

· 化学与分析 ·

## HPLC-ELSD 法测定复方藏药制剂肝纤消颗粒中胆酸含量

徐梦丹<sup>1\*</sup>, 鞠建明<sup>1</sup>, 黄一平<sup>1</sup>, 万元松<sup>2</sup>

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2. 南京工业大学, 南京 210009)

[摘要] 目的: 测定复方藏药制剂肝纤消颗粒中胆酸的含量。方法: 采用 HPLC-ELSD 法进行含量测定, 色谱条件为色谱柱 AlltimaC<sub>18</sub>(4.6 mm ×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.3% 乙酸溶液(40:60); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 35℃; ELSD 漂移管温度 100℃; 载气流量 2.6 L·min<sup>-1</sup>; 进样量 20 μL, 以外标两点对数方程计算样品的含量。结果: 胆酸的线性范围为 2.052 ~ 32.832 μg,  $r=0.9992$ , 肝纤消颗粒样品中胆酸高、中、低浓度的加样回收率分别为 97.1%, 99.4%, 97.4%, RSD 分别为 0.7%, 0.4%, 1.1% ( $n=3$ )。结论: 该方法简便、快速、准确、重复性好, 可用于控制肝纤消颗粒的质量。

[关键词] 肝纤消颗粒; 胆酸; 高效液相色谱-漂移管阵列法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0039-02

### Determination of Cholic acid in Tibetan Medicine Preparation Ganxianxiao Granules by HPLC-ELSD

XU Meng-dan<sup>1\*</sup>, JU Jian-ming<sup>1</sup>, HUANG Yi-ping<sup>1</sup>, WAN Yuan-song<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

2. Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of cholic acid in the compound preparation Ganxianxiao Granules. **Method:** HPLC-ELSD was used in the quantitative analysis with the condition as follows. Alltima C<sub>18</sub>(4.6 mm ×250 mm, 5 μm) was used as column; mobile phase was acetonitrile-0.3% HAC (40:60); the temperature of column was at 35℃; flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the temperature of evaporator tube was set at 100℃; carrier gas flow was 2.6 L·min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 μL, calculating the content with logarithmic equation of external standard. **Result:** Cholic acid was linear in the range of 2.052 ~32.832 μg ( $r=0.9992$ ). The average recovery of high, middle, low concentration in Ganxianxiao Granules was 97.1%, 99.4%, 97.4%, with RSD 0.7%, 0.4%, 1.1% ( $n=3$ ) respectively. **Conclusion:** This method was simple, reliable, accurate, and could be used to control the quality of the compound preparation Ganxianxiao Granules.

[Key words] Ganxianxiao Granules; cholic acid; HPLC-ELSD

肝纤消颗粒系西藏民间验方, 由人工牛黄、伞梗虎耳草、余甘子等 10 余味草药组成, 用于肝纤维化的治疗。方中君药为人工牛黄, 胆酸是人工牛黄中主要活性成分之一, 文献[1-5]报道测定其含量的方法有紫外分光光度法、薄层扫描法、毛细管电泳法, 这些方法操作繁琐、缺少一定的专属性、重现性差,

仪器不够普及。本文参考文献[4-5]建立了肝纤消颗粒中胆酸的 HPLC-ELSD 含量测定方法, 用于控制该复方制剂的质量。

#### 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (Alliance 2695 四元泵及自动进样系统、Alltech ELSD 2000 检测器、Empower 色谱工作站; Millipore Milli-Q 纯水器; METTLER 1/万及 1/10 万电子天平; KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

胆酸对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 00078-200414, 纯度为 99.57%); 肝纤消颗粒(批号 070906, 070913, 070920, 070706) 由江苏省中医药

[收稿日期] 20100421(003)

[基金项目] 江苏省社会发展资助项目(BS2007089); 拉萨市科技局重大科技项目(200414)

[通讯作者] \* 徐梦丹, 学士, 副主任药师, 主要从事中药质量标准研究及制剂工艺研究, Tel: 025-85637940, E-mail: xumengdan@sina.com

研究院新药中试车间按照新药中试要求生产;乙腈为色谱纯,超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取胆酸对照品适量,加流动相溶解制成  $2.052 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,即得。

**2.2 供试品溶液的制备** 取肝纤消颗粒适量,研碎,取细粉 3 g,精密称定,置 100 mL 三角烧瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 45 min,取出,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 15 mL,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,以甲醇定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜( $0.45 \mu\text{m}$ )滤过,即得。

**2.3 阴性样品溶液的制备** 按处方比例称取除去人工牛黄的其他药材适量,依照肝纤消颗粒的制备工艺和供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

**2.4 色谱条件** 色谱柱 Alltima  $\text{C}_{18}$  ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ );流动相乙腈-0.3% 乙酸溶液 (40:60);流速  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;柱温  $35^\circ\text{C}$ ;ELSD 漂移管温度  $100^\circ\text{C}$ ;载气流量  $2.6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;进样量  $20 \mu\text{L}$ ,以外标两点对数方程计算样品的含量。在此色谱条件下,胆酸与相邻峰达到基线分离,分离度大于 1.5,且无阴性干扰,色谱图见图 1。

**2.7 重复性试验** 取同一批样品 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定含量,结果胆酸的平均含量为  $0.846 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 为 1.3%。

**2.8 稳定性试验** 分别将同一供试品溶液,每隔 2 h 测定一次含量,结果表明供试液在 10 h 内稳定,胆酸峰浓度 RSD 分别为 1.2%。

**2.9 加样回收率试验** 取肝纤消颗粒(胆酸平均含量为  $0.8464 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 1.5 g 共 9 份,精密称定,分别按相当于样品中胆酸含量的 80%,100%,120% 的量加入对照品,平行处理 3 份,按 2.2 项下方法操作,测定,计算回收率,结果高、中、低浓度的平均回收率分别为 97.1%,99.4%,97.4%,RSD 分别为 0.7%,0.4%,1.1% ( $n=3$ ),见表 1。

表 1 肝纤消颗粒中胆酸加样回收率 ( $n=6$ )

称样量 /g	样品中胆酸量 /mg	胆酸加入量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.500 2	1.269 8	1.015 6	2.249 2	96.4		
1.501 2	1.270 6	1.015 6	2.257 5	97.2	97.1	0.7
1.500 3	1.269 9	1.015 6	2.263 3	97.8		
1.500 6	1.270 1	1.269 5	2.531 7	99.4		
1.507 8	1.276 2	1.269 5	2.532 5	99.8	99.4	0.4
1.526 8	1.292 3	1.269 5	2.559 2	99.0		
1.500 6	1.270 1	1.523 4	2.750 8	97.2		
1.503 7	1.272 7	1.523 4	2.774 2	98.6	97.4	1.1
1.503 3	1.272 4	1.523 4	2.742 5	96.5		

**2.10 样品测定** 分别取肝纤消颗粒供试品溶液  $20 \mu\text{L}$ ,对照品溶液( $0.8208 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $5 \mu\text{L}, 20 \mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,以外标两点对数方程计算供试品的含量,结果 4 批供试品中胆酸的含量分别为 0.793,0.803,0.809,0.846  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

## 3 讨论

肝纤消颗粒供试品制备过程中,比较了不同提取时间(30,45,60,75,90 min)对胆酸含量的影响,结果表明 45 min 即可把胆酸提取完全。

本研究所建方法具有简便、快速、准确、重复性好的特点,可用于控制人工牛黄和郎庆阿塔的质量。

### [参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2005:47.  
 [2] 杨洪武,王峥,辛敏通.薄层扫描法测定人工牛黄及其制剂中胆酸的含量[J].中成药,2003,25(4):290.  
 [3] 郑建新,邹登峰.毛细管电泳法测定人工牛黄中胆酸的含量[J].中国药房,2006,17(23):1817.  
 [4] 李晓蒙,刘慧琼,程力惠.HPLC-ELSD 测定清开灵颗粒中胆酸和猪去氧胆酸的含量[J].中成药,2007,29(4):623.  
 [5] 李文春,孙永慧.HPLC-ELSD 法测定青羚散中胆酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(5):18.

[责任编辑 顾雪竹]

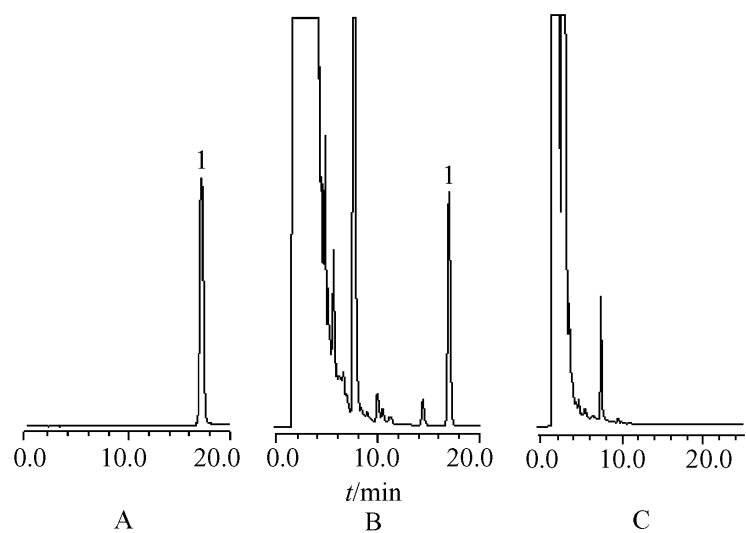


图 1 肝纤消颗粒 HPLC 色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 胆酸

**2.5 线性关系考察** 精密吸取胆酸对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,测定其峰面积。以进样量( $\mu\text{g}$ )自然对数为横坐标,峰面积自然对数为纵坐标,求得其回归方程为  $Y=1.54X+4.80$ ,  $r=0.9992$ ,表明胆酸在  $2.052 \sim 32.832 \mu\text{g}$  有良好的线性关系。

**2.6 精密度试验** 精密吸取对照品溶液( $0.4104 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $20 \mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,峰面积的 RSD 为 0.6%,表明本法精密度良好。