

牛黄降压胶囊中体外培育牛黄的替代使用研究

刘 淑, 徐晨霞*, 孟亚飞, 曲 磊, 赵 微, 王婉婷

天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 天津 300457

摘 要: **目的** 建立牛黄降压胶囊中体外培育牛黄的替代使用的定性鉴别和定量测定方法。**方法** 采用薄层色谱法对方中体外培育牛黄定性鉴别, 采用高效液相色谱法对胆红素进行含量测定。**结果** 在与胆酸对照品色谱相应的位置上, 牛黄降压胶囊(替代方)和牛黄降压胶囊(原方)的供试品均显相同颜色的斑点; 在与猪去氧胆酸对照品色谱相应的位置上, 牛黄降压胶囊(原方)显相同颜色的斑点, 而牛黄降压胶囊(替代方)未显相同颜色的斑点。胆红素在 0.035 52~0.592 00 μg 与峰面积的线性良好。胆红素平均回收率为 97.73%, RSD 值为 3.22% ($n=6$)。**结论** 方法简便, 灵敏度高, 重现性好, 可用于牛黄降压胶囊中体外培育牛黄的替代使用情况控制。

关键词: 牛黄降压胶囊; 体外培育牛黄; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)08- 1544 -04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.008

Alternative use of *Calculus Bovis Sativus* in Niu Huang Jiangya Capsules

LIU Shu, XU Chen-xia, MENG Ya-fei, QU Lei, ZHAO Wei, WANG Wan-ting

Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Corporation LTD. Darentang Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China

Abstract: **Objective** To develop the identification and assay of alternative use of *Calculus Bovis Sativus* in Niu Huang Jiangya Capsules. **Methods** TLC method was used for the qualitative identification of *Calculus Bovis Sativus*,. HPLC method was used to determine the contents of bilirubin. **Results** At the corresponding position of the chromatogram of cholic acid reference substance, Niu Huang Jiangya Capsules (substitution) and Niu Huang Jiangya Capsules showed the same color spots. In the corresponding position with the chromatogram of hyodeoxycholic acid reference substance, Niu Huang Jiangya Capsules showed the same color spots, but Niu Huang Jiangya Capsules (substitution) had no the same color spots. Bilirubin had good linearity in the range of 0.035 52 —0.592 00 μg . The average recovery rate was 97.73% with RSD values of 3.22% ($n=6$). **Conclusion** This method is accurate, reliable, sensitive and suitable for the quality control of alternative use of *Calculus Bovis Sativus* in Niu Huang Jiangya Capsules.

Key words: Niu Huang Jiangya Capsules; *Calculus Bovis Sativus*; TLC; HPLC

牛黄降压胶囊是天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂于 20 世纪 70 年代研究开发的牛黄降压系列的一个剂型, 其质量标准收载于《中国药典》2015 年版一部。国食药监注[2012]355 号通知《关于加强含牛黄等药材中成药品种监督管理的通知》规定“对于国家药品标准处方中含牛黄的临床急重症用药品种及其他剂型或规格, 可以将处方中的牛黄固定以培植牛黄或体外培育牛黄等量替代投料使用, 但不得使用人工牛黄替代”, 说明体外培育牛黄与天然牛黄是等效的, 且疗效好于人工牛黄。为了更好地发挥牛黄降压胶囊的疗效、推

广临床应用, 达仁堂制药厂将牛黄降压胶囊处方中的人工牛黄用等量体外培育牛黄替代, 其他组成、用量不变, 配伍组成牛黄降压胶囊替代方, 其功效为清心化痰、平肝安神, 主要用于心肝火旺、痰热壅盛所致的头晕目眩、头痛失眠、烦躁不安; 高血压病见上述证候者。体外培育牛黄是通过采用与牛黄相同来源牛的新鲜胆汁为母液, 加入去氧胆酸、胆酸、复合胆红素钙等模拟天然牛黄的生成过程而制得^[1], 其中人工牛黄含有猪去氧胆酸^[2-4], 因此采用薄层色谱法将人工牛黄与体外培育牛黄进行检查即可。《中国药典》2015 年版一部“体外培育牛

收稿日期: 2020-07-23

作者简介: 刘 淑 (1975—), 高级工程师, 主要从事中药制造及质量标准研究。

*通信作者 徐晨霞, 工程师, 主要从事中药质量标准研究。Tel: (022)60123750 E-mail: yys@darentang.com.cn

黄”含量测定项中采用紫外-可见分光光度法测定胆红素,但此法相对高效液相色谱法不稳定、准确性低,因此参考《中国药典》2015年版第一增补本项下安宫牛黄丸的胆红素测定方法^[5]来建立本品的胆红素测定方法。因此本实验对牛黄降压胶囊中体外培育牛黄的替代使用情况进行了研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司),岛津 SPD-20A 紫外检测器(日本岛津公司),Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Waters 2487 紫外检测器(美国 Waters 公司),ME204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多),SH8200LHC 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),TDL-40B 飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂

硅胶 G 板(青岛市化学工业研究所),甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯, Fisher 公司),二氯甲烷(分析纯)、异辛烷(分析纯)、正丁醚(分析纯)、冰醋酸(分析纯)、草酸(分析纯)、十六烷基三甲基氯化铵(分析纯)均购自天津科密欧科技有限公司,纯化水,猪去氧胆酸(批号 100087-201411)、胆酸(批号 100078-201415)、胆红素(批号 100077-201607,质量分数 99.5%)对照品均购自中国食品药品检定研究院,

1.3 样品

牛黄降压胶囊(替代方)由天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂提供,批号 3738001、3738002、3738003;牛黄降压胶囊(原方)由天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂提供,规格 0.4 g/粒,批号 3730038、3738004、3738005。

2 方法与结果

2.1 体外培育牛黄的检查

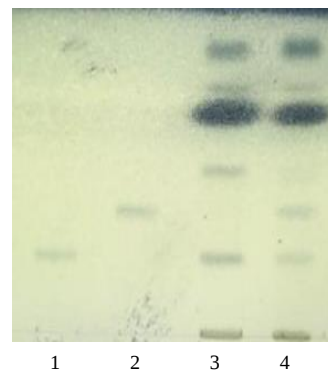
2.1.1 供试品溶液的制备 取 1 g 牛黄降压胶囊内容物,加甲醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至 2 mL,即得。

2.1.2 胆酸对照品溶液的制备 取胆酸对照品适量,用甲醇制成 1 mg/mL 的溶液,即得。

2.1.3 猪去氧胆酸对照品溶液的制备 取猪去氧胆酸对照品适量,加乙醇制成 0.5 mg/mL 的溶液,即得。

2.1.4 薄层色谱法定性鉴别 照薄层色谱法(通则 0502)^[6]试验,取胆酸对照品溶液 2 μ L,猪去氧胆

酸对照品溶液、牛黄降压胶囊(替代方)和牛黄降压胶囊(原方)供试品溶液各 6 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以异辛烷-正丁醚-冰醋酸(8:5:5)为展开剂展开,取出,晾干,喷以 10%磷钼酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,结果见图 1。



1-胆酸 2-猪去氧胆酸 3-牛黄降压胶囊(替代方,批号 3738001)
4-牛黄降压胶囊(原方,批号 3730038)
1-cholic acid 2-hyodeoxycholic acid 3-Niuhuang Jiangya Capsules (substitution, batch 738001) 4- Niuhuang Jiangya Capsules (batch 3730038)

图 1 牛黄降压胶囊的薄层色谱鉴别

Fig. 1 TLC Chromatogram of Niuhuang Jiangya Capsules

可见在供试品色谱中,在与胆酸对照品色谱相应的位置上,牛黄降压胶囊(替代方)和牛黄降压胶囊(原方)的供试品均显相同颜色的斑点;在与猪去氧胆酸对照品色谱相应的位置上,牛黄降压胶囊(原方)显相同颜色的斑点,而牛黄降压胶囊(替代方)未显相同颜色的斑点。

2.2 胆红素的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件 Waters-sunsire C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-1%冰醋酸(95:5);检测波长:450 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;体积流量:1.0 mL/min。理论板数按胆红素峰计算应不低于 3 000。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取胆红素对照品适量,用二氯甲烷制成 60 μ g/mL 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品装量差异项下的牛黄降压胶囊(替代方或原方)内容物,混匀,取 0.1 g,精密称定,置棕色具塞锥形瓶中,加入 10%草酸溶液(含 0.15%十六烷基三甲基氯化铵)10 mL,密塞,漩涡混匀,精密加入水饱和的二氯甲烷 25 mL,密塞,称定质量,混匀,超声处理(功率 500 W,频率 53 kHz,水温 25~35 $^{\circ}$ C)40 min,

放冷,再称定质量,用水饱和的二氯甲烷补足减失的质量,摇匀,3 000 r/min 离心,分取二氯甲烷液,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 取除体外培育牛黄的各味药材按照牛黄降压胶囊的处方制得样品,再按供试品溶液的制备项下方法制得阴性样品溶液。

2.2.5 专属性试验 分别精密吸取牛黄降压胶囊(替代方或原方)溶液、胆红素对照品溶液和除体外培育牛黄的牛黄降压胶囊(替代方)阴性样品溶液各 5 μ L,注入高效液相色谱仪中,记录色谱图,结果见图 2。可见在供试品色谱上有一个与胆红素对照品对应的色谱峰,即胆红素峰,且峰形良好,而阴性样品色谱中无胆红素色谱峰,表明阴性样品对测定无干扰。

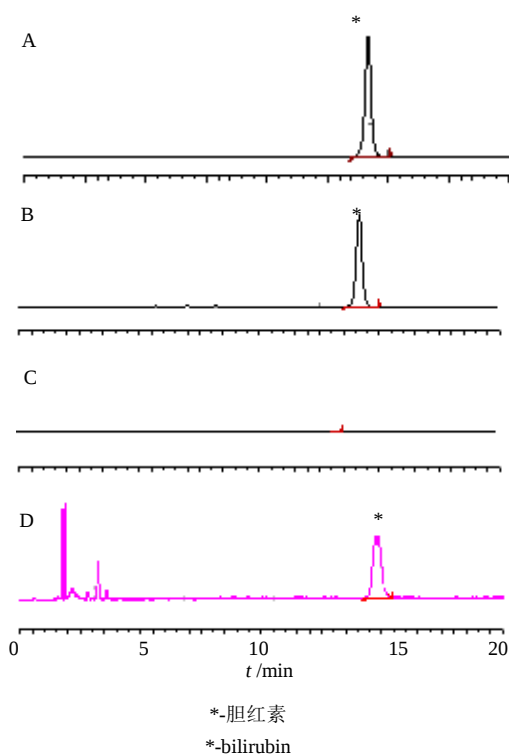


图2 胆红素对照品(A)、牛黄降压胶囊(替代方 3738001, B)、牛黄降压胶囊(替代方)阴性样品(C)和牛黄降压胶囊(原方 3730038, D)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of bilirubin reference substance (A), Niu Huang Jiangya Capsules (substitution, batch 738001, B), Niu Huang Jiangya Capsules negative sample (substitution, C), and Niu Huang Jiangya Capsules (batch 3730038)

2.2.6 标准曲线的制备 取胆红素对照品适量,精密称定,加二氯甲烷制成含胆红素 7.104、14.208、29.600、59.200、118.400 μ g/mL 的系列对照品溶液。

分别精密吸取上述溶液 5 μ L,注入液相色谱仪,测定各自峰面积。以进样量为横坐标,峰面积值为纵坐标,计算回归方程及相关系数,结果胆红素的回归方程为 $Y=5\,585\,771.22 X+6\,790.45$ ($r=1.000\,0$),表明胆红素在 0.035 52~0.592 00 μ g 与峰面积的线性良好。

2.2.7 精密度试验 取批号 3738001 牛黄降压胶囊(替代方)样品,制备供试品溶液,连续进样 6 次,测定胆红素峰面积,结果胆红素峰面积的 RSD 值为 0.24%。

2.2.8 稳定性试验 取批号 3738001 牛黄降压胶囊(替代方)样品,制备供试品溶液,分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样测定胆红素的峰面积,结果样品中胆红素峰面积在 0~12 h 的 RSD 值为 1.15%,在 0~24 h 的 RSD 值为 2.21%,结果表明胆红素在 0~12 h 稳定性较好。

2.2.9 重复性试验 取批号 3738001 牛黄降压胶囊(替代方)样品内容物 0.1 g,精密称定,共 6 份,制备供试品溶液,进样测定,结果样品中胆红素质量分数平均值为 5.524 4 mg/粒, RSD 值为 0.81%。

2.2.10 回收率试验 取批号 3738001 牛黄降压胶囊(替代方)样品内容物 0.05 g,精密称取,加入 0.026 87 mg/mL 胆红素对照品溶液 10 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率,结果胆红素平均回收率为 97.73%, RSD 值为 3.22%。

2.2.11 样品测定 取牛黄降压胶囊(替代方)中试样品、牛黄降压胶囊(原方)样品,分别制备供试品溶液,进样分析,测定胆红素峰面积,外标法计算胆红素峰的质量分数,结果见表 1。

表1 牛黄降压胶囊中胆红素测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of bilirubin in Niu Huang Jiangya Capsules ($n=2$)

样品	批号	胆红素/(mg·粒 ⁻¹)	胆红素/(mg·g ⁻¹)
替代方	3738001	5.573 7	13.934 3
	3738002	5.422 6	13.556 5
	3738003	5.517 4	13.793 5
原方	3730038	0.097 3	0.243 3
	3738004	0.096 2	0.240 5
	3738005	0.090 2	0.225 5

按照处方计算,体外培育牛黄占牛黄降压胶囊全粉的 5%,含体外培育牛黄为 20 mg/粒。《中国药典》2015 年版一部“体外培育牛黄”含量测定项采

用紫外-可见分光光度法测定胆红素,含胆红素不得少于 35%。3 批牛黄降压胶囊(替代方)中胆红素转移率按照最低转移率 70%计算,本品含体外培育牛黄以胆红素计不得少于 4.9 mg/粒。因成品批数较少,考虑到药材和生产中的波动,将含量限度下浮 15%,暂定本品含体外培育牛黄以胆红素计不得少于 4.1 mg/粒。

3 讨论

体外培育牛黄中有 3 种类型的胆红素,分别为结合胆红素、共价胆红素和游离胆红素,其中结合胆红素和共价胆红素具有亲水性,不溶于有机溶剂,但在酸性条件下会转化成游离胆红素;而游离胆红素脂溶性较强,在光照、加热、碱性、金属离子存在等条件下易被氧化,稳定性较差^[7],加之牛黄降压胶囊中药味较多,成分复杂,也可能对游离胆红素的测定带来一定影响。因此整个操作过程要避光进行。

本研究中牛黄降压胶囊采用 TLC 法、HPLC 法对体外培育牛黄的替代使用情况进行定性、定量研

究,最终确定的方法简便,灵敏度高,重现性好,可用于牛黄降压胶囊中体外培育牛黄的替代使用情况进行控制。

参考文献

- [1] 张宇静,夏 晶,仇佳思,等.牛黄中胆汁酸的药理作用及定量分析方法研究进展[J].国际药学研究杂志,2016,43(2):268-274.
- [2] 蔡红娇,裘法祖,刘仁则.体外培育牛黄的药学研究[J].中国天然药物,2004,2(6):335-338.
- [3] 吕浩然,郭月秋,陈代贤,等.牛黄、体外培育牛黄及人工牛黄真伪快速检定探讨[J].中外健康文摘,2013(12):44-46.
- [4] 张轶华,姜建国,孙 婷,等.小儿氨酚黄那敏颗粒中人工牛黄和体外培育牛黄的研究[J].中成药,2015,37(2):329-331.
- [5] 中国药典[S].第一增补本.2018.
- [6] 中国药典[S].四部.2015:57-59.
- [7] 夏 晶,曹 帅,沙祎炜,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].中国药理学杂志,2017,52(11):971-977.