

HPLC法比较熊胆粉及猪胆粉、牛胆粉、羊胆粉和鸡胆粉中胆汁酸类成分

张贇华¹, 刘建忠², 彭霞³, 李忠琼¹, 张雯洁¹

(1. 云南省食品药品检验所, 昆明 650011; 2. 云南省陇川县章凤制药厂, 陇川 678700;

3. 云南省西双版纳州食品药品检验所, 景洪 666100)

摘要 目的: 采用 HPLC 法分别测定熊胆粉与猪胆粉、牛胆粉、羊胆粉和鸡胆粉的胆汁酸类成分并进行比较。方法: 色谱柱为 Alltech Prevail Select C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱; 甲醇-乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (磷酸调 pH 4.4) 为流动相进行梯度洗脱; 检测波长为 210 nm; 柱温为 40℃。结果: 5 种胆汁粉所含结合型胆汁酸和水解后胆汁酸的液相色谱图明显不同。结论: 5 种胆汁粉可采用液相色谱图进行鉴别。

关键词: HPLC; 胆汁酸; 熊胆; 猪胆; 牛胆; 羊胆; 鸡胆

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0487-04

HPLC comparison of bile acids in Fells Ursi powder, Fells Suis powder, Calculus Bovis powder, Fells Caprinus powder and Fells Galli powder

ZHANG Yun-hua¹, LIU Jian-zhong², PENG Xia³, LI Zhong-qiong¹, ZHANG Wen-jie¹

(1. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650011, China; 2. Zhangfeng Pharmaceutical Factory, Longchuan 678700, China;

3. Yunnan Xishuangbanna Institute for Food and Drug Control, Jinghong 666011, China)

Abstract Objective To determine the components of the bile acids in Fells Ursi powder and Fells Suis powder, Calculus Bovis powder, Fells Caprinus powder, Fells Galli powder by HPLC respectively and compare their chromatograms from each other. **Method** The separation was performed on a Alltech Prevail Select C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of methanol-acetonitrile-0.03 mol/L sodium dihydrogen phosphate solution with gradient elution. The detection wavelength was 210 nm. The column temperature was 40 °C. **Results** The chromatograms of conjugated bile acids and bile acids by hydrolysis in five galls was clearly different. **Conclusion** Five galls can be identified by HPLC.

Key words HPLC; bile acids; Fells Ursi; Fells Suis; Calculus Bovis; Fells Caprinus; Fells Galli

熊胆粉为熊科动物黑熊 [*Selenarctos thibetanus* (Cuvier)] 的引流胆汁低温干燥品。熊胆始载于《唐新修本草》。中医药学认为其性寒, 味苦, 具有清热、解毒、利胆、解痉和明目的功能, 活性成分主要为牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸^[1]; 猪胆味苦性寒, 具有清热、润燥、解毒之功效, 其主要成分为猪胆酸、猪去氧胆酸和胆红素等^[2]; 牛胆具有清肝明目、利胆通肠、解毒消肿之效, 主要含有胆红素、胆汁酸、胆固醇、无机元素、蛋白及氨基酸, 胆汁酸中主要含牛磺胆酸、牛磺去氧胆酸、甘氨酸和甘氨去氧胆

酸^[3,4]; 羊胆汁具有显著的抗炎、抑菌等作用, 其主要成分为胆汁酸盐、胆色素、粘蛋白及碳酸氢钠等^[4]; 鸡胆味苦性寒, 有清热解毒、泻肺火、理肺气的作用, 可治百日咳、疟疾, 胆汁用水冲服, 可医风火赤眼^[5]。熊胆粉为国家卫生部批准的一类中药新药, 在药品质量标准中采用薄层色谱法检查猪胆、牛胆和羊胆, 以保证熊胆粉的质量。本文采用 HPLC 法测定熊胆粉及猪胆、牛胆和羊胆的液相图谱, 以比较其同异。

1 仪器及试剂

HP-1100液相色谱仪, 四元泵, VW D可变波长检测器, 自动进样器。

熊胆粉样品: 云南省章凤制药厂提供。

对照品: 中国药品生物制品检定所提供, 牛磺熊去氧胆酸钠 (110816-200305), 牛磺鹅去氧胆酸钠 (0846-200003), 牛磺胆酸钠 (0815-9702), 熊去氧胆酸 (755-9003), 鹅去氧胆酸 (0806-9102), 猪去氧胆酸 (087-9406), 去氧胆酸 (724-8601), 胆酸 (0078-9312)。

对照药材: 中国药品生物制品检定所提供, 牛胆粉 (1095-200001), 羊胆粉 (121524-200501)。

猪胆粉和鸡胆粉购于市场, 经中国药品生物制品检定所中药标本馆张继馆长鉴定分别为猪科动物猪 *Sus scrofa domestica* Brisson 和雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 胆汁的干燥品。

所用溶剂均为分析纯, 流动相配制用色谱纯溶剂。

2 色谱条件

A ltech Prevail Select C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 甲醇 (A) - 乙腈 (B) - 0.03 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (磷酸调节 pH 4.4) (C) 为流动相, 梯度洗脱程序见表 1, 流速为 1 mL·min⁻¹; 检测波长为 210 nm; 柱温为 40 ℃。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Tab 1 The gradient elution events of mobile phase

时间 (time) /min	结合型胆汁酸测定 (for conjugated bile acids)		水解型胆汁酸测定 (for bile acids by hydrolysis)		
	A	C	A	B	C
0	10	90	30	20	50
60	60	40	55	20	25

注: A 表示甲醇; B 表示乙腈; C 表示 0.03 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液

Note: A - methanol B - acetonitrile C - 0.03 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate solution

3 溶液配制

3.1 对照品溶液 分别取对照品牛磺熊去氧胆酸钠、牛磺鹅去氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸和胆酸适量, 分别加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

3.2 结合型胆汁酸供试品溶液 取熊胆粉、牛胆粉、羊胆粉、猪胆粉和鸡胆粉各约 0.6 g 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声 (功率 300 W, 频率 25 kHz) 10 min 使溶解, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.3 水解后胆汁酸供试品溶液 取熊胆粉、牛胆

粉、羊胆粉、猪胆粉和鸡胆粉各约 0.2 g 分别加乙醇 5 mL 使溶解, 滤过, 滤液置水浴上蒸干, 残渣加 10% 氢氧化钠溶液 5 mL, 置水浴上加热水解 8 h 放冷, 滴加盐酸调节 pH 至 2~3 用乙酸乙酯提取 2 次, 每次 10 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加乙醇适量使溶解, 移至 5 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

4 方法与结果

分别量取对照品溶液、供试品溶液注入色谱仪, 记录色谱图。结合型胆汁酸测定时理论板数按牛磺熊去氧胆酸钠峰计算不低于 4000 水解后胆汁酸理论板数按熊去氧胆酸峰计算不低于 4000。

取上述溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图 (图 1、图 2), 分别计算各色谱峰占总峰面积比例 (表 2、表 3)。

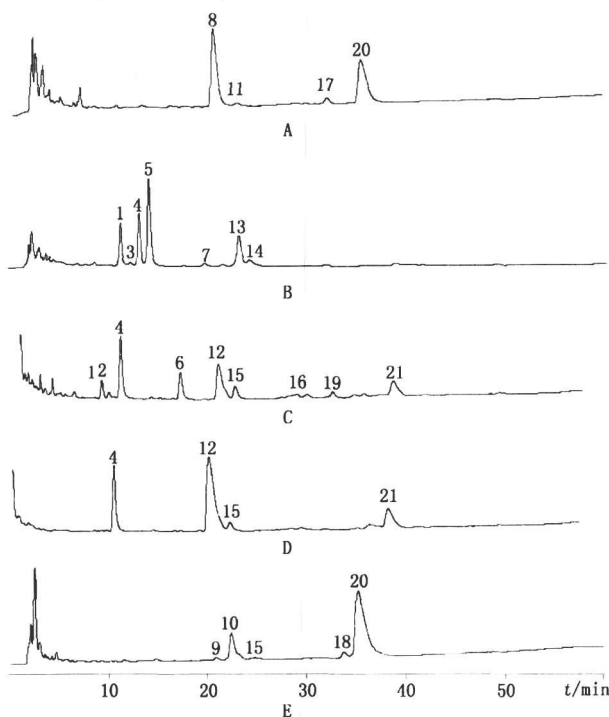


图 1 胆粉结合型胆汁酸类成分高效液相色谱图

Fig 1 Chromatograms of conjugated bile acids of bile powder

A 熊胆粉 (Fellis Ursi) B 猪胆粉 (Fellis Suis) C 牛胆粉 (Cakulus Bovis) D 羊胆粉 (Fellis Caprinus) E 鸡胆粉 (Fellis Galli)

1~21 同表 2 (same as Tab 2)

6 讨论

6.1 液相色谱条件的选择 系参考“熊胆粉”质量标准中 [含量测定] 项目的条件, 加入乙腈进行梯度洗脱, 以各个样品色谱图中 10~60 min 内的主要色谱峰进行统计、比较和分析。

6.2 由结合型胆汁酸测定结果得知: 熊胆粉中胆汁酸类成分以 2 个成分的色谱峰为主 (保留时间为

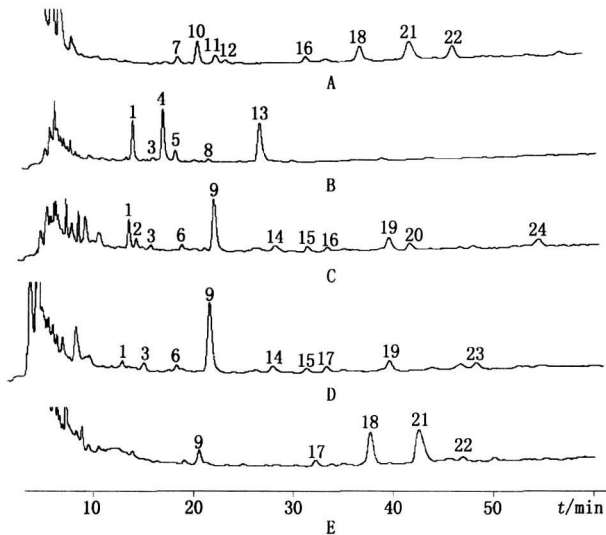


图 2 胆粉水解后胆汁酸类成分高效液相色谱图
Fig 2 Chromatograms of bile acids by hydrolysis of bile powder
A. 熊胆粉 (Fellis Ursi) B. 猪胆粉 (Fellis Suis) C. 牛胆粉 (Calculus Bov is) D. 羊胆粉 (Fellis Caprinus) E. 鸡胆粉 (Fellis Gall i)
1~ 24. 同表 3(same as Tab 3)

20.4 m in和 35.4 m in), 两者峰面积占总峰面积的 90% 以上, 其中保留时间为 20.4 m in的色谱峰为牛磺熊去氧胆酸钠, 保留时间为 35.4 m in的色谱峰为牛磺鹅去氧胆酸钠; 猪胆色谱图中以 4 个色谱峰为主 (保留时间为 11.3, 13.2, 14.1, 23.2 m in), 其峰面积占总峰面积的 90% 以上, 且集中在前半段; 羊胆色谱图与牛胆色谱图较为相似, 羊胆的色谱峰在牛胆的色谱图中均能找到 (保留时间为 13.2, 22.9, 24.9, 40.8 m in), 以 3 个色谱峰为主 (保留时间为 13.2, 22.9, 40.8 m in), 其峰面积占总峰面积的 90% 以上, 保留时间为 22.9 m in的色谱峰为牛磺胆酸钠, 在羊胆的色谱图中其峰面积占总峰面积的 50% 以上, 牛胆的色谱峰则较羊胆明显要多 (达 9 个), 以 4 个色谱峰为主 (保留时间为 13.2, 19.3, 22.9, 40.8 m in), 其峰面积占总峰面积的 70% 以上, 除牛磺胆酸钠的色谱峰外, 保留时间为 19.3 m in的色谱峰为胆酸, 这在羊胆色谱图中未出现; 鸡胆以 2 个色谱峰为主 (保留时间为 22.4, 35.4 m in), 其峰面积占总峰面积的 90% 以上, 保留时间为 35.4 m in的色谱峰为牛磺鹅去氧胆酸钠。

表 2 结合型胆汁酸的保留时间及峰面积比例

Tab 2 The retention time and the percent of area of conjugated bile acids							
序号 (No.)	成分 (component)	保留时间 (retention time) /m in	峰面积比例 (percent of area) %				
			熊胆 (FellisU rsi)	猪胆 (Fellis Suis)	牛胆 (Cakulus Bov is)	羊胆 (Fellis Caprinus)	鸡胆 (Fellis Galli)
1	胆酸 (cholic acid)	11. 3		15. 9	5. 3		
2		12. 1			2. 4		
3		12. 4		2. 1			
4		13. 2		19. 3	23. 0	20. 8	
5		14. 1		38. 0			
6		19. 2			12. 1		
7		19. 8			1. 5		
8	牛磺熊去氧胆酸钠 (sod ium tauroursodeoxycho late)	20. 4	53. 6				
9		20. 9					1. 6
10		22. 4					17. 9
11		22. 7	1. 4				
12	牛磺胆酸钠 (natrium taurocho late)	22. 9			25. 5	56. 6	
13	猪去氧胆酸 (hyodeoxy cholic acid)	23. 2		17. 8			
14		24. 3		4. 8			
15		24. 9			7. 4	4. 1	2. 1
16		31. 1			4. 2		
17		32. 1	3. 5				
18		33. 8					3. 1
19		34. 7			3. 8		
20	牛磺鹅去氧胆酸钠 (sod ium taurochenodeoxycholate)	35. 4	41. 4				75. 4
21		40. 8			16. 2	15. 4	

表 3 水解后胆汁酸的保留时间及峰面积比例

Tab 3 The retention time and the percent of area of bile acid by hydrolysis

序号 (No)	成分 (component)	保留时间 (retention time) /m in	峰面积比例 (percent of area) %				
			熊胆 (Fellis Ursi)	猪胆 (Fellis Sus)	牛胆 (Caculus Bovis)	羊胆 (Fellis Caprinus)	鸡胆 (Fellis Gall)
1		11. 6		20. 0	13. 5	4. 1	
2		12. 2			5. 7		
3		13. 7		2. 4	2. 9	4. 9	
4		14. 7		33. 3			
5		16. 0		7. 3			
6		16. 9			3. 0	4. 6	
7		19. 0	5. 7				
8		19. 4		1. 6			
9	胆酸 (cholic acid)	20. 2			37. 8	57. 5	13. 5
10	熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid)	21. 0	17. 6				
11		22. 8	7. 8				
12		23. 8	2. 8				
13	猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid)	24. 8		35. 4			
14		26. 5			5. 8	6. 2	
15		29. 9			4. 4	3. 7	
16		31. 9	5. 1		3. 0		
17		32. 2				4. 9	4. 9
18	鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)	37. 5	16. 9				32. 4
19	去氧胆酸 (deoxycholic acid)	38. 3			10. 8	8. 4	
20		40. 4			5. 8		
21		42. 5	28. 6				45. 8
22		46. 9	15. 4				3. 4
23		47. 2				5. 7	
24		53. 6			7. 3		

6.3 由水解后胆汁酸测定实验得知: 熊胆粉中胆汁酸类成分以 4 个色谱峰为主 (保留时间为 21.0、37.5、42.5、46.9 min), 其峰面积占总峰面积的 70% 以上, 其中保留时间为 21.0 min 的色谱峰为熊去氧胆酸, 保留时间为 37.5 min 的色谱峰为鹅去氧胆酸; 猪胆色谱图中以 3 个色谱峰为主 (保留时间为 11.6、14.7、24.8 min), 其峰面积占总峰面积的 80% 以上, 保留时间为 24.8 的色谱峰为猪去氧胆酸; 羊胆色谱图与牛胆色谱图较为相似, 以胆酸色谱峰为主 (保留时间为 20.2 min), 其峰面积占总峰面积的 50% 以上; 牛胆的色谱峰较羊胆略多, 以 3 个色谱峰为主 (保留时间为 11.6、20.2、38.3 min), 其峰面积占总峰面积的 60% 以上, 除胆酸的色谱峰外, 保留时间为 38.3 min 的色谱峰为去氧胆酸, 这在羊胆色谱图中也存在; 鸡胆以 2 个色谱峰为主 (保留时间为 37.5、42.5 min), 其峰面积占总峰面积的 70% 以上, 保留时间为 37.5 min 的色谱峰为鹅去氧胆酸。

致谢: 本项工作得到中国药品生物制品检定所中药标本馆张继馆长的指导与支持, 特此深表感谢!

参考文献

1 XU Yu-cong (徐愚聪), WANG Ye(王野). Recent progress in research of Fellis Ursi powder (熊胆粉的研究进展). *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2000, 15(3): 200

2 CHEN Hua-i-qing(陈怀庆), TAN Zi-ping(谭子平). The determination of bilirubin and bile acids in Fellis Sus (猪胆汁中胆红素和胆酸含量测定). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12(4): 315

3 ZHANG Qi-ming(张启明). Study on the compositions in ox-bile powder (牛胆粉的化学研究). *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 1997, 4(1): 58

4 HAO Li-li(郝丽莉), ZHAO Wen-jing(赵文静), WANG Ya-wei(王亚威), et al. Pharmaceutical studies on biles of animals (动物胆汁的药用研究). *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1999, 3: 13

5 YAN Yong-he(严永和). All component parts of the chicken are Chinese traditional medicines (鸡-浑身都是药). *PLA Health* (解放军健康), 2005, 2: 32

(本文于 2008 年 3 月 27 日收到)