

# 高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD) 测定小儿清热宁颗粒中胆酸的含量

崔梦丽<sup>1</sup> 刘雅敏<sup>1</sup> 胡春月<sup>1</sup> 崔浩<sup>2</sup> 陈庆<sup>1</sup> 苏梦<sup>1</sup> 朱宝玉<sup>1</sup>

(1 河南中医学院, 郑州, 450046; 2 辅仁药业集团有限公司, 郑州, 450008)

**摘要** 目的:建立小儿清热宁颗粒中胆酸的含量测定方法;方法:样品制备采用甲醇超声 30 min 提取,色谱条件为色谱柱 Venusil XBP C<sub>18</sub>(L)柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-1%冰醋酸溶液(75:25, v/v),流速 1.0 mL/min,柱温为 25 ℃;检测器漂移管温度控制为 40 ℃,载气气体流速为 2.0 L/min,增益为 4。结果:胆酸的工作曲线为  $\lg A = 1.582 \lg C + 2.9729$  ( $r = 0.9994$ ),进样量在 0.502~2.51 μg 范围内呈良好的线性关系,回收率的 RSD 为 1.969 6%。阴性对照无干扰。结论:所建立的含量测定方法专属性强,可用于小儿清热宁颗粒的质量控制。

**关键词** 高效液相色谱-蒸发光散射法;小儿清热宁颗粒;胆酸

## Determination of Cholic Acid in Xiaoer Qingrening Granule by HPLC-ELSD

Cui Mengli<sup>1</sup>, Liu Yamin<sup>1</sup>, Hu Chunyue<sup>1</sup>, Cui Hao<sup>2</sup>, Chen Qing<sup>1</sup>, Su Meng<sup>1</sup>, Zhu Baoyu<sup>1</sup>

(1 Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2 Furen Pharmaceutical Group Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for determination of cholic acid in Xiaoer Qingrening Granule. **Methods:** Samples were prepared by ultrasonic extraction of methanol for 30 min. Venusil XBP C<sub>18</sub>(L) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with methanol-0.1% phosphoric acid solution (75:25, v/v) with the mobile phase at 1.0 mL/min. The temperature of column was set at 25 ℃ and drift tube was 40 ℃. The flow rate of gas was maintained at 2.0 L/min. **Results:** The linearity was obtained from 0.502~2.51 μg ( $r = 0.9994$ ). The average recovery was 100.532 1% with RSD = 1.969 6%. **Conclusion:** The method is specific, and can be used for quality control of Xiaoer Qingrening Granule.

**Key Words** HPLC-ELSD; Xiaoer Qingrening Granule; Cholic acid

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.041

小儿清热宁颗粒是治疗小儿病毒性感冒的常用中成药,具有解热镇痛、提高免疫力等作用,收载于中华人民共和国卫生部药品标准《中药成方制剂》第十二册。由黄芩、板蓝根、金银花、柴胡、羚羊角粉、水牛角浓缩粉、人工牛黄、冰片 8 味药组成<sup>[1]</sup>。目前该药尚无人工牛黄的质量控制标准,仅见于对其中胆红素进行含量测定的研究报告<sup>[2]</sup>,但是胆红素不是解热镇痛抗病毒的有效成分<sup>[3,4]</sup>。人工牛黄的主要成分是胆酸(含量不小于 13%),具有解热镇痛抗炎的作用,是小儿清热宁颗粒的有效成分<sup>[5-7]</sup>,因此,应对胆酸含量建立质控标准。胆酸在小儿清热宁颗粒处方中含量极低,约占 0.06%,而且胆酸结构中不含生色团,紫外吸收波长在 192 nm 左右,用 HPLC 紫外检测进行定量分析时,会出现流动相干扰性大、检测灵敏度低等缺陷。蒸发光检测器其响应值不依赖于样品的光学特

性,而取决于被测物质颗粒的数量和大小,对无紫外吸收或紫外末端吸收的物质具有较高的检测灵敏度<sup>[8]</sup>。因此,本实验研究建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定方中胆酸含量的方法,为小儿清热宁颗粒中人工牛黄的质量控制提供方法和依据。

### 1 材料

1.1 仪器 METTLER AE240 十万分之一天平(德国梅特勒公司);高效液相色谱系统:Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Alltech 3300 蒸发光散射检测器(ELSD);BSA 124S 万分之一天平(赛多利斯科学仪器有限公司);UPD-II-107 型优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司);DHG-9123A 型电热鼓风恒温干燥箱(郑州生元仪器有限公司);KQ-500DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

基金项目:国家科技重大专项(编号:2013ZX09201023)

作者简介:崔梦丽(1990.03—),女,河南郑州人,硕士研究生,研究方向:中药制剂技术与质量控制研究

通信作者:刘雅敏(1960.06—),教授,研究方向:主要从事中药制剂技术与质量控制研究,E-mail:l\_yamin@126.com

1.2 药品 胆酸对照品(购于中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号:100078-200414);小儿清热宁颗粒(河南辅仁堂制药有限公司,批号:201406041、201406012、201405081、201406021、201403122、201404082);无胆酸的阴性样品(自制)。

1.3 试剂 甲醇(DIKMA TECHNOLOGIES IN,批号:50102),冰醋酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20140122),均为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的胆酸对照品 25.10 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,作为储备液;精密吸取储备液 1 mL 置 10 mL 棕色量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,对照品溶液浓度为 0.100 4 mg/mL。

2.1.2 供试品溶液的制备<sup>[9]</sup> 取小儿清热宁颗粒 2 袋,研细,精密称取 4 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL,称重,30 °C 超声(功率 150 W,40 kHz)提取 30 min,放冷,再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液于蒸发皿中,70 °C 水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,定容至 5 mL 容量瓶中,摇匀,制成供试品溶液。

2.1.3 阴性对照品溶液的制备 按小儿清热宁颗粒制备工艺,制备不含人工牛黄的阴性颗粒。精密称取阴性样品,照“2.1.2”项下方法制成阴性对照品溶液。

2.2 色谱条件与系统适应性 ELSD 参数:漂移管温度:40 °C,载气流速:2.0 L/min,增益=4。色谱柱:Venusil XBP<sub>18</sub>(L)柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:甲醇-1%冰醋酸溶液(75:25,v/v);流速:1.0 mL/min;柱温:25 °C;进样体积:20 μL。理论塔板数按照胆酸计算 $\geq 5\ 000$ ,分离度 $> 1.5$ 。

2.3 专属性 分别取“2.1.1”项下制备的对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,注入液相色谱仪,照“2.2”项下色谱条件操作进样,记录色谱图。结果见图 1,显示胆酸峰分离度良好,阴性样品无干扰。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取胆酸对照品溶液 5,8,10,12,15,20,25 μL,依次注入液相色谱仪,照“2.2”项下色谱条件测定,记录峰面积。以胆酸进样量的对数值( $\lg C$ )与峰面积的对数值( $\lg A$ )进行线性回归,得胆酸的工作曲线: $\lg A = 1.582 \lg C +$

2.972 9( $r = 0.999\ 4$ )。

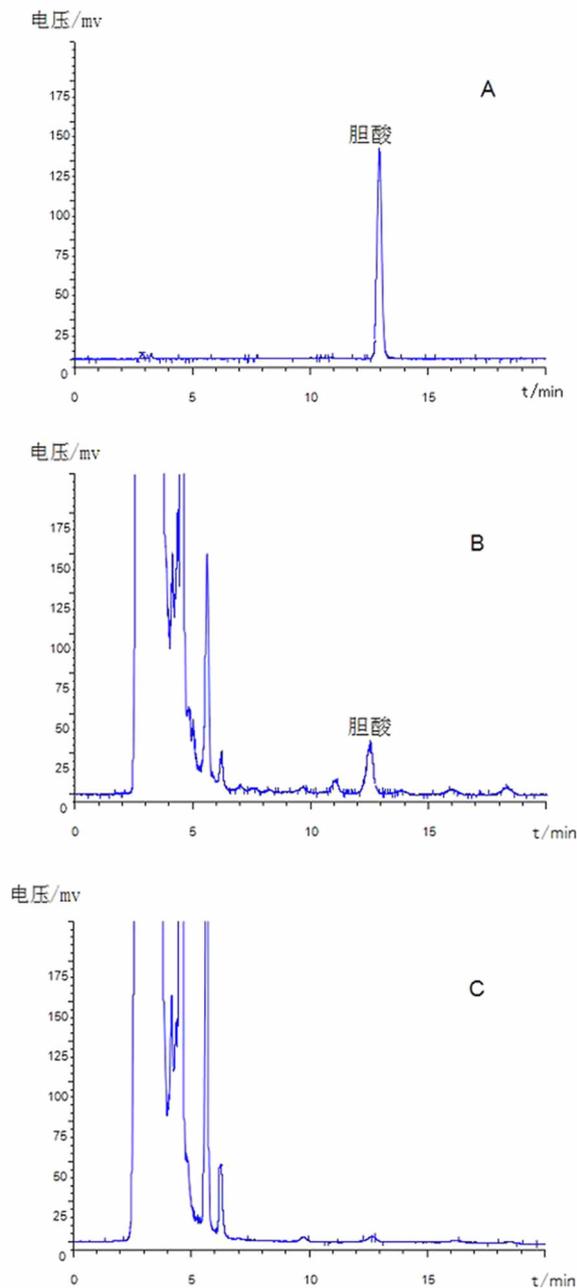


图 1 高效液相色谱-蒸发光散射色谱图

注:A 对照品溶液;B 供试品溶液;C 阴性对照溶液

2.4.2 精密性 精密“2.1.1”项下吸取对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,照“2.2”项下色谱条件进行测定,计算峰面积, $RSD$  值为 0.87%。表明仪器的精密性良好。

2.4.3 稳定性 分别精密吸取胆酸对照品溶液 10 μL、供试品溶液 20 μL,室温放置 0,2,5,8,12,24 h,照“2.2”项下色谱条件进样测定,对照品溶液和供试品溶液峰面积的  $RSD$  值分别为 2.06%,1.69%。表明对照品溶液和供试品溶液在室温情况 24 h 内,溶

液稳定性良好。

2.4.4 重复性 精密称取同一批号(201406021)的小儿清热宁颗粒6份,按照“2.1.2”项下的方法平行制备供试品溶液,照“2.2”项下色谱条件进样测定,计算样品中胆酸含量。小儿清热宁颗粒中胆酸的平均含量为0.046 02 mg/g, RSD值为0.88%。表明本方法重复性良好。

2.4.5 回收率 精密称取同一批已知含量的样品(批号:201406021)9份,每份4 g,分成3组。分别精密加入胆酸对照品溶液1、1.5、2.5 mL,依法制备供试品溶液并测定胆酸含量。计算加样回收率。结果见表1。检测结果表明,回收率的RSD为1.97%,本方法准确度高。

表1 胆酸加样回收率试验

样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
3.980 2	0.183 1	0.100 4	0.286 8	103.30		
4.004 1	0.184 2	0.100 4	0.281 6	97.02		
4.010 3	0.184 5	0.100 4	0.284 1	99.23		
4.009 6	0.184 4	0.150 6	0.333 9	99.24		
4.011 2	0.184 5	0.150 6	0.338 1	101.98	100.53	1.97
3.998 5	0.183 9	0.150 6	0.337 6	102.04		
3.989 9	0.183 5	0.251 0	0.433 6	99.63		
4.000 5	0.184 0	0.251 0	0.440 5	102.18		
4.012 6	0.184 6	0.251 0	0.436 0	100.17		

2.5 样品含量测定 取6个批次的小儿清热宁颗粒,按照“2.1.2”项下方法制备样品,并按“2.2”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算胆酸含量,结果见表2。

表2 样品测定结果

批号	胆酸/(mg/g)	平均值/(mg/g)	RSD/%
201406041	0.046 21		
201406012	0.045 39		
201405081	0.049 08	0.045 41	5.60
201406021	0.046 02		
201403122	0.044 43		
201404082	0.041 30		

### 3 讨论

1)关于从牛黄或复方中提取胆酸制备供试品的方法,文献报道主要有乙酸乙酯超声<sup>[10]</sup>,氯仿超声<sup>[5]</sup>,石油醚超声<sup>[4]</sup>。本实验采用甲醇超声提取与之对照,发现甲醇超声提取率较高。推测原因应当是胆酸在人工牛黄中以胆酸盐形式存在的比例高,甲醇极性大于上述溶剂,因此甲醇的提取率高。实验还比较了超声提取和加热回流2种提取方式,结果证明两者的提取率无明显差异,因此选择操作简

便的超声提取。

2)胆酸分子结构状态受pH的影响。当pH值为4~6时,游离胆酸以离子型和非离子型2种形式存在<sup>[11]</sup>,蒸发光检测器对分子型胆酸有很好的检测灵敏度。有研究者对其研究的复方采用甲醇提取,过中性氧化铝柱<sup>[4]</sup>、水液稀盐酸调节pH至酸性-乙酸乙酯萃取<sup>[12-13]</sup>胆酸等分子态胆酸的富集纯化方法,再用酸性流动相分离检测。本实验采用甲醇超声提取液直接进样,以甲醇-0.1%冰醋酸的酸性系统为流动相,抑制胆酸电离,其检测效果与上述提取纯化供试品无明显差异。本实验采用的这种测定方法可以简化样品制备过程,便于在生产实际中应用。

3)ELSD对检测性能的主要影响在于载气气流流速、漂移管温度和增益<sup>[14-15]</sup>。载气气流流速与基线的稳定性有关,漂移管温度直接决定检测中流动相的挥发性,增益影响检测器对散射光的灵敏程度。实验过程中,分别考察了不同载气气流流速(1.5、2、2.5 L/min),不同漂移管温度(35℃、40℃、45℃、50℃),不同增益(1、2、4、8、16)对响应值及信噪比的影响。综合分析色谱图发现:增益=4,载气气流流速=2.0 L/min,漂移管温度=40℃条件时,噪声最小,进样分析的峰形良好,基线稳定。

本实验建立的高效液相-蒸发光法测定小儿清热宁颗粒中胆酸含量方法,具有操作方法简捷,分析条件易于精确控制,待测成分易于分离等优点,且通过上述方法学考察,证明此方法具有较好的重现性和较高的精密度。

### 参考文献

- [1]徐荣,沈鸿,高英杰,等.小儿清热宁颗粒的主要药效学研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(6):38-40.
- [2]王宁,肖燕.高效液相色谱法测定小儿清热宁颗粒中胆红素的含量[J].现代中西医结合杂志,2008,17(24):3756-3757.
- [3]蔡红娇,汪世元,刘烈刚,等.体外培育牛黄耐缺氧和清除自由基作用的研究[J].中药药理与临床药理,2003,19(6):20-22.
- [4]何羽.紫外-可见分光光度法测定桂蒲肾清片中胆酸的含量[J].北方药学,2014,11(2):5-7.
- [5]国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [6]曹贵方,李培峰.牛黄胆酸的解热镇痛作用及其作用机理的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2006.
- [7]李霞,于庆海,艾朋,等.人工培植牛黄抗炎作用及其机制的初步探讨[J].沈阳药科大学学报,2000,17(6):431-433.
- [8]纪祥娟,王军,杨新光,等.蒸发光散射检测器的应用概况及检定方法研究进展[J].计量与测试技术,2014,41(5):50-53.
- [9]李贵本,刘珊珊,李振国.HPLC-ELSD同时测定清开灵注射液胆酸和猪去氧胆酸[J].中医研究,2013,26(11):72-75.

(下接第909页)

### 3 小结

本文参考了历代主要本草文献,结合柴胡品种及入药部位的变化,探讨了柴胡功效认识的历史演变。笔者认为,《本经》时期应用的柴胡品种已不可考。唐代以后,狭叶柴胡、银州柴胡被认为是柴胡上品,而银柴胡在很长一段时期内亦被当做上品柴胡应用,这有可能成为柴胡出现“补虚劳”功效描述的原因。古来柴胡皆以根入药,清末以来,在长江一线逐流行以全草或地上部分入药。同时期兴起的“柴胡劫肝阴”之说或许与入药部位的改变而造成的有效成分改变有关,但仍需进一步的实验研究。

#### 参考文献

- [1] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:61-62.
- [2] 陶弘景. 本草经集注[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:223-224.
- [3] 唐慎微. 证类本草[M]. 北京:华夏出版社,1993:162-163.
- [4] 张元素. 医学启源[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:95.
- [5] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:785-788.
- [6] 潘胜利,顺庆生,柏巧明,等. 中国药用柴胡原色图志[M]. 上海:

上海科学技术文献出版社,2002:1-2.

- [7] 王年鹤,郭可跃,袁昌齐,等. 银州柴胡钩沉[J]. 中国中药杂志,1992,17(11):643-646.
- [8] 刘晓龙,尚志钧. 银州柴胡的原植物再讨论[J]. 中药材,1994,17(9):40-42.
- [9] 李达,邓中甲,秦凯华,等. 《证类本草》中柴胡的本草学考证[J]. 陕西中医学院学报,2012,35(1):8-10.
- [10] 林玉友. 本草辑要[M]. 北京:中国中医药出版社,2015:61-62.
- [11] 倪朱谟. 本草汇言[M]. 北京:中国古籍出版社,2005:43-45.
- [12] 李春花,刘少琼,罗辉. 柴胡劫肝阴考辨[J]. 四川中医,2011,29(6):37-38.
- [13] 王正公. 论柴胡的品种与其功能、特性的关系[J]. 上海中医药杂志,1964,10(9):27-30.
- [14] 冯宝麟,王琦,赵小桐. 柴胡药用部位的探讨——南柴胡根与茎叶的比较[J]. 山东中医学院学报,1979,3(2):59-62.
- [15] 吴仪洛. 本草从新[M]. 天津:天津科学技术出版社,2003:14-15.
- [16] 刘亚旻,刘新民,潘瑞乐. 柴胡毒性作用研究进展[J]. 中成药,2012,34(6):1148-1151.

(2016-01-04 收稿 责任编辑:王明)

#### (上接第905页)

- [10] 韩杰. HPLC 测定清开灵颗粒中黄芩苷、栀子苷及胆酸、猪去氧胆酸的含量[J]. 中成药,2010,32(2):227-231.
- [11] 马玲云,郑笑为,马双成. HPLC-ELSD 法测定消痔灵片中胆酸的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(2):250-251.
- [12] 熊登科,张安萍,袁铭,等. 高效液相-蒸发光散射法测定小儿降温贴中体外培育牛黄胆酸含量[J]. 医药导报,2009,28(5):662-664.

- [13] 何荣芬. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法同时测定胆汁檳榔维 B1 胶囊中鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸含量[J]. 中国药业,2015,24(15):30-32.
- [14] 肖锋,万明. 蒸发光散射检测器测定黄芪甲苷的参数优化[J]. 湖北中医杂志,2014,36(8):72-73.
- [15] 赵宇新,李曼玲. 蒸发光散射参数对齐墩果酸和菝葜皂苷元的影响[J]. 药物分析杂志,2006,26(9):1245-1247.

(2015-08-05 收稿 责任编辑:洪志强)