

• 药物制剂与药品质量控制 •

高效液相色谱-蒸发光散射检测法 检测天然牛黄与酶促牛黄中胆固醇含量^{*}

李珂 高允生 李炳龙 齐永秀

(泰山医学院药学院, 山东泰安 271016)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法,测定并比较天然牛黄与酶促牛黄中胆固醇的含量。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈-异丙醇(1:1)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹;漂移管温度 67.5 °C,气体流速 1.7 L·min⁻¹。结果 胆固醇浓度在 4.0~20.0 μg·mL⁻¹ 范围,浓度对数(logC)与峰面积对数(logA)呈良好的线性关系 logA=1.541 2logC-2.525 (r=0.999 2);低、中、高浓度平均回收率分别为 98.41%、100.04%、96.46%,RSD 分别为 0.63%、1.67%、1.03%。结论 该法简便、准确、专属强,可用于牛黄、牛黄替代品及其制剂的质量控制。

[关键词] 天然牛黄;酶促牛黄;胆固醇;含量测定;高效液相色谱-蒸发光散射测定法

[中图分类号] R286;R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2011)12-1633-04

Content Determination of Cholesterol in Natural Calculus Bovis and Cultivated Calculus Bovis by Glucuronidase with HPLC-ELSD

LI Ke, GAO Yun-sheng, LI Bing-long, QI Yong-xiu (School of Pharmacy, Taishan Medical College, Shandong, Taian 271016, China)

ABSTRACT Objective To establish a HPLC-ELSD method for determining cholesterol and making a comparison of which between two kinds of calculus bovis. **Methods** A C₁₈(250 mm×4.6 mm 5 μm) column was used with a mobile phase as acetonitrile-Isopropanol (1:1) flowing at 1.0 mL·min⁻¹. The temperature of drift tube was 67.5 °C and the gas flow rate was 1.7 L·min⁻¹. **Results** The cholesterol was in a good linear relationship in the range of 4.0~20.0 μg·mL⁻¹, logA = 1.541 2logC-2.525 (r=0.999 2). The average recovery was 98.41%, 100.04%, 96.46%, respectively, and RSD was 0.63%, 1.67%, 1.03%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, specific and can be used for the quality control of cholesterol in natural calculus bovis, succedaneums and preparations.

KEY WORDS Natural calculus bovis; Calculus bovis cultivated by glucuronidase; Cholesterol; Content determination; HPLC-ELSD

胆固醇广泛分布于人和动物的各种组织中,是维持机体正常生理功能所必需的重要物质^[1]。胆固醇不仅在中枢神经系统的发育和功能活动中发挥重要作用,也参与动脉粥样硬化等心血管疾病的发生发展过程。目前胆固醇的含量测定方法有比色法、气相色谱法^[2]、酶水解法^[3]、傅立叶变换-衰减全反射红外光谱法^[4]及高效液相色谱(HPLC)法^[5]等。比色法是胆固

醇含量测定的传统方法,样品前处理操作繁杂,样品中脂肪的提取比较耗时,所需试剂多,成本较高,结果易产生偏差,应用受到了限制。气相色谱法测定胆固醇,分离效果好,选择性高,但因样品中常有脂类物质共存,需对样品进行皂化处理,操作繁琐,易引起偏差。傅立叶变换-衰减全反射红外光谱法和酶水解法由于所需仪器限制,目前较少采用。在已报道的采用 HPLC 法测定胆固醇含量的方法中,多采用末端吸收测定,末端吸收受所用溶剂截止波长的限制,现已较少采用。笔者建立的高效液相色谱-蒸发光散射检测法(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection, HPLC-ELSD)法,对牛黄中的胆固醇含量进行了测定。样品不需衍生化,操作简便,方法灵敏、专属、精密。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Waters 公司 600E 高效液相色谱仪,

[收稿日期] 2011-05-03 **[修回日期]** 2011-05-29

[基金项目] * 山东省教育厅基金资助项目(基金编号: J10LF16)

[作者简介] 李珂(1978-),女,陕西汉中,人,讲师,硕士,研究方向:药物分析。电话:0538-6229751, E-mail: kli@tsmc.edu.cn。

[通讯作者] 齐永秀(1968-),女,湖北荆州人,教授,硕士生导师,研究方向:药物分析。电话:0538-6229752, E-mail: yxqi@tsmc.edu.cn。

Alltech ELSD2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司), Empower 数据处理系统, 在线脱气系统; AR1140/C 型电子分析天平(美国 OHAUS 公司); KQ600DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), AP-01P VACUUM PUMP(天津 Autoscience 公司), 溶剂过滤器(天津 Autoscience 公司)。

1.2 试药 胆固醇对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 10007-200604); 天然牛黄分别购于济南、青岛、北京、上海、南京、河南、陕西和泰安地区, 经泰山医学院中药学教研室苏延友教授鉴定为牛科动物牛(*Bos taurus domesticus* Gmelin)的干燥胆结石, 符合《中华人民共和国药典》2010 年版一部的规定, 酶促牛黄(泰山医学院自制)。乙腈为色谱纯(天津永大公司); 异丙醇为色谱纯, 水为二次纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil 迪马 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μ m) 色谱柱; 流动相为乙腈: 异丙醇(1:1), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹。ELSD 检测器: 氮气流速 1.7 L $\cdot$ min⁻¹, 漂移管温度 67.5 $^{\circ}$ C。

2.2 对照品溶液的制备 准确称取胆固醇对照品 10 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。

2.3 供试品溶液的制备 称取天然牛黄和酶促牛黄样品各 10.0 mg, 分别置 5 mL 棕色量瓶中, 用适量无水乙醇稀释, 超声处理 10 min, 再用无水乙醇稀释至刻度、定容, 12 000 r $\cdot$ min⁻¹ ($r=5$ cm) 离心 5 min, 取上清液过筛孔内径 0.22 μ m 滤膜即得。

2.4 系统适用性实验 取空白溶剂、胆固醇对照品溶液和两种牛黄供试品溶液, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图见图 1。结果对照品和供试品中的胆固醇色谱峰分离完全, 峰型对称, 无拖尾现象。理论板数为 4 318。

2.5 标准曲线的制备 取胆固醇对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 5 个 5 mL 棕色量瓶中, 用无水乙醇分别稀释并定容。分别进样 3 次, 记录色谱图, 浓度对数 $\log C$ 与峰面积对数 $\log A$ 线性回归, 得回归方程为 $\log A = 1.541 2 \log C - 2.525$ ($r = 0.999 2$), 表明胆固醇浓度在 4.0 ~ 20.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.6 重复性实验 取浓度 12.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 胆固醇对照品溶液 20 μ L, 在上述色谱条件下进样, 重复 5 次, 测定其峰面积, 计算 RSD 为 1.24%, 结果表明进样的精密度良好。

2.7 稳定性实验 取常温条件下放置的酶促牛黄供

试品溶液 20 μ L, 按上述色谱条件分别在 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12 h 进样, 测定胆固醇峰面积。结果 RSD = 1.21% ($n=8$), 表明供试品溶液在常温条件下放置 12 h 稳定性良好。

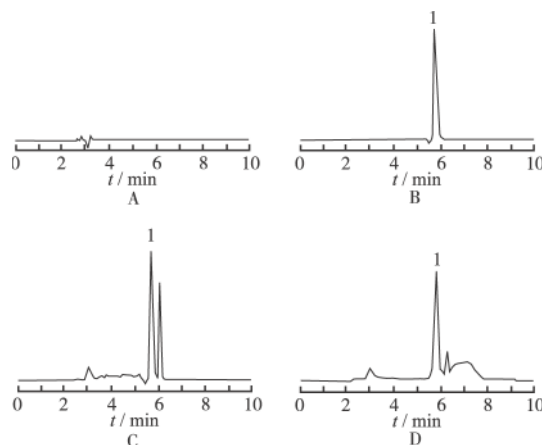


图1 溶剂甲醇(A)、胆固醇对照品(B)、天然牛黄(C)、酶促牛黄(D)的HPLC-ELSD色谱图

1. 胆固醇

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of blank solvent (A), reference substances (B), sample of natural calculus bovis (C) and sample of calculus bovis cultivated by glucuronidase (D)

1. cholesterol

2.8 中间精密度实验 精密称取同一批号酶促牛黄供试品 6 份, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定。结果胆固醇含量平均值为 4.78 μ g $\cdot$ mg⁻¹, RSD = 1.87% ($n=6$), 表明其中间精密度较好。

2.9 加样回收率实验 精密称取同一批次酶促牛黄共 9 份, 分为 3 组, 每组 3 份。3 组样品分别准确加入高、中、低 3 种不同已知含量的胆固醇对照品溶液, 按照“2.3”项下方法制成供试品溶液。取供试品溶液 20 μ L 进样, 每一样品重复 3 次, 测定胆固醇含量, 并计算回收率。结果见表 1。

2.10 样品胆固醇含量测定 取天然牛黄、酶促牛黄, 分别按照“2.3”项下方法制成供试品溶液。取供试品溶液 20 μ L 进样, 每一样品重复 3 次, 测定胆固醇含量, 结果见表 2。

3 讨论

牛黄(*Calculus Bovis*)为牛科动物牛(*Bos taurus domesticus* Gmelin)的干燥胆结石, 为名贵中药材, 具有极高的药用价值。在我国有上百种中成药以牛黄为原料, 需求量巨大。但天然牛黄的自然发生率 1% ~ 2%, 远不能满足中成药生产和临床的需要。因此, 牛

表 1 酶促牛黄中胆固醇的加样回收率

Tab. 1 Recovery of cholesterol in calculus bovis cultivated by glucuronidase

取样量 / mg	原有量	加入量 μg	测得量	回收率	平均回收率 %	RSD
9.89	47.27	35.00	81.54	97.91	98.41	0.63
10.12	48.37	35.00	82.75	98.22		
10.02	47.90	35.00	82.59	99.11		
10.05	48.04	45.00	92.19	98.11		
10.00	47.80	45.00	93.30	101.11	100.04	1.67
10.11	48.33	45.00	93.73	100.89		
10.08	48.18	55.00	101.48	96.91	96.46	1.03
9.90	47.32	55.00	99.74	95.31		
10.01	47.85	55.00	101.28	97.15		

表 2 样品胆固醇含量测定结果

Tab. 2 Results of cholesterol content determination of sample

		$\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \bar{x} \pm s \quad n=3$	
购买地	样品编号	天然牛黄	酶促牛黄
济南	2004-03	10.51±0.15	4.38±0.13
青岛	2004-05	6.69±0.17	5.43±0.11
泰安	2004-06	13.25±0.17	4.31±0.21
泰安	2004-08	18.01±0.20	6.92±0.20
河南	2004-10	6.12±0.16	5.46±0.19
北京	2004-12	53.02±0.45	6.24±0.15
上海	2005-02	35.26±0.25	8.23±0.21
南京	2005-05	80.01±0.72	4.98±0.18
陕西	2005-08	6.53±0.18	4.78±0.14
济南	2005-10	23.24±0.27	5.67±0.12

黄代用品的研究日益受到重视。酶促牛黄(calculus bovis cultivated by glucuronidase ,CBG) 是根据天然牛黄形成原理,以新鲜牛胆汁为原料,采用酶法制备的牛黄替代品^[6-8]。除胆红素^[9-10]和胆酸^[11]作为牛黄常规的质最控制指标而广泛测定外,其他成分的含最测定报道较少。人工牛黄配方中加有胆固醇,其量自然应以天然牛黄的含量为依据,而且现代实验药理学已充分证明牛黄本身就是一种复方,其效能和作用表现在多方面^[1],因此,准确测定牛黄中的胆固醇含量是有重要意义。

本实验考察了甲醇、甲醇-0.1% 醋酸、甲醇-水、乙腈、乙腈-异丙醇等多种流动相的组成及比例。结果表明,以乙腈-异丙醇(1:1)为流动相时,胆固醇与其他物质分离完全,保留时间适宜。实验中分别对提取方式、提取溶剂和提取时间进行了考察。分别采用回流法提取、索氏提取和超声提取法,结果表明超声提取法提取完全,本实验选用超声提取法。提取溶剂考察了正己烷、无水乙醇、甲醇三种溶剂,以无水乙醇较好,与文献报道一致。提取时间分别考察了 20、30、40 min,结果以 30 min 的提取率最高,因此选择 30 min。

表 2 样品含量测定结果表明,天然牛黄中胆固醇

的含量差异明显,提示胆固醇的含量与牛黄的产地和来源有关,不同区域的牛的饲料、生活环境等因素的变化可影响天然牛黄中胆固醇的含量,测定各地牛黄中胆固醇含量可为综合评价牛黄的化学成分提供依据。10 批酶促牛黄中胆固醇含量差别较小,说明酶促牛黄生产制备工艺稳定。但 10 批酶促牛黄与不同产地天然牛黄中胆固醇含量差别大,提示需要对酶促牛黄的生产工艺进一步考察和改进,使之更接近于天然牛黄。通过控制已知的主要有效成分,严格控制人工牛黄的原料来源和优化生产工艺,并结合其他成分和药理活性的比较研究,综合评价酶促牛黄替代天然牛黄的药用价值,从而为其替代天然牛黄发挥治疗效果奠定基础。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.12.029

[参考文献]

[1] 柳琪, 腾葳, 李坚. 西藏产天然牛黄中 19 种游离氨基酸的分析及药理作用[J]. 基层中药杂志, 1996, 10(4): 39-40.

[2] 张启明, 严克东, 钱丽华. 气相色谱法测定牛黄中胆固醇的含量[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(7): 426-427.

[3] 陈晓楠, 黄明刚, 宋航, 等. CHOD-PAD 法测定蛋黄磷脂中胆固醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 729-730.

[4] 孙会敏, 岳志华, 田颂九, 等. 傅立叶变换-衰减全反射红外光谱(FTIR-ATR)法对人体胆结石中胆固醇和胆红素地定量分析研究[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 769-770.

[5] 高允生, 齐永秀, 姜隆梅, 等. 反相高效液相色谱法快速测定鹌鹑蛋黄胆固醇含量[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 72-73.

[6] 周广礼, 朱长义, 张丰雪. 以大肠埃希菌 β-葡萄糖醛酸酶培育牛黄实验研究[J]. 泰山医学院学报, 1991, 12(1): 13-14.

[7] 周和亭, 刘化侠, 高允生, 等. 酶育牛黄的制备方法[P].

- 中国专利 CN101474209 2009-07-08.
- [8] 高允生,李珂,陈燕妮,等.酶促牛黄对小鼠的镇静催眠和缺氧保护作用[J].中国医院药学杂志 2010 30(10): 846-847.
- [9] 李珂,齐永秀,高允生,等.酶促牛黄与天然牛黄 HPLC 指纹图谱比较研究[J].中成药 2011 33(1):1-5.
- [10] 李珂,齐永秀,高允生,等.HPLC 法测定 3 种牛黄中胆红素的含量[J].今日药学杂志 2010 20(3):17-18.
- [11] 李珂,王唯红,齐永秀,等.6 种胆酸类成分的 HPLC-ELSD 测定法及在两种牛黄中的含量比较[J].中国药理学杂志 2010 45(8):626-627.

硼酸溶液细菌内毒素检查干扰实验

何进¹,史国兵¹,高军¹,李俊莹²

(1. 沈阳军区总医院药剂科,110840; 2. 大连医科大学临床药学系,116027)

[摘要] 目的 建立硼酸溶液细菌内毒素检查方法。方法 按《中华人民共和国药典》2010 年版附录细菌内毒素检查法,分别进行了鲎试剂灵敏度复核实验、细菌内毒素干扰实验预实验及正式实验。结果 硼酸溶液稀释 4 倍后,用灵敏度为 0.125 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂进行检查,可消除抑制干扰。结论 该方法简便可靠,可用于硼酸溶液细菌内毒素的检查。

[关键词] 硼酸溶液;细菌内毒素;干扰实验

[中图分类号] R979.7; R927.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)12-1636-03

Interference Test of Checking Bacterial Endotoxin in Boric Acid Solution

HE Jin¹, SHI Guo-bing¹, GAO Jun¹, LI Jun-ying² (1. Department of Pharmacy the General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110840, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for checking bacterial endotoxin in solution of boric acid. **Methods** The method was based on the bacterial endotoxin test described in the appendix of Chinese Pharmacopeia 2010 including the sensitivity of tachypleus amebocyte lysate (TAL), preliminary interference test and official interference test of bacterial endotoxin. **Results** The interference was eliminated by using 0.125 EU·mL⁻¹ TAL in boric acid solution being diluted by 4 times. **Conclusion** The method is simple and reliable, which can be used for checking bacterial endotoxin in boric acid solution.

KEY WORDS Boric acid solution; Bacterial endotoxin; Interference test

硼酸溶液为沈阳军区总医院配制的外用冲洗剂,主要用于眼、尿道、黏膜等冲洗或口腔含漱。根据《中华人民共和国药典》2010 年版对冲洗剂的相关规定^[1],硼酸溶液应进行细菌内毒素检查或热原检查。由于热原检查法中家兔影响因素较多,加之操作繁杂费时,不太适合医院制剂快速检查的需求。因此笔者按照《中华人民共和国药典》2010 年版细菌内毒素检查方法的规定及相关要求^[1-3],对硼酸溶液采用凝胶法细菌内毒素检查的可行性进行探讨。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 XW-80A 漩涡混和器(上海医科大学仪器厂);S648 电热恒温水温箱(上海医疗器械七厂);试管、吸管等所需器皿均经 250℃ 干烤 1 h 除去外源性

内毒素。

1.2 试剂 硼酸溶液(沈阳军区总医院,批号:20100805,20100810,20100825);鲎试剂(TAL,规格:每支 0.1 mL,广东湛江安度斯生物有限公司,λ 为 0.5 EU·mL⁻¹,批号:0903022,λ 为 0.125 EU·mL⁻¹,批号:1005262;厦门鲎试剂厂,λ 为 0.5 EU·mL⁻¹,批号:090106,λ 为 0.125 EU·mL⁻¹,批号:090811);细菌内毒素工作标准品(CSE,效价:每支 120 EU,广东湛江安度斯生物有限公司,批号:150601-201069);细菌内毒素检查用水(BET 水,规格:每支 5 mL,广东湛江安度斯生物有限公司,批号:0803120)。

2 方法与结果

2.1 TAL 灵敏度复核 按《中华人民共和国药典》2010 年版细菌内毒素检查法^[2]进行操作,实验表明两个生产厂家的鲎试剂,灵敏度 λ_c 在 0.5~2.0λ 之间,符合规定。结果见表 1 2。

[收稿日期] 2011-05-04 **[修回日期]** 2011-06-18

[作者简介] 何进(1958-),女,辽宁沈阳人,主任药师,硕士,研究方向:药物制剂研究与分析。电话:024-28851432, E-mail: Hejin127@sina.com。