酸钠(批号:B1425062,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),抗坏血酸(99%,批号:I2208265,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

牛黄样品详情见表 1,图 1 所示,所有样品经广州

收稿日期:2024-07-06; 修订日期:2024-12-30

基金项目:广州中医药大学学术学位推免生专项(广中医学办[2022]173号);

广东省农村科技特派员-化橘红道地药材的种植推广项目(KTP20200136);

省级乡村振兴专项资金种业振兴行动项目-化橘红品种培育(2024-NPY-00-042)

作者简介:黄凤萍(1996-),女(汉族),广西梧州人,广州中医药大学在读硕士研究生,主要从事中药资源开发及新药研究工作。

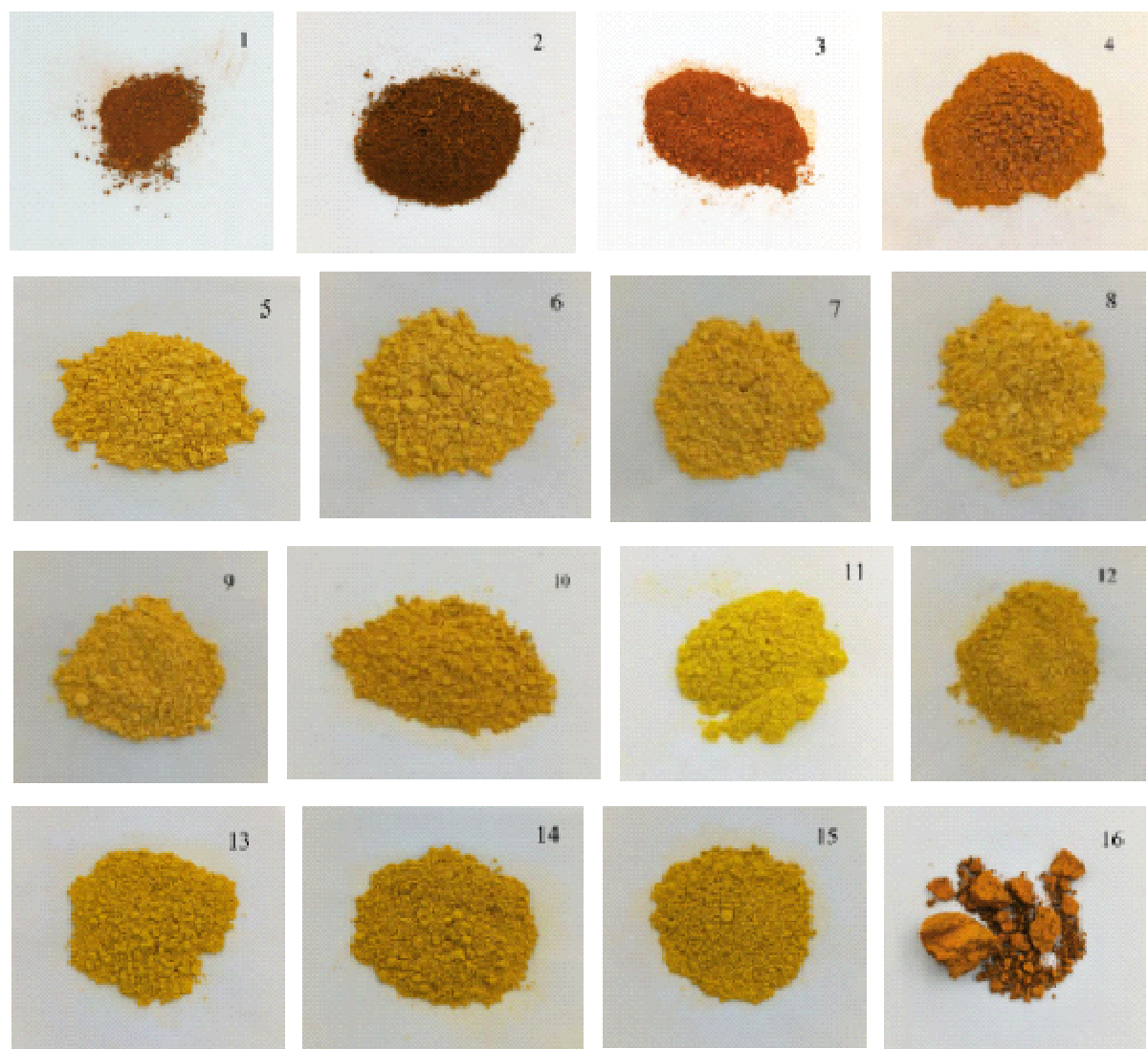
*通讯作者简介:肖凤霞(1973-),女(汉族),山东聊城人,广州中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事中药资源开发及新药研究、药品科学监管研究工作。

中医药大学高明副教授鉴定。

表 1 牛黄药材样品

样品编号	药材类型	颜色	地区
1	天然牛黄	棕褐色	西藏
2	不详	土黄色	云南
3	体外培育牛黄	红黄色	不详
4	天然牛黄	红黄色	不详
5	人工牛黄	黄色	安徽合肥
6	人工牛黄	黄色	安徽合肥
7	人工牛黄	黄色	安徽合肥
8	人工牛黄	黄色	安徽合肥
9	人工牛黄	黄色	安徽合肥
10	人工牛黄粉(网购)	黄色	安徽亳州
11	人工牛黄粉(网购)	亮黄色	安徽亳州
12	人工牛黄粉(网购)	黄色	安徽亳州
13	人工牛黄粉(网购)	黄色	安徽亳州
14	人工牛黄粉(网购)	黄色	安徽亳州
15	人工牛黄粉(网购)	黄色	安徽亳州
16	人工牛黄粉(网购)	棕褐色	安徽亳州

1-9 号样品来自同行赠送,10-16 号样品购自淘宝



牛黄样品编号见表 1

图 1 不同牛黄样品图

2 方法与结果

2.1 试剂配制^[9-11]

(1)Folch 试剂:氯仿-甲醇 2:1 配制。

(2)磷显色液:A 液:分别称取钼酸铵 1.25 g,无水醋酸钠 4.1 g 于烧杯中,以纯水溶解,并定容至 500 mL 容量瓶中。B 液:为 10% 抗坏血酸水溶液。使用时将 A 液与 B 液按 9:1 比例混合,即为磷显色液。

(3)消化剂:取烧杯加入 50 mL 纯水,浓硫酸 28 mL 慢慢加入并搅拌均匀,放置至室温,再缓慢加入 70% 高氯酸 6.5 mL,稍放置,移至 100 mL 容量瓶中,纯水定容,即得。

2.2 标准磷试液的制备

取干燥至恒重的磷酸二氢钾 0.0513 g 于烧杯中,纯水溶解,并定容至 50 mL 容量瓶中,即得 $1.026 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准磷溶液,磷含量为 $0.233 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 供试品溶液制备

分别取表 1 中样品粉末(过 40 目筛)0.5 g,精密称定,置刻度试管中,加入 Folch 试剂 5.0 mL,称定总质量,超声(功率 250 W、频率 50 kHz)提取 30 min,放置室温,称重,加入 Folch 试剂补至原重, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清液,Folch 试剂定容于 5 mL 容量瓶

中,摇匀即得供试品溶液,编号为供试品 1~16。

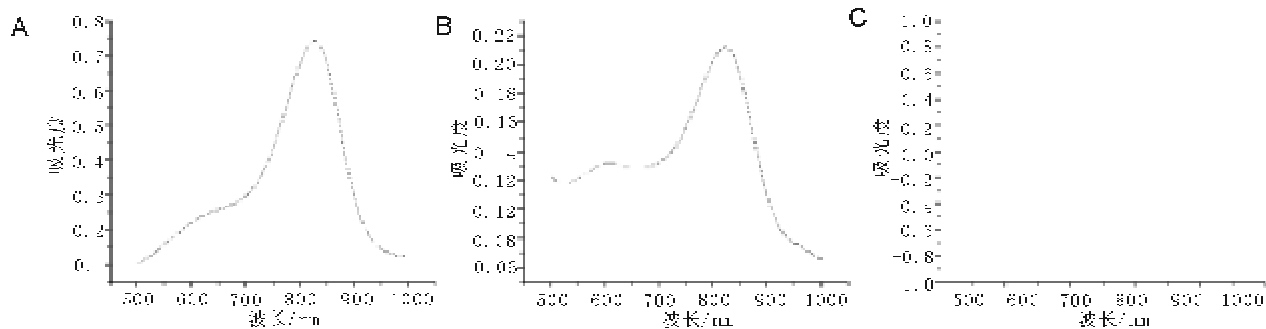
2.4 最大吸收波长的测定

取标准磷溶液 0.20 mL 置于 10 mL 离心管中,纯水补足体积至 1.0 mL,为对照管;取供试品 3 溶液 1.0 mL,置于 10 mL 离心管中,为待测管;取纯水 1.0 mL,置于 10 mL 离心管中,为空白管;各管分别加入 0.27 mL 消化剂,混匀、消化 10 min,冷却后,加入 4.0 mL 磷显色液,于 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ 水浴 10 min,冷却,按《中华人民共和国药典》(四部,2020 版)通则光谱法中紫外-可见分光光度法^[12],于 500~1000 nm 区间扫描,测最大吸收波长。

测得最大吸收波长为 824 nm,见图 2。

2.5 标准曲线的绘制

分别取标准磷试液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,纯水定容。取各浓度标准磷溶液 1 mL,置于 10 mL 离心管中,精密加入 0.27 mL 消化剂,消化 10 min,冷却,加入 4.0 mL 磷显色液, $60 \sim 70^\circ\text{C}$ 水浴 10 min 显色,冷却,在 824 nm 测定吸光度,以标准磷试液的含量为横坐标 X,以吸光度为纵坐标 Y,绘制标准曲线,计算回归方程为: $Y = 155.53X - 0.0061$ ($r = 0.9997$),标准磷溶液线性范围为: $0.0012 \sim 0.0093 \text{ mg}$,结果见图 3。



A. 标准磷试液 B. 供试品 3 溶液 C. 空白试剂(氯仿-甲醇)

图 2 吸收光谱图

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度实验

取供试品 1 溶液 0.10 mL,置于 10 mL 离心管中,加入纯水 0.9 mL,按标准曲线的绘制项下方法测定,自“精密加入 0.27 mL 消化剂……于 824 nm 处测定吸光度”止,连续操作 6 次,测定吸光度,计算 RSD 值。RSD 值小于 3%,说明仪器精密度良好。结果见表 2。

2.6.2 稳定性实验

取供试品 1 溶液 0.10 mL 置于 10 mL 离心管中,加入纯水 0.9 mL,按标准曲线的绘制项下方法测定,自“分别精密加入 0.27 mL 消化剂……824 nm 处测定吸光度”止,分别于 0、30、60、90、120、150 min 测定吸光度,计算 RSD 值。RSD 值小于 3%,说明溶液 150 min 内稳定性良好。结果见表 3。

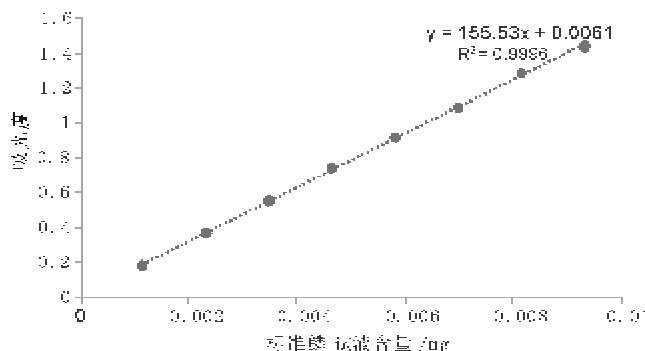


图 3 标准磷试液标准曲线图

表 2 精密度试验

测定次数	吸光度
1	0.473
2	0.473
3	0.473
4	0.473
5	0.473
6	0.474
RSD/%	0.09

表 3 稳定性试验

时间/min	吸光度
0	0.473
30	0.476
60	0.472
90	0.477
120	0.480
150	0.475
RSD/%	0.68

2.6.3 重复性实验

按 2.3 项下制备供试品 1 溶液 6 份,按标准曲线绘制项下方法测定,自“精密加入 0.27 mL 消化剂……824 nm 处测定吸光度”止,测定吸光度,计算磷含量和

RSD 值。RSD 值小于 3%,说明重复性良好。结果见表 4。

表 4 重复性试验

样品份数	吸光度	磷含量/mg·g ⁻¹
1	0.512	0.324
2	0.506	0.321
3	0.516	0.328
4	0.505	0.321
5	0.505	0.320
6	0.515	0.327
均值	0.510	0.323
RSD/%	1.03	1.11

2.6.4 加样回收率实验

取已知含量的样品 4 粉末各 5 份,每份 0.1 g,精密称定,分别精密加入标准磷溶液,按 2.3 项下比例制备供试品溶液,按标准曲线的绘制项下方法测定,自“精密加入 0.27 mL 消化剂……于 824 nm 处测定吸光度”止,测定供试品溶液吸光度值,计算其回收率和 RSD 值。平均加样回收率为 98%,RSD 值小于 3%。结果见表 5。

表 5 牛黄总磷脂加样回收率测定结果

编号	称样量/g	样品含量/mg	标准磷加入量/mL	测定总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.1001	0.04492	0.05	0.04984	102.1	98	2.91
2	0.1000	0.04492	0.05	0.04310	94.7		
3	0.1001	0.04492	0.05	0.04524	99.4		
4	0.1000	0.04492	0.05	0.04684	98.8		
5	0.1002	0.04492	0.05	0.04569	96.4		

2.7 供试品含量测定

取各供试品溶液 0.05 ~ 1.0 mL,置刻度试管中,按标准曲线绘制项下方法测定,自“置于 10 mL 离心管中……824 nm 处测定吸光度”止,测定吸光度值,按下列公式计算各供试液中总磷脂含量。用 SPSS26.0 软件对数据结果进行处理。结果见表 6。

总磷脂含量(%) = $\frac{X \times V_2 \times 25}{V_1 \times W} \times 100\%$

X:带入标准曲线方程后计算出的溶液含磷量(mg);
V₂:样品提取液的总体积(mL);
V₁:测定时吸取样品的体积(mL);
W:样品的称样量(mg);
25:由磷换算成磷脂的系数。

表 6 牛黄总磷脂含量($\bar{x} \pm s$) %

样品	总磷脂含量	样品	总磷脂含量	样品	总磷脂含量	样品	总磷脂含量
1	0.810 ± 0.01	5	0.689 ± 0.13**	9	0.563 ± 0.02**	13	0.000
2	0.039 ± 0.01	6	0.612 ± 0.17**	10	0.000	14	0.000
3	0.076 ± 0.01***	7	0.558 ± 0.17**	11	0.000	15	0.000
4	1.118 ± 0.01	8	0.553 ± 0.14**	12	0.000	16	0.082 ± 0.01

与天然牛黄相比,**P<0.01,***P<0.001,n=3

3 讨论

由表 6 可知,不同牛黄样品中总磷脂含量存在较大差异,总磷脂含量总体趋势为天然牛黄>人工牛黄

>体外培育牛黄,与天然牛黄总磷脂含量相比,人工牛黄差异显著(**P<0.01),体外培育牛黄差异极显著(***P<0.001)。11~15 号人工牛黄粉(网购)总磷

脂含量均为 0, 16 号样品虽含总磷脂, 但在测定过程中发现, 16 号样品经钼蓝比色法显色后的溶液颜色为橙黄色, 而天然牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄的溶液为蓝色; 经显微观察, 16 号样品具备中药材黄连的鳞叶表皮细胞显微结构特征, 故判断是混入的黄连药材粉末产生紫外吸收导致。

牛黄为贵细中药材, 不同牛黄价格悬殊, 因此市场上牛黄伪冒造假、染色、增重等现象层出不穷。伪品有以黄连、大黄、黄柏、姜黄等药材与甘草浸膏、鸡蛋黄、淀粉等粉末混制而成^[13], 也有用动物的胆囊结石如猪胆黄、骆驼黄、熊胆黄以及羊胃中的草结石冒充^[14], 还有以白泥和胆汁炼合或以郁金、蒲黄等中药轧末与胶液调和并凝结造假的^[15]; 在监管中也发现用金橙 II、柠檬黄、胭脂红等染色, 或向牛黄中掺入无机物如铁、黄泥等使其达到增重的^[16, 17], 或以价格较低的人工牛黄、体外培育牛黄代替价格高的天然牛黄生产投料^[18]等不同造假谋利的情形。

目前对牛黄、体外培育牛黄、人工牛黄的含量测定为胆红素和胆酸类成分, 且不同品种含量限度要求不一, 也导致了制剂存在的质量差异。如夏晶等^[19]研究分析结果, 所测定的体外培育牛黄总胆红素含量均低于《中华人民共和国药典》规定的 35%, 天然牛黄也有近 1/5 样品总胆红素含量未达到《中华人民共和国药典》规定的要求; 袁继承等^[20]对 4 个厂家的中成药人工牛黄(牛黄)胆红素的含量进行测定, 3 个厂家的胆红素含量偏低或未检出; 杨海源^[21]测定国家评价性抽验的小儿氨酚黄那敏颗粒中人工牛黄的胆红素, 含量合格率仅为 22.6%。因此, 探寻牛黄的全面质量评价体系具有重要的实际意义, 也符合中医的整体观。

本文建立的方法稳定可靠、设备易得、操作便利、成本低, 通过测定总磷脂含量, 结合《中华人民共和国药典》质量评价项目, 将为牛黄药材建立更完善的质量评价体系。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部[M]. 北京: 中国医

药科技出版社, 2020: 72.

- [2] 付文娟, 黄明安, 王双桂. 牛黄的历史沿革及其文化传承探究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(7): 1709.
- [3] 马嘉. 天然牛黄拟允许进口试点用于中成药生产[N]. 中国商报, 2024-07-04(006).
- [4] 冯承阳, 张程亮, 刘东. 牛黄的现代研究(二): 质量控制[J]. 医药导报, 2017, 36(2): 117.
- [5] 冯永刚, 吴素青, 李忠保. 走私牛黄样本鉴定的探讨[J]. 中国医药导刊, 2023, 25(1): 96.
- [6] 陈斌, 李峰, 张春娟. 商品鹿茸药材中总磷脂含量测定[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(4): 700.
- [7] 原扬, 于龙, 王殿波. 金钱白花蛇商品药材中总磷脂测定[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(6): 1258.
- [8] 左池靖, 刘艳, 江杰, 等. 牛黄及其代用品的化学成分及质量控制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(18): 4874.
- [9] 林秀玉, 王殿波. 九香虫商品药材中总磷脂含量比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(11): 2333.
- [10] 林秀玉, 李可强. 商品药材蕲蛇中总磷脂含量的比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(11): 1959.
- [11] 丁冠华, 李峰, 康廷国. 水蛭地龙商品药材中总磷脂含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(4): 36.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 39.
- [13] 王菊梅. 天然牛黄真伪鉴别[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(6): 491.
- [14] 王瑞峰, 王雪, 余行俊. 天然牛黄的真伪鉴别[J]. 光明中医, 2010, 25(6): 1092.
- [15] 满茹. 四法巧辨真假牛黄[J]. 开卷有益. 求医问药, 2011, (1): 46.
- [16] 柳温曦. 中药牛黄及其代用品的真伪鉴别及牛黄药材及成药的质量控制方法研究[D]. 中国食品药品检定研究院硕士学位论文, 2019.
- [17] 康帅, 林芳, 穆向荣, 等. 牛黄与其一种伪品的鉴别研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(3): 405.
- [18] 汪祺, 于健东, 王捷, 等. 从国家药品抽检角度分析已上市中成药需关注的相关问题[J]. 中国现代中药, 2024, 26(4): 603.
- [19] 夏晶, 曹帅, 沙伟焯, 等. 天然牛黄和体外培育牛黄中不同胆红素含量及比例的初步探究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(11): 971.
- [20] 袁继承, 张裕民, 沙启营. HPLC 测定心可宁胶囊中人工牛黄(牛黄)胆红素的含量[J]. 食品与药品, 2018, 20(3): 207.
- [21] 杨海源. 小儿氨酚黄那敏颗粒中人工牛黄质量控制及抽验质量评价方法[J]. 中成药, 2023, 45(8): 2690.

Determination of total phospholipid content in Calculus bovis, a rare Chinese medicinal material

HUANG Feng-ping¹, LIANG Fang-yu¹, HE Jian³, DU Hua-zhou³, HUANG Ke¹, LI Hua-xiang¹, YU Jing-jing¹,

XIAO Feng-xia^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China; 3. Guangzhou Caizhilin Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510360, China)

Abstract: Objective To establish a method for determining the total phospholipid content in Calculus bovis, measure and compare the

total phospholipid content in various *Calculus bovis* samples, supplement existing methods for distinguishing authentic from counterfeit products, and enhance the quality evaluation system. **Methods** Samples of natural *Calculus bovis*, in vitro cultivated *Calculus bovis*, artificially - cultivated *Calculus bovis*, and online - purchased *Calculus bovis* were collected. Ultrasonic extraction with Folch reagent, strong acid digestion, molybdenum blue color development, and UV - VIS spectrophotometry at 824 nm were performed to measure absorbance and calculate total phospholipid content. Statistical comparison and analysis were conducted. **Results** Significant differences in total phospholipid content were observed among the samples. Two natural *Calculus bovis* samples contained 0.810% and 1.118%, one in vitro cultivated *Calculus bovis* sample contained 0.076%, five artificially - cultivated *Calculus bovis* samples ranged from 0.553% to 0.689%, and six out of seven online - purchased samples contained none. Compared with natural *Calculus bovis*, artificially - cultivated *Calculus bovis* showed a significant difference in total phospholipid content ($P < 0.01$), while in vitro cultivated *Calculus bovis* showed a highly significant difference ($P < 0.001$). **Conclusion** The established method for determining total phospholipid content in *Calculus bovis* is simple, stable, and reliable. Total phospholipid content can reflect the quality differences in *Calculus bovis*. This method may serve as an internal control standard for enterprises and provide a reference for improving the *Calculus bovis* quality evaluation system.

Key words: *Calculus bovis*; Total phospholipid determination; Molybdenum blue colorimetric method; Quality evaluation

(责任编辑:杜国安)