

HPLC-ELSD 法同时测定脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的含量

周 军*,王 杰,张 蕾(天津市药品检验所中药室,天津 300070)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0404-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.41

摘要 目的:建立测定脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法。色谱柱为 SHIMADZU VP-ODS C₁₈,检测器为蒸发光散射检测器,流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸进样量分别在 0.039 84~0.398 4、0.032 064~0.320 64、0.033 952~0.339 52 mg($r \geq 0.999 0$)范围内进样量的对数值与其峰面积的对数值呈良好的线性关系;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD < 2%;加样回收率分别为 101.33%~104.05%、95.56%~101.38%、96.07%~97.12%,RSD 分别为 0.95%、2.54%、0.44%($n=6$)。结论:该方法简便、准确,适用于脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的含量测定。

关键词 高效液相色谱-蒸发光散射检测法;脑血栓片;胆酸;猪去氧胆酸;去氧胆酸

Determination of Cholic Acid, Hyodeoxycholic Acid and Deoxycholate Acid in Naoxueshuan Tablet by HPLC-ELSD

ZHOU Jun, WANG Jie, ZHANG Lei(TCM Room of Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of cholic acid, hyodeoxycholic acid and deoxycholate acid in Naoxueshuan tablet. METHODS: HPLC-ELSD was performed on the column of SHIMADZU VP-ODS C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.2% formic acid (gradient elution) column temperature was 30 ℃, at flow rate of 1.0 ml/min, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.039 84-0.398 4 mg for cholic acid, 0.032 064-0.320 64 mg for hyodeoxycholic acid and 0.0339 52-0.339 52 μg for deoxycholate acid ($r \geq 0.999 0$), and the logarithm value of volume injection and peak area showed good linear relationship; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 101.33%-104.05% (RSD=0.95%, $n=6$), 95.56%-101.38% (RSD=2.54%, $n=6$) and 96.07%-97.12% (RSD=0.44%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and suitable for the contents determination of cholic acid, hyodeoxycholic acid and deoxycholate acid in Naoxueshuan tablet.

KEYWORDS HPLC-ELSD; Naoxueshuan tablet; Cholic acid; Hyodeoxycholic acid; Deoxycholate acid

脑血栓片是临床治疗中风和脑血栓的常用中成药,由丹参、红花、桃仁、人工牛黄等10味中药材组成,具有活血化痰、醒脑通络、潜阳熄风的功效。该药可用于预防和治疗因淤血、肝阳上亢出现的中风先兆,如肢体麻木、头晕目眩等,以及脑血栓形成出现的中风不语、口眼歪斜、半身不遂等症。其处方

中的人工牛黄具有清热解毒、化痰定惊的功效,为佐制药^[1],主要成分包括胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸等。脑血栓片具有糖衣片和薄膜衣片两种药品规格,其质量标准分别为《卫生部药品标准(中药成方制剂第十九册)》(标准号:WS₃-B-3666-98)及《国家食品药品监督管理局国家药品标准》(标准号:

体积比为 75:25 时,4 种蒽醌类化合物都能得到较好的分离,因此选用其为流动相。

综上所述,本方法操作简便、稳定、重复性好,可用于牛黄上清丸中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种蒽醌类化合物含量的测定。

参考文献

- [1] 王玉堂,于永,汪子明,等.高压微波辅助提取法提取牛黄上清丸中的黄芩苷[J].高等学校化学学报,2006,27(10):1 862.
- [2] 张丹,蒋心惠.反相高效液相色谱法测定大黄药材中游离及结合型蒽醌类衍生物的含量[J].分析化学,2003,31(4):459.
- [3] 张吴琼,陈红杰,李邴芸,等.芦荟蒽醌类化合物的生物学功效[J].吉林医药学院学报,2013,34(1):52.

- [4] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等.HPLC 法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2010,30(10):1 841.
- [5] 施翠英,邓放,任波,等.应用 HPLC 法探究虎杖泻心汤中蒽醌类成分的含量[J].中国药房,2012,23(11):1 010.
- [6] 王胤,沈力,周浓,等.HPLC 同时测定大黄剂中的 5 种蒽醌类衍生物[J].光谱实验室,2012,29(5):2 928.
- [7] 郑艳超,李先宽,米宝丽,等.HPLC 测定血脂灵片中 8 种蒽醌类成分的含量[J].中药材,2013,36(6):1 007.
- [8] 任伟光,王冬梅,黄林芳,等.UPLC 法同时测定大黄中 8 个成分的含量[J].药物分析杂志,2014,34(9):1 565.
- [9] 陆建平. HPLC 法测定健胃消炎颗粒中大黄素和大黄酚的含量[J].中国药房,2013,24(24):2 285.

(收稿日期:2015-03-10 修回日期:2015-08-17)

(编辑:张 静)

* 副主任药师,硕士。研究方向:中药分析。电话:022-23513806。E-mail:happy76dragon.com@aliyun.com

YBZ04962004)。上述两个标准中人工牛黄的质量控制均采用以胆酸和去氧胆酸为指标的薄层色谱鉴别,无法真实反映出药品中人工牛黄的含量。因此,本试验采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法同时测定了脑血栓片中人工牛黄的主要有效成分胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的含量,以为提高脑血栓片的质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695 型 HPLC 仪,包括四元泵、蒸发光散射检测器(ELSD)、自动进样器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);XS205 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);TS-16R 型离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂

脑血栓片(天津同仁堂集团股份有限公司,薄膜衣片,批号:B83006、D86004、C90023,规格:0.6 g/片;天津同仁堂集团股份有限公司,糖衣片,批号:C89020,规格:0.3 g/片;厂家1,糖衣片,批号:2013a001、2013a002,规格:0.3 g/片;厂家2,糖衣片,批号:2013b001,规格:0.3 g/片);胆酸对照品(批号:100078-201415,纯度:98.9%)、猪去氧胆酸对照品(批号:100087-201411,纯度:99.7%)、去氧胆酸对照品(批号:110724-200207,纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,甲酸为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:SHIMADZU VP-ODS C_{18} (150 mm×4.6 mm,5 μ m);检测器:ELSD;流动相:乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min,柱温:30 $^{\circ}$ C,进样量为10 μ l。在此色谱条件下,胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的保留时间分别为31.71、32.58、37.72 min,分离度均>1.5,理论板数按胆酸峰计算应不低于10 000;样品中其他成分对胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的测定无干扰。色谱见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of the linear gradient elution

时间,min	A,%	B,%
0	5	95
15	20	80
30	50	50
45	80	20
46	5	95
60	5	95

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸对照品各适量,精密称定,分别置于100 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成每1 ml分别含胆酸0.02 mg、猪去氧胆酸0.016 mg、去氧胆酸0.017 mg(低浓度)和每1 ml分别含胆酸0.20 mg、猪去氧胆酸0.16 mg、去氧胆酸0.17 mg(高浓度)两种质量浓度的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品10片,除去包衣,精密称定,研细,精密称取0.5 g,置于100 ml锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,称定质量,置于水浴上加热回流30 min,放冷,再次称定质量,用

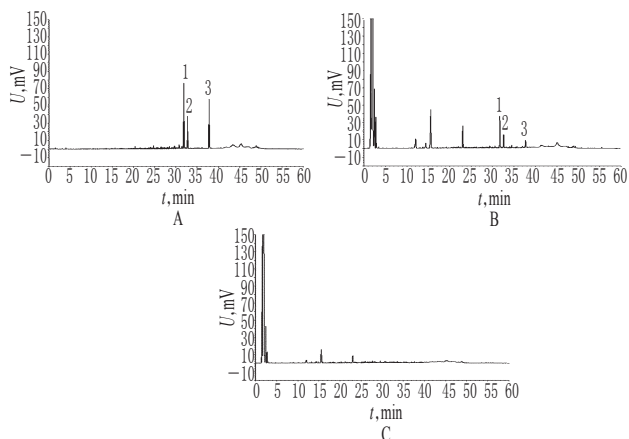


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.胆酸;2.猪去氧胆酸;3.去氧胆酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference; B. test sample; C. negative control; 1. cholic acid; 2. hyodesoxycholic acid; 3. deoxycholic acid

甲醇补足减失的质量,摇匀,以半径为10 cm、3000 r/min离心5 min,取上清液,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例和制备工艺制备不含人工牛黄的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 线性关系考察

精密称取胆酸对照品49.80 mg、猪去氧胆酸对照品40.08 mg、去氧胆酸对照品42.44 mg,置于同一50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品贮备液;精密量取上述贮备液0.4、1、2、3、4 ml,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量的对数值为横坐标(x)、峰面积的对数值为纵坐标(y)进行线性回归,得胆酸的回归方程为 $y=5.1362+1.4953x$ ($r=0.9995$),猪去氧胆酸的回归方程为 $y=5.0607+1.5160x$ ($r=0.9990$),去氧胆酸的回归方程为 $y=5.2197+1.5017x$ ($r=0.9992$)。结果表明,胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸的进样量分别在0.03984~0.3984、0.032064~0.32064、0.033952~0.33952 mg范围内进样量的对数值与其峰面积的对数值线性关系良好。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下高浓度的混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸峰面积的RSD分别为1.40%、1.92%、1.58%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:B83006)适量,分别于放置0、2、4、8、12、18、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸峰面积的RSD分别为1.31%、1.86%、1.20%($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品(批号:B83006)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录

峰面积。结果,胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸峰面积的RSD分别为0.56%、1.28%、1.31%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取同一批样品(批号:B83006)适量,精密称定,共6份,分别加入一定量的胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备每1 ml含胆酸40.352 μg 、猪去氧胆酸22.816 μg 、去氧胆酸15.856 μg 的供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
胆酸	0.255 8	1.021 4	1.008 8	2.071 1	104.05	103.20	0.95
	0.253 3	1.009 1	1.008 8	2.031 3	101.33		
	0.254 2	1.012 7	1.008 8	2.058 9	103.71		
	0.254 2	1.012 7	1.008 8	2.053 4	103.16		
	0.252 6	1.006 4	1.008 8	2.053 0	103.75		
	0.252 3	1.005 2	1.008 8	2.046 5	103.22		
猪去氧胆酸	0.255 8	0.583 7	0.570 4	1.130 2	95.81	97.24	2.54
	0.253 3	0.578 0	0.570 4	1.124 4	95.79		
	0.254 2	0.580 1	0.570 4	1.125 8	95.67		
	0.254 2	0.580 1	0.570 4	1.146 1	99.23		
	0.252 6	0.576 4	0.570 4	1.154 7	101.38		
	0.252 3	0.575 7	0.570 4	1.120 8	95.56		
去氧胆酸	0.255 8	0.390 3	0.396 4	0.771 9	96.27	96.55	0.44
	0.253 3	0.386 5	0.396 4	0.770 8	96.95		
	0.254 2	0.387 8	0.396 4	0.769 3	96.24		
	0.254 2	0.387 8	0.396 4	0.771 0	96.67		
	0.252 6	0.385 4	0.396 4	0.766 2	96.07		
	0.252 3	0.384 9	0.396 4	0.769 9	97.12		

2.8 样品含量测定

取7个批号的样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标两点法计算各成分含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/片)

Tab 3 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/tablet)

批号	胆酸	猪去氧胆酸	去氧胆酸
C89020	0.94	0.99	0.22
D86004	1.65	1.56	0.52
C90023	1.35	1.64	0.41
B83006	2.20	1.26	0.84
2013a001	0.65	0.33	0.16
2013a002	0.72	0.34	0.20
2013b001	0.22	0.06	0.14

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本试验采用规格为150 mm \times 4.6 mm、粒径为5 μm 的色谱柱,与常用的250 mm色谱柱相比,不仅减少了分析时间,节约

了有机溶剂,还极大地提高了工作效率。

3.2 提取方法的考察

笔者曾采用甲醇、70%甲醇、95%乙醇和70%乙醇作为提取溶剂,分别使用加热回流和超声处理两种方法进行比较,并对提取溶剂用量和提取时间进行考察。结果表明,加入甲醇25 ml置于水浴加热回流30 min,可将样品中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸提取完全。

3.3 流动相的选择

笔者比较了甲醇-甲酸、乙腈-甲酸两种流动相体系,结果以甲醇-甲酸为流动相进行梯度洗脱时,样品色谱中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸色谱峰与杂质峰分离较差;而以乙腈-甲酸为流动相进行梯度洗脱时^[2-8],样品色谱中以上各成分色谱峰与杂质峰分离均较好,分离度均 >1.5 。

3.4 检测方法的确定及柱温的选择

由于胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸均无紫外吸收,因此本试验采用ELSD进行检测。另外,本试验还比较了不同柱温(30、35、40 $^{\circ}\text{C}$)条件下样品的分离情况,结果柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 时样品分离较好。

综上所述,本方法简便、准确,适用于脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:5.
- [2] 叶蓓蓓, 潘莉, 王栋, 等. 薄层扫描法同时测定人工牛黄中胆酸及猪去氧胆酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4):706.
- [3] 韩杰. HPLC测定清开灵颗粒中黄芩苷、栀子苷及胆酸、猪去氧胆酸的含量[J]. 中成药, 2010, 32(2):227.
- [4] 魏锋, 钟敏, 尼加提, 等. HPLC-ELSD法同时测定牛胆粉中3种胆酸类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1):21.
- [5] 李珂, 王唯红, 齐永秀, 等. 6种胆酸类成分的HPLC-ELSD测定法及在两种牛黄中的含量比较[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(8):626.
- [6] 鞠建明, 孔铭, 钱大玮, 等. 六神软膏质量控制标准研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6):1 060.
- [7] 周海燕, 李丹, 黄莹. HPLC法测定胆酸和猪去氧胆酸的含量[J]. 中国药品标准, 2011, 12(2):91.
- [8] 杨立伟, 刘潇潇, 巩琚, 等. 清开灵系列品种中胆酸和猪去氧胆酸的通用检测方法研究[J]. 中国药房, 2012, 23(35):3 340.

(收稿日期:2015-06-12 修回日期:2015-10-27)

(编辑:刘 柳)

《中国药房》杂志——《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊, 欢迎投稿、订阅