

HPLC同时测定猪胆汁水解产物中 猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的含量

陈悦¹, 王静¹, 陈剑锋², 吕佳¹, 袁子民^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁成大方圆医药有限公司, 沈阳 110005)

[摘要] 目的: 建立同时测定猪胆汁水解产物中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸(45:55)为流动相, 检测波长 192 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。结果: 猪去氧胆酸在 1.027 ~ 8.216 μg 具有良好的线性关系($r=0.999\ 9$), 平均回收率 99.0% (RSD 1.94%)。鹅去氧胆酸进样量 0.963 ~ 7.704 μg 具有良好的线性关系($r=0.999\ 0$), 平均回收率 99.5% (RSD 1.76%)。结论: 该方法灵敏、准确简便, 适用于猪胆汁水解产物中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱; 猪胆汁水解产物; 猪去氧胆酸; 鹅去氧胆酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0061-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190061

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0920.006.html>

[网络出版时间] 2014-08-19 9:20

Determination of Contents of Hyodeoxycholic Acid and Chenodeoxycholic Acid in Hydrolysate of Fel Suillus by HPLC

CHEN Yue¹, WANG Jing¹, CHEN Jian-feng², LV Jia¹, YUAN Zi-min^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Liaoning Chengda Fangyuan Medicine Chained Limited Company, Shenyang 110005, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of both hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in the hydrolysate of Fel Suillus simultaneously. **Method:** The column named Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was used for the chromatographic separation. Acetonitrile-0.1% phosphoric acid (45:55) was used as the mobile phase. The flow-rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 192 nm. The column temperature was maintained at 35 °C and the injection volume was 10 μL. **Result:** Both hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid showed good linear relationship in the range of 1.027-8.216 μg and 0.963-7.704 μg, with the correlation coefficients of 0.999 9 and 0.999 0, respectively. The average recovery rates were 99.0% (RSD 1.94%) and 99.5% (RSD 1.76%). **Conclusion:** The method is accurate, suitable, simple, and can be used for the simultaneous determination of hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in the hydrolysate of Fel Suillus by HPLC.

[Key words] HPLC; the hydrolysate of Fel Suillus; hyodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid

猪胆汁为猪科动物猪的胆汁,具有清热润燥、止咳平喘、解毒的作用,主要含有胆汁酸类、胆红素等

[收稿日期] 20131108(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303225)

[第一作者] 陈悦,在读硕士,从事中药质量标准研究, Tel:0411-85890159, E-mail:cychen1@126.com

[通讯作者] *袁子民,博士,副教授,从事新药研究与开发及中药炮制机制研究, Tel:0411-85890145, E-mail:yuanzmin@163.com

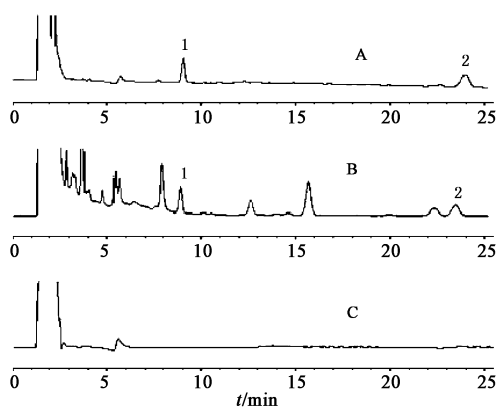
化学成分,其中胆汁酸含量最高,占总量的 50% ~ 70%,主要含猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪胆酸等^[1-3]。猪胆汁主要作为药用、猪胆粉制备的原料药及中药炮制辅料。其质量标准还并不完善,目前研究主要采用薄层扫描法测定猪去氧胆酸含量^[4],HPLC 测定胆红素含量^[5],HPLC-ELSD 同时测定猪胆粉中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量^[6]。但目前研究中,猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸含量测定时供试品溶液制备操作繁琐,样品经水解后还需乙酸乙酯提取,才能进行测定。而本实验经参考有关文献,采用 HPLC 同时测定猪胆汁水解产物中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸含量,供试品制备不需乙酸乙酯提取,为进一步提高、完善猪胆汁的质量标准提供科学依据。

1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪(包括 chemstation system 工作站,美国 Agilent),SG3300 型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司);猪胆汁购于大连猪肉市场;对照品猪去氧胆酸(批号 100087-200610)、鹅去氧胆酸(批号 110806-201105)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其他均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1] Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(45:55),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 192 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。见图 1。



1. 猪去氧胆酸;2. 鹅去氧胆酸;A. 对照品;B. 样品;C. 阴性样品

图 1 猪胆汁 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 取猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品适量,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成含猪去氧胆酸 410.8 mg·L⁻¹,鹅去氧胆酸 385.2 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取猪胆汁 0.60 g,精密称

定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加 10% 氢氧化钠 5 mL,于 120 °C 碱化 4 h,放冷,用盐酸调节 pH 至 6.0 ~ 7.0 后,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液^[7-9]。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μL 依次注入液相色谱仪,记录各色谱峰,进行分析,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程分别为 $Y_{\text{猪去氧胆酸}} = 39.90X + 0.144$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{鹅去氧胆酸}} = 51.21X + 4.755$ ($r = 0.9990$)。结果表明猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸进样量分别在 1.027 ~ 8.216, 0.963 ~ 7.704 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 取同一猪胆汁供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下,连续进样 6 次,记录峰面积,计算猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的 RSD 分别为 1.28%, 1.13%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一猪胆汁,按 2.3 项下方法分别制备 6 份供试品溶液,测定猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的含量,结果分别为 16.4, 12.1 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.76%, 1.78%,表明该法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一猪胆汁供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10 μL,记录峰面积,计算猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸含量的 RSD 分别为 1.41%, 1.89%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的猪胆汁(批号 20130911,猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸分别含 16.43, 12.09 mg·g⁻¹)约 0.3 g,共 6 份,置 50 mL 具塞锥形瓶中,各精密加入猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品适量,按供试品溶液制备方法操作,测定。结果见表 1, 2。

表 1 猪去氧胆酸回收率试验测定

称样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.301	4.942	4.802	9.711	99.3		
0.308	5.052	5.073	9.998	97.5		
0.303	4.982	5.022	9.895	97.8	99.0	1.94
0.301	4.944	4.898	9.804	99.2		
0.306	5.021	5.101	10.003	97.7		
0.302	4.957	4.944	10.031	102.6		

2.9 样品含量测定 分别精密吸取上述 2.2 项中对照品溶液和 2.3 项中供试品溶液各 10 μL,按上述色谱条件测定猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的含量($n = 3$)。结果见表 3。

表 2 鹅去氧胆酸回收率试验测定

称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.301	3.637	3.709	7.301	98.8	99.5	1.76
0.308	3.718	3.701	7.360	98.4		
0.303	3.666	3.604	7.191	97.8		
0.301	3.638	3.600	7.201	99.0		
0.306	3.695	3.708	7.500	102.6		
0.302	3.649	3.638	7.300	100.4		

表 3 猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸含量测定 %

批号	猪去氧胆酸	鹅去氧胆酸
20130911	1.64	1.21
20130919	1.28	1.07
20131012	1.63	1.46

3 讨论

猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸无紫外吸收,为提高检测灵敏度,可考虑采用蒸发光散射检测器(ELSD),但由于实验条件及仪器普及性问题,本实验采用紫外检测器,用末端吸收进行测定,实验中曾对供试品溶液分别在 192,200,210 nm 进行测定,结果显示猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸在 192 nm 处吸收最强,峰形与分离度较好,最终选择 192 nm 作为紫外测定波长。

曾考察不经加热碱化,直接用甲醇提取猪胆汁中游离的猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸,由于含量较少及紫外检测器灵敏度低等原因,方法重复性较差。因此本实验供试品溶液的制备,采用加热碱化水解的方法,使猪胆汁中结合型胆汁酸水解,增加猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸含量,利于样品检测分析。

考察了柱温为室温、20,30,35 ℃ 时的分离效果,实验结果表明 35 ℃ 时出峰多,且各成分分离较

好。比较了乙腈-0.1% 磷酸(45:55)与甲醇-0.1% 磷酸(45:55)洗脱,发现乙腈-0.1% 磷酸(45:55)比甲醇-0.1% 磷酸(45:55)分离效果好。比较了乙腈-0.1% 磷酸比例为 40:60,45:55,50:50,55:45,60:40,结果表明 45:55 分离效果较好。在此基础上,比较了 190,192,200 nm 下的吸收峰,实验结果表明 192 nm 下峰形较好,分离度较好。因此最终选择了以乙腈-0.1% 磷酸(45:55)为流动相,检测波长 192 nm,柱温 35 ℃ 洗脱。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:300,1105.
- [2] 邓启华,姚颖,刘婷,等. 猪胆汁中三种主要胆汁酸的提取分离[J]. 中国生化药物杂志,2012,33(4):405.
- [3] 刘养清,刘二保. 动物胆汁理化性质及药用[M]. 北京:化学工业出版社,2002:203.
- [4] 莫少红,陈晓军,谭洪盛,等. 猪胆汁质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2004,15(3):146.
- [5] 李先端,游修琪,代婉莹,等. HPLC 法测定中药炮制辅料猪胆汁中胆红素的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(5):714.
- [6] 唐元军,陈育琳,陈庆辉. HPLC-ELSD 法同时测定猪胆粉中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(6):651.
- [7] 郭小林,徐丽丽,吕彬,等. HPLC-ELSD 法测定异丙嗪胆汁片中猪去氧胆酸的含量[J]. 中国医药指南,2013,11(14):484.
- [8] 盛燕,陆静娴,赵卫民,等. 胆酸止咳片中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量测定[J]. 医药导报,2013,32(12):1045.
- [9] 李先端,钟银燕,游修琪,等. HPLC 测定中药炮制辅料猪胆汁中猪去氧胆酸含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(12):1492.

[责任编辑 顾雪竹]