

薄层扫描法测定胆黄片中猪去氧胆酸的含量

陈晓军¹, 莫少红¹, 谭洪盛², 覃柳娟¹, 唐第光¹ (1. 南宁市汇科医药新技术研究, 广西 南宁 530021; 2. 桂林漓江制药有限公司, 广西 桂林 541001)

摘要:目的 建立胆黄片中猪去氧胆酸的含量测定方法。方法 采用薄层扫描法, 测定胆黄片中猪去氧胆酸的含量。结果 线性范围为 $1.0 \sim 5.0 \mu\text{g}$, $r = 0.9994$, 平均回收率为 97.5% , RSD 为 2.52% 。结论 方法可行, 重现性好, 适用于该制剂的质量控制。

关键词: 胆黄片; 猪去氧胆酸; 薄层扫描法

中图分类号: R917.770.1; R975.5 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)06-0500-03

Determination of hyodeoxycholic acid in Danhuang tablets by TLC scanning

CHEN Xiao-jun¹, MO Shao-hong¹, TAN Hong-sheng², QIN Liu-juan¹, TANG Di-guang¹ (1. Nanning Huike Medical New Technical Institute, Nanning 530021, China; 2. Guilin Lijiang Pharmaceutical Co., Ltd, Guilin 541001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of hyodeoxycholic acid in Danhuang tablets. **METHOD** The content of hyodeoxycholic acid in Danhuang tablets was determined by TLC-Scanning. **RESULTS** The linear range of hyodeoxycholic acid was $1.0 \sim 5.0 \mu\text{g}$, $r = 0.9994$. The average recovery was 97.5% and RSD was 2.52% . **CONCLUSION** The methods are available with a good reproducibility and can be used for the quality control of Danhuang tablets.

KEY WORDS: Danhuang tablets; hyodeoxycholic acid; TLCS

胆黄片是由猪胆汁、黄柏、青黛组方而成的中成药, 具有清热解暑、祛痰消瘰的作用, 适用于阴虚痰火凝结所致瘰癧痰核诸症。猪胆汁为方中君药, 用量较大, 为有效控制产品质量, 采用薄层扫描色谱法对猪胆汁中的有效成分猪去氧胆酸进行了含量测定研究, 为建立完整的质量标准提供了依据。

1 仪器与试药

CS-9301 型双波长薄层扫描仪(日本岛津)。硅胶 G(青岛海洋化工厂); 猪去氧胆酸对照品(中国药品生物制品检定所); 胆黄片样品(桂林漓江制药有限公司, 批号 20020205); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

作者简介: 陈晓军(1977~), 男, 广西人, 助理工程师, 主要从事新药研究与开发工作。

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取在五氧化二磷干燥器中减压干燥 24h 的猪去氧胆酸对照品 10.0 mg, 加乙醇使溶解, 置 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 作为对照品溶液。

2.1.2 样品溶液的制备 取本品 20 片, 除去糖衣, 精密称定, 研细。取细粉约 0.3 g (约相当于 15 mg 猪去氧胆酸), 加 10% 氢氧化钠溶液 5 mL, 于 120 °C 加热 4 h, 放冷, 滴加盐酸调节 pH 值至 2~3, 摇匀, 用醋酸乙酯提取 4 次, 每次 15 mL, 合并提取液, 蒸干, 残渣加乙醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.1.3 阴性对照样品溶液的制备 按处方比例及工艺, 制备缺猪胆汁的阴性样品, 再按试品溶液的制备方法制备不含猪胆汁的阴性样品溶液。

2.2 实验条件

2.2.1 薄层色谱条件 精密吸取供试溶液 1 μ L, 对照品溶液 1 μ L 与 3 μ L, 分别交叉点于同一硅胶 G 薄层板上, 以新配制的异辛烷-乙醚-冰醋酸-正丁醇-水(10:5:5:3:1) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰 (约 10 min), 取出, 在薄层板上覆

盖同样大小的玻璃板, 周围用胶布固定。

2.2.2 吸收波长的选择 精密吸取上述供试品溶液、对照品溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 按“2.2.1”项下展开, 显色, 并于 370~700 nm 处对对照品斑点、供试品与对照品对应斑点进行扫描, 结果对照品和供试品在 370 nm 和 550~610 nm 处有两个吸收峰, 550~610 nm 处的吸收峰吸收度低, 灵敏度差, 且吸收度受烘烤时间影响大, 370 nm 为薄层扫描仪中紫外和可见光的转换波长, 参考文献^[1], 选择 375 nm 为测定波长(λ_S), 对照品和供试品在 690 nm 处吸收均较小, 选择 690 nm 为参比波长(λ_R)。

2.2.3 扫描条件 $\lambda_S = 375$ nm, $\lambda_R = 690$ nm, 双波长反射法锯齿扫描, 狭缝 0.4 mm $\times$ 0.4 mm, SX = 3, 灵敏度: 中等。测量供试品吸收度积分值与对照品吸收度积分值, 计算, 即得。

2.3 空白试验

按上述实验条件对猪去氧胆酸对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液进行试验。测定结果表明, 对照品与供试品有一位相同的色谱峰, 阴性样品在相同位置无吸收峰干扰, 分离效果佳。见图 1。

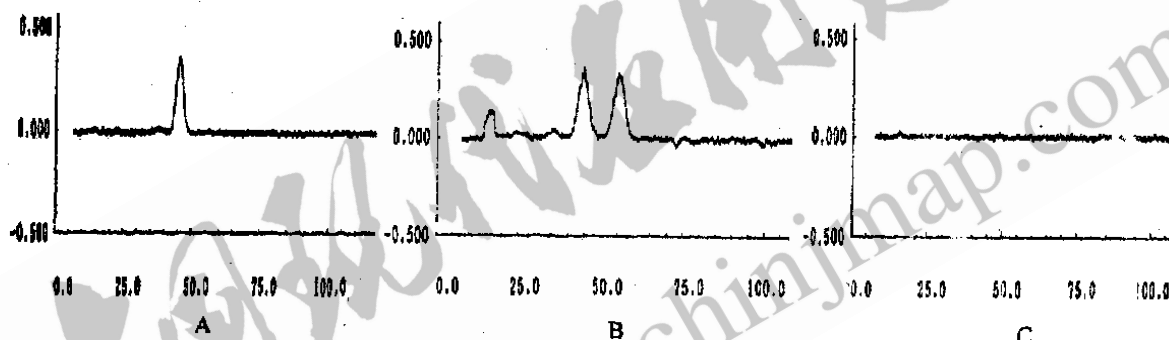


图 1 猪去氧胆酸色谱图

Fig 1 The chromatograms of hyodeoxycholic acid

A. 猪去氧胆酸对照品; B. 供试品; C. 猪胆汁阴性对照品

A. Standard of hyodeoxycholic acid; B. sample; C. negative

2.4 稳定性试验

吸取猪去氧胆酸对照品溶液和供试品溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 按测定条件展开, 显色, 用胶布固定后, 每隔 0.5 h 扫描一次, 结果表明自显色后 0~3 h 内均稳定, 其间对照品峰面积平均值为 1179.3, RSD = 1.18%; 样品峰面积平均值为 1743.0, RSD = 0.95%。

2.5 对照品纯度检查

取猪去氧胆酸对照品, 精密称定 10.0 mg, 加乙醇 1 mL 使溶解, 吸取该溶液 10 μ L, 按测定条件测定, 峰面积归一化法计算含量, 含量为 99.1%, 符合含量测定的要求。

2.6 线性关系考察

精密吸取猪去氧胆酸对照品溶液(1.0 mg $\cdot$ mL⁻¹) 1, 2, 3, 4, 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 按测定条件展开, 显色。扫描测定各斑点的面积积分值。以对照品点样量为横坐标, 斑点面积积分值为纵坐标作图, 结果表明猪去氧胆酸在 1.0~5.0 μ g 内, 具有良好的线性关系, 回归方程 $Y = 444.4X + 293.3$, 相关系数 $r = 0.9994$ 。

2.7 精密度试验

2.7.1 仪器精密度 精密吸取供试品溶液 1 μ L, 点于硅胶 G 薄层板上, 按测定条件展开, 显色。重复扫描测定峰面积积分值 5 次。结果峰面积积分平均值为 1175.5, RSD = 0.86%。

2.7.2 同板精密度 精密吸取供试品溶液在同一硅胶 G 薄层板上重复点 5 个 1 μ L 的斑点, 按测定条件展开, 显色, 测定。结果峰面积积分平均值为 1153.9, RSD = 2.74%。

2.7.3 异板精密度 精密吸取同一供试品溶液点样 1 μ L, 按测定条件分别在 5 块薄层板上展开, 显色, 扫描测定各斑点的峰面积积分值, 外标两点法计算含量。结果含量平均值为 15.3 mg/片, RSD = 1.28%。

2.8 重现性试验

取同一样品按供试品溶液的制备方法制备 5 份供试品溶液, 依法测定, 计算含量及 RSD。结果含量平均值为 15.1 mg/片, RSD = 2.41%。

2.9 回收率试验

精密吸取已知含量的样品(批号:20020205,含量:59.1 mg·g⁻¹)5份,各加入一定量的猪去氧胆酸对照品,依法测定,计算,平均回收率为97.5%,RSD=2.52%,结果见表1。

表1 猪去氧胆酸加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Recovery of hyodeoxycholic acid($n=3$)

No	样品重量(g)	猪去氧胆酸含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.1589	9.4	6.6	15.7	95.5		
2	0.1690	10.0	7.6	17.7	101.3		
3	0.1394	8.2	7.9	15.8	96.2	97.5	2.52
4	0.1472	8.7	7.1	15.5	95.8		
5	0.1449	8.6	7.4	15.9	98.6		

2.10 样品测定

取样品10批,按含量测定方法进行测定,结果见表2。

表2 10批样品猪去氧胆酸的测定结果($n=3$)

Tab 2 Determination of hyodeoxycholic acid in ten batches of samples($n=3$)

批号	重量(mg/片)	RSD(%)	批号	重量(mg/片)	RSD(%)
20020205	15.1	2.41	20020402	12.0	3.46
20020220	15.8	0.73	20020403	11.4	2.21
20020301	12.0	2.54	20020404	14.1	1.42
20020305	13.7	1.52	20020405	11.5	1.82
20020401	12.5	2.88	20020406	10.4	3.65

由测定结果确定本品含量限度:胆黄片每片含猪去氧胆酸($C_{24}H_{40}O_4$)不得少于9.0mg。

3 讨论

3.1 猪胆汁含有猪胆酸、猪去氧胆酸、石胆酸及胆色素等成分,文献报道胆酸的含测方法有紫外分光光度法及薄层色谱扫描法^[1~3]。胆酸属四环三萜类化合物,结构中无共轭双键,紫外吸收在210nm,无法直接测定,耐用糠醛显色后才能可见光区测定吸收度,而猪胆汁所含胆酸类成分复杂,故紫外分光光度法仅能测定总胆酸含量,专属性不强。本实验采用薄层色谱扫描法对猪去氧胆酸进行含量测定,测定结果准确,重现性好,专属性强。

3.2 展开系统还比较过异辛烷-醋酸乙酯-冰醋酸(15:7:5),正己烷-醋酸乙酯-甲酸-醋酸(6:32:1:1)等系统,以本展开系统为优。

3.3 对薄层板的显色方法进行了考察,温度低,显色时间长,温度太高,薄层板易烤焦,不利于扫描;于105℃加热,7min开始显斑点,在约10min时,斑点清晰,扫描峰面积最大,13min以后出现焦化,峰面积下降趋势明显。显色方法选择于105℃加热约10min最好。

参考文献

- [1] 中国药典2000年版一部[S].2000:259.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用[M].第六卷.北京:学苑出版社,1999:5078.
- [3] 郭亚红,倪健,邵爱新,等.痰喘消质量标准的研究[J].中成药,2002,24(2):146.

收稿日期:2003-11-14