

HPLC-CAD 法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸

赵 慧, 姜 玮*

泰州市药品检验院, 江苏 泰州 225300

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱-电雾式检测器(HPLC-CAD)法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸。**方法** 采用 Waters SunFire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液, 进行梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 20 μL; 电雾式检测器, 雾化温度: 35 ℃; 雾率: 1.0; 采样频率: 10 Hz; 过滤常数: 10 s。**结果** 胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸在一定质量浓度范围内线性关系良好, 其平均回收率分别为 102.1%、101.5%、100.9%、101.6%, RSD 值分别为 1.40%、1.87%、1.34%、1.69%。**结论** 本法操作简单, 灵敏度高, 重现性好, 可用于人工牛黄甲硝唑胶囊的质量控制。

关键词: 人工牛黄甲硝唑胶囊; 胆酸; 去氧胆酸; 鹅去氧胆酸; 猪去氧胆酸; 高效液相色谱-电雾式检测器

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)08-1943-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.08.008

Determination of cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, and hyodeoxycholic acid in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules by HPLC-CAD

ZHAO Hui, JIANG Wei

Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 225300, China

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography - charge aerosol detector (HPLC-CAD) method for the determination of cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, and hyodeoxycholic acid in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules. **Methods** A Waters SunFire C₁₈ column (250 mm × 4.6mm, 5 μm) was used in gradient elution with the mobile phase acetonitrile - 0.1% formic acid. The volumetric flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 35 ℃, and injection volume was 20 μL. The detector of CAD was applied with nebulization temperature at 35 ℃, power function value (PFV) at 1.0, collection frequency at 10 Hz, and filter constant at 10 s. **Results** Cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, and hyodeoxycholic acid had good linear relationships within a certain concentration range, with average recovery rates of 102.1%, 101.5%, 100.9%, and 101.6%, respectively, and with RSD values of 1.40%, 1.87%, 1.34%, and 1.69%, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitivity, and reproducible, which is suitable for the quality control for Galculus Bovis and Metronidazole Capsules.

Key words: Galculus Bovis and Metronidazole Capsules; cholic acid; deoxycholic acid; chenodeoxycholic acid; hyodeoxycholic acid; HPLC-CAD

人工牛黄甲硝唑胶囊是常用的中西药复方制剂, 由甲硝唑、人工牛黄和相应的辅料组成, 临床上主要用于治疗急性智齿冠周炎、牙髓炎、局部牙槽脓肿和根尖周炎等^[1]。目前国家食品药品监督管理局标准中仅对人工牛黄甲硝唑胶囊中人工牛黄

中的胆红素进行测定, 对人工牛黄中的胆酸和猪去氧胆酸进行薄层色谱鉴别^[2]。胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸是人工牛黄中含量较高的胆汁酸类成分, 也是其主要有效成分, 胆汁酸类成分直接影响人工牛黄的品质, 因此有必要建立合适

收稿日期: 2025-04-13

基金项目: 江苏省药品监督管理局科研计划项目(202377); 泰州市科技支撑计划社会发展(指导性)项目(46)

作者简介: 赵 慧(1989—), 女, 副主任药师, 硕士, 从事药品质量标准研究。E-mail: yaoxuezh@yeah.net

*通信作者: 姜 玮(1987—), 男, 副主任药师, 硕士, 从事药品质量标准研究。E-mail: 124235088@qq.com

的方法对人工牛黄甲硝唑胶囊中的胆汁酸类成分进行测定,加强制剂的质量控制和安全监管。目前已有文献对人工牛黄甲硝唑胶囊中的胆酸和猪去氧胆酸进行研究^[3]。胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸是具有甾核和羧酸的甾体类化合物,分子结构中缺少共轭基团,仅有末端紫外吸收,使用紫外检测器进行测定大多具有干扰大、响应低、或需衍生化等繁琐前处理等问题。目前大多使用蒸发光检测器、示差检测器、质谱检测器等通用型检测器与高效液相色谱仪联用技术对胆汁酸类成分进行测定^[4-6]。目前已有不少文献使用电雾式检测器(CAD)进行胆汁酸类分析研究,如《美国药典》采用电雾式检测器进行脱氧胆酸的分析研究^[7];有采用 HPLC-CAD 法同时测定猪、羊、牛、熊胆粉中 5 种胆汁酸,结果 CAD 检测器灵敏度较蒸发光散射检测器(ELSD)提高了 3 倍,且线性范围更宽^[8]。本研究建立了 HPLC-CAD 法同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸,为人工牛黄甲硝唑胶囊质量控制提供依据。

1 仪器与材料

UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Corona Veo SD 电雾式检测器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Mettler XSE205DU 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KH-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,质量分数 98.4%,批号 100078-202216),去氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110724-201808,质量分数 100%),鹅去氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110806-202009,质量分数 96.2%),猪去氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100087-201411,质量分数 99.7%);人工牛黄甲硝唑胶囊(规格:每粒含甲硝唑 0.2 g、人工牛黄 5 mg;辅仁药业集团有限公司,批号 2012071、2001101;濮阳市汇元药业有限公司,批号 201202,201107);乙腈(色谱纯,Scharlau),甲酸(色谱纯,Thermo Fisher Scientific),试验用水均为 Milli-Q 纯水系统制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters SunFire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液,进行梯度洗

脱(0~10 min,乙腈 15%~50%;10~15 min,乙腈 50%;15~22 min,乙腈 50%~68%;22~23 min,乙腈 68%~95%;23~33 min,乙腈 95%;33~33.1 min,乙腈 95%~15%;33~43 min,乙腈 15%);体积流量为 1.0 mL/min;柱温 35℃;进样量 20 μL;电雾式检测器,雾化温度:35℃;雾率:1.0;采样频率:10 Hz;过滤常数:10 s。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品贮备液的制备 分别称取胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸对照品适量,精密称定,置量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成含胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸 0.50、0.25、0.15、0.50 mg/mL 的混合对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取人工牛黄甲硝唑胶囊内容物适量,约相当于 4 粒的内容物,置 20 mL 量瓶中,加甲醇适量超声 20 min 使溶解,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 专属性试验

精密吸取溶剂甲醇、混合对照品贮备液和人工牛黄甲硝唑胶囊供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 1。结果表明,色谱图各主峰与其相邻峰之间的分离度均大于 1.5,溶剂和样品中的辅料峰对主成分测定无干扰,且各主峰的理论塔板数均大于 6 000。

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品贮备液 20、10、5、2、1 mL,分别置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。精密吸取各溶液,进样,记录色谱图。以胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制工作曲线,得线性方程,见表 1。

2.5 定量限(LOQ)和检测限(LOD)测定

将最低质量浓度的混合对照品溶液逐级稀释,依次进样测定,按信噪比(S/N)约为 3:1 计算各组分的检测限,按信噪比(S/N)约为 10:1 计算各组分的定量限,结果见表 1。

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液(含胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸 51.17、25.90、15.28、52.93 μg/mL),连续进样 6 次,记录各主峰的峰面积。结果胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸峰面积的 RSD 值分别为 0.75%、0.39%、0.82%、0.46%。

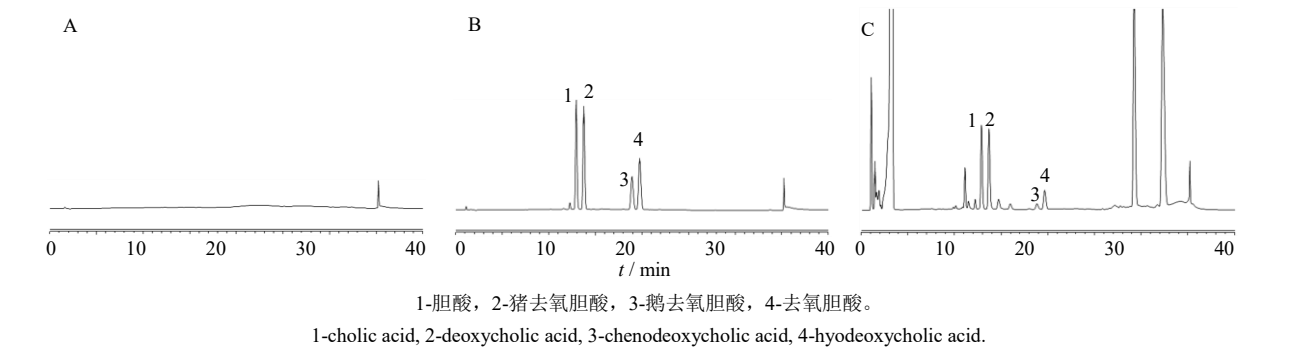


图 1 溶剂甲醇 (A)、混合对照品贮备液 (B) 和人工牛黄甲硝唑胶囊 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution methanol (A), mixed reference substance stock solution (B), and Galculus Bovis and Metronidazole Capsules (C)

表 1 线性关系考察及定量限和检测限测定结果

Table 1 Results of the linear relationship investigation and LOQ and LOD determination

成分	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
胆酸	5.12~102.34	$Y=5.615 X+50.042$	0.996 8	0.134 0	0.040 2
猪去氧胆酸	5.29~105.86	$Y=5.791 X+53.956$	0.996 7	0.202 0	0.060 6
鹅去氧胆酸	1.53~30.57	$Y=9.454 X+12.363$	0.997 4	0.336 0	0.101 0
去氧胆酸	2.59~51.80	$Y=8.316 X+25.111$	0.997 3	0.177 0	0.053 2

2.7 重复性试验

称取人工牛黄甲硝唑胶囊(批号 2001101)6 份,精密称定,分别制备供试品溶液,进样测定胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸的峰面积,结果胆酸,猪去氧胆酸,鹅去氧胆酸和去氧胆酸质量分数的 RSD 值分别为 0.95%、0.86%、1.01%、1.07%。

2.8 稳定性试验

取人工牛黄甲硝唑胶囊(批号 2001101)制备供试品溶液,分别于 0、4、8、12 h 进样分析,记录色谱图各主峰峰面积,结果胆酸、猪去氧胆酸,鹅去氧胆酸和去氧胆酸峰面积的 RSD 值分别为 1.03%、0.79%、0.68%、1.21%,表明人工牛黄甲硝唑胶囊供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 回收率试验

称取胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸对照品适量,配成含成分 0.250、0.250、0.013、0.050 mg/mL 的混合对照品溶液。分别取批号 2001101 人工牛黄甲硝唑胶囊样品 6 份,约相当于 2 粒内容物,置 20 mL 量瓶中,精密加入上述混合对照品溶液 3 mL,加甲醇超声使溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,进样分析,计算回收率,结果胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸的平均回收率分别为 102.1%、101.5%、100.9%、101.6%,RSD 值

分别为 1.40%、1.87%、1.34%、1.69%。

2.10 样品测定

取人工牛黄甲硝唑胶囊样品,每批样品制备 2 份供试品溶液,进样测定,按外标法以峰面积计算胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸的质量分数,结果见表 2。4 批样品中胆酸和猪去氧胆酸的含量较高,鹅去氧胆酸和去氧胆酸的含量较低,并且去氧胆酸的含量略有差异。人工牛黄甲硝唑胶囊的规格为每粒含人工牛黄 5 mg,依此将 4 种胆汁酸按人工牛黄的标示量进行换算,人工牛黄中胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸的质量分数分别为 74~78、72~80、3.8~4.8、4~15.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

表 2 人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和去氧胆酸的测定结果 ($n=2$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$)			
	胆酸	猪去氧胆酸	鹅去氧胆酸	去氧胆酸
2012071	0.380	0.400	0.020	0.078
2001101	0.370	0.390	0.019	0.079
201202	0.390	0.370	0.024	0.021
201107	0.380	0.360	0.023	0.020

3 讨论

3.1 检测条件的优化

由于胆汁酸类含有羧基,具有弱酸性,所以采用 0.1%甲酸作为水相,酸性流动相条件下抑制胆汁酸的电离,使其更容易雾化,形成气溶胶,从而进行检测,同时也改善胆汁酸的色谱峰形,达到良好的分离。CAD 检测器主要有 4 个设置参数,分别是采样频率、滤光常数、雾化温度和雾率,其中采样频率和滤光常数主要影响基线噪音和色谱峰的平滑度,通过调节采样频率和滤光常数,最终确定采样频率为 10 Hz、过滤常数为 10 s。CAD 通过加热使样品雾化,分别设置雾化温度为 35、55 °C 进行研究,结果发现雾化温度对胆汁酸类成分影响较小,由于柱温为 35 °C,为了更好地控制温度,减少温度对响应的影响,因此选择与柱温一致的 35 °C 作为雾化温度。CAD 检测器的线性范围广,但是在低浓度范围内呈线性,在高浓度范围内需要进行一定的对数转换,而雾率就是 CAD 特有的线性校正参数,分别考察 0.9、1.0、1.1 的雾率对 4 种胆汁酸的线性拟合的影响,结果表明随着雾率的增加,4 种胆汁酸的线性拟合越来越好,但是组分的响应越来越低,综合线性拟合和色谱峰响应情况,最终确定雾率设为 1.0。

3.2 提取条件的优化

胆汁酸类成分大多易溶于甲醇,因此选择甲醇作为提取溶剂,通过超声进行提取。分别考察了超声 10、20、30 min 的提取效率,随着时间的延长,胆汁酸峰相应逐渐增大,但超声 20 min 后样品响应几乎不变,因此选择超声 20 min 进行样品提取。

从测定结果可以看出,不同厂家的人工牛黄甲硝唑胶囊中的胆汁酸,如去氧胆酸的含量略有差异。胆汁酸作为人工牛黄中有效成分,是考察人工牛黄质量的重要指标。目前也有文献对人工牛黄甲硝唑胶囊中的胆汁酸进行分析,以此考察制剂中人工牛黄的投料情况和完善制剂的质量标准^[9]。但是目前大部分研究采用蒸发光散射检测器(ELSD)对人工牛黄甲硝唑胶囊中的胆汁酸进行分析,ELSD 检测器易受环境影响,且需采用对数转换进行线性

拟合。CAD 检测器作为一种新型的通用型检测器,具有较高的灵敏度、较宽的线性范围、受环境影响小等特点^[10]。

本研究建立了 HPLC-CAD 法同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸和猪去氧胆酸,建立的方法具有操作简便,专属性强,灵敏度高,线性范围宽,可用于人工牛黄甲硝唑胶囊中人工牛黄的投料情况研究,加强制剂的质量控制,为完善制剂的质量标准提供依据,同时为人工牛黄制剂中胆汁酸的研究提供技术手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张洪凯,石崇,韩冰,等.人工牛黄甲硝唑胶囊联合米诺环素治疗慢性牙周炎的临床研究[J].现代药物与临床,2021,36(7):1462-1466.
- [2] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 WS-10001-(HD-0204)-2002[S].2002.
- [3] 徐陆忠,严莺,周学琴.HPLC-ELSD 法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆酸和猪去氧胆酸的含量[J].医药导报,2015,34(5):658-660.
- [4] 胡晓茹,周若怡,程显隆,等.安宫牛黄丸(体外培育牛黄)中胆酸与牛磺胆酸的含量测定及比例研究[J].药物分析杂志,2017,37(10):1817-1823.
- [5] 何风艳,刘静,何轶,等.HPLC-DAD-ELSD 法同时测定牛黄镇惊丸中 5 个成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(12):2260-2265.
- [6] 程岁寒,张双庆,马灿,等.HPLC-ELSD 法区分小儿氨酚黄那敏颗粒中体外培育牛黄和人工牛黄[J].三峡大学学报:自然科学版,2018,40(6):101-103.
- [7] USP-NF 2024 [S/OL]. 2024. https://doi.org/10.31003/USPNF_M958_05_01/GUID-92A09AA9-B5A9-4B1F-9AD3-A124EEA12239_5_en-US.
- [8] 王一博,王春雨,曲范娜,等.高效液相色谱-电雾式检测器同时测定猪、牛、羊、熊胆粉中 5 种胆汁酸的含量[J].分析化学,2024,42(1):109-112.
- [9] 毕天琛,杨国宁,井改革,等.人工牛黄甲硝唑胶囊质量分析[J].山东化工,2022,51(17):130-131.
- [10] 邹晓伟,刘星,杨佩华,等.电雾式检测器的研究进展及在药物领域中的应用[J].分析测试技术与仪器,2024,30(3):172-188.

【责任编辑 解学星】