

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00522

高效液相色谱-蒸发光散射法测定 牛黄中多种有效成分含量及其质量相关性研究

刘 菁^{1,2} 金城^{*1} 孔维军^{1,3} 王海涛⁴ 龚千锋² 肖小河¹

¹(解放军中药研究所 解放军第 302 医院,北京 100039) ²(江西中医学院 药学院,南昌 330004)

³(成都中医药大学 药学院,成都 610075) ⁴(解放军第 306 医院,北京 100101)

摘 要 建立高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)同时快速测定牛黄中 7 种组分的含量的方法。色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ 柱,流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液,梯度洗脱,流速 1 mL/min;蒸发光散射检测器参数:漂移管温度 100 °C,载气(N₂)流速 1.9 L/min。在选定色谱条件下,胆固醇、各种胆汁酸及其钠盐峰形良好且能达到很好地分离。各组分色谱峰峰面积的对数与浓度的对数呈良好线形关系($r > 0.9972$);标准加入回收率为 98.8% ~ 112.7%;7 种组分的最低检出限为 0.001 ~ 0.007 g/L。本方法可简便、快速地同时检测不同牛黄样品中 7 种组分的含量并可表征不同牛黄样品的质量,从而为该名贵药材的质量控制提供更全面的依据和参考。

关键词 牛黄;高效液相色谱-蒸发光散射检测;多组分;同时测定

1 引 言

牛黄为牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin 的干燥胆结石^[1],其天然资源奇缺且价值昂贵,而代用品(培植牛黄、体外培育牛黄与人工牛黄)的价格和质量差异悬殊,必然导致疗效的巨大差异^[2,3]。为此,国家 SFDA 明确限定了天然牛黄及其代用品在调剂和制剂入药方面的使用范围^[4]。针对牛黄品种、质量的复杂性和多样性,有必要对这些样品建立实用和有效的质控方法。

《中国药典》(2005 版)规定,以薄层色谱法定性检验天然牛黄中胆酸、去氧胆酸和胆红素及人工牛黄中胆酸、猪去氧胆酸、牛磺酸等,定量测定的天然牛黄中胆酸不得少于 4.0%,紫外-可见分光光度法测得天然牛黄中的胆红素不得少于 35.0% 及人工牛黄中的含胆酸不得少于 13.0%,胆红素不得少于 0.63%^[1]。文献[5,6]报道,以其中一种或几种成分为指标来测定牛黄质量,而猪去氧胆酸作为牛黄中重要成分之一,却少见报道。因胆酸类成分无紫外吸收或者紫外吸收很弱,常用检测器很难同时反映所有组分的信息^[7],更难准确监测和控制其主要的药效组分。蒸发光散射检测器(Evaporative light scattering detector, ELSD)是一种通用型质量检测器,可分析不含共轭结构或无紫外吸收的物质,并能在多溶剂梯度的情况下获得稳定的基线和较低的噪音,也可在较快的分离速度下获得理想的分辨率^[8~15]。

本实验采用 HPLC-ELSD 同时测定牛黄中 7 种组分的含量,并以此 7 种组分含量为指标,对不同样品的质量进行比较和预测分析,为牛黄的质量控制提供参考,亦为名贵中药材化学有效成分的同时测定及生物评价和质量控制提供了一种模式。

2 实验部分

2.1 仪器与材料

1100 Series 高效液相色谱仪,配自动进样器及二极管阵列检测器(Agilent 公司);色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱(25 cm × 4.6 mm, 5 μm);Alltech-2000 型 ELSD 检测器(Alltech 公司)。乙腈为色谱纯(Fisher 公司);甲酸及其它试剂均为分析纯(北京化学分析公司)。

牛黄胆酸钠、胆酸、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸和胆固醇均购于中国药品生物制

2009-09-17 收稿;2009-12-07 接受

本文系科技重大专项“重大新药创新”(No. 2009ZXJ0904-057)资助

* E-mail: pijincheng@126.com

品检定所。天然牛黄:A(北京同仁堂药店),B(中国药材公司),C和F(中国药品生物制品检定所);人工牛黄:D(北京同仁堂药店),E(重庆格瑞林药业有限公司),以上药材均经解放军302医院肖小河研究员鉴定。

2.2 色谱条件

流动相:A为0.2%甲酸水溶液,B为乙腈;梯度洗脱程序:0 min,58% A,15.00 min,45% A,25.00 min,10% A。流速:1 mL/min;进样量:7 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C;ELSD检测器参数:漂移管温度:100 $^{\circ}$ C;载气(N_2)流速:1.9 L/min;不分流模式(Impact off)。

2.3 样品处理

分别精密称量A、B、D、E样品(0.1 \pm 0.005) g,C样品0.0105 g,F样品0.0434 g于25 mL容量瓶中,加入10 mL甲醇,超声30 min,离心,吸取上清液,如上重复3次,合并上清液,蒸干。残渣加甲醇溶解并转移至10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

3 结果与讨论

3.1 紫外全波长扫描

采用DAD检测器,对牛黄样品溶液在0~31.00 min及210~500 nm范围内做全波长扫描,结果发现,除溶剂峰外,样品溶液几乎没有紫外吸收,DAD检测器难以获得有效响应。因此,本实验选择蒸发光散射检测器进行含量测定。

3.2 ELSD测定条件优化

依据流动相的组成、流速及牛黄所含成分的性质,为了既保证流动相的充分挥发又不大幅损失灵敏度,测定本实验时选择了不分流模式。

漂移管温度和雾化气流速是影响ELSD检测性能的两个最重要参数^[14]。本实验比较了在不分流模式下,不同雾化气体流速(1.1,1.5,1.9,2.3,2.7和3.1 L/min)和漂移管温度(90,95,100,105,110和115 $^{\circ}$ C)条件下的信号响应。结果表明:随着雾化气体流速的增加,基线噪音增大,优选的雾化气流速为1.9 L/min。在该流速下,以温度对熊去氧胆酸的检出限(LOD)作图,由图1可以看出,随漂移管温度的升高,响应值降低;但当温度升到110 $^{\circ}$ C时,噪音明显增大,且基线飘移严重,导致检出限升高。通过计算最佳信噪比(S/N),选定最佳的漂移管温度为100 $^{\circ}$ C。

3.3 流动相的选择

由于胆酸类成分呈现弱酸性,因此,在流动相中加入少量的酸能明显改善被测成分的色谱保留行为。此外,考虑到所使用的蒸发光散射检测器的特点,流动相溶液中不宜使用难挥发的酸或缓冲盐。本实验考察了不同的酸溶液(甲酸、乙酸、三氟醋酸)分别与甲醇和乙腈组成流动相时,各组分的色谱分离行为,结果表明:采用0.2%甲酸溶液和乙腈按本实验的梯度洗脱程序时,各色谱峰分离和分析效果最为理想。

3.4 标准曲线

分别精密称取牛黄胆酸钠、胆酸、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸和胆固醇适量,用甲醇配制成浓度依次为44.8,60.8,75.7,62.0,61.2,62.4和62.0 mg/L的混合标准品母液,然后用甲醇稀释为6个浓度梯度的溶液,经0.45 μ m微孔滤膜过滤。每个浓度平行进样测定3次,以峰面积的常用对数值Y为纵坐标,进样量的常用对数值X为横坐标,绘制标准曲线,结果见表1。从表1可见,各组分在相应的进样量范围内线性关系良好。

3.5 方法学考察

采用在空白样品(D)溶液中添加标准品溶液的方法,得到的加样回收率,实验结果见表2。从表2可

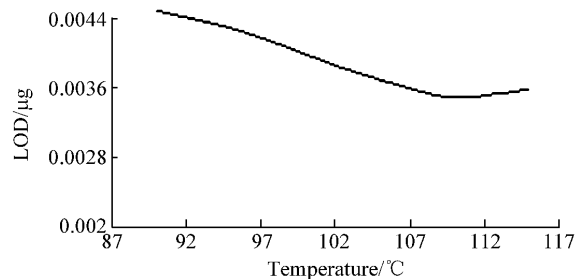


图1 漂移管温度对熊去氧胆酸检出限的影响

Fig. 1 Influence of drift tube temperature on limit of detection for ursodeoxycholic acid

表 1 各组分回归方程

Table 1 Regression equations of seven components

组分 Component	回归方程 Regression Equation	线性范围 Linear Range (mg/L)	相关系数 Correlation coefficient (r)	LOD (g/L)	LOQ (g/L)
牛黄胆酸钠 Sodium taurocholate	$Y = 1.284X + 6.120$	6.4 ~ 96	0.9975	0.001	0.005
胆酸 Cholic acid	$Y = 1.310X + 6.740$	8.7 ~ 96	0.9972	0.001	0.004
熊去氧胆酸 Ursodeoxycholic acid	$Y = 1.088X + 6.830$	22 ~ 347	0.9987	0.001	0.002
猪去氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	$Y = 1.405X + 6.52$	49 ~ 106	0.9974	0.002	0.005
鹅去氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	$Y = 1.406X + 6.76$	19 ~ 87	0.9975	0.003	0.008
去氧胆酸 Deoxycholic acid	$Y = 1.352X + 6.56$	59 ~ 107	0.9976	0.003	0.008
胆固醇 Cholesterol	$Y = 0.683X + 6.206$	44 ~ 2657	0.9981	0.007	0.022

见 7 个组分的平均回收率值在 98.8% ~ 112.7% 范围内, 相应的 RSD 值均小于 3%。取供试品 (D) 溶液, 连续进样 5 次, 考察仪器的精密性; 平行制备 5 份样品 (D), 考察方法的重复性; 另在 24 h 内, 间隔 2 h 进样测定样品 (D) 溶液, 考察样品在 24 h 内的稳定性, 实验结果显示, 各组分含量的 RSD 值均小于 3%。

表 2 各组分的加样回收率

Table 2 Average recoveries of seven components

组分 Component	样品含量 Original Content (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg, n = 9)	平均回收率 Average recovery (%, n = 9)	相对标准偏差 RSD (%)
牛黄胆酸钠 Sodium taurocholate	1.305	1.306	2.720	108.4	0.7
胆酸 Cholic acid	1.146	1.144	2.292	100.2	0.1
熊去氧胆酸 Ursodeoxycholic acid	-	1.242	1.241	100.0	0.1
猪去氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	1.512	1.510	3.213	112.7	0.9
鹅去氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	0.420	0.422	0.837	98.8	1.5
去氧胆酸 Deoxycholic acid	0.651	0.653	1.304	100.0	0.3
胆固醇 Cholesterol	0.402	0.404	0.805	99.7	0.4

3.6 样品中 7 种组分的含量测定及其质量评价

在优化的色谱条件下所得的混合标准品和样品的色谱图如图 2 所示。测得 6 批不同产地天然牛黄、不同厂家的人工牛黄样品中 7 种组分的含量见表 3。

表 3 牛黄样品中 7 个组分的含量测定结果 (n = 3)

Table 3 Contents of seven components in calculus bovis samples (n = 3)

样品 Sample	牛黄胆酸钠 Sodium taurocholate (mg/g)	胆酸 Cholic acid (mg/g)	熊去氧胆酸 Ursodeoxycholic acid (mg/g)	猪去氧胆酸 Hyodeoxycholic acid (mg/g)	鹅去氧胆酸 Chenodeoxycholic acid (mg/g)	去氧胆酸 Deoxycholic acid (mg/g)	胆固醇 Cholesterol (mg/g)
天然牛黄 Calculus Bovis	43.0	36.4	-	-	6.55	39.91	105.5
	3.64	3.46	0.20	-	14.54	3.69	722.5
	21.6	9.97	-	-	5.65	14.68	0.04
人工牛黄 Calculus Bovis Artifactual	43.1	37.9	-	50.0	13.85	21.53	13.3
	32.0	42.3	-	35.6	11.71	26.33	0.09
	74.0	41.8	-	67.6	16.50	61.35	51.5

由表 3 可知, 样品中鹅去氧胆酸的含量相对一致, 其次为胆酸、胆酸、牛黄胆酸钠、去氧胆酸、猪去氧胆酸, 含量差异较大的是胆固醇和熊去氧胆酸。表 3 表明, 天然牛黄与人工牛黄中的熊去氧胆酸含量很低甚至检测不到; 人工牛黄中牛黄胆酸钠、胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸的含量均明显高于天然牛黄; 而 3 批天然牛黄均不含猪去氧胆酸, 且主要成分胆酸的含量差异显著。这可能与牛黄的产地和来源有关, 不同区域的牛的生长环境和饲养条件导致内在质量差异较大的天然牛黄。3 批人工牛黄中, 牛磺胆酸钠、猪去氧胆酸、胆固醇等成分的含量也存在一定差异。应严格控制人工牛黄的原料来源和生产工艺, 尽量控制已知的主要有效成分, 保证人工牛黄的质量, 从而为其真正替代天然牛黄发挥治疗效果奠定基础。

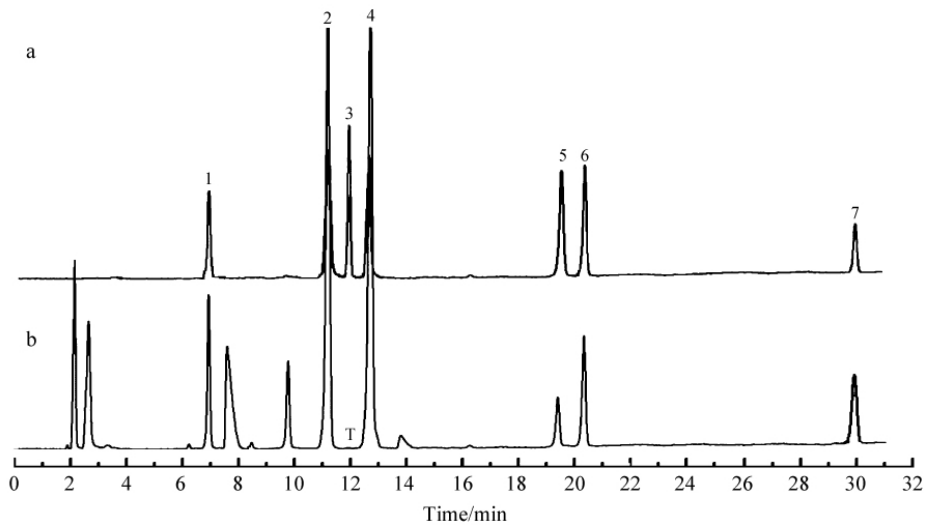


图2 混合对照品和试样的色谱图

Fig. 2 HPLC-evaporative light scattering detection (ELSD) chromatograms of mixed standards and sample

a. 混合标准品 (Mixed standards); b. 样品 (sample)。1. 牛黄胆酸钠 (Sodium taurocholate); 2. 胆酸 (Cholic acid); 3. 熊去氧胆酸 (Ursodeoxycholic acid); 4. 猪去氧胆酸 (Hyodeoxycholic acid); 5. 鹅去氧胆酸 (Chenodeoxycholic acid); 6. 去氧胆酸 (Deoxycholic acid); 7. 胆固醇 (Cholesterol)。注 (Nota): 3 号峰标识 (Peak 3)。

References

- 1 The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China (国家药典委员会). *Chinese Pharmacopoeia* (中国药典). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2005, Vol I: 4~7, 47~48
- 2 XU Lu (徐路), FU Hai-Yan (付海燕), JIANG Ning (姜宁), YU Xiao-Ping (俞晓平). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2010, 38(2): 175~180
- 3 DU Xiao-Xi (杜晓曦), Yang Chang-Ming (阳长明). *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology* (中药新药与临床药理), 2004, 15(1): 64~65
- 4 <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0055/10163.html>
- 5 PAN Hong-Zuo (潘宏祚), WANG Hong-Jie (王洪杰). *Hei Long Jiang Medicine Journal* (黑龙江医药), 2004, 6(17): 427~430
- 6 LUO Xiao-Ru (罗晓茹), CAO Hong (曹红), XING Jun-Bo (邢俊波). *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army* (解放军药学学报), 2009, 25(3): 247~249
- 7 FAN Guang-Ping (范广平), ZHU Jing-Jian (朱静建), WANG Zhi-Hua (王智华). *Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药), 1996, 18(5): 39~41
- 8 ZHAO Yu-Xin (赵宇新), LI Man-Ling (李曼玲). *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 913~917
- 9 WEI Feng (魏锋), ZHONG Min (钟敏), NI Jia-Ti (尼加提), LIN Rui-Chao (林瑞超). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), 2009, 29(1): 21~24
- 10 FENG Fang (冯芳), MA Yong-Jian (马永建), CHEN Ming (陈明), ZHANG Zheng-Hang (张正行), AN Deng-Kui (安登魁). *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报), 2000, 35(3): 216~219
- 11 Kong W J, Zhao Y L, Shan L M, Xiao X H, Guo W Y. *J. Chromatogr. B*, 2008, 871(1): 109~114
- 12 Zhou D Y, Zhang X L, Xu Q, Xue X Y, Zhang F F, Liang X M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 50(1): 2~8
- 13 Cong Y, Zhou Y B, Chen J, Zeng Y M, Wang J H. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48(3): 573~578
- 14 Ritthitham S, Wimmer R, Stensballe A, Pedersen L H. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(25): 4963~4967

- 15 Squibb A W , Taylor M R , Parnas B L , Williams G , Girdler R , Waghorn P , Wright A , Pullen F S. *J. Chromatogr. A* , 2008 , 1189 (1-2) : 101 ~ 108

Simultaneous Determination of Multi-active Components in Calculus Bovis for Quality Control by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection

LIU Wei^{1 2} , JIN Cheng^{* 1} , KONG Wei-Jun^{1 3} , Wang Hai-tao⁴ , GONG Qian-Feng² , Xiao Xiao-He¹

¹ (China Military Institute of Chinese Material Medical , 302 Military Hospital of China , Beijing 100039)

² (Pharmacy College , Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine , Nanchang 330004)

³ (Pharmacy College , Chengdu University of Traditional Chinese Medicine , Chengdu 610075)

⁴ (China Military Institute of Chinese Material Medical , 306 Military Hospital of China , Beijing 100101)

Abstract To establish a high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) method for the rapid simultaneous determination of seven components in Calculus Bovis , furthermore , to provide an effective approach for quality control of this Chinese medicine material , the components were separated and analyzed on a Ultimate AQ-C₁₈ column. A mixture of acetonitrile-water(0.2% formic acid) was selected as the mobile phase with the flow rate of 1 mL/min using gradient elution program. An Alltech 2000ES evaporative light scattering detector(ELSD) was connected to this HPLC equipment with the drift tube temperature of 100 °C and nitrogen gas flow-rate of 1.9 L/min. Under the selected chromatographic condition , cholesterol , bile acids and its sodium salts had ideal resolutions and good peak shapes. The experimental results showed that the logarithm of peak area of each standard component was linearly correlated to the logarithm of injected mass within an acceptable range ($r > 0.9972$) with the recoveries of 98.8% - 112.7% and the limits of detection of 0.001 - 0.007 g/L. The established HPLC-ELSD method is simple , quick and could be used for the simultaneous determination of multicomponent contents in Calculus Bovis , further to reflect the differences of internal quality and provide more references for the quality control of this rare medical material.

Keywords Calculus Bovis; High performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection; Multicomponent content; Simultaneous determination

(Received 17 September 2009; accepted 7 December 2009)

《色谱定性与定量》(第二版)

该书主要介绍了色谱分析中常用的定性和定量方法。在定性分析中除了介绍经典的保留值定性的各种方法外,对近年来在色谱定性分析中使用的质谱和红外光谱的谱图解析作了较详细的介绍。定量分析中除了介绍各种定量分析方法外,对数据处理中的误差分析、定量结果的评价和表达方法作了详细介绍。该书还对色谱定性定量分析常用的积分仪和色谱工作站作了介绍,并对保证色谱定性和定量结果准确的优良实验室规范及实验室认可制度作了介绍。与第一版相比,该书的第二版增加了色谱峰纯度检验、色谱指纹图谱分析、实验室能力验证等新内容。

该书是《色谱技术丛书》之分册,在第一版基础上作了修改和充实,补充了新近发展的仪器、技术与应用实例。

该书可供从事色谱分析的人员及大专院校分析化学相关专业师生学习参考。该书由汪正范编著,化学工业出版社出版,定价 39.00 元。