

HPLC-ELSD法同时测定牛胆粉中 3种胆酸类成分的含量

魏锋¹, 钟敏², 尼加提³, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所中药室, 北京 100050 2 深圳市药品检验所, 深圳 518029

3 新疆喀什地区药品检验所中药室, 喀什 844000)

摘要 目的: 建立 HPLC-ELSD 同时测定动物类药材牛胆粉中胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠 3 种成分含量的方法。方法: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相采用乙腈-0.2% 甲酸进行梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 采用蒸发光散射检测器检测。结果: 胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠的线性范围分别为 0.45~4.48, 0.21~4.18, 0.23~4.56 μg, 加样回收率 ($n=9$) 分别为 96.39%, 96.78%, 97.37%。结论: 本方法简便、灵敏、准确, 可用于牛胆粉药材中胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠 3 种成分的含量测定。

关键词: 牛胆粉; HPLC-ELSD; 胆酸; 去氧胆酸; 牛黄胆酸钠; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0021-04

HPLC-ELSD determination of three cholic acid derivatives in N iudan powder

WE I Feng¹, ZHONG M in², NI Jia- ti³, LIN Rui- chao¹

(1. Division of Chinese Materia Medica and Natural Products, National Institute for the Control of Pharmaceutical and

Biological Products, Beijing 100050, China 2 Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518029, China

3 Xinjiang Kashi Institute for Drug Control, Kashi 844000, China)

Abstract Objective To develop an HPLC-ELSD method for simultaneous determination of cholic acid, deoxycholic acid and sodium taurocholate in N iudan powder (from *Bos Taurus domesticus* Gemelin). **Methods** An Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was applied, a gradient elution solvent system composing of acetonitrile and 0.2% formic acid was used as the mobile phase, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. An ELSD was applied as detector. **Results** The results were obtained that quantitative linear ranges of three components were 0.45~4.48, 0.21~4.18, 0.23~4.56 μg respectively, and the average recoveries ($n=9$) were 96.39%, 96.78%, and 97.37% respectively. **Conclusion** A specific, sensitive, simple and reproducible HPLC-ELSD method has been established for simultaneous determination of the three cholic acid derivatives in N iudan powder.

Key words N iudan powder; HPLC-ELSD; cholic acid; deoxycholic acid; sodium taurocholate; quantitative determination

牛胆粉为牛科动物牛 (*Bos Taurus domesticus* Gemelin) 的干燥胆汁粉末。具有清肝明目、利胆通肠、解毒消肿的功效, 临床多用于治疗风热目疾、黄疸、便秘、消渴、小儿惊风、痈肿疮毒等症。

胆汁类药材常见的有猪胆汁、羊胆汁、蛇胆汁、牛胆汁、熊胆等, 其中主要含有胆汁酸类和胆汁酸的盐类等成分, 它们均为以胆固醇为原料在动物肝脏中合成的胆酸类成分, 常见的有胆酸

(cholic acid)、去氧胆酸 (deoxycholic acid)、猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid)、鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)、熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid) 以及牛黄胆酸钠 (sodium taurocholate) 等成分, 这些成分目前被认为是胆汁类药材的主要有效成分。因此, 对这些成分的含量测定对于其药理作用、临床疗效、合理用药、制剂质量控制等均具有重要的意义。胆酸类成分的含量测定方法文献报

道较多的有比色法^[1]、薄层扫描法^[2~4]和高效液相色谱法^[5~8]。其中薄层扫描法报道最多,如中国药典 2005 年版一部所收载牛黄药材中胆酸的含量测定即用薄层扫描法。这些方法大多报道从成药制剂中测定 1 种或多种胆酸类成分的含量,很少有牛胆粉中胆酸类成分的含量测定。还有学者研究比较了药材天然牛黄和人工牛黄在胆酸类成分方面的区别^[9],但所用的色谱条件不够理想,色谱分离度较低,因此可能导致含量测定的结果不够准确。另外,胆酸类成分因其紫外光谱吸收很弱,用紫外检测器进行高效液相色谱测定时很难达到理想的效果。蒸发光散射检测有利于对在紫外检测下没有吸收的小分子成分进行测定,而胆酸类成分利用蒸发光散射方式可以有效地得到检测。为了更好地评价和控制药品的质量,建立更加高效准确的分析检测方法,本文建立了利用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)同时测定牛胆粉中胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠 3 种成分的含量测定方法,并取得了满意的效果。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 2690 高效液相色谱仪, Alltech ELSD 2000ES 蒸发光散射检测器。对照品胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠均由中国药品生物制品检定所提供。实验所用甲醇和乙腈均为色谱纯,其他溶剂为分析纯,水为纯净水,过 Millipore 0.22 μm 滤膜。牛胆粉(经中国药品生物制品检定所标本馆张继副研究员鉴定)样品共 3 份,均购自河北省安国药材市场。

2 溶液的制备

2.1 对照品储备液 分别精密称取对照品胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠适量,加甲醇分别配制成浓度为 $0.2288 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.2096 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.2280 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,作为对照品储备液。

2.2 供试品溶液 分别取样品细粉 0.1 g 精密称定,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,超声(功率 120 W,频率 45 kHz)处理 30 min 放至室温,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,即得。

3 色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;流动相由流动相 A(0.2% 甲酸)和流动相 B(乙腈)按以下梯度进行洗脱:初始状态为 20% 流动相 B,0~45 min 内流动相 B 增

至 80%,45~50 min 内流动相 B 降至 20%;流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;蒸发光散射检测器检测,氮气流速 $2.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,漂移管温度 110 $^{\circ}\text{C}$;理论塔板数按胆酸计算不低于 2000。色谱图见图 1。

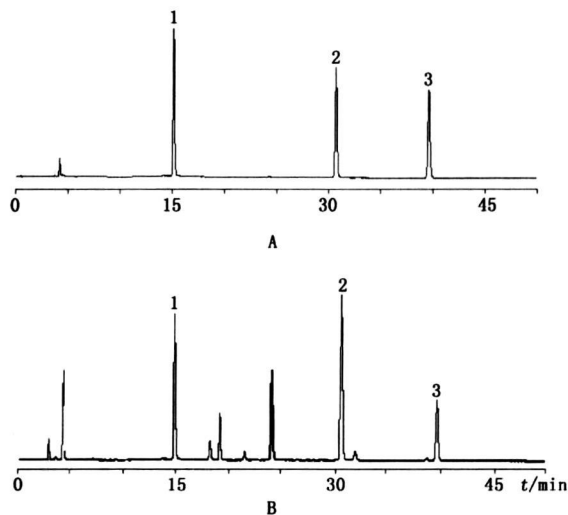


图 1 对照品(A)和样品(B)色谱图

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

1. 牛黄胆酸钠(sodium taurocholate) 2. 胆酸(cholic acid) 3. 去氧胆酸(deoxycholic acid)

4 方法与结果

4.1 线性关系考察 分别对“2.1”项下对照品储备液进行不同比例的稀释,制得系列浓度(5个浓度)的对照品溶液。精密吸取各级对照品溶液 10 μL 分别注入液相色谱仪,测定峰面积。以峰面积的常用对数值 Y 为纵坐标,进样量(μg)的常用对数值 X 为横坐标,计算其回归方程。结果表明胆酸、去氧胆酸、牛黄胆酸钠进样量分别在 0.45~4.48, 0.21~4.18, 0.23~4.56 μg 范围内线性关系良好,回归方程分别为:

$$Y = 2.037 \times 10^4 X - 1.385 \times 10^3 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2.239 \times 10^4 X - 1.455 \times 10^3 \quad r = 0.9991$$

$$Y = 1.787 \times 10^4 X - 2.305 \times 10^3 \quad r = 0.9993$$

4.2 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL ,每隔 2 h 进样 1 次,共 6 次,测定峰面积。结果胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠峰面积的 RSD 分别为 0.82%, 1.1%, 1.1%,表明 10 h 内测定结果稳定。

4.3 精密度试验 分别精密吸取对照品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积,结果胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠的 RSD($n=5$)分别为 0.86%, 1.0%, 0.92%,表明仪器精密度良好。

4.4 最低检测限和定量限 以信噪比 3:1 为标准测得胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠的最低检测限分

别为 0.03 0.05 0.04 μg 以信噪比 10:1 时的进样量作为定量限, 则胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠的定量限分别为 0.13 0.15 0.12 μg 。

4.5 重复性试验 取同一样品 5 份, 按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液, 进样测定。结果胆酸、去氧胆酸和牛黄胆酸钠含量平均值分别为 15.8 8.79 10.9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.0%, 0.92%, 1.0%, 表明本法重复性良好。

4.6 回收率试验 分别精密称取已知含量(胆酸 15.8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 去氧胆酸 8.79 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 牛黄胆酸钠 10.9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的样品 0.05 g 共 9 份, 每 3 份为 1 组, 按高、中、低 3 个水平分别精密加入一定量对照品(胆酸 1.0 0.5 0.2 mg 去氧胆酸 1.6 0.8 0.4 mg 牛黄胆酸钠 1.0 0.5 0.2 mg), 按“2.2”项下方法操作, 制备所需溶液, 进行测定。结果胆酸高、中、低 3 个浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 97.59% (RSD = 1.1%), 96.42% (RSD = 1.3%), 95.19% (RSD = 1.8%), 平均回收率 ($n=9$) 为 96.36%; 去氧胆酸高、中、低 3 个浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 97.86% (RSD = 1.2%), 96.81% (RSD = 1.5%), 95.70% (RSD = 1.1%), 平均回收率 ($n=9$) 为 96.78%; 牛黄胆酸钠高、中、低 3 个浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 98.53% (RSD = 1.6%), 97.32% (RSD = 1.3%), 96.26% (RSD = 1.7%), 平均回收率 ($n=9$) 为 97.37%。结果表明, 以本法同时测定 3 种胆酸类成分, 其回收率结果良好。

4.7 样品测定 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪进行测定, 进样 3 次取峰面积的平均值, 根据回归方程计算含量。3 批牛胆粉样品的测定结果见表 1。

表 1 不同样品中 3 种胆酸类成分的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 1 The content of 3 cholic acids components in different batches

样品编号 (sample No.)	胆酸 (cholic acid)	去氧胆酸 (deoxycholic acid)	牛黄胆酸钠 (sodium taurocholate)
1	15.8	8.84	11.0
2	17.0	9.98	11.3
3	16.1	7.82	12.1

5 讨论

5.1 流动相的选择 由于胆酸类成分显弱酸性, 因此流动相溶液中加入少量的酸能大大改善被测成分的色谱保留行为。另外, 考虑到所使用的蒸发光散射检测器的特点, 流动相溶液中不适宜使用难挥发

的酸或缓冲盐。本实验分别尝试选择不同浓度 (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 1.0%) 的甲酸溶液为流动相的组成部分, 并进行了梯度洗脱, 实验表明采用 0.2% 的甲酸溶液按本文的梯度洗脱程序分离和分析效果最为理想。

5.2 检测器和检测条件的选择 由于胆酸类成分的紫外光谱吸收很弱, 因此 HPLC 测定用紫外检测器精确度不高, 蒸发光散射检测适合对在紫外检测下吸收弱或没有吸收的小分子成分进行测定。本文选择了蒸发光散射检测器, 测定效果较好。同时, 本实验对蒸发光散射检测器的检测条件 (如氮气流速、漂移管温度) 进行了优化研究, 发现氮气流速为 2.0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 漂移管温度为 110 $^{\circ}\text{C}$ 较为理想。

5.3 提取方法的选择 参考有关文献报道^[2], 结合胆酸类成分的性质和样品本身的特点, 比较了超声提取和回流提取, 结果表明二者提取效率接近, 但超声提取方法简单, 容易操作, 因此选择超声提取; 在提取溶剂方面, 考察了甲醇、乙醇、70% 甲醇、50% 甲醇和 70% 乙醇, 结果以甲醇提取效率最高, 因此选择甲醇作为提取溶剂; 进一步对甲醇的用量和不同提取时间也进行了考察, 结果发现用 25 mL 甲醇超声 30 min 的提取方法较为简单, 且提取效果好。

5.4 方法的可用性 本实验旨在研究建立同时测定牛胆粉中 3 种胆酸类成分的方法, 从而为制定该类产品的质量 标准提供依据。从测定结果可以看出, 所检测 3 个批次的牛胆粉中 3 种胆酸类成分的含量基本一致。另外, 含量测定方法学实验结果表明, 本法操作简单, 测定结果准确, 重复性好, 可用于牛胆粉中 3 种胆酸类成分的含量测定和该类药材的质量控制。

参考文献

- 1 LIAO Yue-jing(月镜), LU Hui-ying(卢惠英). Content determination of cholic acid in Shedan oral liquid(snake galls) with spectrophotometry(分光光度法测定蛇胆糖浆口服液 中胆酸的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 1990, 12(8): 12
- 2 ZHANG Li-hua(张丽华), JIN Ying-lan(金英兰), CHE Jun(车军). TLC-scanning determination of cholic acid in the artificial Ni Huang(薄层扫描法测定人工牛黄中胆酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1993, 13(6): 402
- 3 WANG Jian-nong(王建农), LI Jian-qiang(李健强), YANG Jing-hong(杨景宏), et al. TLC-scanning determination of cholic acid in the Huguang tablets(薄层扫描法测定护肝片中胆酸的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 1994, 16(11): 17

- 4 LA I Dong-me (赖东美), YANG Y ing(杨颖), WENG Lu- na(翁鹭娜). TLC- scanning determination of cholic acid in the compound N iuhuang San(薄层扫描法测定复方牛黄散中胆酸的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2000, 22(5): 379
- 5 N I Kun- yi(倪坤仪), TU Shu- zi(屠树滋), HUANG Bin- xue(黄斌学). HPLC determination of cholic acid in the oral liquids of Shedan Chuanbei Ye(蛇胆川贝液中胆酸的 HPLC 测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1993, 13(1): 3
- 6 CAO Jin(曹进), XU Yan(徐燕), WANG Yi- ming(王义明), *et al* Three methods comparison for determination of cholic acid in injection of Q ingkailing(清开灵注射液中三种胆酸含量测定方法比较). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2003, 25(9): 705
- 7 YAN Shi- kai XN Wen- feng LUO Guo- an, *et al* Simultaneous determination of major bioactive components in Q ingkailing injection by high- performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53: 1392
- 8 YAN Shi- kai ZHANG Wei- dong LU Run- hui *et al* Chemical fingerprinting of Shex iang Baoxin pill and simultaneous determination of its major constituents by HPLC with evaporative light scattering detection and electrospray mass spectrometric detection. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54: 1058
- 9 YAN Shi- kai WU Yan- wen, LIU Run- hui *et al* Comparative study on major bioactive components in natural, artificial and in- vitro cultured calculus bovis. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55: 128

(本文于 2008 年 2 月 27 日收到)

中检所与 WHO 召开生物仿制药质量和临床评价卫星研讨会

WHO 官员 Ivana Knezevic 博士应中国药学会邀请参加第二届国际生物医药研讨会。会议期间 Ivana 博士作了大会报告并主持会议。另外根据 WHO 的安排, 2008 年 12 月 10 日与中国药品生物制品检定所召开了生物仿制药质量和临床评价 (Seminar on the Quality and Clinical Evaluation of Similar Biological Therapeutics) 卫星研讨会, 以此了解中国企业在生物技术治疗药物领域的研发、实例、经验以及 SFDA 相关技术评价的法规要求, 为 WHO 生物仿制药指导原则起草提供参考和帮助。

参加会议的 WHO 专家为 Ivana Knezevic 博士; 中方专家有中检所王军志副所长、生检处沈琦副处长、饶春明主任、高凯副主任、侯继峰副主任、周勇副研究员、梁成罡副研究员, SFDA 药品审评中心张培培副主任、卓宏研究员、王海学副研究员, 以及来自厦门特宝孙黎博士、长春金赛金磊博士、北京神州细胞谢良志博士、上海中信国健李晶博士、沈阳三生张皎娥博士、北京三元刘金毅博士等近 30 人参加了此次会议。

会议由王军志副所长和 Ivana Knezevic 博士共同主持。首先由 Ivana Knezevic 博士介绍了 WHO 生物仿制药指南的起草背景和各国专家讨论的热点问题。随后由王军志副所长、饶春明主任分别报告了我国生物仿制药现状、相关法规和 2005 版《中国药典》三部生物治疗产品的技术标准。之后 6 个中国生物技术治疗药物生产企业的代表分别介绍了各自产品研发和与国外原创产品的比对研究状况并进行了热烈讨论。

通过报告交流和讨论, Ivana Knezevic 博士表示对中国生物技术治疗药物的研究评价状况有了进一步的了解, 她认为中国在治疗性生物技术药物的研究开发主要还是以“Stand alone”加个别或部分对照研究的模式。虽然在审批中注意到已有国家标准的仿制药物与创新药物的区别, 在注册管理办法附录中有类似的简化条款的描述, 但尚没有独立的相关技术指导原则。同时她也认为中国已经积累了开发和审评的丰富经验, 并取得了很大成就, 也引起了 WHO 的关注。

这次会议是我国专家和企业代表与 WHO 的专家进行面对面交流的难得机会, 也使与会同仁更多了解到国际生物仿制药的进展, 更进一步认识到我国生物技术治疗药物未来所面临的严峻挑战。同时, 也使 WHO 在制订生物仿制药相关法规中听到了发展中国家专家和企业的声音, 这对于完善生物仿制药指南的制订并使其适用于发展中国家起到积极作用。

(中国药品生物制品检定所生检处、外事处供稿)