

西黄丸定性定量方法的研究

郑新元 张茉 王杰 吕曙华

(天津市药品检验所 天津 300070)

摘要 目的:提高、完善西黄丸的质量标准。方法:建立处方中乳香、没药的薄层色谱鉴别方法;采用 HPLC-ELSD 法检查处方中猪去氧胆酸,使用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱,以乙腈-0.5% 甲酸(38:62)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 35 °C,Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器(漂移管温度为 90 °C,气体流量 2 L · min⁻¹);采用 HPLC 法测定牛黄(体外培育牛黄)中胆红素的含量,使用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm),以乙腈-1% 醋酸溶液(95:5)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长为 450 nm,柱温 40 °C。结果:薄层色谱斑点清晰,专属性强;HPLC-ELSD 检查方法方便、快捷,专属性强;HPLC 方法学考察结果表明胆红素浓度在 0.0046 ~ 0.1145 mg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r = 0.9993$);平均加样回收率($n = 6$)为 100.6% (RSD = 1.8%)。结论:建立的方法简便、准确,重复性好,可作为西黄丸的定性定量方法。

关键词: 中成药;西黄丸;乳香;没药;猪去氧胆酸;胆红素;蒸发光散射检测;高效液相色谱法;薄层色谱;含量测定

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0254-1793(2011)07-1410-04

Study of qualitative and quantitative methods for Xihuang pills

ZHENG Xin-yuan, ZHANG Mo, WANG Jie, LÜ Shu-hua

(Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To enhance and consummate the quality standard of Xihuang pills. **Methods:** Frankincense, myrrh were identified by TLC. Hyodeoxycholic acid in prescription was checked by HPLC-ELSD; The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.5% formic acid (38:62) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and column temperature was 35 °C; The flow rate of N₂ in ELSD was 2 L · min⁻¹, and the temperature of drift tube was 90 °C. The contents of bilirubin in bezoar (cultured ox gallstone) were determined by HPLC; The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-1% acetic acid (95:5) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detecting wavelength was 450 nm, and column temperature was 40 °C. **Results:** The TLC identification was highly specific and spots were clear. The HPLC-ELSD check-up method was convenient and specific. The bilirubin showed a good linear relationship at a range of 0.0046-0.1145 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9993$), and the average recovery ($n = 6$) was 100.6% with RSD of 1.8%. **Conclusion:** The method established is accurate, simple and reproducible, and can be used for the study of quality and quantity for Xihuang pills.

Key words: Chinese patent medicine; Xihuang pills; frankincense; myrrh; hyodeoxycholic acid; bilirubin; ELSD; HPLC; TLC; assay

西黄丸是多家药厂生产的品种,其质量标准收载于卫生部药品标准中药成方制剂第9册,由牛黄、麝香、乳香、没药组成,具有清热解毒、和营消肿的功效。现行质量标准只有显微鉴别及化学鉴别,难以有效控制其内在质量。本实验在原标准基础上,删去了原标准中专属性不强的化学鉴别方法,增加了处方中乳香、没药的薄层色谱鉴别方法,猪去氧胆酸的 HPLC-

ELSD 检查方法及胆红素的 HPLC 含量测定方法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪,紫外检测器,蒸发光散射检测器(Alltech 2000ES)。

对照药材乳香(批号:120970-200403)、没药(天然没药)(批号:121250-200302)、对照品胆红素(供含量测定用,批号 100077-200604)、猪去氧

胆酸(供含量测定用,批号 100087-200610)均由中国药品生物制品检定所提供;硅胶 G 板购自青岛海洋化工厂;乙腈、甲醇为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);水为重蒸水;其他试剂为分析纯。西黄丸样品:中新药业集团乐仁堂制药厂,批号 B112011;济南宏济堂制药有限责任公司,批号 0803001 0804001;武汉健民大鹏药业有限公司,批号 070801 080401 080501。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 取西黄丸 1 g,研细,加甲醇 10 mL,超声处理 10 min,滤过,滤液作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备 分别取对照药材乳香、没药(天然没药)各 0.1 g,加甲醇 5 mL,超声处理 10 min,滤过,滤液作为对照药材溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按照处方配比,分别取除乳香与没药(天然没药)的其他药味,按处方中【制法】项下方法制得样品,按照“2.1.1”供试品溶液的制备方法分别制成乳香与没药(天然没药)的阴性对照溶液。

2.1.4 薄层鉴别方法及结果 吸取供试品溶液、对照药材溶液及阴性对照溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂)上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(95:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,放置 10 min 以上。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性样品无干扰。见图 1。

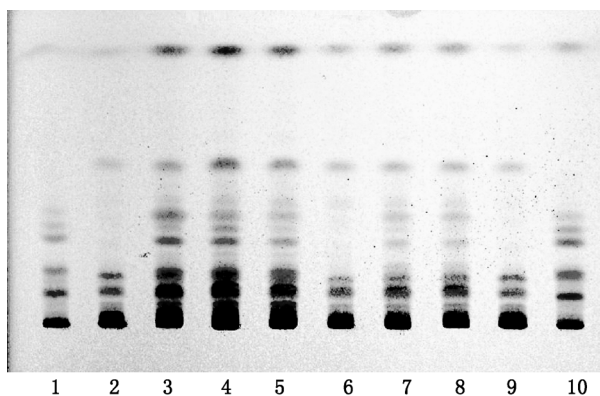


图 1 乳香、没药薄层色谱图

Fig 1 Thin layer chromatogram of frankincense and myrrh

1. 乳香阴性(negative sample without frankincense) 2. 没药阴性(negative sample without myrrh) 3~8. 样品(test samples, Lot No.: B112011 0803001 0804001 070801 080401 080501) 9. 乳香对照药材(reference crude drug of frankincense) 10. 没药对照药材(reference crude drug of myrrh)

2.2 猪去氧胆酸的检查项

2.2.1 对照品溶液的制备 取猪去氧胆酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含猪去氧胆酸 0.2 mg 的溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取西黄丸 2 g,研细,加甲醇 40 mL,超声处理 40 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 10 mL 使溶解,即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μ m) 色谱柱,以乙腈-0.5% 甲酸(38:62)为流动相,流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温 35 $^{\circ}$ C;蒸发光散射检测器漂移管温度为 90 $^{\circ}$ C,气体流量 2 L $\cdot$ min⁻¹。理论板数按猪去氧胆酸峰计算不得低于 4000。

2.2.4 专属性试验 按照处方配比,取除牛黄(体外培育牛黄)的其他药味,按处方中【制法】项下方法制得样品,按照“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。分别取阴性样品溶液、对照品溶液、供试品溶液各 10 μ L 进样测定。结果表明,在“2.2.3”项色谱条件下,阴性样品对测定无干扰,图 2-B 中保留时间为 21.165 min 的色谱峰,经验证为牛黄(体外培育牛黄)的胆酸成分。见图 2。

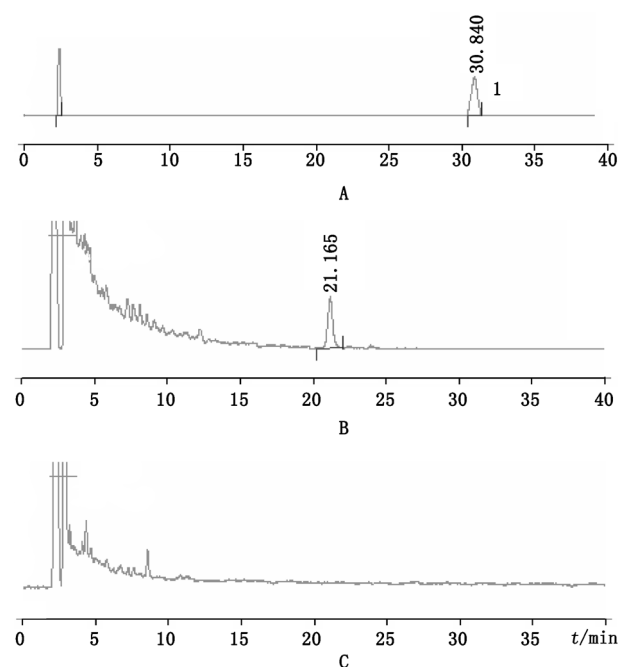


图 2 猪去氧胆酸对照品(A)、样品(B)、缺牛黄阴性样品(C) HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of hyodeoxycholic acid(A), sample(B), sample without bezoar(C)

1. 猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid)

2.2.5 检出限 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 2 mL 置 10、25、50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得供检出限测定用系列对照品溶液。按照“2.2.3”项下色谱条件精密吸取上述对照品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,测定。结果表明猪去氧胆酸对照品在 $0.016 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,信噪比约为 3:1。因此确定该方法测得猪去氧胆酸检出限为 $0.16 \mu\text{g}$ 。

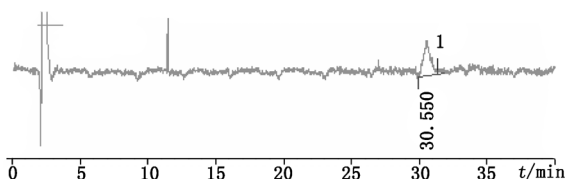


图3 检出限色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of detection limit

1. 猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid)

2.3 胆红素的测定

2.3.1 对照品溶液的制备 取胆红素对照品适量,精密称定,加三氯甲烷制成每 1 mL 含 $20 \mu\text{g}$ 的溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取西黄丸适量,研细,取约 0.2 g,精密称定,精密加入[三氯甲烷-甲醇(3:1)]-磷酸(100:0.18) 25 mL,称定重量,超声处理(功率 200,频率 40 kHz) 15 min,放冷,再称定重量,用[三氯甲烷-甲醇(3:1)]-磷酸(100:0.18)补足减失的重量,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX SB C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μm) 色谱柱,以乙腈-1%醋酸溶液(95:5)为流动相,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 450 nm,柱温 40°C ,进样 $5 \mu\text{L}$ 。理论板数按胆红素色谱峰计为 3500,分离度符合规定。

2.3.4 专属性试验 按处方配比,去除牛黄(体外培育牛黄)外的各味药材,按处方中【制法】项下方法制得样品,再按“2.3.2”项下方法制得阴性样品溶液。取阴性样品溶液、对照品溶液和供试品溶液各 $5 \mu\text{L}$ 进样测定。结果表明在上述色谱条件下,阴性样品无干扰。见图 4。

2.3.5 线性关系考察 取胆红素对照品适量,精密称定,加三氯甲烷制成每 1 mL 含 0.1145 mg 的溶液,精密吸取此溶液 1、2、5、10、25 mL,置 25 mL 量瓶中,加三氯甲烷至刻度,制得系列浓度对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 $5 \mu\text{L}$,按“2.3.3”项下色谱条件注入液相色谱仪,测定各自峰面积,以对照品浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积值为纵坐标,求得回归方程为:

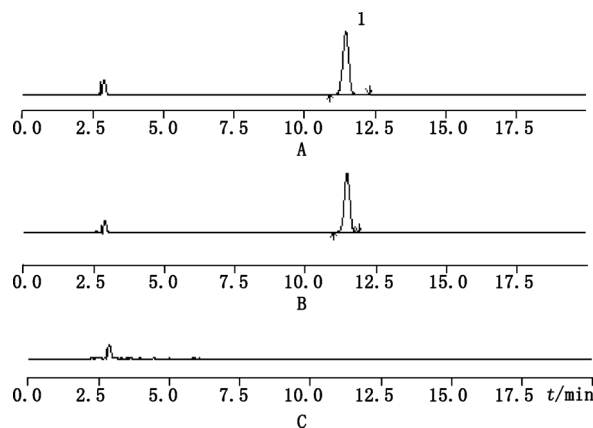


图4 胆红素对照品(A)、样品(B)、缺牛黄阴性样品(C)色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample(B), sample without bezoar(C)

1. 胆红素(bilirubin)

$$Y = 2.780 \times 10^7 X - 9.752 \times 10^4 \quad r = 0.9993$$

结果表明胆红素在 $0.0229 \sim 0.5725 \mu\text{g}$ 范围内线性良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批号(乐仁堂,批号 B12011)样品,研细,取约 0.2 g,共 6 份,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件分析,测定每份样品中胆红素含量。结果样品中胆红素平均含量为 $2.517 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 2.0%。

2.3.7 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(乐仁堂,批号 B12011),按“2.3.3”项下色谱条件分析,连续进样 6 次,结果胆红素峰面积的 RSD 为 0.3%。

2.3.8 稳定性试验 取同一批号(乐仁堂,批号 B12011)样品,研细,取约 0.2 g,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、9、12 h 进样 $5 \mu\text{L}$,测定样品中胆红素峰面积。结果峰面积值的 RSD 为 1.9%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.9 回收率试验 取同一批号(乐仁堂,批号 B12011)样品,研细,取约 0.1 g,共 6 份,精密称定,精密加入 $10.13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 25 mL,按照“2.3.2”项下方法制备溶液,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果平均回收率($n=6$)为 100.6%,RSD 为 1.8%,符合规定。

2.3.10 样品测定 取不同厂家 6 个批号的样品,分别按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,按外标法计算样品中胆红素含量。结果见表 1。

表1 样品中胆红素含量测定结果
Tab 1 Content of bilirubin in samples

批号(Lot No.)	含量(content) /mg · g ⁻¹
0803001	2.36
0804001	2.43
B112011	2.52
070801	2.32
080401	1.68
080501	2.23

3 讨论

3.1 薄层鉴别的耐用性试验 实验中对乳香、没药的薄层鉴别方法,考察了不同品牌的薄层板(青岛海洋化工厂、烟台市化学工业研究所、Merck 公司)、不同温度(室温与 4℃)和湿度(30%与 75%)的影响。结果表明样品在不同品牌的薄层板、不同温度和湿度的情况下均能达到良好的分离效果,检测结果基本一致。

3.2 不同牛黄之间的区别 通过对人工牛黄、牛黄、体外培育牛黄、培植牛黄的质量标准研究^[1]发现,人工牛黄中胆红素含量仅为 0.63%,而牛黄、培植牛黄和体外培育牛黄中胆红素含量为 35.0%;同时在人工牛黄中含有猪去氧胆酸,而在牛黄和体外培育牛黄中不含有猪去氧胆酸;这两点是人工牛黄和牛黄、体外培育牛黄的根本性区别。为此,建立了处方中猪去氧胆酸的检查项和胆红素的含量测定项。

3.3 猪去氧胆酸检查方法的建立 曾试验使用乙醚脱脂及酸碱加热水解的前处理办法^{[1]162},使用不同的显色剂及采取不同的检视方式,以期达到去除干扰并纯化供试品溶液的目的,但终因供试品溶液本底颜色太深,影响猪去氧胆酸在薄层色谱中的结果判定。通过大量试验^[2],最后利用 HPLC 的高分离能力,建立了前处理简单、快捷且灵敏度高、专属性强的 HPLC-ELSD 检查方法。

3.4 胆红素含量测定中流动相的选择 天然的胆红素在提取分离过程中受酸碱的影响,双吡咯环产生异构化,即产生胆红素Ⅲa、Ⅸa、和 XⅢa3 种异构体,胆红素Ⅸa 是天然产物的原型物,由于试验条件的不同,导致牛黄(体外培育牛黄)中胆红素异构体相对含量不同,目前仍未清楚其有效成分是哪一种

异构体产生。实验中曾选择不同比例的乙腈-二甲亚砜-0.1 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液(pH 4.6)作为流动相,分离得到 3 个色谱峰,经文献查阅^[3,4],此 3 个峰互为同分异构体;选择甲醇-三氯甲烷-0.1% 磷酸溶液为流动相时,重现性较差;经多次摸索试验,建立了以乙腈-1% 醋酸溶液(95:5)为流动相的测定方法。

3.5 胆红素含量测定中供试品溶液制备方法的摸索 由于胆红素对光、热、酸碱都不稳定,因此在实验过程中对不同提取溶剂[氯仿、氯仿-甲醇(4:1)、氯仿-甲醇(3:1)、氯仿-甲醇(3:2)、甲醇]、提取方式(加热回流、超声处理)、提取溶剂酸度[磷酸体积百分比:0.06%、0.18%、0.3%]、提取溶剂用量(15、25、50 mL)和提取时间(10、15、20、30 min)均进行了考察研究,并且整个实验过程都采取避光操作的方式进行。

3.6 胆红素含量测定中耐用性试验 分别采用 3 种品牌的色谱柱 Diamonsil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、ZORBAX SB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Sepax Sapphire C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)对样品进行测定。结果表明,不同品牌的色谱柱对本含量测定方法基本无影响。

参考文献

- 1 ChP(中国药典).2010. Vol I (一部):5
- 2 WANG Shou-qing(王守箴). HPLC-ELSD Determination of Content of Ursodeoxycholic acid in Shuangdan Suppository for Hemorrhoids (HPLC-ELSD 测定双胆痔栓中熊去氧胆酸含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2005 25(6):722
- 3 YUE Zhi-hua(岳志华),SUN Hui-min(孙会敏),TIAN Song-jiu(田颂九),et al. Study on Simultaneous Quantitative Determination of Cholesterol, Bilirubin and Various Cholic Acids in Human Gallstones by HPLC-ELSD-UV (HPLC-ELSD-UV 法同时测定人体胆结石中胆固醇、胆红素及各种胆酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2004 24(3):310
- 4 JI Sheng-li(姬胜利),ZHANG Tian-min(张天民). Determination of bilirubin isomers in products obtained by different methods and their antioxidant activity(不同工艺胆红素异构体的测定及抗氧化性). *Acta Acad Med Shandong*(山东医科大学学报),1992 30(4):335

(本文于 2011 年 4 月 12 日修改回)