

牛黄降压丸的高效液相指纹图谱研究

王文燕¹, 赵 强², 张铁军¹, 朱宏吉², 黎 阳³

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 研究牛黄降压丸的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立牛黄降压丸的 HPLC 指纹图谱, 收集了不同批次的 10 批产品进行测定。结果 建立了牛黄降压丸的指纹图谱, 确立 10 个共有峰, 指认了包括大黄素在内的 4 个共有峰。结论 此方法可用于牛黄降压丸的质量控制。

关键词:牛黄降压丸; 指纹图谱; 共有峰归属分析

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)01-0056-02

牛黄降压丸具有清心化痰、镇静降压之效, 用于肝火旺盛、头晕目眩、烦躁不安、痰火壅盛、高血压症^[1,2]。牛黄降压丸收录于《中国药典》2005 年版一部, 药典中规定了冰片、人工牛黄、川芎、黄芪的鉴别方法和白芍、黄芩提取物的测定方法。显然, 这种检测方法对于牛黄降压丸这样一个由 14 味中药组成的复方过于简单, 相对于目前中药产品质量控制的要求有较大的差距。指纹图谱是顺应中药多组分、多靶点的整体综合作用的特点, 从“全成分”的角度出发的一种现代中药质量控制方法, 现已成为国内外广泛接受的中药质量控制评价模型^[3-6]。为全面控制其质量, 本实验对牛黄降压丸指纹图谱进行研究。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 996 型 PDA 检测器, 电热恒温水浴锅 (江苏省医疗器械厂), HS3120 超声波 (海卓康生物科技有限公司), PB303-N 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯, 乙醇、磷酸为分析纯。阿魏酸、大黄酚、黄芩苷、芍药苷对照品均由中国药品生物制品检定所提供, 牛黄降压丸样品由天津市达仁堂制药厂提供, 见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Sunktik C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸; 洗脱方式: 梯度洗脱; 检测波长: 230 nm; 柱温: 35 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 取阿魏酸对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 超声 20 min, 冷却后补足体积, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

样品	批号	生产时间
N1	5450065	2007-09-06
N2	5450055	2007-04-20
N3	5450030	2006-06-08
N4	5450064	2007-09-04
N5	5450047	2006-11-27
N6	5450068	2007-09-14
N7	5450034	2006-06-20
N8	5450039	2006-09-07
N9	5450020	2006-05-10
N10	5450024	2006-05-16

液, 即得。同法制得黄芩苷、芍药苷、阿魏酸、大黄酚对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 称取牛黄降压丸 3 g, 粉碎, 加硅藻土 2 g 研匀, 加入 50% 乙醇 40 mL 置圆底烧瓶中, 回流提取 2 h, 滤过, 旋转蒸发回收溶剂, 残渣用甲醇溶解置 10 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 取 N1 供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察各共有峰的相对保留时间、相对峰面积比值的一致性, 结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化, 各色谱峰的相对保留时间和单峰面积大于或等于 5% 的色谱峰的比值基本一致 (RSD 在 3.0% 以下), 符合指纹图谱的要求。

2.4.2 稳定性试验: 取 N1 供试品溶液, 分别在 0、3、6、12、24 h 进样, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性, 结果显示各色谱峰的相对保留时间、峰面积的比值基本没有明显变化, 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均

收稿日期: 2009-05-22

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAI06A01-02)

*通讯作者 张铁军 Tel: (022) 23006848 E-mail: tiezheng4@sina.com

不大于 2.98%,符合指纹图谱的要求(不大于 3%)。建议供试品溶液在 24 h 内测定为好。

2.4.3 重现性试验:取 N1 批号的供试品溶液 5 份,进行测定,考察各共有峰的相对保留时间、相对峰面积比值的一致性,结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,各共有峰的相对保留时间和单峰面积占总峰面积大于或等于 5%的色谱峰面积比值基本一致(RSD 在 3.0%以下),符合指纹图谱要求。

2.5 指纹图谱的建立:对 10 批样品进行测定,色谱图见图 1。经比较样品的色谱图和计算相对保留时间,其中有 10 个峰确定为共有指纹峰,见图 2。试验发现,其中大黄素在 51 min 出峰(10 号峰),黄芩苷在 25 min 出峰(5 号峰),芍药苷在 13 min 出峰(3 号峰),阿魏酸在 17 min 出峰(4 号峰)。

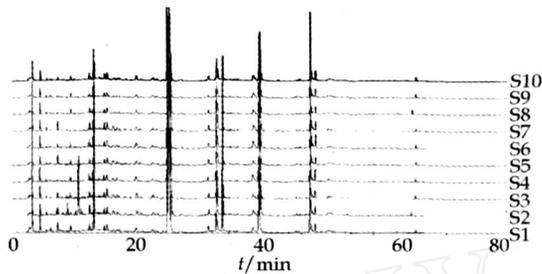


图 1 10 批样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint for ten batches of samples

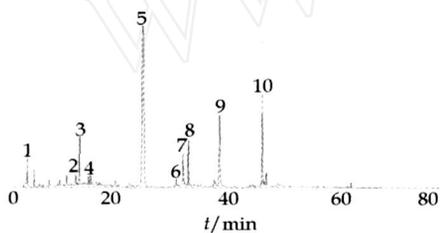


图 2 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC Reference fingerprints

以 25 min 处的黄芩苷色谱峰为内参照峰,计算各共有指纹峰保留时间、峰面积的相对比值。按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》要求,对单峰面积超过总峰面积 10%以上的峰进行面积标定,超过总峰面积 10%的是 S 峰。将数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版),经选峰,设定匹配模板,将谱峰自动匹配;然后设定标准模板,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价,得出牛黄降压丸指纹图谱的共有模式见图 2,相似度计算结果见表 2。

表 2 10 批样品相似度评价结果

Table 2 Similarities for ten batches of samples

样品	相似度	样品	相似度
N1	0.995	N6	0.996
N2	0.991	N7	0.999
N3	0.997	N8	0.998
N4	0.997	N9	0.995
N5	0.998	N10	0.999

结果表明,10 批样品相似度均在 0.95 以上,符合国家药典委员会的要求。本实验对牛黄降压丸 HPLC 指纹图谱的构建进行了探讨,可为牛黄降压丸的品质评价、质量标准的制定提供科学依据。

3 讨论

3.1 流动相的选定:由于样品成分复杂,采用等度洗脱时各组分峰分离不理想,不能有效检测样品中各成分峰,故采用梯度洗脱的方式,先后尝试了甲醇-水、甲醇-磷酸、甲醇-醋酸、乙腈-水和乙腈-磷酸等不同流动相系统,并且尝试了多种不同梯度条件,最后确定梯度洗脱方式。经比较,乙腈和 0.1%磷酸水溶液组成流动相进行梯度洗脱分离效果较好,能较好地使样品中各色谱峰分离且出峰最多。样品 160 min 图谱显示 80 min 后无特征峰出现,故确定分析时间为 80 min。

3.2 检测波长的选择:取供试品溶液,进样 5 μL,进行 210~400 nm 的全波长全梯度扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在 230 nm 下,各峰分离良好,特征峰明显且峰型较好,因此选定 230 nm 为指纹图谱测定波长。

3.3 提取方式的选定:试验对样品用甲醇、水、50%乙醇、95%乙醇分别进行了超声和回流提取方法比较。对不同提取溶剂、提取方法的结果比较,拟定采用 50%乙醇回流 2 h 提取方式作为供试品的制备方法,所得指纹图谱出峰数较多。

参考文献:

- [1] 杜伟,牛黄降压丸的临床应用[J]. 北京中医,2007,26(9):612-613.
- [2] 徐芳,高林善.牛黄降压丸(胶囊、片)降压疗效及药理研究概述[J]. 中草药,2005,36(9):附 1-附 2.
- [3] 宋丽明,王文燕,张智超. 陕西安康葛根药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(3):436-438.
- [4] 王文燕,赵强,张铁军,等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药,2009,40(10):1638-1641.
- [5] 王文燕,赵强,张铁军,等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药,2009,40(11):1810-1813.
- [6] 王文燕,赵强,张铁军,等. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药,2009,40(12):1980-1983.