

薄层扫描法测定藿胆片中猪去氧胆酸的含量

徐韧柳¹,康怀萍²,李丽华³ (1.河北省药品检验所,河北 石家庄 050011; 2.河北科技大学,河北 石家庄 050018; 3.河北医科大学中医学院,河北 石家庄 050091)

摘要:目的 建立藿胆片的含量测定方法。方法 应用 TLCS法对方中猪胆粉的有效成分猪去氧胆酸进行了含量测定,固定相为硅胶 G,流动相为异辛烷 醋酸乙酯 冰醋酸 (5: 5: 1),测定波长为 375nm。结果 猪去氧胆酸在 0.528 ~ 5.28 μ g范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.9991$),平均回收率为 98.24% ($RSD=1.71\%$, $n=5$)。结论 含量测定方法准确可行,重复性好,操作简便,可用于控制藿胆片的质量。

关键词:藿胆片;薄层扫描法;猪去氧胆酸;含量

中图分类号: R917.7.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)02-0157-03

Determination of hyodeoxycholic acid for Huodan tablets by TLC-scanning

XU Ren-liu¹, KANG Huai-ping², LI Li-hua³ (1. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a determination method for Huodan tablets. **METHOD** TLCS was used to determine the content of hyodeoxycholic acid. Silica G thin layer was used, and the mobile phase was composed of isooctane-ethyl acetate-acetic (5: 5: 1). The detection wavelength was at 375nm. **RESULTS** The quantification method of hyodeoxycholic acid had the linear range of 0.528 ~ 5.28 μ g ($r=0.9991$). The average recovery was 98.24% ($RSD=1.71\%$, $n=5$). **CONCLUSION** The method is accurate, realizable and reproducible. It can be used effectively for the quality control of Huodan tablets.

KEY WORDS: Huodan tablets; TLC-scanning; hyodeoxycholic acid; content

藿胆片由藿香提取物和猪胆粉组成,具有芳香化浊,通鼻窍去肝胆之火,消除或减轻浓肿、鼻塞和头痛的功效。用于鼻窦炎、鼻炎。该药收载于卫生部药品标准中药成方制剂第二十册^[1],标准中除理化鉴别外,无任何定量检测方法。猪去氧胆酸是猪胆粉的主要有效成分之一^[2],猪去氧胆酸的含量测定方法文献报道有薄层扫描测定法^[3,4],高效液相色谱法^[5]等。中国药典 2000年版一部猪胆粉项下的含量测定为薄层扫描法。为了进一步控制藿胆片的质量,建立了以薄层扫描法测定该药中猪去氧胆酸含量的方法。

1 实验材料与仪器

CS-930薄层扫描仪(日本岛津)。猪去氧胆酸对照品(中国药品生物制品检定所);藿胆片(唐山市龙山药业有限公司);阴性对照的药材(唐山市龙山药业有限公司);试剂为分析纯。薄层板:硅胶 G预制板为青岛海洋化工厂分厂生产(批号 20020604),硅胶 G(青岛海洋化工厂)。

2 实验方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取猪去氧胆酸对照品 10mg,置 10mL量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.2 供试品溶液的制备

取本品 20片,除去包衣,精密称定,研细(过三号筛),取约 1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 20mL,密塞,称定重量,超声处理 30min,再称定重量,用乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5mL置烧瓶中,回收溶剂至干,残渣加 10%氢氧化钠溶液 10mL,120℃加热 4h,放冷,滴加盐酸调节 pH 值至 2~3(约滴加盐酸 5mL),摇匀。用醋酸乙酯提取 5次,每次 10mL,每次醋酸乙酯液均通过同一铺有少量无水硫酸钠的脱脂棉滤过,并用 10mL醋酸乙酯分次洗涤无水硫酸钠和滤器,洗液并入滤液,蒸干,残渣加无水乙醇使溶解并转移至 5mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 薄层色谱条件与扫描条件

展开剂:异辛烷 醋酸乙酯 冰醋酸 (5: 5: 1)。显色方式:喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105℃加热至斑点显色清晰。检测波长:375nm。扫描方式:单波长反射法锯齿扫描,线性化参数 SX=3,狭缝 1.2mm×1.2mm。

2.4 线性关系考察

配制猪去氧胆酸 1.056mg/mL的无水乙醇溶液,精密吸

作者简介:徐韧柳(1962~),女,河北省人,主任药师。主要研究方向:中药制剂工艺与质量标准研究。电话:(0311) 5212008-8045

取该对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上按拟定条件展开, 显色, 扫描, 记录峰面积积分值与点样量。以点样量 (μL) 为横坐标, 以峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程: 猪去氧胆酸 $Y = 23\,867.3X + 655.7$, $r = 0.999\,1$ 。猪去氧胆酸点样量在 0.528 ~ 5.28 μg 内呈线性关系。

2.5 稳定性试验

取同一对照品溶液和供试品溶液点于同一硅胶 G 薄层板上, 按上述条件展开, 显色, 分别在 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5 h 扫描测定, 猪去氧胆酸对照品、藿胆片供试品猪去氧胆酸峰面积积分值的 RSD 分别为 1.75% 和 1.78%, 说明猪去氧胆酸在 0.5 ~ 3.5 h 内稳定。

2.6 精密度试验

仪器精密度: 按上述条件展开, 显色, 对某一对照品和供试品斑点连续扫描 5 次, 对照品及供试品猪去氧胆酸峰面积

表 1 藿胆片中猪去氧胆酸的加样回收试验结果

Tab 1 Result of recovery of hydoxycholic acid in Huodan tablets

编号	样品中含猪去氧胆酸的量 (mg)	添加猪去氧胆酸对照品的量 (mg)	测出猪去氧胆酸的总量 (mg)	所加猪去氧胆酸对照品的测出量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	5.1070	4.9280	10.0507	4.9500	100.45	98.24	1.71
2	4.3320	4.9280	9.2310	4.8990	99.41		
3	4.4148	4.9280	9.1717	4.7569	96.53		
4	4.3678	4.9280	9.1988	4.8310	98.03		
5	5.0565	4.9280	9.8268	4.7703	96.80		

2.9 样品测定结果

按前述方法制备对照品溶液与供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 1 μL 、对照品溶液 1 μL 和 3 μL , 分别交叉点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开, 显色, 在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板, 周围用胶布固定, 照中国药典 2000 年版一部附录附录 VIB 薄层扫描法进行扫描测定, 并计算含量, 样品测定结果见表 2。

表 2 藿胆片中猪去氧胆酸的含量测定结果

Tab 2 Content of hydoxycholic acid in Huodan tablets

样品批号	猪去氧胆酸含量 ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$)
020701	13.0
020702	13.1
020703	12.8

3 小结与讨论

3.1 测定波长的确定及阴性对照试验

按照藿胆片的处方和制法, 自制缺少猪胆粉的模拟样品, 依供试品溶液方法制备猪胆粉阴性对照溶液, 与藿胆片供试品溶液、猪去氧胆酸对照品溶液同板进行薄层色谱, 见图 1。在 370 ~ 700 nm 内对猪去氧胆酸对照品、藿胆片供试品猪去氧胆酸色谱斑点、猪胆粉阴性对照的相应位置进行光谱扫描, 见图 2。对照品、供试品吸收曲线基本一致, 在 375 nm、515 nm 和 600 nm 处均有吸收峰, 分别以这三个波长为测定波长进行色谱扫描, 结果显示: 三个波长处所测结果相近, 但以 375 nm 处测定最灵敏且同板吸收峰峰面积积分值的 RSD 较小, 选定 375 nm 为测定波长, 其色谱扫描图见图 3。由于使

积分值的 RSD 分别为 0.19% 和 0.21%。同板精密度: 精密吸取某一对照品溶液 5 份与供试品溶液 5 份, 分别点于同一薄层板上, 展开, 显色, 依次扫描, 对照品及供试品猪去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.97% 和 2.63%。异板精密度: 某一供试品溶液分别在 5 块薄层板上依法测定含量, 5 次所测含量的 RSD 为 2.99%。

2.7 重复性试验

对同一批号的样品按正文所述的含量测定方法进行 5 次平行提取测定, 计算含量, 结果分别为 13.3, 13.1, 12.9, 12.3, 13.2 $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, 供试品平均含量为 13.0 $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, RSD 为 2.89%。

2.8 回收率试验

精密称取已知含量的样品 5 份, 分别加入一定量的猪去氧胆酸对照品 (以溶液的形式加入, 挥干溶剂), 按上述方法进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。

用单波长反射法锯齿扫描, 供试品能得到较好的基线分离, 为节省时间, 未采用双波长扫描。猪胆粉阴性对照在猪去氧胆酸斑点相应处没有斑点, 其光谱扫描图为一平线, 进行色谱扫描, 积分值为 0。说明其它药味不干扰猪去氧胆酸的检测。

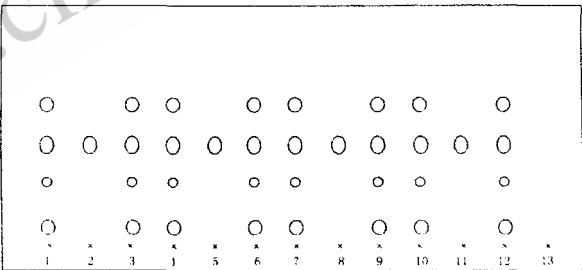


图 1 藿胆片中猪去氧胆酸 TLC 图谱

Fig 1 TLC chromatogram of hydoxycholic acid in Huodan tablets

室温: 15 $^{\circ}\text{C}$; 相对湿度: 33%; 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12. 藿胆片供试品; 2, 5, 8, 11. 猪去氧胆酸对照品; 13. 猪胆粉阴性对照
1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12. sample; 2, 5, 8, 11. hydoxycholic acid standard; 13. blank sample

3.2 提取条件的选择

试验证明猪胆粉中猪去氧胆酸多数以结合型形式存在, 直接对供试品在碱性条件下水解, 水解液不易滤过, 水解液直接用氯仿萃取, 环境温度低时, 易乳化, 操作困难。所以要测定样品中总猪去氧胆酸的含量, 首先选择适宜的提取溶剂, 使样品中游离型和结合型胆酸成分同时提取出来, 根据

待测成分的理化性质,选择乙醇为溶剂。对比了超声处理提取和回流提取,两者差异不明显,选定提取方式为超声处理,并对提取时间进行了考察,根据实测结果选定超声提取时间为 30min。

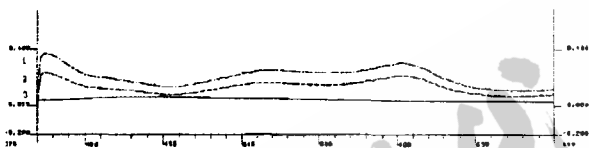


图 2 藿胆片中猪去氧胆酸 TLCS光谱扫描图

Fig 2 TLCS spectrograms of hydoxycholic acid in Huodan tablets

1. 藿胆片供试品; 2. 猪去氧胆酸对照品; 3. 猪胆粉阴性对照

1. sample; 2. hydoxycholic acid standard; 3. blank sample

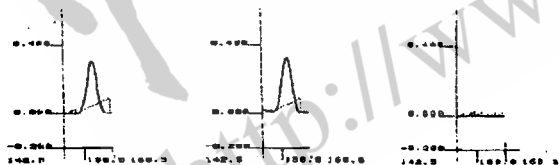


图 3 藿胆片中猪去氧胆酸 TLCS 色谱扫描图

Fig 3 TLCS chromatograms of hydoxycholic acid standard in Huodan Tablets

1. 猪去氧胆酸对照品; 2. 藿胆片供试品; 3. 猪胆粉阴性对照

1. hydoxycholic acid standard; 2. sample; 3. blank sample

3.3 水解条件的选择

为使结合型的待测成分转变为游离型的需进行水解。对比了 5%、10% 和 20% 氢氧化钠溶液等不同浓度碱液水解,并对水解时间 (2, 3, 4h) 进行了考察,结果表明 10% 和 20% 氢氧化钠溶液作为水解液无明显区别,水解时间 3h 和 4h 差异不大,故选定氢氧化钠溶液的浓度为 10%,加热水解时间为 4h。

3.4 醋酸乙酯萃取次数考察

在碱性条件水解后,加入盐酸调节 pH 值至酸性,用氯仿或醋酸乙酯萃取均可,以醋酸乙酯萃取两相分层好而快被采用。用醋酸乙酯 5 次可使待测成分萃取完全,之后的醋酸乙酯提取液浓缩,定容后测定,未检出猪去氧胆酸吸收峰。醋酸乙酯提取液要用无水硫酸钠等脱水剂进行脱水处理,否则蒸干后的残渣易变黑,溶解后供试液颜色较深。

以上定量方法专属、快速、准确、重现性好,可用于藿胆片的质量控制。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂第二十册 [S]: 378.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用 (第六卷) [M], 北京: 学苑出版社 1999. 5078.
- [3] 中国药典 2000 年版一部 [S]. 2000: 259 ~ 260, 634, 52 ~ 53.
- [4] 麻风华,朱秀荣,王卫东,等. 双波长扫描法测定猪胆粉中猪去氧胆酸的含量 [J]. 中成药, 2001, 23(1): 68.
- [5] 林蔚,肖学风,邱智东,等. HPLC 法测定双胆片中猪去氧胆酸含量 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 712.