

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)22-0095-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.22.022



高效液相色谱法同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中甲硝唑和胆红素含量*

陈路¹, 李苗¹, 黄金秋¹, 兰彤², 宫立孟^{1△}

(1. 武汉药品医疗器械检验所·国家药品监督管理局药物制剂质量研究与控制重点实验室, 湖北 武汉 430075;
2. 湖北生物医药产业技术研究院有限公司, 湖北 武汉 430073)

摘要:目的 建立同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中甲硝唑和胆红素含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 1% 醋酸水溶液 - 乙腈(梯度洗脱), 流速为 1 mL/min, 检测波长分别为 449 nm(胆红素)和 320 nm(甲硝唑), 柱温为 30 ℃, 进样量分别为 10 μL(甲硝唑)和 5 μL(胆红素)。结果 胆红素、甲硝唑质量浓度分别在 1.98~13.85 μg/mL 和 20.13~201.28 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.9999, n = 7$); 定量限分别为 0.10 μg/mL 和 0.057 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均不超过 1.0%; 平均加样回收率分别为 99.50% 和 99.76%, RSD 分别为 0.82% 和 0.48% ($n = 9$)。结论 该方法专属性强、精密性好、准确性高、操作简便, 可用于同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中甲硝唑和胆红素的含量。

关键词:人工牛黄甲硝唑胶囊; 甲硝唑; 胆红素; 高效液相色谱法; 含量测定

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

CHEN Lu¹, LI Miao¹, HUANG Jinqiu¹, LAN Tong², GONG Limeng¹

(1. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control · NMPA Key Laboratory for Quality Research and Control of Pharmaceutical Preparation, Wuhan, Hubei, China 430075; 2. Hubei Biological Medicine Industrial Technology Institute Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China 430073)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of metronidazole and bilirubin in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules. **Methods** The chromatographic column was Hypersil BDS C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 1% acetic acid aqueous solution - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 449 nm (bilirubin) and 320 nm (metronidazole) respectively, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL (metronidazole) and 5 μL (bilirubin) respectively. **Results** The linear ranges of bilirubin and metronidazole were 1.98 - 13.85 μg/mL and 20.13 - 201.28 μg/mL ($r = 0.9999, n = 7$) respectively. The limits of quantitation of the above two components were 0.10 μg/mL and 0.057 μg/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were not higher than 1.0%. The average recovery rates of bilirubin and metronidazole were 99.50% and 99.76%, with RSDs of 0.82% and 0.48% respectively ($n = 9$). **Conclusion** This method is specific, precise, accurate and simple, which can be used for the simultaneous determination of metronidazole and bilirubin in Galculus Bovis and Metronidazole Capsules.

Key words: Galculus Bovis and Metronidazole Capsules; metronidazole; bilirubin; HPLC; content determination

* 基金项目:湖北省药品监督管理局科研项目[20200113]。

第一作者:陈路,男,硕士,助理工程师,研究方向为药物质量控制,(电子信箱)hugong68@163.com。

△通信作者:宫立孟,男,硕士,主管药师,研究方向为药物质量控制,(电子信箱)148089391@qq.com。

endotoxin quantification[J]. Innate Immun, 2017, 23(2): 136-146.

[8] MUROI M, OGURA N, MIZUMURA H, et al. Application of a Recombinant Three-Factor Chromogenic Reagent, PyroSmart, for Bacterial Endotoxins Test Filed in the Pharmacopeias[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(12): 2024-2037.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 178.

[10] 张红梅, 方芳, 李祥胜, 等. 甘精胰岛素原料药细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药业, 2022, 31(20): 72-74.

[11] 钱明明, 刘益庆. 动态浊度法检测复方蒲公英注射液细菌内毒素[J]. 中国药业, 2021, 30(4): 53-55.

[12] 范治云, 刘瑞, 赵岩, 等. 碘克沙醇注射液细菌内毒素检查法质量标准修订建议[J]. 中国药业, 2021, 30(22): 82-84.

[13] MALONEY T, PHELAN R, SIMMONS N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection[J]. PLoS Biol, 2018, 16(10): e2006607.

[14] 顾晓勇, 钟金香, 关杰耀, 等. 基于萤光剂需求的中国萤资源保护的迫切性研究[J]. 中国渔业经济, 2021, 2(39): 109-116.

(收稿日期: 2023-01-09; 修回日期: 2023-05-12)

人工牛黄甲硝唑胶囊对急性智齿冠周炎、局部牙槽脓肿、牙髓炎牙根炎疗效较好^[1-2]。该方主要由人工牛黄和甲硝唑组成,其中人工牛黄主要成分有牛磺酸、牛胆粉、胆红素等,有清热解毒、化痰定惊功效^[3-5]。胆红素是制剂质量的评价指标之一。2020年版《中国药典》暂未收录人工牛黄甲硝唑胶囊的质量标准,本品现行标准为《国家药品标准·化学药品地方标准上升国家标准》,其中甲硝唑与胆红素的含量需分别测定,操作烦琐。且测定甲硝唑含量的紫外-可见分光光度法专属性不强,易受辅料等杂质干扰;测定胆红素含量的高效液相色谱(HPLC)法,流动相和提取溶剂均用到了三氯甲烷,其对人体有害,且易挥发,在光照条件下易氧化,分解为剧毒的碳酰氢和氯化氢,作为溶剂对液相流路部分有侵蚀效应^[6]。鉴于此,本研究中建立了同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素和甲硝唑含量的HPLC法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);SK8200HP型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司);XS205型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);CLXXXUVM2型纯水机(瑞士Elga公司)。

1.2 试药

人工牛黄甲硝唑胶囊(企业A 1批,批号为201101;企业B 3批,批号分别为366201191,366210503,366201061;规格均为每粒含甲硝唑200 mg、人工牛黄5 mg);甲硝唑对照品(批号为100191-201808,含量100.0%),胆红素对照品(批号为100077-202009,含量98.8%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:1%醋酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~6.0 min时92%A,6.0~6.1 min时92%A→2%A,6.1~16.0 min时2%A,16.0~16.1 min时2%A→92%A,16.1~22.0 min时92%A);流速:1 mL/min;检测波长:320 nm(甲硝唑)、449 nm(胆红素);柱温:30℃;进样量:10 μL(甲硝唑)、5 μL(胆红素)。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取胆红素对照品适量,精密称定,加二氯甲烷制成含胆红素8 μg/mL的对照品溶液I;取甲硝唑对照品适量,105℃干燥2 h,精密称定,加50%甲醇溶解,制成含甲硝唑0.1 mg/mL的对照品溶液II。

供试品溶液:取样品适量(约10粒,相当于人工牛黄50 mg),精密称定,置50 mL棕色容量瓶中,加提取溶剂[二氯甲烷-甲醇-水-盐酸(90:10:0.3:0.03, V/V/V/V)]30 mL,冰浴超声(功率500 W,频率53 kHz)20 min使溶解,用提取溶剂定容,滤过,取续滤液,作为供试品溶液I。取样品适量(约1粒,相当于甲硝唑200 mg),精密称定,置200 mL容量瓶中,加50%甲醇振荡使溶解并定容,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 mL,置50 mL容量瓶中,用50%甲醇定容,摇匀,作为供试品溶液II。

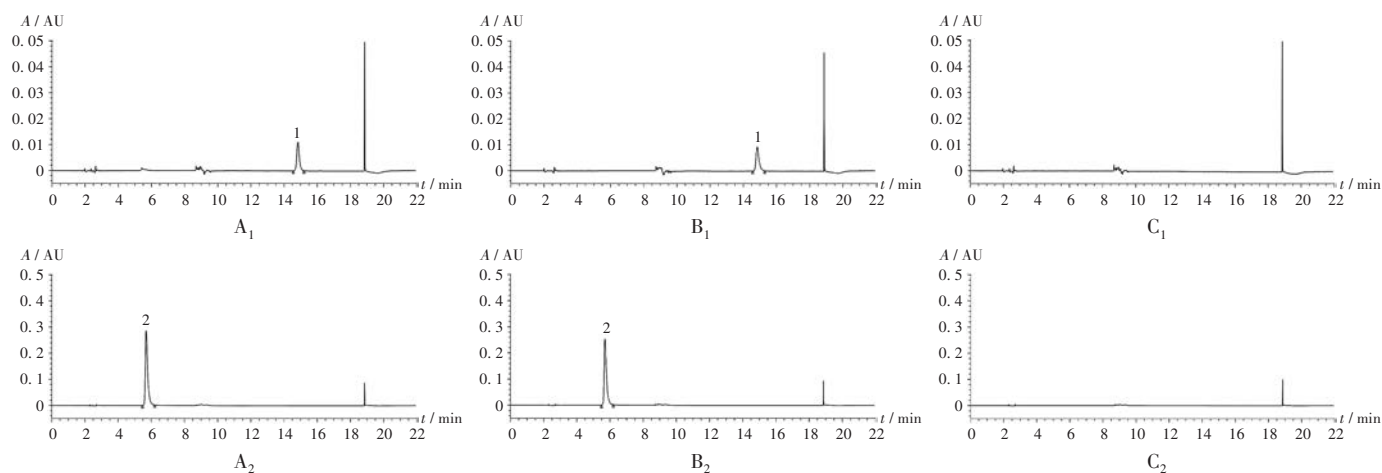
阴性对照品溶液:按人工牛黄甲硝唑胶囊的处方及工艺分别制备缺人工牛黄或甲硝唑的单一阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液I和II。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:取2.2项下6种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱图相应位置处有吸收峰。理论板数按胆红素、甲硝唑峰计均不低于3 000,分离度均大于1.5,基线分离良好,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:取胆红素对照品约10 mg,置100 mL棕色容量瓶中,用二氯甲烷溶解并定容,制成含胆红素98.90 μg/mL的对照品贮备液I,分别量取适量,稀释,制成含胆红素1.98,3.96,5.93,7.91,9.89,11.87,13.85 μg/mL的系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以胆红素质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 25\,474 X_1 + 7\,329$ ($r = 0.999\,9, n = 7$)。结果表明,胆红素质量浓度在1.98~13.85 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。取甲硝唑对照品适量,105℃干燥2 h,精密称定,加50%甲醇溶解,制成含甲硝唑1 006.4 μg/mL的对照品贮备液II,分别量取适量,稀释,制成含甲硝唑20.13,50.32,80.51,100.64,120.77,150.96,201.28 μg/mL的系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以甲硝唑质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_2 = 23\,902 X_2 - 59\,310$ ($r = 0.999\,9, n = 7$)。结果表明,甲硝唑质量浓度在20.13~201.28 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限考察:取线性关系考察项下对照品贮备液I适量,加二氯甲烷稀释,制成含胆红素0.098 9 μg/mL的溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,得胆红素峰的信噪比为9.4,按信噪比10:1计算,胆红素定量限为0.10 μg/mL。取对照品贮备液II适量,加50%甲醇稀



1. 胆红素 2. 甲硝唑

A₁. 对照品溶液 I B₁. 供试品溶液 I C₁. 阴性对照品溶液 I A₂. 对照品溶液 II B₂. 供试品溶液 II C₂. 阴性对照品溶液 II

图1 高效液相色谱图

1. Bilirubin 2. Metronidazole

A₁. Reference solution I B₁. Test solution I C₁. Negative reference solution I A₂. Reference solution II B₂. Test solution II

C₂. Negative reference solution II

Fig. 1 HPLC chromatograms

释,制成含甲硝唑0.040 3 μg/mL的溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,得甲硝唑峰的信噪比为7.1,按信噪比10:1计算,甲硝唑定量限为0.057 μg/mL。

精密度试验:取2.2项下供试品溶液 I 和 II 各适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,计算峰面积。结果胆红素和甲硝唑峰面积的RSD分别为0.42%和0.21%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液 I 和 II 各适量,分别在室温下放置0,4,12,16,18,24 h及0,4,8,12,24,36,48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明,供试品溶液 I 峰面积的RSD为0.82%(n=6),表明其室温放置24 h内稳定性良好;供试品溶液 II 峰面积的RSD为0.40%(n=7),表明其室温放置48 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为201101)内容物适量,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果胆红素、甲硝唑平均含量分别为0.032 mg/粒和101.42%,RSD分别为1.00%和0.31%(n=6)。

加样回收试验:取样品(批号为201101)内容物适量,各9份,精密加入胆红素对照品及甲硝唑对照品适量,按2.2项下方法分别制备胆红素及甲硝唑的供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取B企业3批样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再分别按2.1项下色谱条件及法定方法

表1 加样回收试验结果(n=9)

Tab.1 Results of the recovery test (n=9)

取样量(g)		样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		\bar{X} (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.249 8	0.119 6	166.50	100.98	98.90	80.03	265.05	180.33	99.65	99.15				
1.310 6	0.119 9	174.60	101.17	98.90	80.61	274.52	181.50	101.03	99.65				
1.287 3	0.120 2	171.49	101.53	98.90	81.56	270.62	182.71	100.23	99.53				
1.190 5	0.119 5	158.60	100.96	148.35	100.47	304.79	201.19	98.54	99.76				
1.173 2	0.118 3	156.29	99.86	148.35	99.73	302.43	198.70	98.51	99.11	99.50	99.76	0.82	0.48
1.214 5	0.118 6	161.80	100.08	148.35	98.88	308.76	199.37	99.06	100.41				
1.189 7	0.119 6	158.49	101.02	197.80	120.82	355.98	221.91	99.84	100.06				
1.162 0	0.120 0	154.80	101.27	197.80	121.60	350.66	222.59	99.02	99.77				
1.228 8	0.121 0	163.70	102.20	197.80	124.98	360.83	227.69	99.66	100.41				

注:A为胆红素,B为甲硝唑。

Note:A refers to bilirubin,and B refers to metronidazole.

表2 样品含量测定结果($n=3$)Tab. 2 Results of content determination of bilirubin and metronidazole in samples ($n=3$)

批号	胆红素(mg/粒)		甲硝唑(%)	
	本方法	法定方法	本方法	法定方法
366201191	0.033	0.032	101.42	102.03
366210503	0.032	0.032	99.82	99.12
366201061	0.032	0.031	100.10	99.10

进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 流动相选择

目前,现行标准和文献中规定胆红素的流动相中均含有三氯甲烷^[7-8],且仅针对胆红素的检测。三氯甲烷为易制毒物且对环境污染大,故本研究中对流动相进行优化,采用对环境伤害较小的1%醋酸水溶液-乙腈(5:95, V/V)代替原有含三氯甲烷的流动相,同时兼顾了甲硝唑的检测。经反复试验,本研究中最终在该流动相基础上采用梯度洗脱,2个组分均在合理的时间范围内洗脱。

3.2 波长和溶剂选择

由于甲硝唑和胆红素最大吸收波长相差较大,故采取双波长检测。结合甲硝唑和胆红素扫描图谱和现行标准,确定甲硝唑检测波长为320 nm,胆红素检测波长为449 nm。参考2020年版《中国药典》中甲硝唑胶囊的现行标准,甲硝唑提取溶剂采用50%甲醇。结合胆红素由胆红素蛋白和钙元素聚合而成,难溶于水和有机溶剂^[9-10]。游离胆红素的分子结构为折叠型,故易在二氯甲烷、苯、三氯甲烷等有机溶剂中溶解,为了将结合型胆红素解离转化为游离胆红素,多用酸作为解离剂^[11-12]。故胆红素多用三氯甲烷和酸组合来提取。据报道,在提取溶剂中加入甲醇对样品的渗透性较好,且能提高提取效率^[13-14]。因二氯甲烷毒性低于三氯甲烷,预试验中考察了不同比例二氯甲烷和甲醇的提取效率及参考现行标准,确定了二氯甲烷-甲醇-水-盐酸(90:10:0.3:0.03, V/V/V/V)为提取溶剂。

3.3 进样量选择

预试验中在进样量为10 μ L时,胆红素浓度较高时峰形欠佳,柱效过低,当进样量 ≤ 5 μ L时峰形良好。另外,不同来源的人工牛黄中胆红素含量差异较大,为适应检测需求,将进样量设为5 μ L。

3.4 方法评价

本研究中建立了可同时测定人工牛黄甲硝唑胶囊中甲硝唑和胆红素含量的HPLC法。该方法与制剂法定标准检测结果相近,且改进了甲硝唑的检测方法,优化了胆红素的提取溶剂。所建立的方法准确度高、重复性好,可用于本品中2个有效成分的同时测定与质量控制,也为其他含牛黄制剂的测定提供了参考。

参考文献

- [1] 李香荷,王强,高燕霞,等. 高效液相色谱法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中胆红素含量[J]. 中国药业,2019,28(13):39-41.
- [2] 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.
- [3] 熊婧,郑天骄,石岩,等. 人工牛黄甲硝唑胶囊中主要胆汁酸类成分的HPLC-ELSD法测定研究[J]. 药物分析杂志,2015,35(6):1067-1071.
- [4] 钟胜佳,石岩,熊婧,等. 人工牛黄中牛磺酸成分的含量测定[J]. 中国现代中药,2012,14(9):32-34.
- [5] LIU Y, TAN P, LIU S, et al. A new method for identification of natural, artificial and in vitro cultured Calculus bovis using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Pharmacognosy Magazine, 2015, 11(42):304-310.
- [6] 潘赢,王学涛,王峰. 人工牛黄甲硝唑胶囊评价抽验质量分析[J]. 中国药师,2016,19(8):1603-1605.
- [7] 吴红霞,付锦光. 高效液相色谱法测定西黄片中人工牛黄的胆红素含量测定[J]. 当代医学,2009,15(4):124-125.
- [8] 孙迎春,程卉,刘东风. 两种小儿抗感冒颗粒剂中胆红素含量测定方法的研究[J]. 海峡药学,2022,34(6):48-51.
- [9] 李为,李喜平,张程亮,等. 高效液相色谱法同时测定复方牛黄贴中胆红素和奥硝唑含量[J]. 医药导报,2016,35(10):1101-1104.
- [10] 周绪华,袁启恒,王赞泽,等. 高效液相色谱法测定小儿咽扁颗粒中胆红素含量[J]. 中国药业,2023,32(6):78-81.
- [11] 曹帅,夏晶,杨新华,等. 3种牛黄及安宫牛黄丸中总胆红素含量测定方法的优化[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):329-334.
- [12] 李美芳,刘敏,肖丽和,等. 氨金黄敏颗粒中人工牛黄的胆红素含量测定[J]. 中国药品标准,2021,22(4):367-374.
- [13] 罗亚玲,周娟,齐景梁. 基于高效液相色谱法的牛黄解毒制剂中胆红素含量测定[J]. 成都大学学报(自然科学版),2017,36(1):18-20.
- [14] 段超慧,李强,张冬梅,等. 基于高效液相色谱法的图喜木勒-3蒙药制剂中胆红素含量测定[J]. 中国民族医药杂志,2020,26(1):36-38.

(收稿日期:2022-12-26;修回日期:2023-04-15)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565

网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统