

HPLC-ELSD 测定胆益宁片中甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸含量

马若飞¹, 陈勇², 陈碧莲^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 测定胆益宁片中的甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸的含量测定方法。方法 采用 Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.1%甲酸溶液(40:60), 柱温: 35 °C, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测器为 ELSD6000 型蒸发光散射检测器, 漂移管温度为 105 °C, 氮气流速为 2.5 L·min⁻¹。结果 甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸分别在 0.206~3.090 μg($r=0.999\ 5$)和 0.180~2.693 μg($r=0.999\ 4$)内呈良好的线性, 平均加样回收率分别为 99.54%(RSD=0.99%)和 100.58%(RSD=1.70%)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可用于胆益宁片的质量控制。

关键词: 胆益宁片; 甘氨酸猪去氧胆酸; 甘氨酸鹅去氧胆酸; HPLC-ELSD

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)07-1018-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.019

引用本文: 马若飞, 陈勇, 陈碧莲. HPLC-ELSD 测定胆益宁片中甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 1018-1020.

Determination of Glycohyodeoxycholic Acid and Glycochenodeoxycholic Acid in Danyining Tablet by HPLC-ELSD

MA Ruofei¹, CHEN Yong², CHEN Bilian^{2*} (1.Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Provincial Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the simultaneous determination of glycohyodeoxycholic acid and glycochenodeoxycholic acid in Danyining tablet by HPLC-ELSD. **METHODS** The analysis was performed on Welch Ultimate Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid(40:60). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. ELSD6000 was used as the detector, the drift tube temperature was 105 °C and the nitrogen flow rate was 2.5 L·min⁻¹. **RESULTS** Glycohyodeoxycholic acid and glycochenodeoxycholic acid had good linear relationships in the ranges of 0.206–3.090 μg($r=0.999\ 5$) and 0.180–2.693 μg($r=0.999\ 4$), respectively. The average recoveries were 99.54% (RSD=0.99%) and 100.58% (RSD=1.70%), respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate with good repeatability, which can be used for the quality control of Danyining tablet.

KEY WORDS: Danyining tablet; glycohyodeoxycholic acid; glycochenodeoxycholic acid; HPLC-ELSD

胆益宁片主要成分为梅根和胆酸钠, 具有疏肝止痛, 清热利胆的功效, 临床上用于治疗急、慢性胆囊炎, 对于胆道感染和胆结石疗效显著^[1-4]。因原标准无含量测定项, 故需增加处方中胆酸钠的含量测定。胆酸钠来源于牛或猪胆中提取的胆汁酸盐的混合物, 其标准收载于卫生部药品标准二部第六册, 原方法为皂化后采用重量法进行含量测定, 专属性较差^[3]。目前, 对于动物胆汁类药材的含量测定大多以游离型胆汁酸^[5-7]为指标, 而对于结合型胆汁酸的研究和测定较少, 与实际成分在药材中存在状态不符。本实验采用 HPLC-ELSD 测定胆益宁片中含量较高的结合型胆酸甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸, 用以更好地控制其质量。

1 仪器与试剂

Thermo Ultimate 3000 系列高效液相色谱仪(配备四元低压梯度泵, 自动进样器, 柱温箱), ELSD 6000 型蒸发光散射检测器, 变色龙 7.2 色谱工作站。

甘氨酸猪去氧胆酸对照品(加拿大多伦多研究化学品公司, 批号: 24-CF-57-3, 纯度≥98%); 甘氨酸鹅去氧胆酸钠(加拿大多伦多研究化学品公司, 批号: 5-YFD-138-1, 纯度≥98%); 胆益宁片(薄膜衣片, 浙江诚意药业股份有限公司, 规格: 每片 0.32 g, 批号: 20160406, 20160407, 20160408); 阴性样品由浙江诚意药业股份有限公司提供。乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余为分析纯。

作者简介: 马若飞, 女, 硕士生 Tel: (0571)87180345 E-mail: 375187627@qq.com

*通信作者: 陈碧莲, 女, 主任中药师 Tel: (0571)86459402 E-mail: zsyonly@hotmail.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸溶液(40:60); 柱温: 35 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 对照品 5, 10 μL, 供试品 5 μL; ELSD 参数: 漂移管温度为 105 °C, 氮气流速为 2.5 L·min⁻¹。

在此色谱条件下, 供试品中的甘氨酸猪去氧胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸与其他杂质峰均能达到很好的分离, 结果见图 1。

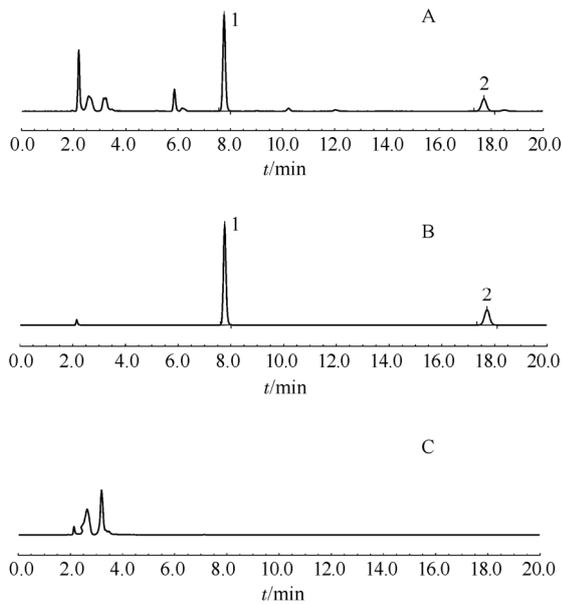


图 1 高效液相色谱图

A-供试品溶液; B-对照品溶液; C-空白样品溶液; 1-甘氨酸猪去氧胆酸; 2-甘氨酸鹅去氧胆酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-standard solution; C-blank; 1-glycohyodeoxycholic acid; 2-glycochenodeoxycholic acid.

2.2 混合对照品溶液的制备

取甘氨酸猪去氧胆酸对照品和甘氨酸鹅去氧胆酸钠对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含甘氨酸猪去氧胆酸 0.206 0 mg 和甘氨酸鹅去氧胆酸钠 0.179 5 mg 的混合对照品溶液, 即得(甘氨酸鹅去氧胆酸质量=甘氨酸鹅去氧胆酸钠质量×0.953 4)。

2.3 供试品溶液的制备

取胆益宁片 10 片, 精密称定, 研细, 取约 0.12 g, 精密称定, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 400 W, 频率 50 kHz)30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 标准曲线的制备

精密吸取混合对照品溶液(含甘氨酸猪去氧胆酸 0.206 0 mg·mL⁻¹、甘氨酸鹅去氧胆酸 0.179 5 mg·mL⁻¹)1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15 μL, 注入液相色谱仪, 得进样量与平均峰面积, 以色谱峰面积的对数为纵坐标(Y), 以进样量(ng)的对数为横坐标(X), 进行线性回归, 得甘氨酸猪去氧胆酸线性方程为 $Y=1.750 8X-4.379 6$, $r=0.999 5$, 线性范围为 0.206~3.090 μg; 甘氨酸鹅去氧胆酸钠线性方程为 $Y=1.744 9X-4.756 3$, $r=0.999 4$, 线性范围为 0.180~2.693 μg。

2.5 专属性试验

取缺胆酸钠的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果本品在甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸钠混合对照品相应位置处无色谱峰出现, 即本品阴性无干扰, 结果见图 1。

2.6 仪器精密度试验

取胆益宁片(批号: 20160407), 按“2.3”项下方法提取, 重复进样 6 次, 结果甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸的峰面积 RSD 分别为 1.5%和 2.2%。

2.7 重复性试验

取胆益宁片(批号: 20160407), 按“2.3”项下方法提取供试品 6 份, 分别测定每份的含量, 甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸的含量 RSD 分别为 1.5%和 2.0%。

2.8 回收率试验

采用加样回收法, 精密称取已知含量的胆益宁片(批号: 20160407)适量, 精密加入甘氨酸猪去氧胆酸对照品与甘氨酸鹅去氧胆酸钠对照品混合溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 测定供试品中甘氨酸猪去氧胆酸与甘氨酸鹅去氧胆酸的量, 计算回收率, 结果见表 1。

2.9 稳定性试验

取“2.7”项下样品, 分别在 0, 5, 10, 17, 25, 32 h 测定峰面积, 甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸峰面积 RSD 分别为 3.0%和 2.4%, 表明供试品溶液在室温下放置 32 h 内基本稳定。

2.10 样品测定结果

取胆益宁片(薄膜衣片)3 批, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 测定甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸钠的含量, 并将甘氨酸鹅去氧胆酸钠折

算成甘氨酸去氧胆酸, 结果见表 2。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test ($n=6$)

名称	称样量/ mg	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
甘氨酸猪去氧胆酸	62.97	4.626	5.150	9.764	99.79	99.54	0.99
	60.57	4.449	5.150	9.631	100.63		
	62.08	4.560	5.150	9.706	99.93		
	60.25	4.426	5.150	9.468	97.91		
	60.63	4.454	5.150	9.609	100.11		
61.58	4.524	5.150	9.614	98.85			
甘氨酸鹅去氧胆酸	62.97	3.784	4.489	8.316	100.97	100.58	1.70
	60.57	3.640	4.489	8.255	102.82		
	62.08	3.730	4.489	8.224	100.11		
	60.25	3.620	4.489	8.049	98.66		
	60.63	3.643	4.489	8.227	102.13		
61.58	3.700	4.489	8.135	98.80			

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Results of sample determination($n=3$)

批次	甘氨酸猪去氧胆酸		甘氨酸鹅去氧胆酸	
	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RD/%	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RD/%
20160406	26.40	2.18	21.42	0.44
20160407	24.67	1.01	19.30	0.67
20160408	24.06	0.79	19.24	0.28

3 讨论

3.1 提取方法比较

本实验考察了超声处理、加热回流, 提取溶剂, 不同取样量, 不同超声时间等对胆酸钠中甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸提取效果的影响, 并确定了最佳条件。

3.2 耐用性考察

实验中比较了不同类型的色谱柱(Agilent Zorbax SB C₁₈、月旭 Ultimate Plus C₁₈、绿百草 Ecosil C₁₈); 不同生产厂家(Agilent 公司、Thermo 公司、岛津公司)的仪器; 不同浓度的甲酸溶液(0.05%, 0.1%, 0.2%); 不同柱温(25, 35, 40 °C)以及不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹)的影响, 均得到满意的结果, 故该方法耐用性良好。

3.3 含量测定

经实验, 胆酸钠中检测到 2 个较大的色谱峰, 采用对照品比对并经液质联用进行确证, 2 个成分为甘氨酸猪去氧胆酸和甘氨酸鹅去氧胆酸。因目前未

购买到甘氨酸鹅去氧胆酸, 仅仅买到了甘氨酸猪去氧胆酸钠, 故测定中采用甘氨酸猪去氧胆酸钠对照品, 并将得到的数据进行折算。

流动相起初参考文献使用甲醇-0.1%甲酸^[8-10], 并参考中国药典 2015 年版使用紫外检测器, 波长为 200 nm^[11]。由于甲醇在 200 nm 处存在末端吸收, 故使用乙腈作为流动相, 同时采集蒸发光散射检测器数据作对比, 结果表明, 流动相为乙腈-0.1%甲酸(40:60)并使用蒸发光散射检测器时的峰分离度好、基线噪音小。经方法学验证, 该方法线性、精密度、重复性、稳定性、准确度、耐用性均符合要求, 可作为胆益宁片质量控制的方法。

REFERENCES

- [1] 吴抗美. 胆石症的中成药治疗[J]. 中成药, 1995, 18(9): 23-24.
- [2] SUN X R, HUANG S X, QIN L J. Study on Danyining intervention of TNF- α , β -EP and SOD of patient with chronic cholecystitis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2015, 34(11): 2761-2763.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 卫生部药品标准二部第六册[S]. 1997: 56-98.
- [4] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 卫生部中药成方制剂第 19 册[S]. 1998: 12.
- [5] CHEN Y, LI W X, MA L K. Determination of hyodeoxycholic acid in porcine gallbladder powder and menthol ointment by RP-HPLC [J]. Drug Standard China(中国药品标准), 2008, 9(1): 53-55.
- [6] TANG Y J, CHEN Y L, CHEN Q H. Simultaneous determination of hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in Suis Fellis Pulvis by HPLC-ELSD [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2010, 21(6): 651.
- [7] LI Z W, MA Q, YUAN Y S, et al. Determination of hyodeoxycholic acid in porcine gall powder by HPLC with evaporative light-scattering detector [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2005, 11(5): 14-16.
- [8] CHEN Z W, LI Y C, BAO M J, et al. Determination of glycine and taurine in Pulvis Fellis Suis conjugated cholic acid by pre-column derivation on HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(2): 288-290.
- [9] TAN C M, LU J X, WANG Z N. Determination of taurohyodeoxycholic acid and glycohyodeoxycholic acid in Pulvis Fellis Suis by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38(1): 122-125.
- [10] 刘树业, 聂福华, 张明利. 肝胆肿瘤患者血清七种胆汁酸的 HPLC 分析研究[J]. 天津医药杂志, 1994(4): 227-229.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2015: 319.

收稿日期: 2017-01-16

(本文责编: 蔡珊珊)