

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.21.010

蒸发光散射检测器-高效液相色谱法测定小儿化毒胶囊中胆酸和猪去氧胆酸含量

吴芳¹, 罗定强¹, 李青¹, 赵珊珊², 刘海静^{1,2△}

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710061; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 建立同时测定小儿化毒胶囊中胆酸含量和猪去氧胆酸的蒸发光散射检测器-高效液相色谱(ELSD-HPLC)法。方法 色谱柱采用 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%冰醋酸溶液(40:60), 流速为 1 mL/min, 柱温为 35℃, 检测器为 ELSD, 漂移管温度为 98℃, 空气流速为 3.0 mL/min。结果 胆酸进样量在 1.068~10.680 μg 范围内其与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y=1.46X+5.83$ ($r=0.999$), 平均加样回收率为 99.81%, RSD 为 2.46% ($n=6$); 猪去氧胆酸进样量在 1.121~11.210 μg 范围内其与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y=1.46X+5.68$ ($r=0.999$), 平均加样回收率为 101.40%, RSD 为 2.91% ($n=6$)。结论 该方法科学、简便、专属性较强, 可有效控制该制剂中人工牛黄的质量。

关键词: 小儿化毒胶囊; 人工牛黄; 胆酸; 猪去氧胆酸; 蒸发光散射检测器-高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)21-0035-03

Content Determination of Cholic Acid and Hyodeoxycholic Acid in Xiao'er Huadu Capsules by ELSD-HPLC

Wu Fang¹, Luo Dingqiang¹, Li Qing¹, Zhao Shanshan², Liu Haijing^{1,2}

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710061; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To establish an ELSD-HPLC method for content determination of cholic acid and hyodeoxycholic acid in Xiao'er Huadu Capsules. **Methods** The chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid(40:60), the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 35℃, the detector was ELSD, the temperature of the drift tube was 98℃ and the flow rate of the nitrogen gas was 3.0 mL/min. **Results** Cholic acid showed a good linear relationship within the range of 1.068-10.680 μg, the regression equation was $Y=1.46X+5.83$ ($r=0.999$), the average recovery rate was 99.81% and RSD was 2.46% ($n=6$). Hyodeoxycholic acid showed a good linear relationship within the range of 1.121-11.210 μg, the regression equation was $Y=1.46X+5.68$ ($r=0.999$), the average recovery rate was 101.40% and the RSD was 2.91% ($n=6$). **Conclusion** The method is scientific, simple and specific, which can effectively control the quality of artificial bezoar in the preparation.

Key words: Xiao'er Huadu Capsules; artificial bezoar; cholic acid; hyodeoxycholic acid; ELSD-HPLC; content determination

小儿化毒胶囊有清热解毒、活血消肿功效,用于小儿疹后余毒未尽、烦躁、口渴、口疮、便秘等症。现行质量标准收载于《国家药品标准·新药转正标准(第50册)》,原处方规定使用牛黄投料,后根据国家食品药品监督管理局相关文件,经批准将处方中的牛黄修改为人工牛黄进行投料,现行标准中含量测定项为使用薄层色谱法测定人工牛黄中胆酸的含量,方法的专属性和重复性均欠佳。该品种的系列制剂小儿化毒散现收载于2015年版《中国药典(一部)》,标准中亦缺少对人工牛黄的定量控制方法^[1]。小儿化毒胶囊为儿科用药,质量标准应予以更合理和严格的控制。本研究中采用蒸发光散射检测器-高效液相色谱(ELSD-HPLC)法同时测定方中胆酸和猪去氧胆酸的含量,方法科学、简便,可有

效控制小儿化毒胶囊中人工牛黄的质量,并可为同系列制剂提供方法依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters1525/2487 型高效液相色谱仪, Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); BS224S 型, BS223S 型电子分析天平(德国赛多利斯公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Alltech ELSD 3300ES 蒸发光散射检测器(美国奥泰科技(中国)有限公司)。

1.2 试剂

胆酸对照品(批号为 100078-201415, 含量为 98.9%), 猪去氧胆酸对照品(批号为 100087-200610,

第一作者: 吴芳, 女, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制, (电子信箱) 8681070@qq.com。

△通信作者: 刘海静, 女, 主任药师, 硕士生研究生导师, 研究方向为药物分析, (电子信箱) liuhaijing1@163.com。

含量为 97.3%),均由中国食品药品检定研究院提供。小儿化毒胶囊样品共 9 批(批号分别为 20091,10021,60161,10011,10061,10031,10051,60171,20081),阴性样品及人工牛黄药材均由西安碑林药业股份有限公司提供,且由罗定强副主任药师鉴定,符合药典相关规定。乙腈为色谱纯(Avantor Performance Materials Sda Bhd),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2-5]

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 冰醋酸溶液(40:60);ELSD 漂移管温度:98℃;空气流速:3.0 mL/min;流速:1.0 mL/min;柱温:35℃。

2.2 溶液制备

对照品溶液:称取胆酸对照品和猪去氧胆酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 中各含 0.2 mg 的溶液,摇匀,即得。

供试品溶液与阴性对照品溶液:分别取小儿化毒胶囊内容物、阴性样品适量,研细,取约 3 g;人工牛黄研细,取约 45 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇 50 mL,水浴加热回流 30 min,放冷,滤过,用适量甲醇洗涤容器和滤纸,合并滤液,蒸至近干,加甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,摇匀,滤过,即得。

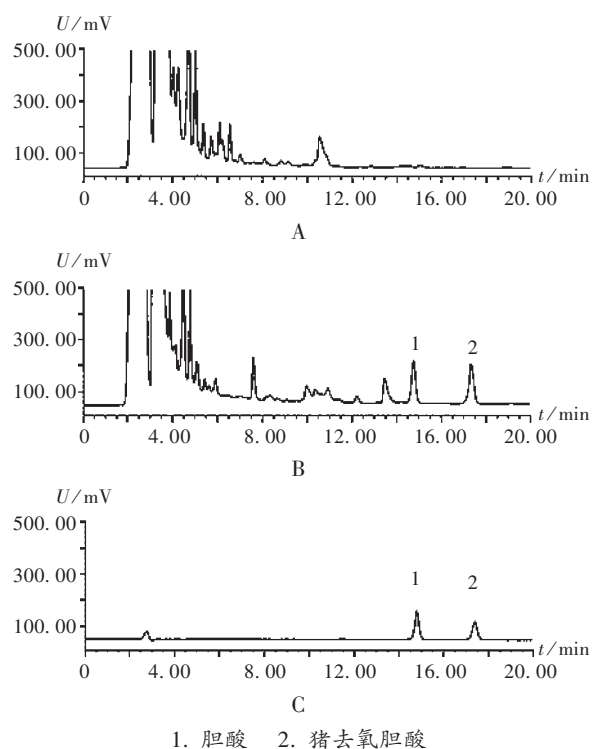
2.3 方法学考察

线性关系考察:取胆酸对照品 10.80 mg(含量为 98.9%),猪去氧胆酸对照品 11.52 mg(含量为 97.3%),精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,折纯度后质量浓度分别为 1.068 g/L 和 1.121 g/L;分别吸取 1,2,3,5,8,10 μL,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进行测定,以对照品进样量的对数值($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积积分值的对数值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程:胆酸 $Y = 1.46X + 5.83$ ($r = 0.999$),猪去氧胆酸 $Y = 1.46X + 5.68$ ($r = 0.999$),胆酸进样量线性范围为 1.068 ~ 10.680 μg,猪去氧胆酸进样量线性范围为 1.121 ~ 11.210 μg。

专属性试验:取阴性对照品溶液,按拟订色谱条件进样。结果未出现与对照品溶液色谱中胆酸与猪去氧胆酸对照品保留时间相同的色谱峰,阴性对照无干扰,详见图 1。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10 μL,按拟订色谱条件操作,重复进样 6 次。结果胆酸和猪去氧胆酸峰面积积分值的 RSD 分别为 2.90% 和 2.28% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密称取同一供试品(批号为 20081),



1. 胆酸 2. 猪去氧胆酸
A. 阴性对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 对照品溶液
图 1 高效液相色谱图

依法制备供试品溶液,分别于配制后每隔 4 h 测定。结果胆酸和猪去氧胆酸峰面积积分值的 RSD 分别为 3.0% 和 2.1% ($n = 6$),表明供试品溶液在 20 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 20081)样品 6 份,依法制备供试品溶液,测定。结果胆酸的平均含量为 0.774 mg/g, RSD 为 2.23% ($n = 6$);猪去氧胆酸的平均含量为 1.050 mg/g, RSD 为 2.71% ($n = 6$)。平均装量为 0.312 2 g,每粒含有胆酸和猪去氧胆酸的总量为 0.570 mg。

加样回收试验:取胆酸对照品 14.54 mg,猪去氧胆酸对照品 14.60 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 6 份溶液各 1 mL,置锥形瓶中,再精密称取 6 份样品(批号为 20081)各 1 g,分别依次置上述锥形瓶中,按 2.2 项下方法制备供试品溶液并测定。结果见表 1。

2.4 胆酸和猪去氧胆酸转移率

取人工牛黄药材适量,制备供试品溶液,测得人工牛黄中胆酸的含量为 5.05%,猪去氧胆酸的含量为 7.23%。按其含量及处方进行计算,样品中胆酸的转移率为 96.5%,猪去氧胆酸的转移率为 91.5%。

2.5 样品含量与限度测定

依法测定 8 批样品含量,结果为每粒 0.570 ~

表1 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.130 5	1.533 6	1.438	1.421	2.617	2.930	103.37	98.27				
1.130 5	1.533 6	1.438	1.421	2.621	2.950	103.65	99.67				
1.184 8	1.607 2	1.438	1.421	2.583	3.051	97.23	101.60				
1.184 8	1.607 2	1.438	1.421	2.590	3.083	97.72	103.85				
1.195 4	1.621 6	1.438	1.421	2.622	3.086	99.21	103.05				
1.195 4	1.621 6	1.438	1.421	2.627	3.097	99.56	103.83	99.81	101.40	2.46	2.91
1.162 5	1.577 0	1.438	1.421	2.627	3.018	101.84	101.41				
1.162 5	1.577 0	1.438	1.421	2.632	2.932	102.19	95.36				
1.166 0	1.581 7	1.438	1.421	2.556	3.071	96.67	104.81				
1.166 0	1.581 7	1.438	1.421	2.609	2.979	100.35	98.33				
1.185 1	1.607 7	1.438	1.421	2.603	3.095	98.60	104.67				
1.185 1	1.607 7	1.438	1.421	2.585	3.057	97.35	101.99				

注:A为胆酸,B为猪去氧胆酸。

0.659 mg。按此结果,考虑批间差异、药材差异等的影响,含量限度暂定为:本品每粒含人工牛黄以胆酸($C_{24}H_{40}O_5$)和猪去氧胆酸($C_{20}H_{27}O_4$)的总量计,不得少于0.40 mg。

3 讨论

人工牛黄中的胆酸为胆甾酸类成分,分子结构中无共轭双键,在紫外-可见光区吸收不明显。《中国药典(一部)》人工牛黄项下记载的含量测定方法及方法后附的原料含量测定方法均为采用糠醛溶液显色后进行紫外测定。另有采用薄层色谱法^[6]或高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)法测定胆酸和猪去氧胆酸的含量^[7-8]。但经试验,两者色谱峰在紫外检测器下响应值很低,且受其他成分干扰,色谱峰几乎难以辨认。在蒸发光散射检测器下信号较强,色谱峰响应值较大,与周围色谱峰分离良好。故蒸发光散射检测器用来测定胆酸类物质较为理想^[9]。

考察超声提取30 min、回流提取30 min、回流提取40 min 3种提取方式,结果回流提取30 min制备的供试品溶液中胆酸和猪去氧胆酸的含量最高。根据测定结果,选定回流提取30 min为溶液的提取方式。

人工牛黄由牛胆粉、胆酸、猪去氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工制成^[1],胆酸和猪去氧胆酸为其中含量最高的2种化学成分,质量控制方法研究较成熟^[10-12]。人工牛黄为天然牛黄的代用品,部分含有天然牛黄的制剂品种使用人工牛黄进行替代,但标准项下并未进行相应的检验检测项目的完善和提高,建议应及时进行标准提高工作,完善人工牛黄的质量控制方法。

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,2015:528,20.

- [2] 葛玉松. HPLC-ELSD法测定小儿氨酚黄那敏颗粒中胆酸和猪去氧胆酸的含量[J]. 中国药师,2015,18(7):1239-1240.
- [3] 熊婧,郑天骄,石岩,等. 人工牛黄甲硝唑胶囊中主要胆汁酸类成分的HPLC-ELSD法测定研究[J]. 药物分析杂志,2015,35(6):1067-1071.
- [4] 徐陆忠,严莺,周学琴. HPLC-ELSD法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸和猪去氧胆酸的含量[J]. 医药导报,2015,34(5):658-660.
- [5] 王璐,戴敬,牛小莲. 清开灵软胶囊中胆酸和猪去氧胆酸的含量测定[J]. 中国药业,2013,22(12):79-80.
- [6] 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):706-709.
- [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):91-94.
- [8] 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):227-231.
- [9] 彭灿,吕蒙莹,李耕,等. 牛黄及其代用品胆酸类物质分析方法研究进展[J]. 中草药,2013,44(5):632-636.
- [10] 邹泰文,石岩,刘薇,等. 牛黄类药材各类成分定量检测方法研究概况[J]. 药物分析杂志,2015,35(1):8-15.
- [11] 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]. 中国药理学杂志,2010,45(8):626-629.
- [12] Qiao X, Ye M, Pan DL, et al. Differentiation of various traditional Chinese medicines derived from animal bile and gallstone: Simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(1): 107-117.

(收稿日期:2018-05-21)