

# 液相色谱法测定人工牛黄中六种胆酸类化合物含量

LC-430

**摘要：** 本文参照《人工牛黄国家药品标准修订草案公示稿》中胆酸类化合物含量测定标准，利用岛津液相色谱仪 LC-2040C 3D 联合 ELSD-LT III，分析了人工牛黄中六种胆酸类化合物含量。六种胆酸类化合物线性良好，相关系数大于 0.998，回读值准确度在 91.5~106.9% 之间；检测限在 0.1 ~1.2 mg/L 之间，定量限在 0.4~3.5 mg/L 之间；对照溶液 4 连续进样 6 针，各化合物保留时间和峰面积 RSD 在 0.05~3.01% 之间；六种胆酸类化合物加标回收率在 96.5~113.7% 之间，方法可靠。

**关键词：** HPLC ELSD 人工牛黄胆酸类化合物

## 技术特点：

- ❖ 使用 ShimNex UP C18 色谱柱，牛黄去氧胆酸、甘氨酸分离度大于 1.5，满足系统适用性实验要求。
- ❖ 高灵敏度的 ELSD-LT III，检测限低，线性好，保证结果可靠性。

人工牛黄由牛胆粉、胆酸、猪去氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工制成，具有清热解毒，化痰定惊之功效。常用于痰热谵狂、小儿急惊风、咽喉肿痛等病症的治疗。因其有效成分类似天然牛黄，现已成为天然牛黄的主要替代品，广泛用于药品生产和医疗，并列国家医保品种。

现行《中国药典（2020 年版）》一部人工牛黄品种项下胆酸含量测定使用紫外可见分光光度法检测。在已发布的《人工牛黄国家药品标准修订草案公

示稿》中，胆酸类项目检测方法修订为高效液相色谱法联合蒸发光散射检测器，检测胆酸类牛磺胆酸、牛磺去氧胆酸、甘氨酸、甘氨酸去氧胆酸、胆酸、猪去氧胆酸六个化合物的含量。

本文参照公示稿中胆酸类含量测定标准，利用岛津液相色谱仪 LC-2040C 3D 联合 ELSD-LT III，分析了人工牛黄样品中六种胆酸类化合物含量，结果显示，该方法操作方便，稳定可靠，供相关检测人员参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

液相色谱仪 LC-2040C 3D，配置 ELSD-LT III 蒸发光散射检测器，色谱工作站为 LabSolutions Ver. 5.109。

### 1.2 分析条件

色 谱 柱： ShimNex UP C18 250×4.6 mm I.D., 5 μm  
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 380-01231-49

流 动 相： A- 乙腈； B-0.2% 三氟乙酸水溶液

进 样 体 积： 5 μL 柱 温： 30°C

流 速： 1.0 mL/min 洗 针 液： 甲醇 / 水 =1/1 (v/v)

漂移管温度： 50°C ELSD 增益： 5 (x16)

洗 脱 方 式： 梯度洗脱，B 相初始浓度为 71%，时间程序如表 1 所示。

表 1 时间程序表

洗脱时间 / 分钟	A-乙腈 %	B-0.2% 三氟乙酸水溶液 %
30.00	56	44
45.00	56	44
45.01	29	71
50.00	29	71

### 1.3 标准品配制和样品前处理

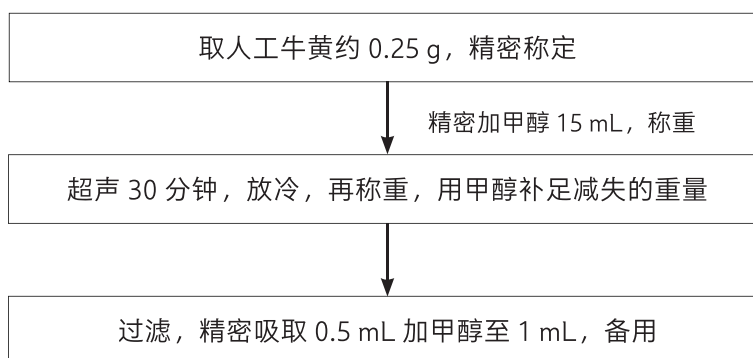
#### 1.3.1 标准溶液配制

精密称取六种胆酸类对照品适量，加适量甲醇超声溶解，定容至 5 ml，配制成标准储备液，再用甲醇稀释成系列对照溶液，系列标准溶液配制如表 2 所示。

表 2 标准溶液配制系列表 (mg/L)

编号	化合物名称	对照 1	对照 2	对照 3	对照 4	对照 5	对照 6	对照 7
1	牛磺胆酸	86.3	259.0	431.6	690.6	863.2	1035.8	1294.8
2	牛磺去氧胆酸	39.1	117.4	195.7	313.0	391.3	469.6	587.0
3	甘氨酸胆酸	77.6	232.8	388.1	620.9	776.1	931.3	1164.2
4	胆酸	76.6	229.7	382.9	612.6	765.7	918.8	1148.6
5	猪去氧胆酸	210.3	631.0	1051.7	1682.7	2103.4	2524.1	3155.1
6	甘氨酸去氧胆酸	43.9	131.8	219.7	351.5	439.4	527.3	659.1

#### 1.3.2 样品前处理



## ■ 结果

### 2.1 系统适用性实验

本实验需要选择合适的色谱柱，实验过程中筛选了 ACCHROM Xaqua C18、ShimNex CS C18、ShimNex HE C18-AQ、Shim-pack GIST、Shim-pack VP-ODS、ShimNex UP C18 这几款色谱柱，其中 ShimNex UP C18 可满足系统适用性实验要求，按照 1.2 中分析条件进行系统适用性实验测定，理论板数按牛磺胆酸峰计算为 35298（标准规定大于 10000）；牛磺胆酸与牛磺猪去氧胆酸分离度为 2.3（标准规定大于 2.0），鹅去氧胆酸与去氧胆酸分离度为 5.4（标准规定大于 1.5），满足系统适用性实验要求。系统适用性实验色谱图如图 1 所示。

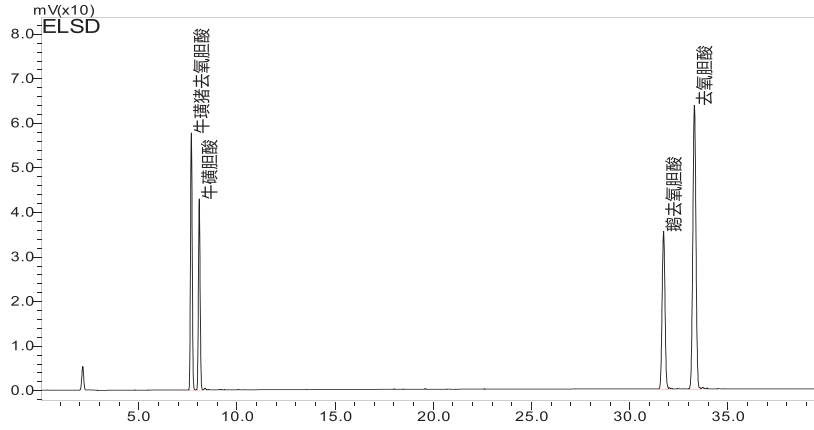


图 1 系统适用性实验色谱图

## 2.2 对照品谱图

按照 1.2 中分析条件，混标中牛磺去氧胆酸、甘氨酸分离度大于 1.5。对照溶液 7 色谱图如图 2 所示。

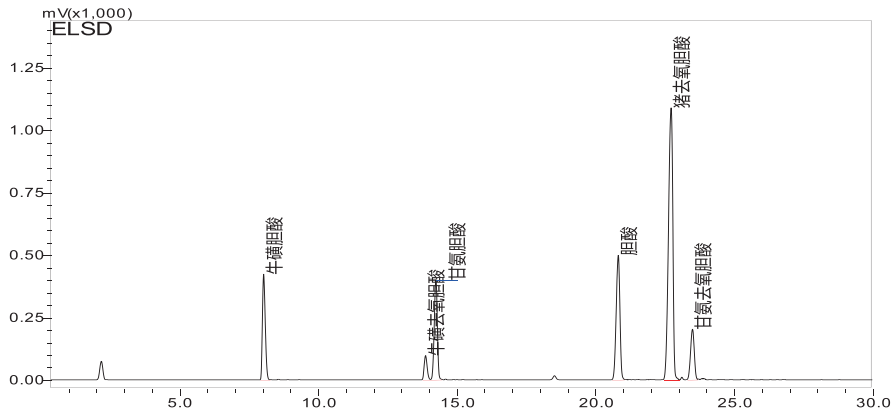
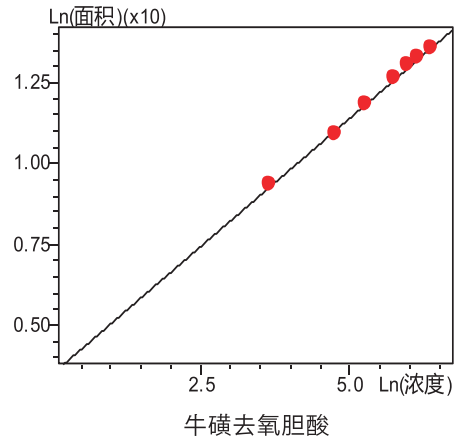
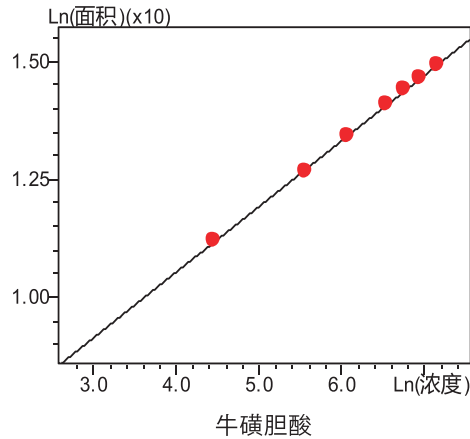


图 2 对照品色谱图

## 2.3 线性关系

按 1.3.1 配制标准系列溶液，按 1.2 条件分析，外标法绘制校准曲线，以浓度对数为横坐标，峰面积对数为纵坐标，各化合物校准曲线见图 3 所示。校准曲线线性关系良好，相关系数大于 0.998。各化合物回读值准确度在 91.5~106.9% 之间。使用 LabSolutions 软件计算检出限和定量限，结果如表 3 所示。



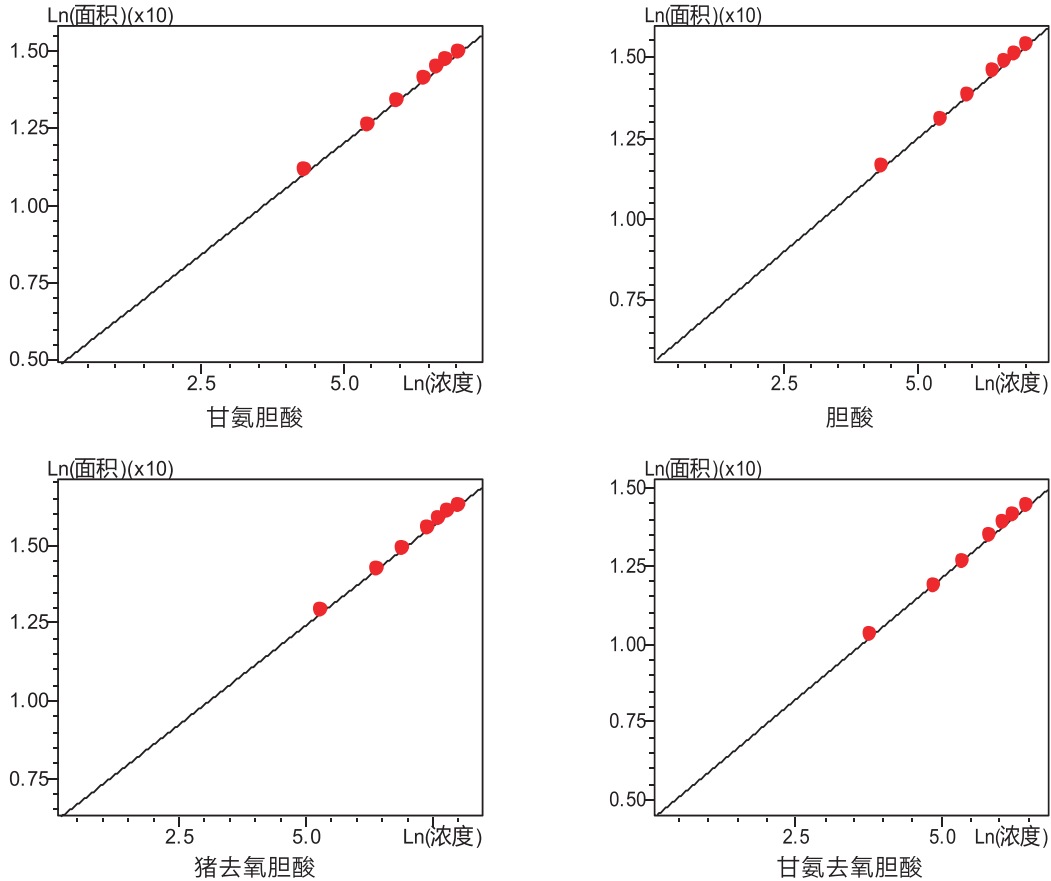


图3 六种胆酸类化合物校准曲线

表3 校准曲线、检出限和定量限结果

编号	化合物	浓度范围 (mg/L)	回读值准确度 (%)	相关系数	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
1	牛磺胆酸	86.3~1294.8	96.2~103.6	0.9998	0.2	0.7
2	牛磺去氧胆酸	39.1~587.0	91.9~106.9	0.9989	1.2	3.5
3	甘氨酸胆酸	77.6~1164.2	93.7~105.6	0.9993	0.3	0.9
4	胆酸	76.6~1148.6	93.5~105.2	0.9994	0.2	0.6
5	猪去氧胆酸	210.3~3155.1	93.8~104.9	0.9994	0.1	0.4
6	甘氨酸去氧胆酸	43.9~659.1	91.5~106.5	0.9989	0.6	1.7

#### 2.4 精密度

取对照溶液4，重复进样6次，各化合物保留时间和峰面积RSD在0.50~3.01%之间，仪器精密度良好，结果如表4所示。

表4 精密度结果 (n=6)

编号	化合物名称	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1	牛黄胆酸	0.15	1.46
2	牛黄去氧胆酸	0.09	1.31
3	甘氨胆酸	0.09	1.69
4	胆酸	0.06	1.66
5	猪去氧胆酸	0.05	0.94
6	甘氨去氧胆酸	0.06	3.01

## 2.5 样品分析

称取人工牛黄样品两份，按照 1.3.2 进行样品前处理，上机测定，样品色谱图如图 4 所示，各化合物含量结果如表 5 所示。

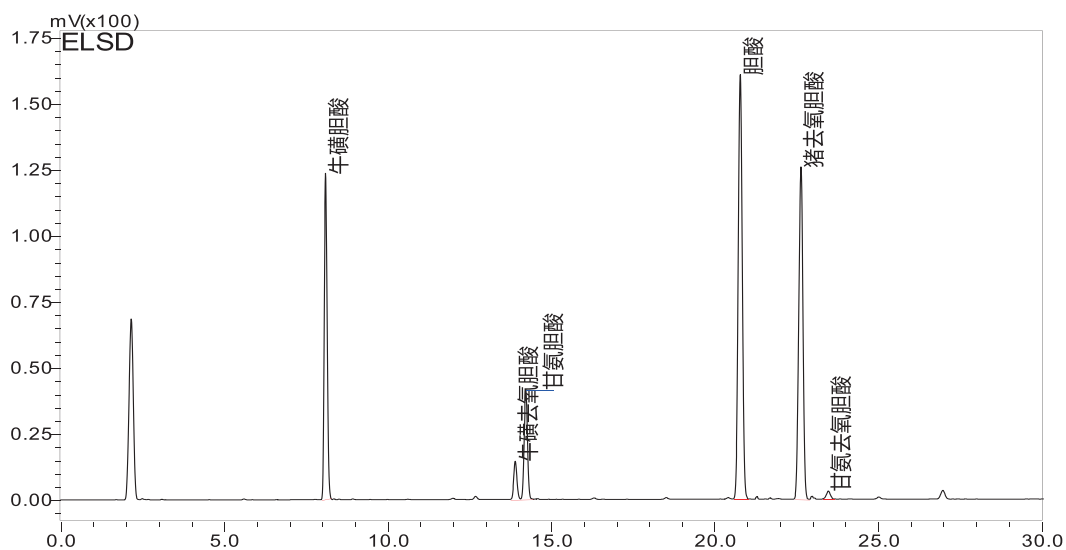


图4 样品色谱图

表4 精密度结果 (n=6)

编号	化合物名称	样品 1 含量 (%)	样品 2 含量 (%)	平均值 (%)
1	牛磺胆酸	5.79	6.02	5.91
2	牛磺去氧胆酸	1.89	1.93	1.91
3	甘氨胆酸	2.68	2.75	2.72
4	胆酸	5.64	5.69	5.67
5	猪去氧胆酸	5.79	5.84	5.82
6	甘氨去氧胆酸	0.49	0.49	0.49

## 2.6 回收率

取人工牛黄样品适量，分别按样品含量的 50%、100%、150% 添加标准品，配制成三个不同浓度的加标样品，按照 1.3.2 进行样品前处理，各化合物加标回收率良好，方法可靠，回收率结果如表 6 所示。

表 6 加标样品回收结果表

#	化合物	浓度 (mg/L)	加标 1			加标 2			加标 3		
			加标量 (mg/L)	测定浓度 (mg/L)	回收率 (%)	加标量 (mg/L)	测定 浓度 (mg/L)	回收率 (%)	加标量 (mg/L)	测定 浓度 (mg/L)	回收率 (%)
1	牛磺胆酸	498.2	214.6	709.8	98.6	429.2	918.0	97.8	643.7	1153.5	101.8
2	牛磺去氧胆酸	161.2	74.3	237.7	103.0	148.6	304.6	96.5	223.0	386.0	100.8
3	甘氨酸	229.0	99.8	331.8	103.0	199.6	437.6	104.5	299.3	555.9	109.2
4	胆酸	478.0	188.4	672.0	103.0	376.8	859.2	101.2	565.3	1099.7	110.0
5	猪去氧胆酸	490.7	230.6	722.7	100.6	461.3	956.0	100.9	691.9	1237.6	108.0
6	甘氨酸去氧胆酸	41.1	18.0	60.6	108.3	36.1	78.0	102.2	54.1	102.6	113.7

## ■ 结论

本文参照《人工牛黄国家药品标准修订草案公示稿》中胆酸类化合物含量测定标准，利用岛津液相色谱仪 LC-2040C 3D 联合 ELSD-LT III，分析了人工牛黄中牛磺胆酸、牛磺去氧胆酸、甘氨酸、甘氨酸去氧胆酸、胆酸、猪去氧胆酸六种胆酸类化合物含量。本实验中色谱柱选择，除了要满足系统适用性实验以外，还要满足牛磺去氧胆酸、甘氨酸分离度要求。高灵敏度 ELSD-LT III，检测限低。该方法适用于人工牛黄中六种胆酸类含量测定。

岛津应用云

