

反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定人工牛黄中多组分含量

冯 芳^{*}, 马永建¹, 陈 明, 张正行, 安登魁

(中国药科大学药物分析教研室,¹江苏省防疫站,南京 210009)

摘要 目的:建立人工牛黄中多组分色谱分离条件,并对除无机盐外各成分同时测定进行方法学考察。方法:用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法,蒸发光散射检测器参数:漂移管温度 105 ℃,雾化气体(N₂)流速:2.05 SLP M。结果:在选定色谱条件下,胆固醇、各种胆汁酸及无机盐在室温下可达很好分离,胆酸与猪去氧胆酸的非衍生分离尚属首次。除无机盐外,各物质色谱峰面积与浓度呈良好线性关系($r > 0.998$)。3个浓度水平的回收率测定值为 98.3%~102.4%。进样 20 μL 组分最低检出量为 0.05~0.106 μg。结论:蒸发光散射检测器与高效液相色谱法联用,可使不含生色团物质的分离、分析更为准确、灵敏。可为人工牛黄的质量控制提供更为科学的依据。

关键词 蒸发光散射检测器; 高效液相色谱法; 人工牛黄

人工牛黄是用牛、羊、猪胆汁中提取的有效成分加工而成的,主要成分为胆汁酸、胆固醇、无机盐等^[1]。目前,人工牛黄分析报道是以其中一种或几种成分为指标,方法涉及糠醛比色法^[2],紫外分光光度法^[3,4]和高效液相色谱法^[5,6]。糠醛比色法、紫外分光光度法均需先对样品进行处理,且只能测定其中以胆酸为指标的胆汁酸总量。高效液相色谱法,虽具有分离、分析的优势,但常用检测器(如紫外、荧光检测器等)无法在相同条件下对所有组分产生响应,因而不利于多组分分离条件选择,其分析结果仍不能全面反映人工牛黄的质量。蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering detector, ELSD)是一种新型质量型检测器,在不含共轭结构或无紫外吸收物质分析中的应用具有相当优势,近年来受到人们越来越多的关注。本文首次采用蒸发光散射检测法建立了人工牛黄中无机盐、胆固醇及各种胆汁酸的高效液相色谱分离条件,在此基础上进一步对其其中 5 种成分的同时含量测定进行了方法学考察。

实 验 部 分

1 仪器与试剂

美国 Waters 1510 型高效液相色谱仪,美国 Alltech ELSD 500 型蒸发光散射检测器,杭州英谱

色谱工作站。

胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸对照品(中国药品生物制品检定所),胆固醇(上海生化制药厂),其他试剂均为分析纯,二次重蒸水(自制),人工牛黄(西北制药厂)。

2 色谱条件及分离结果

Waters Nova-Pak C₁₈ 不锈钢色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm),柱温:室温;流动相:甲醇-水-冰醋酸(80:20:0.01),流速:1.0 mL·min⁻¹;ELSD 参数:漂移管温度 105 ℃,雾化气体(N₂)流速:2.05 SLP M(L·min⁻¹)。

在上述条件下进样 20 μL,测得人工牛黄色谱分离图谱如图 1 所示。经对照品添加法确认,胆固醇(cholesterol)、猪去氧胆酸(HDCA)、胆酸(CA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、去氧胆酸(DCA)的出峰时间分别为:11.04, 12.57, 14.22, 25.39 和 27.47 min。1.79 min 色谱峰对应物质在柱上不保留,与人工牛黄中无机盐存在的报道一致^[1]。由于无机盐类型多种,且在同一峰位出峰,无法定量,故以下建立含量测定方法时不予以考虑。

3 线性关系考察

标准溶液的配制:精密称取胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、脱氧胆酸和胆固醇对照品分别为 200, 134, 25, 40 和 22 mg 置于一 250 mL 量瓶中,甲醇 150 mL 为溶剂,超声溶解,进一步稀释、定容。取该溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 和 5.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释制成不同浓度的标准溶液。

收稿日期:1999-06-09

* Tel: (025) 3222881, E-mail: FengFangF@990.net

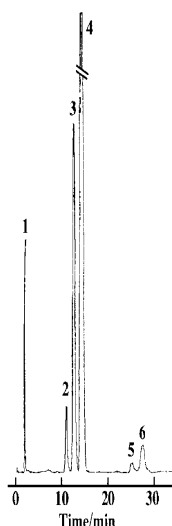


Fig 1 HPLC chromatogram of artificial ox gallstone. 1. Inorganic salts; 2. Cholesterol; 3. Hyodeoxycholic acid; 4. Cholic acid; 5. Chenodeoxycholic acid; 6. Deoxycholic acid.

标准曲线的测定:取各标准溶液 20 μL ,于前述色谱条件下分别进样分析,平行 5 次。以测得的峰面积(A)对浓度($C, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行线性回归,得各组线性方程分别为:

$$\text{CA} \quad A = 91.83 C + 1.6, \quad r = 0.9993;$$

$$\text{HDCA} \quad A = 103.3 C - 35.2, \quad r = 0.9997;$$

$$\text{CDCA} \quad A = 76.25 C + 11.9, \quad r = 0.9983;$$

$$\text{Chol} \quad A = 157.4 C + 4.67, \quad r = 0.9995;$$

$$\text{DCA} \quad A = 85.63 C + 26.92, \quad r = 0.9988.$$

线性范围分别为:胆酸 1.60 ~ 6.41 μg ;猪去氧胆酸 1.07 ~ 4.29 μg ;鹅去氧胆酸 0.18 ~ 0.89 μg ;胆固醇 0.17 ~ 0.69 μg ;脱氧胆酸 0.28 ~ 1.42 μg 。

4 方法回收率

取已知含量的人工牛黄样品适量,分别准确加入已知量的各组分对照品,甲醇为溶剂,配制浓度为高、中、低 3 个水平的溶液,测定加样回收率。结果列于表 1。

5 精密度实验

间隔 0, 1, 3, 5, 7 h 和 0, 1, 2, 3, 4 d, 配制混合标准溶液,进样,考察各组分测定精密度。结果表明:5 组分的日内、日间测定精密度($\text{RSD}, n = 5$) 在 0.5% ~ 1.5% 之间。

Tab 1 Recoveries of components in artificial ox gallstone

Component	Content in sample/ mg	Added / mg	Obtained / mg	Recovery / %
Cholic acid (CA)	29.93	18.10	48.25	101.2
	29.93	30.05	59.97	100.0
	29.93	42.16	71.62	98.9
Hyodeoxycholic acid (HDCA)	10.04	6.11	16.09	99.0
	10.04	10.09	20.26	101.3
	10.04	14.20	24.55	102.2
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	3.14	1.87	4.98	98.6
	3.14	3.13	6.30	101.2
	3.14	4.39	7.64	102.4
Deoxycholic acid (DCA)	5.02	2.98	7.95	98.3
	5.02	5.13	10.24	101.8
	5.02	6.98	11.89	98.4
Cholesterol (Chol)	1.63	0.98	2.59	99.2
	1.63	1.63	3.23	98.4
	1.63	2.28	3.88	98.9

6 最低检测量

以不同浓度标准溶液进样分析,测得进样量 20 μL 时,各物质最低检测量($S/N = 3$)为:胆酸 0.10 μg ,去氧胆酸 0.10 μg ,鹅去氧胆酸 0.11 μg ,猪去氧胆酸 0.09 μg ,胆固醇 0.05 μg 。

7 含量测定

精密称取人工牛黄 70 mg,置 25 mL 量瓶中,以甲醇为溶剂,超声 30 min,使各组分溶解。稀释、定容后过滤,吸取续滤液 20 μL 进样。平行 3 次。将测得的峰面积代入线性回归方程,计算各组分含量:胆酸 5.49%,猪去氧胆酸 3.68%,鹅去氧胆酸 0.72%,去氧胆酸 0.92%,胆固醇 0.595%。

结果与讨论

1 检测器的选择

人工牛黄的高效液相色谱分析,文献报道有紫外分光光度法和柱前衍生-荧光检测法两类。这两类方法都是以胆汁酸为测定指标。采用紫外分光光度法,由于人工牛黄中胆汁酸处于游离态^[5],不含有生色团,因此测定需在短波末端($\leq 210 \text{ nm}$)进行,灵敏度低^[7],一些微量强吸收杂质或溶剂(如甲醇)会产生干扰,影响色谱峰的基线分离^[5,7]。此外,常用有机改性剂、离子抑制剂,如甲醇、醋酸,在此波长区域有很大吸收,不能使用,也限制了色谱分离条件的选择,这也可能正是胆汁酸分离、分析文献中无胆酸和猪去氧胆酸这两种性能相近物质的同时测定报道的缘故。柱前衍生-荧光检测法,虽有较高

灵敏度,但样品需经繁杂处理,测定结果的稳定性、准确性也不满意。蒸发光散射检测法是基于不挥发样品分子对光的散射程度与其质量成正比,与其所含基团性质无关。只要选择适当的检测器参数,便可使流动相和溶剂完全气化,不产生信号,而样品中的各个组分以不挥发粒子存在,对光有散射,被检测。因此,蒸发光散射检测器可用于含不同基团的多组分同时分离、分析。和紫外、荧光等方法相比,蒸发光散射检测法对不同物质有近似相同的响应因子,因而不出现低浓度、高响应或高浓度、低响应的现象,有利于不同比例混合物的准确测定。

2 流动相选择

选用甲醇、水作为流动相基本组成成分。考虑到游离胆汁酸的存在形式易受流动相酸度影响,采用挥发性冰醋酸作为离子抑制剂。考察甲醇—水—冰醋酸(80:20:x)条件下,x值变化对各组分的色谱行为影响,结果见图2。可见冰醋酸量较少时,胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸、去氧胆酸两对物质保留程度相近,不能很好分离。冰醋酸量太大,各成分虽可很好分开,但时间过长(>50 min),色谱峰易变宽、钝,同时基线出现随机毛刺峰,影响定量准确性。甲醇—水—冰醋酸(80:20:0.01)条件较适中,此时流动相在检测器中完全气化,基线噪音小(图1)。冰醋酸量增大,基线噪音增加的原因是流动相不易气化完全。改变检测器参数,仍无法得到满意结果。故实验中采用冰醋酸比例为0.01。

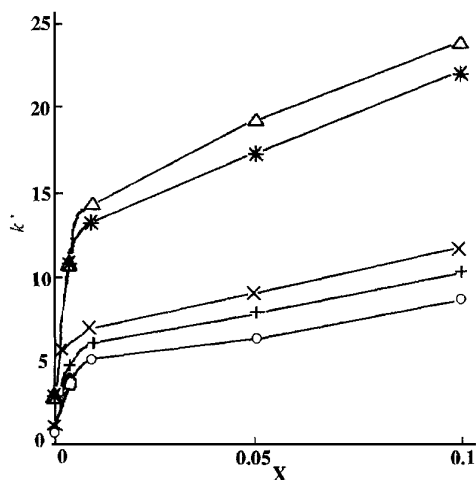


Fig 2 Capacity ratio k' of each component vs proportion x of glacial acetic acid in mobile phase methanol—water—acetic acid (80:20: x). ○—○ Cholesterol; +—+ Hyodeoxycholic acid; ×—× Cholic acid; *—* Chenodeoxycholic acid; △—△ Deoxycholic acid.

3 检测器参数确定

ELSD的参数选择主要有雾化气体流速和漂移管温度^[8]。设定原则是力求得到高信/噪比的结果。以检测器使用手册推荐值为起点,逐步改变漂移管温度或气体流速,观察流动相进入检测器时的基线噪声,发现:温度105℃,气流2.05 SLPM条件下,噪声最小,进样分析,此时信号最强,故确定该条件为测定用条件。与推荐漂移管和气体流速参数比较,本实验设定值更高,这在其他样品分析中也有过。

4 检测灵敏度

胆汁酸类的紫外检测灵敏度很低,使用蒸发光散射检测器可使其检测灵敏度大为提高,与柱前衍生化-紫外检测法相近^[6,9],但本法更为简便、准确。与已有胆汁酸ELSD分析报道^[10]相比,本文建立的实验条件下的测定灵敏度更高。这不仅减少了样品用量,延长柱的使用寿命,同时也改善了色谱峰形,提高了测定灵敏度。

5 柱温

文献报道中,胆汁酸的分离均采用高于室温条件(如37℃^[9,10],50℃^[5]),本文首次采用冰醋酸代替H₃PO₄,HClO₄及NH₄Ac,在室温下即可使各组分很好分离。

参 考 文 献

- 1 崔树德. 中药大全. 第一版. 哈尔滨:黑龙江科技出版社, 1997. 12
- 2 中华人民共和国卫生部药品标准. WS₃-132(Z-122)-98
- 3 张培荣. 分光光度法测定人工牛黄中总胆酸含量. 药物分析杂志, 1992, 12: 350
- 4 曾俐峰, 薛钜枢. 人工牛黄及复方制剂中胆酸的二阶导数分光光度测定. 中国医药工业杂志, 1995, 26: 455
- 5 范广平, 朱静建, 王智华. 25个牛黄样品胆汁酸的多组分含量研究. 中成药, 1996, 18: 39
- 6 倪坤仪, 张国清, 洪惠丰. 胆汁酸类药物的HPLC测定法. 中国药科大学学报, 1989, 20: 22
- 7 Santo S, Umberto C, Marco F, et al. Determination of free bile acids in raw materials and bulk products by HPLC and GC. Anal Lett, 1994, 27: 1789
- 8 邓海根, 曹雨震. 高效液相色谱仪的通用型质量检测器-蒸发光散射检测器. 药物分析杂志, 1994, 14: 61
- 9 Hiroo S, Michiaki S, Noriyuki K, et al. Simultaneous determination of bile acids in rat bile and serum by high performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1993, 621: 123
- 10 Aldo R, Carola C, Partrizia S. Determination of free and amidated bile acids by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering mass detection. J Lipid Res, 1992, (33): 1393

SI MULTANEOUS DETERMINATION OF COMPONENTS IN ARTIFICIAL BEZOAR BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTOR

Feng Fang, Ma Yongjian¹, Chen Ming, Zhang Zhengxing and An Dengkui

(*Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University;*

¹*Jiangsu Province Health Anti-Epidemic Station, Nanjing 210009)*

ABSTRACT **AIM:** To establish a simple reverse phase high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of several components in artificial ox gallstone. **METHODS:** Chromatography was performed on a 5 μm Nova Park C₁₈ steel column (250 mm \times 4.6 mm ID, Waters) at ambient temperature. The mobile phase composition was methanol — water — glacial acetic acid (80: 20: 0.01). The flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹. An evaporative light-scattering detector (ELSD) Model 500 (Alltech, USA) was used as detector, its parameters were set as follows: nitrogen carrier gas flow 2.05 SLPM; drift tube temperature 105 $^{\circ}\text{C}$. **RESULTS:** Complete resolution of cholesterol, free bile acids [especially cholic acid (CA) and hyodeoxycholic acid (HDCA)] and inorganic salts in artificial ox gallstone was obtained for the first time. The method fulfills all the standard requirements of precision, accuracy and linearity. The recoveries of components at three concentration levels were: cholic acid (CA) 98.88% ~ 101.2%, hyodeoxycholic acid (HDCA) 99.02% ~ 102.2%, chenodeoxycholic acid (CDCA) 98.56% ~ 102.4%, deoxycholic acid (DCA) 98.32% ~ 101.8%, cholesterol 98.41% ~ 99.18%. The detection limits for 20 μL injected were CA and DCA 0.10 μg , CDCA 0.106 μg , HDCA 0.09 μg , cholesterol 0.054 μg , respectively. The detectivity of this method for bile acids is higher than that reported. **CONCLUSION:** HPLC, combined with ELSD, can give more accurate and sensitive results for the analyses of those compounds without chromophore. The new method established is more suitable for analyses of artificial ox gallstone.

KEY WORDS evaporative light-scattering detector; high performance liquid chromatography; artificial ox gallstone