

HPLC-ELSD 法对猪胆粉中猪去氧胆酸的含量测定研究

李志万¹, 马 强², 袁永生³, 周玉新³

(1. 国家药品审评中心, 北京 100038;

2. 大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024;

3. 北京美德森医药技术开发有限公司, 北京 100083)

摘要: 目的: 建立猪胆粉及其制品中猪去氧胆酸的含量测定方法。方法: 以 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5μm) 色谱柱为固定相, 柱温 25 °C, 以乙腈-0.1% 乙酸水溶液 (50: 50) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 40 °C, 以氮气为载气, 压力 2.0 bar。结果: 猪去氧胆酸在 5.4 μg~ 27.0 μg 范围内线性关系良好, $r = 0.9994$, 加样回收率为 97.0%, RSD = 2.7% ($n = 5$)。结论: 该方法简便、准确、重复性好。

关键词: HPLC-ELSD; 猪胆粉; 猪去氧胆酸

中图分类号: R284.1

文献标识码: B

文章编号: 1005-9903(2005)05-0014-03

收稿日期: 2004-10-11

通讯作者: 李志万, Tel: (010) 68585566-539, E-mail: lizhiwan@qianlong.com

Determination of Hyodeoxycholic Acid in Porcine Gall Powder by HPLC with Evaporative Light-Scattering Detector

LI Zhi-wan¹, MA Qiang², YUAN Yong-sheng³, ZHOU Yu-xin³

(1 Center for Drug Evaluation, SFDA, Beijing 100038, China;

2 Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Science
and Technology, Dalian University of Technology, Liaoning Dalian 116024, China;

3 Beijing Medsun Corp., Beijing 100083, China)

Abstract: Objective: To develop a method for the determination of hyodeoxycholic acid in Porcine Gall Powder. Method: Chromatography was performed on a 5 μ m Kromasil C₁₈ (4.6mm \times 250 mm) at 25 $^{\circ}$ C. The mobile phase was composed of acetonitrile- 0.1% acetic acid solution (50: 50) with a flow rate of 1.0mL \cdot min⁻¹. A Sedex 55 evaporative light-scattering detector was used with tube temperature of 40 $^{\circ}$ C and gas pressure of 2.0 bar. Result: A good relationship between peak area and amount of injection was noted at 5.4 μ g~ 27.0 μ g. Average recovery of hyodeoxycholic acid was 97.0% and the RSD was 2.7%. Conclusion: It was proved that the method was reliable, simple and accurate.

Key words: HPLC-ELSD; Porcine Gall Powder; hyodeoxycholic acid

猪胆粉为猪科动物猪胆汁的干燥品,为黄色、灰黄色粉末,味苦,性寒,归肝、胆、肺、大肠经。具清肺化痰、清热解毒之功效,临床用于肺热咳嗽、痰多不爽、百日咳、目赤肿痛、喉痹、黄疸、痢疾、疮疡肿毒等。猪胆粉主要含有猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、胆汁酸、胆红素类成分,中国药典 2000 年版一部猪胆粉^[1]项下规定以薄层扫描法测定猪去氧胆酸的含量,文献多采用此法^[2],亦有报道采用滴定法和高效液相色谱法^[3]测定猪去氧胆酸的含量。本文拟采用灵敏度高、重复性好的高效液相色谱-蒸发光散射检测器进行测定,以克服薄层扫描法重复性差、滴定法灵敏度低的缺点。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(在线脱气机、四元泵、自动进样器); Sedex 55 型蒸发光散射检测器; MILLIPORE Simplicity 超纯水器。

乙腈(色谱纯,批号: 022920, Fisher), 乙酸(分析纯,批号: 20010618 北京化工厂)。

猪去氧胆酸对照品由中药品生物制品检定所提供,猪胆粉购自湖南益阳生化试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 柱温 25 $^{\circ}$ C; 乙腈 0.1% 乙酸水溶液(50: 50) 为流动相, 流速 1.0mL \cdot min⁻¹; 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 40 $^{\circ}$ C, 以氮气为载气, 压力 2.0 bar。此条件下, 猪去氧胆酸和样品中其他物质可达到良好的分离。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定猪去氧胆酸对

照品 10.68mg, 置 10mL 量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取猪胆粉 40mg, 精密称定, 加 10% 氢氧化钠溶液 5mL, 置 10mL 西林瓶中, 压塞, 封盖, 于 120 $^{\circ}$ C 加热 4h, 放冷, 溶液滴加盐酸调 pH 值至 2~ 3, 摇匀。用乙酸乙酯提取 4 次, 每次 10mL, 合并提取液, 蒸干, 残渣加乙醇使溶解, 转移至 10mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液 5 μ L, 15 μ L 及供试品溶液 10 μ L 注入液相色谱仪, 用外标二点法计算供试品的含量。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μ L, 在上述同一色谱条件下, 连续进样 5 次, 测定, 计算猪去氧胆酸峰面积的 RSD% 为 1.6%。表明精密度良好。

2.6 线性关系的考察 在上述同样色谱条件下, 分别精密吸取对照品溶液 5、10、15、20、25 μ L 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积为横坐标, 以猪去氧胆酸进样量(μ g) 为纵坐标, 绘制标准曲线并计算回归方程: $Y = 189.394X - 509$ ($n = 5, r = 0.9994$), 结果表明, 猪去氧胆酸在 5.4 μ g~ 27.0 μ g 范围内线性关系良好。

2.7 稳定性试验 取新制备的供试品溶液, 在上述同一色谱条件下, 于 0、2、4、6、8h 分别进样 10 μ L 测定, 计算猪去氧胆酸峰面积 RSD 为 2.4%。结果表明, 供试品溶液于 8h 内稳定。

2.8 重复性试验 用同一批猪胆粉平行制备 5 份供试品溶液, 在上述同一色谱条件下, 分别进样 10 μ L 测定, 计算猪去氧胆酸平均含量为 29.2%, RSD

为 1.3%, 方法的重复性符合要求。

2.9 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的供试品, 分别加入猪去氧胆酸对照品适量(按 1:1 加入), 按上述色谱条件测定, 计算回收率, 见表 1。结果表明, 方法的回收率良好。

表 1 猪胆粉中猪去氧胆酸的加样回收实验结果

称样量 (mg)	样品中含 量(mg)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
20.21	5.90	5.08	10.80	94.8	97.1	2.3
	5.90	5.08	10.62			
19.83	5.79	5.25	11.09	100.7		
	5.79	5.25	11.27			
18.32	5.35	5.40	11.13	95.8		
	5.35	5.40	11.00			
19.42	5.67	5.34	11.04	97.4		
	5.67	5.34	11.15			
19.55	5.71	5.50	11.28	96.6		
	5.71	5.50	11.13			

2.10 样品含量测定 按上述方法, 分别对 10 批原料和 3 批成品中猪去氧胆酸的含量进行测定。结果见表 2。

表 2 猪胆粉中猪去氧胆酸含量测定结果

样品批号	猪去氧胆酸含量(%)	样品批号	猪去氧胆酸含量(%)
020710	27.6	020907-1	30.0
020815	27.9	020907-2	30.9
020821	28.9	020910-1	30.2
020827-1	28.6	029010-2	31.7
020827-2	29.2	029010-3	31.5

3 小结与讨论

ELSD 检测的漂移管温度与载气流速是影响实验的 2 个关键参数, 不同的样品需采用不同的条件。根据流动相的种类和比例, 通过观察在不同漂移管温度和不同载气压力进样时猪去氧胆酸的信号强度, 再结合基线的情况, 最终确定蒸发光散射检测器的漂移管温度为 40℃, 载气压力 2.0 bar 为检测的最佳参数。

线性关系考察结果表明, 猪去氧胆酸在 5.41 μ g~27.01 μ g 范围内线性关系良好, 但曲线偏离原点, 故不宜采用外标一点法计算含量。文献[4]报道蒸发光散射检测器所获得的峰面积与样品浓度的线性关系不太理想, 一般分别取对数后可得到理想的线性关系, 这种现象与 ELSD 检测器的检测机理是一致的。经比较可知采用外标二点法或采用对数计算含量, 测定结果较准确。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000. 259.
- [2] 麻风华, 朱秀荣, 王卫东, 等. 双波长扫描法测定猪胆粉中猪去氧胆酸的含量[J]. 中成药, 2001, 23(1): 68-69.
- [3] 林酷, 肖学风, 邱智东, 等. HPLC 法测定双胆片中猪去氧胆酸含量[J]. 中草药, 2002, 33(8): 712-713.
- [4] 冯埃生, 邹汉法, 汗海林, 等. 影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(6): 414.