

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.13.011

高效液相色谱法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素含量

李香荷, 王 强, 高燕霞, 张 冬, 郭 毅, 张轶华

(河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 建立测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素含量高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-1%冰醋酸溶液(95:5), 检测波长为 453 nm, 柱温为 30℃, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 5 μL。结果 胆红素质量浓度在 0.442~11.05 μg/mL($r=0.999\ 9$)范围内与峰面积线性关系良好; 平均回收率为 99.45%, RSD 为 1.02% ($n=9$)。结论 该法简便、精密度好、结果准确, 可用于人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素的含量测定。

关键词:人工牛黄甲硝唑胶囊; 胆红素; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2; R988.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)13-0039-03

Content Determination of Bilirubin in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules by HPLC

LI Xianghe, WANG Qiang, GAO Yanxia, ZHANG Dong, GUO Yi, ZHANG Yihua

(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050011)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the content determination of bilirubin in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules. **Methods** The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-1% acetic acid(95:5), the detection wavelength was 453 nm, the column temperature was 30℃, the flow rate was 1.0 mL/min and the sample size was 5 μL. **Results** The bilirubin showed good linear relationship with peak area in the range of 0.442-11.05 μg/mL($r=0.999\ 9$), the average recovery was 99.45% and RSD was 1.02% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, accurate with good reproducibility, which can be used for the content determination of bilirubin in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules.

Key words: Galculus Bovis and Metronidazole Capsules; bilirubin; HPLC

人工牛黄甲硝唑胶囊主要用于治疗急性智齿冠周炎、局部牙槽脓肿、牙髓炎、根尖周炎等, 具有清热、解毒、祛疾、定惊之功效^[1]。牛黄是方中主药, 胆红素含量是评定人工牛黄其质量的重要指标。2015年版《中国药典(一部)》^[1]人工牛黄项下胆红素的测定方法为紫外-可见分光光度法, 以三氯甲烷为溶剂提取, 毒性较大, 且紫外测定法易受其他药味的干扰, 因此无法应用到牛黄制剂中。而2015年版《中国药典(二部)》尚未收载人工牛黄甲硝唑胶囊质量标准, 国家药品标准^[2]及文献^[3-7]均采用高效液相色谱法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素的含量, 流动相为甲醇-氯仿-1%磷酸, 流动相用到氯仿, 氯仿毒性较大, 对液相色谱的 PEEK 管有侵蚀作用, 且对色谱柱损伤较大。为此, 本研究中参考文献[8-13], 通过试验优化了液相条件。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ULTRASONIC SD 型超声波清洗器(北京中晟铭科技有限公司); Mettler XS205 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

试剂: 胆红素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 100077-200805, 含量为 98.5%, 供含量测定用); 人工牛黄甲硝唑胶囊(批号分别为 366130201,

366130202, 366130202, A 企业; 批号分别为 F201303011, F201303012, F201303013, B 企业), 均为市售品。乙腈(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 二氯甲烷(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 冰醋酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

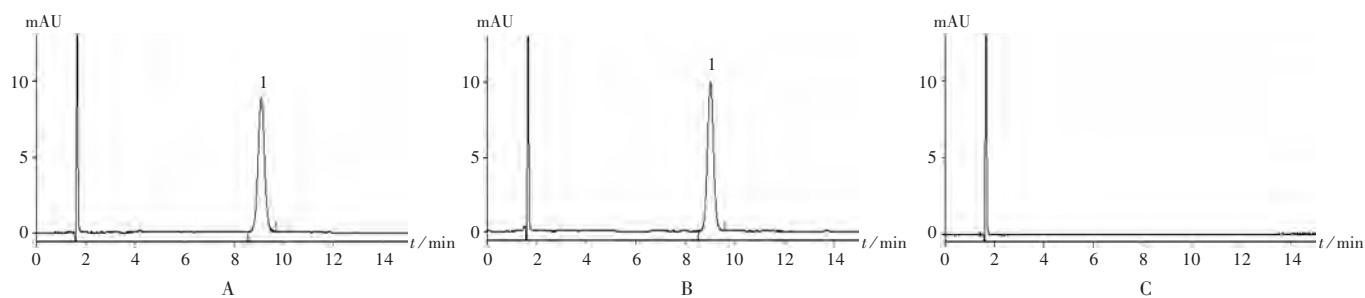
取胆红素对照品适量, 精密称定, 加二氯甲烷制成含胆红素 5.53 μg/mL 的溶液, 得对照品溶液。取本品适量(约相当于人工牛黄 2.5 mg), 精密称定, 置 25 mL 棕色容量瓶中, 加二氯甲烷 20 mL, 冰浴超声 20 min 使溶解, 用二氯甲烷定容, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。按处方比例配制缺人工牛黄的阴性样品, 按供试品溶液方法制备阴性对照品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1%冰醋酸溶液(95:5); 检测波长: 453 nm; 柱温: 30℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5 μL。在此色谱条件下的色谱图见图 1。理论板数以胆红素峰计不低于 2 000, 阴性对照无干扰。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 取胆红素对照品 11.22 mg, 精密称



1. 胆红素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

定,置 100 mL 棕色容量瓶中,加二氯甲烷溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 $110.5 \mu\text{g/mL}$ 对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 分别置 25 mL 棕色容量瓶中,加二氯甲烷定容,摇匀,按拟订色谱条件分别进样,测定峰面积,以质量浓度 ($C, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标、峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 4.7 \times 10^6 C - 5210$ ($r = 0.9999, n = 6$)。结果表明,胆红素质量浓度在 $0.442 \sim 11.05 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.1 项下对照品溶液,按拟订色谱条件连续重复进样 6 次,以峰面积计算。结果的 RSD 为 0.40% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 3661302101)样品,按 2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件分别进样,以峰面积计算。结果胆红素含量为每粒 0.0313 mg , RSD 为 0.50% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性考察:取同一供试品溶液,室温放置,按拟订色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 时进样,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.54% ($n = 8$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:精密称取已知含量同一批号(批号为 366130203)供试品 9 份,分别精密加入低、中、高 3 种质量浓度的胆红素对照品溶液各 3 份,按供试品溶液方法制备,同法测定,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件,对 6 批人工牛黄甲硝唑胶囊样品进行测定,计算胆红素的含量。结果见表 2。

3 讨论

本试验溶剂体系下,在 $300 \sim 600 \text{ nm}$ 波长范围内扫描对照品溶液,结果在 453 nm 波长处有最大吸收,与文献[14]报道结果相同,故确定检测波长为 453 nm 。

文献[3-7]均采用高效液相色谱法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素的含量,流动相为甲醇-氯仿-1%磷酸,流动相用到氯仿,氯仿毒性较大,对液相色谱的

表1 胆红素加样回收试验结果($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
0.0313	0.0121	0.0431	97.52		
0.0313	0.0121	0.0432	98.35		
0.0313	0.0121	0.0433	99.17		
0.0313	0.0302	0.0616	100.33		
0.0313	0.0302	0.0617	100.66	99.45	1.02
0.0313	0.0302	0.0615	100.00		
0.0313	0.0605	0.0919	100.17		
0.0313	0.0605	0.0916	99.67		
0.0313	0.0605	0.0913	99.17		

表2 6批人工牛黄中胆红素含量测定结果($n = 3$)

批号	胆红素含量(mg/粒)	$RSD(\%)$
366130201	0.0313	1.53
366130202	0.0312	1.81
366130203	0.0315	1.62
F201303001	0.0272	1.23
F201303002	0.0270	1.56
F201303003	0.0275	1.60

PEEK 管有侵蚀作用,且对色谱柱损伤较大,文献[8, 11-13]流动相为乙腈-1%冰醋酸溶液(95:5),与本研究一致,试验结果分离效果良好,且峰形对称性好,灵敏度好,重现性、准确性好,满足分析方法要求,流动相易得,毒性较小,对色谱柱性能影响很小。

文献[3, 15]报道的胆红素提取溶剂为氯仿,文献[4-7, 8-10, 12]报道的胆红素提取溶剂除了氯仿和甲醇,还用了盐酸、磷酸、草酸等作为解离剂。人工牛黄中只含有脂溶性较强的游离胆红素,包括 IXa, IIIa 和 XIIa 3 种异构体,不溶于水,溶于二氯甲烷、三氯甲烷、苯和二硫化碳等有机溶剂中,而天然牛黄中除了含游离胆红素,还有结合胆红素和共价胆红素,需将后两者全部解离为游离胆红素才能测定,多采用盐酸、磷酸、乙酸、草酸等作为解离溶剂,以二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、二甲基亚砜等作为提取溶剂。本试验中,人工牛黄中胆红素为游离胆红素,故不必使用酸溶液作为解离剂,参考文