

# HPLC-CAD法测定蛇胆川贝液中主要活性物质的含量

秦旭阳 金燕 Dennis Koehler Sabrina Patzelt , 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

## 关键词:

电雾式检测器、蛇胆川贝液、胆酸、贝母素、高效液相色谱。

## 摘要

本文采用Thermo Fisher Vanquish Core全新高效液相色谱系统, 结合电雾式检测器测定蛇胆川贝液中的主要活性物质胆酸类及贝母素碱类成分。

## 1. 前言

蛇胆川贝液为糖浆剂, 主要是由蛇胆汁、平贝母; 辅料为杏仁水、蔗糖、蜂蜜、薄荷脑等组成的复方制剂, 具有祛风止咳、除痰散结的功效。方中的蛇胆汁和平贝母为主药, 有清热解毒, 化痰镇痉等功效。蛇胆汁的主要活性成分为胆酸类物质, 目前胆酸成分的含量测定多采用薄层法和HPLC法测定。薄层法操作繁琐, 干扰因素较多及重现性差等不足; 而HPLC-UV法(利用紫外末端吸收检测)和HPLC-ELSD法检测稳定性差, 灵敏度较低。方中的平贝母功效的物质基础是其中的甾体生物碱, 对其测定的方法有比色法、滴定法等, 但存在终点不易辨认、灵敏度低等缺点; 而薄层色谱法、柱前衍生化法等也有干扰因素多、样品处理烦琐的局限; 甾体生物碱没有紫外吸收, 无法使用常规的紫外检测器测量。本方法采用赛默飞特色电雾式检测器(CAD), 对蛇胆川贝液中的胆酸类及贝母素类进行检测, 方法操作简便, 结果可靠, 重复性较好, 适合于蛇胆川贝液的质量控制。

## 2. 实验方法

### 2.1 仪器

包括下列模块和组件的Thermo Fisher Vanquish Core高效液相色谱系统:

- Vanquish Quaternary Pump (VC-P20-A)
- Vanquish Autosampler (VC-A12-A)
- Vanquish Column Compartment (VC-C10-A)
- Vanquish solvent monitor (6230.1310-01)
- Vanquish Charged Aerosol Detector H (VH-D20-A)

### 2.2 软件

Chromeleon 7.2.10

### 2.3 试剂

2.3.1 试剂: 乙腈、甲醇、乙酸(色谱级, Fisher), 三乙胺(色谱级, CNW), 氯仿(分析纯, General-Reagent), 去离子水(18.2 MΩ@25°C, Millipore纯水机)。

2.3.2 对照品: 胆酸(≥98%, Sigma), 牛磺胆酸钠(≥95%, Sigma), 贝母素甲(100%, 同田生物), 贝母素乙(97.7%, 中国食品药品检定研究院)

## 2.4 样品前处理

### 2.4.1 对照溶液的制备

取胆酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度为1mg/mL的储备液。

取牛磺胆酸钠对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度为1mg/mL的储备液。

取贝母素甲对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度为50 $\mu$ g/mL的储备液。

取贝母素乙对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度为50 $\mu$ g/mL的储备液。

### 2.4.2 供试品溶液的制备

分别取蛇胆川贝液市售A、B、C、D四个品牌商品，用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤后即得供试品溶液。

## 2.5 色谱条件

色谱柱：Thermo Surfactant 4.6mm  $\times$  150mm, 5 $\mu$ m

流动相：乙腈:0.5%乙酸水溶液（45:55）

流速：1mL/min

进样量：5 $\mu$ L

柱温：35 $^{\circ}$ C

检测器条件：蒸发温度50 $^{\circ}$ C，采集频率5Hz，Filter 3.6s。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 胆酸类物质含量测定方法学的建立

精密量取胆酸储备液适量，用甲醇稀释制成每1mL含有胆酸10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、50 $\mu$ g、100 $\mu$ g、200 $\mu$ g、500 $\mu$ g、1000 $\mu$ g的系列工作溶液；精密量取牛磺胆酸钠储备液适量，用甲醇稀释每1mL含有牛磺胆酸钠5 $\mu$ g、10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、100 $\mu$ g、200 $\mu$ g、500 $\mu$ g、1000 $\mu$ g的系列工作溶液，按2.5项下色谱条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，考察方法的线性关系，检出限、定量限和精密度。实验结果见表1，胆酸和牛磺胆酸钠在其浓度范围内线性良好（图1、图2），相关系数均 $>0.999$ 。方法灵敏度较高，胆酸和牛磺胆酸钠的检出限分别为4 $\mu$ g/mL，3 $\mu$ g/mL（图3）。

精密量取胆酸储备液适量，用甲醇制成50 $\mu$ g/mL的对照品溶液，连续进样6次，结果胆酸峰面积的RSD为0.18%；精密量取牛磺胆酸钠储备液适量，用甲醇制成100 $\mu$ g/mL的对照品溶液，连续进样6次，结果牛磺胆酸钠峰面积的RSD为0.77%，表明方法精密度良好。

表1 方法的线性关系，检出限、定量限和精密度

对照品	线性方程	线性范围 ( $\mu$ g/mL)	R <sup>2</sup>	LOD / LOQ ( $\mu$ g/mL)	%RSD (n=6)
胆酸	$Y=0.0929+0.0270x+x^2$	10~1000	0.9998	4 / 10	0.18
牛磺胆酸钠	$Y=0.0263+0.0055x+x^2$	5~1000	0.9995	3 / 5	0.77

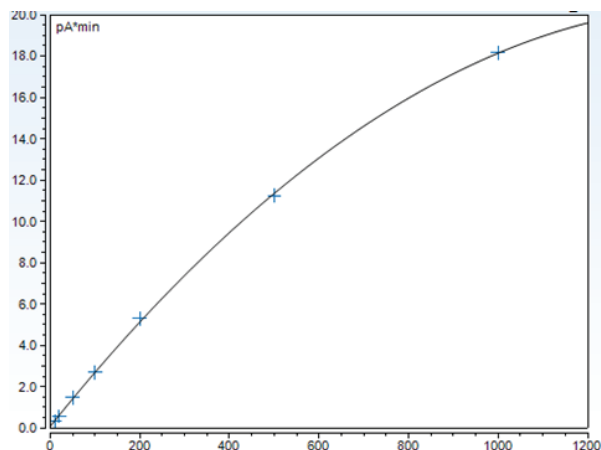


图1 胆酸线性关系图

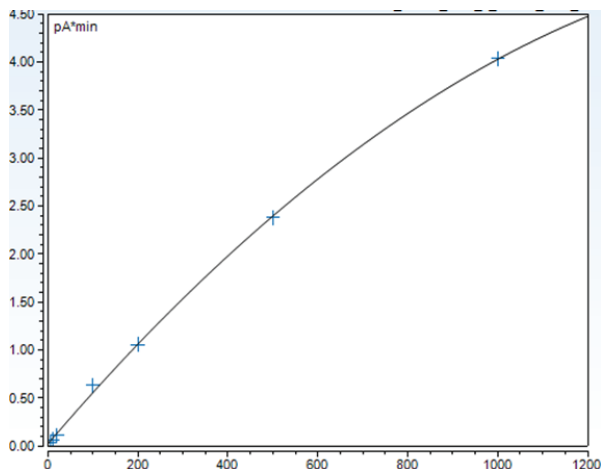


图2 牛磺胆酸钠线性关系图

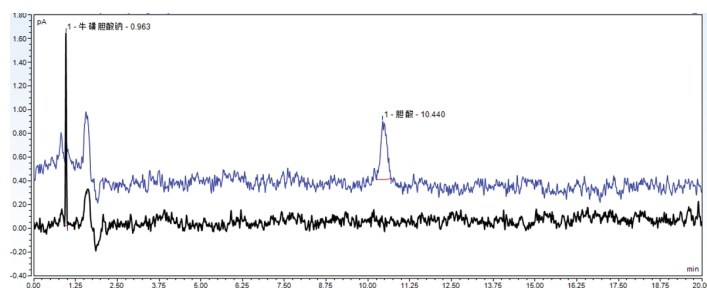


图3 胆酸 (S/N=5) 和牛磺胆酸钠 (S/N=3) 检出限水平分析图谱

### 3.2 样品中胆酸和牛磺胆酸的含量测定

取2.4.2项下A、B、C、D品牌的供试品溶液，按2.5项下色谱条件测试胆酸含量，实验结果表明不同品牌蛇胆川贝液的CAD表征存在较大的差异，如下图4所示。

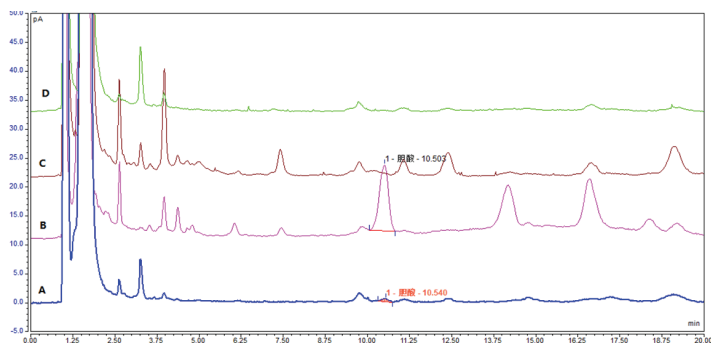


图4 A、B、C、D品牌蛇胆川贝液色谱图

以胆酸含量为指标，样品B中胆酸含量最高，约131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。样品A中胆酸含量极少，已低于检出限浓度，而样品C、D则未检出胆酸（表2）。

蛇胆汁中以牛磺胆酸钠含量最高，约占总胆酸含量的90%以上，因此蛇胆川贝液中胆酸含量较低。而牛磺胆酸钠在CAD检测器上响应很高，在对蛇胆川贝液中牛磺胆酸钠含量测定时，将A、B、C、D供试品溶液稀释100倍后照2.5项下色谱条件测定牛磺胆酸钠含量，结果见表2，可见不同品牌的样品溶液中的牛磺胆酸钠含量差异较大，可能与企业生产工艺和原料来源不同有关。

表2 A、B、C、D品牌蛇胆川贝液中胆酸和牛磺胆酸钠含量

品牌	胆酸含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	牛磺胆酸钠含量( $\text{mg}/\text{mL}$ )
A	< 4	16.67
B	131	5.48
C	未检出	13.32
D	未检出	23.78

供试品溶液经稀释后，可以避免牛磺胆酸钠峰响应过载，还可以避免供试品基质的干扰（图5）。

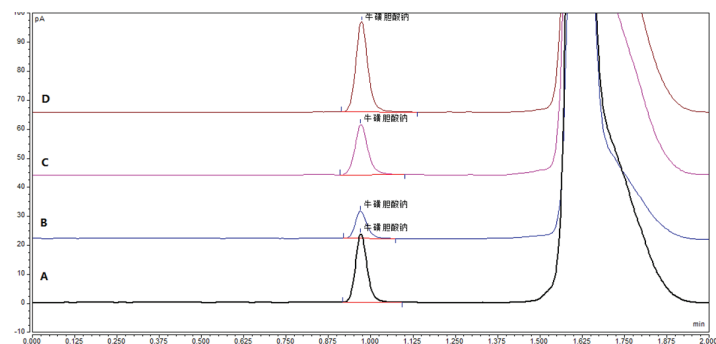


图5 A、B、C、D品牌蛇胆川贝液稀释100倍后的放大色谱图

### 3.3 样品中贝母素甲和贝母素乙的测定

蛇胆川贝液中的贝母素甲与贝母素乙均为生物碱类物质，根据生物碱在碱性条件下易溶于有机溶剂的特点，先将2.4.2项下A、B、C、D品牌的供试品溶液用氨水将样品调至碱性，使生物碱游离出来，再用氯仿提取，制得供试品提取溶液。为延长生物碱在色谱柱的保留，最终选用Thermo Acclaim C18 4.6mm  $\times$  250mm, 5 $\mu\text{m}$ 和碱性流动相进行试验，结果表明各供试品提取溶液中仅C、D品牌能检测出贝母素甲，且含量较低，同时各供试品提取溶液均未检出贝母素乙（图6）。

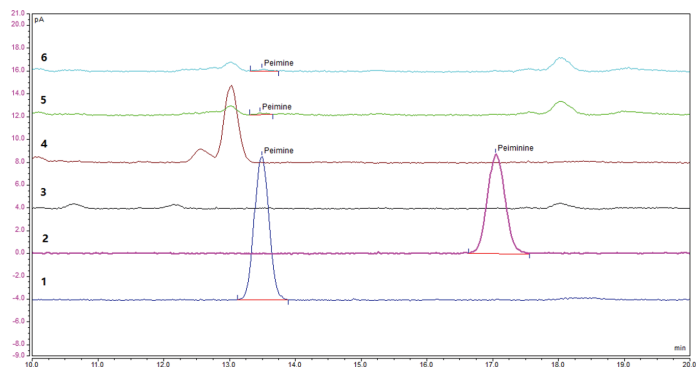


图6 样品中贝母素甲和贝母素乙测定色谱图

（1-贝母素甲对照品溶液50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，2-贝母素乙对照品溶液50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，3-样品A提取液，4-样品B提取液，5-样品C提取液，6-样品D提取液）

## 结论

本文结合Thermo Fisher Vanquish Core全新高效液相色谱系统和CAD检测器，形成了针对蛇胆川贝液中的胆酸类和贝母素类成分的检测方法，样品前处理过程简单，样品分析时间短，有利于提高分析效率。CAD作为一款新型通用型检测器，参数设置较少，较蒸发光检测器使用更简便，灵敏度更高，更利于企业产品质量控制和日常分析检测。



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)