

# HPLC-ELSD 法测定青羚散中胆酸的含量

李文春<sup>1</sup>, 孙永慧<sup>2</sup>

(1 哈药集团中药二厂研究所, 黑龙江 哈尔滨 150078; 2 黑龙江中医药大学中药研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**目的: 建立青羚散中人工牛黄的含量测定方法。方法: 采用反相高效液相法进行人工牛黄中胆酸的含量测定, 采用 Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(250 × 4.6mm, 5 $\mu$ m); 以甲醇-1% 醋酸溶液(77: 23) 为流动相, 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 采用蒸发光散射检测器, 检测温度 40℃; 灵敏度: 10; 氮气压力 1.0bar。结果: 线性范围: 0.49~ 3.92 $\mu$ g, 相关系数  $r = 0.9992$ 。平均回收率为 100.5% ( $n = 6$ ),  $RSD = 1.79\%$ 。结论: 该方法为评价和控制青羚散的质量提供了依据。

**关键词:** 青羚散; 人工牛黄; 胆酸; HPLC-ELSD; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)05-0018-03

青羚散主要由羚羊角、平贝母、青礞石、人工牛黄、大黄、甘草等九味中药组成。具有清热解毒, 祛痰止咳功效, 用于肺热咳嗽, 痰热咳嗽, 咳吐黄痰, 小便短赤, 便燥等肺热症。该制剂已在临床及市场销售二十年, 但其质量控制相对简单, 仅有显微鉴别, 特异性差, 不能完全反映制剂的质量及临床疗效, 我们通过研究, 对青羚散中人工牛黄进行含量测定, 以评价和控制制剂的质量。

## 1 实验部分

**1.1 试剂与仪器** Dynamax SD-200 泵; Star 色谱工作站; Dynamax 色谱工作站; 美国 RAININ 公司生产; Fuji CBI-100 型柱温盒; Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(250 × 4.6mm, 5 $\mu$ m); Sedex-55 蒸发光散射检测器(ELSD), 法国 SEDERE 公司生产。胆酸化学对照品(批号: 078-9312, 供含量测定用), 中国药品生物制品检定所提供。青羚散(哈药集团中药二厂提供) 甲醇色谱纯(美国 Tedia 公司); 其它试剂均为分析纯。

**1.2 高效液相色谱条件<sup>[1]</sup>** Hypersil BDS-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 × 4.6mm, 5 $\mu$ m); 流动相: 甲醇-1% 乙酸溶液(77: 23); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 采用蒸发光散射检测器, 检测温度 40℃; 灵敏度: 10; 氮气压力 1.0bar; 进样量 10 $\mu$ L, 色谱图见下图。

### 1.3 测定方法与结果

**1.3.1 对照品溶液的制备** 取胆酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1mL 含胆酸对照品 200 $\mu$ g 的

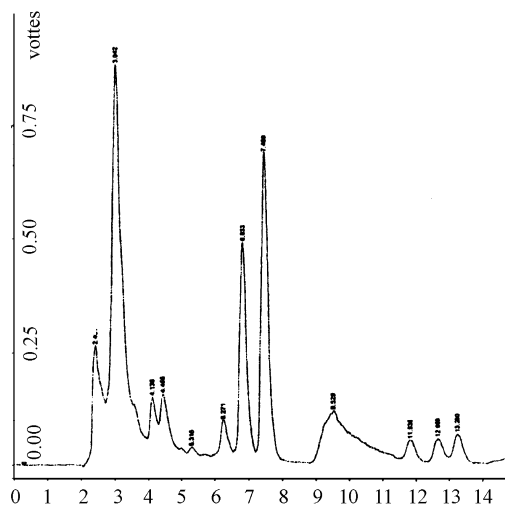


图 1 供试品溶液 HPLC 图

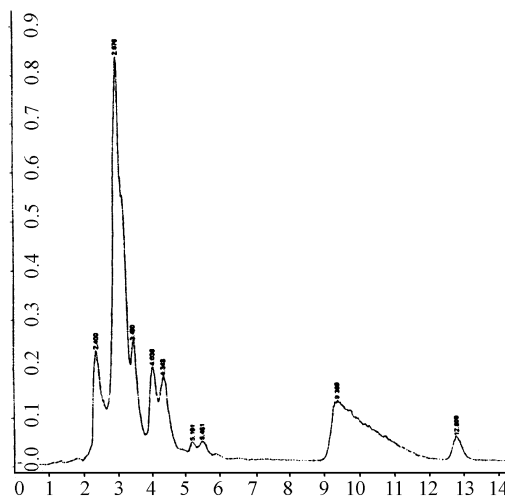


图 2 阴性对照液 HPLC 图

溶液, 即得。

**1.3.2 供试品溶液的制备<sup>[1]</sup>** 取本品粉末 1.0g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50mL, 精密称定重量, 超声处理 30min, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液

收稿日期: 2004-04-29

通讯作者: 孙永慧, Tel: (0451) 88591916 或 82196157, E-mail:

sunyonghui8888@sohu.com

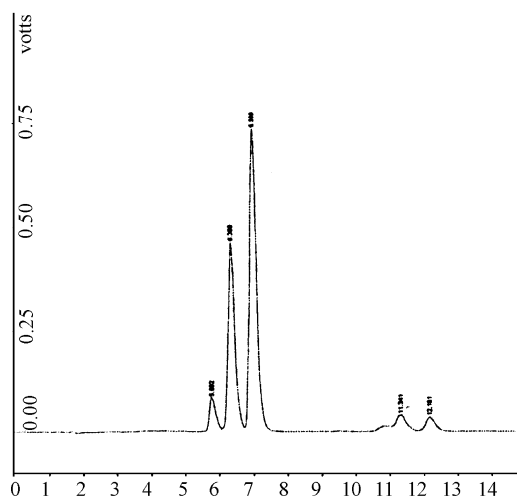


图 3 人工牛黄药材 HPLC 图谱

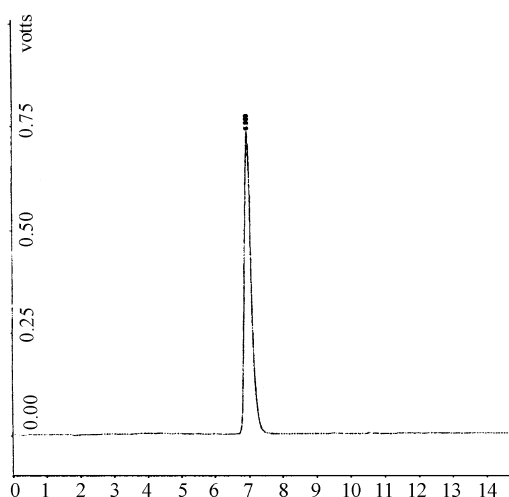


图 4 胆酸对照品 HPLC 图

25mL, 蒸干, 残渣加 25% 氢氧化钠溶液 10mL, 加热回流 2h, 冷却, 加稀盐酸 20mL 调节 pH 至酸性, 用醋酸乙酯提取 4 次 (25mL、25mL、20mL、20mL), 合并提取液, 乙酸乙酯层再用 0.1mol/L 的盐酸溶液洗涤两次, 水层弃去, 乙酸乙酯液通过铺有少量无水硫酸钠的脱脂棉滤过, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

**1.3.3 线性关系考察** 精密称取胆酸对照品 1.96mg, 置 10mL 棕色量瓶中, 加甲醇超声振荡溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 196 $\mu$ g/mL 对照品溶液。精密吸取对照品溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0 $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 于 ELSD 上测定。以对照品进样量的自然对数值为横坐标, 峰面积值的自然对数值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程为  $Y = 1.3467X + 14.7452$ , 相关系数  $r = 0.9992$ 。表明胆酸在 0.49 $\mu$ g ~ 3.92 $\mu$ g 范围内呈良好的线性关系。

**1.3.4 精密度试验** 取胆酸对照品溶液 10 $\mu$ L 注入高效液相色谱仪, 依法测定 5 次。其胆酸峰面积值

的 RSD 为 1.89%, 说明仪器精密度良好。

**1.3.5 供试品溶液稳定性** 取制备好的供试品溶液 10 $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 在之后 0.5、1.5、2、6h 各进样 10 $\mu$ L, 得出供试品中胆酸的峰面积值的 RSD 值为 1.54%。说明供试品溶液在 6h 内稳定性较好。

**1.3.6 重复性试验** 精密称取同一批样品 5 份, 照供试品溶液制备法制备供试品溶液并测定, 其胆酸含量值 RSD 为 1.43%。结果显示方法重复性良好。

**1.3.7 加样回收试验** 精密称取已知含量的同一批号供试品 6 份, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入含胆酸对照品的甲醇溶液 50mL (含胆酸 1.70mg), 超声处理 30min, 按供试品溶液的制备方法制备, 作为供试品溶液。测定其含量, 并计算加样回收率 (表 1)。

表 1 胆酸加样回收率试验结果

供试品号	取样量 (g)	胆酸量 (mg)	加入胆酸 (mg)	胆酸测定值 (mg)	加样回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.5145	2.68	1.70	4.392	100.7	100.5	1.79
2	0.4815	2.51	1.70	4.190	98.8		
3	0.5198	2.71	1.70	4.426	100.9		
4	0.5794	3.02	1.70	4.746	101.5		
5	0.5286	2.76	1.70	4.426	98.0		
6	0.5335	2.78	1.70	4.530	102.9		

**1.4 供试品的含量测定** 对 10 批青羚散 (羚羊清肺散) (由哈药集团中药二厂提供) 中的胆酸进行含量测定 (表 2)。

表 2 青羚散胆酸的含量测定结果 (%)

批号	含量	批号	含量
990201	0.348	011002	0.321
991001	0.338	011003	0.355
991002	0.399	020701	0.475
010301	0.311	020702	0.466
011001	0.251	020703	0.512

## 2 讨论

青羚散原名羚羊清肺散, 由于与部颁标准 (中药成方制剂) 中羚羊清肺散重名, 且不为同一品种, 因此地标整顿更名为青羚散, 该制剂由羚羊角、青礞石、人工牛黄、大黄、甘草等九味药物组成。临床用于小儿肺热咳嗽风热感冒具有较好的疗效。我们对其中组成部分人工牛黄进行了含量测定, 为评价和控制该品种的质量提供依据。《药典》中牛黄的含量测定采用薄层扫描法, 该法重复性较差, 文献有采用<sup>[3]</sup> 1-溴乙酰基对硝基苯对人工牛黄中的胆酸进行化学衍生化, HPLC 分离利用紫外检测器进行含量测

定。该方法操作较复杂,重复性较差,本法采用蒸发光散射检测器(ELSD)对胆酸直接进行定量分析,获得了较理想的结果。

该测定法供试品溶液的制备参照了中国药典 2000 版一部牛黄项下供试品制备方法,线性关系考察表明胆酸在  $0.49\mu\text{g} \sim 3.92\mu\text{g}$  范围内呈良好的线性关系。因该线性方程为不通过原点的直线,因而采用外标两点法测定,同时对进样量及峰面积取自然对数,其线性较好。供试品制备方法的重复性良好,加样回收率为  $100.5\%$  ( $n = 6$ )。人工牛黄是用牛、猪、羊胆汁中提取的有效成分加工而成<sup>[3]</sup>,人工牛黄药材色谱中自左向右分别为:胆固醇(cholesterol)、猪去氧胆酸(HDCA)、胆酸(CA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、去氧胆酸(DCA)与文献<sup>[3]</sup>报道完全一致。同时考虑到制剂中成分复杂,以及人工牛黄中含有结合型胆酸,因此用碱水解处理,以保证胆酸的充分检出。

蒸发光散射检测器是 90 年代出现的最新型的泛用检测器,理论上这种检测器可用于挥发性低于流动相的任何样品组分,但由于它对于有紫外吸收的样品组分的检测灵敏度较低,因而主要用于糖类、高分子化合物、高级脂肪酸、磷脂、维生素、氨基酸、

甘油三酯及甾体类等几十类化合物。其检测原理:将流出色谱柱的流动相及组份先引入已通气体(常用高纯氮,也有时用空气)的蒸发室,加热,使流动相蒸发而除去;样品组分在蒸发室内形成气溶胶,而进入检测室,用强光或激光照射气溶胶而产生光散射(丁铎尔光效应),测定光强度而获得组分的浓度信号。中药成分中的皂苷类、甾醇类成分检测已逐步由 HPLC-ELSD 法取代薄层扫描法,胆酸的含量采用 HPLC-ELSD 法测定的较少有报道,而在成方制剂中采用此法测定胆酸,灵敏度高,分离度好,干扰少,重复性好以及回收率高,是一种良好的胆酸含量测定方法。

#### 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. 52.
- [2] 赵陆华. 高效液相色谱法分析中药成分手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 228.
- [3] 冯芳, 马永建, 陈明, 等. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定人工牛黄中多组分含量[J]. 药学学报, 2000, 35(3): 216.