

HPLC 法测定复方制剂中人工牛黄的胆红素含量

陈剑¹, 刘频健¹, 王晓一² (1. 江西九江学院基础医学院, 江西九江 332000; 2. 江西天一药业有限公司, 江西南昌 330029)

摘要 采用高效液相色谱法对复方制剂中胆红素进行含量测定, 经方法学考察, 该方法线性关系、精密度、重现性和稳定性均良好, 经阴性对照试验、回收率试验及 10 批样品测定, 结果表明该方法可行, 专属性好。

关键词 HPLC; 人工牛黄; 胆红素

中图分类号 O657.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)21-09839-02

Determination of Bilirubin Content in Artificial Bezoar in Compound Preparation by HPLC

CHEN Jian et al (School of Basic Medical Sciences, Jiujiang University of Jiangxi Province, Jiujiang, Jiangxi 332000)

Abstract By using high performance liquid chromatography, the content of bilirubin in artificial bezoar in the compound preparation was determined. In the perspective of methodology study, HPLC method had good linear correlation, precision, reproducibility and stability. Through negative control test, recovery rate test and determination of 10 batches of samples, the results showed that the method was feasible and it had good specificity.

Key words HPLC; Artificial bezoar; Bilirubin

许多复方制剂中都含有人工牛黄。人工牛黄主要有效成分为胆红素, 文献中有薄层色谱鉴定^[1], 国标中采用紫外分光光度法测定胆红素含量^[2]。笔者采用高效液相色谱法^[3]对复方制剂中胆红素进行含量测定, 以期为人工牛黄中胆红素含量的测定提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料 Waters 高效液相色谱仪 (515 泵, 2487 检测器, Version4.02 色谱工作站); DH-64 型电热恒温干燥箱; HH-B11-400 型电热恒温培养箱; LMX-90A 型立式生化霉菌培养恒温箱; SXK-103 型净化工作台; LDZX-40II 型立式全自动消毒器; RBY-4 型融变时限检验仪。胆红素对照品 (中国药品生物制品检定所); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯。小儿退热栓, 小儿氨酚黄那敏片, 小儿氨酚烷胺颗粒, 小儿氨咖黄敏颗粒均为市售。

1.2 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇-乙腈-1% 冰醋酸溶液 (82:10:8) 为流动相; 检测波长为 450 nm。理论板数按胆红素峰计算应不低于 1 500。

1.3 对照品溶液的制备 取胆红素对照品 10 mg, 精密称定, 置 200 ml 棕色量瓶中, 加二氯甲烷溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 ml, 置 100 ml 棕色量瓶中, 加二氯甲烷-甲醇 (1:1) 稀释至刻度, 摇匀, 即得 (每 1 ml 中含胆红素 2.5 μg)。

1.4 供试品溶液的制备 取复方制剂品种 (按处方中含人工牛黄量计算相当于 10 mg), 置具塞锥形瓶中, 精密加入二氯甲烷 20 ml, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 500 W, 频率 50 kHz), 放冷, 再称定重量, 用二氯甲烷补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加二氯甲烷-甲醇 (1:1) 稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取滤液, 即得。

1.5 阴性对照试验 取按处方及工艺制备的不含人工牛黄的样品, 按正文中含量测定方法试验。

1.6 阳性对照试验 取生产用人工牛黄, 同供试品溶液制

备方法制成阳性对照溶液。

2 结果与分析

2.1 液相色谱图 胆红素对照品液相色谱图见图 1, 样品液相色谱图见图 2。由图 3 可知, 在胆红素的峰位上未出现色谱峰, 说明阴性对照无干扰。按正文含量测定方法测定, 测得药材中胆红素含量为 3.472 mg/g (图 4)。

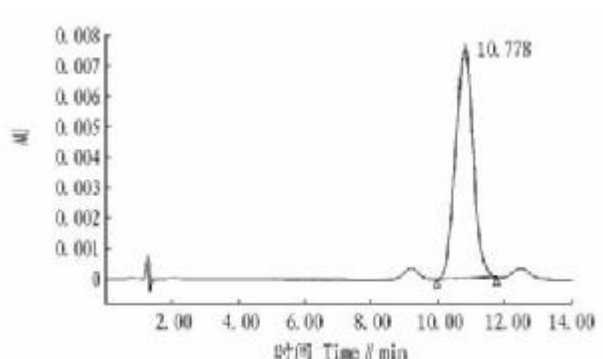


图 1 胆红素对照品液相色谱

Fig. 1 The liquid chromatogram of bilirubin reference substance

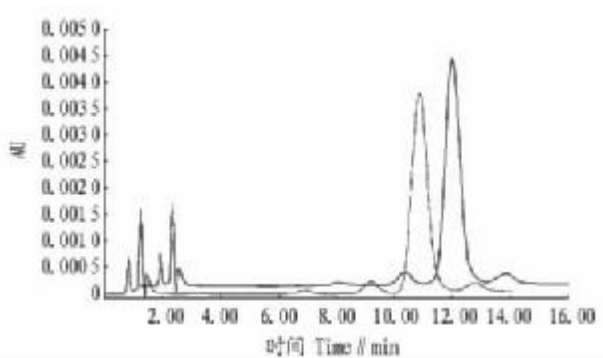


图 2 样品液相色谱

Fig. 2 The liquid chromatogram of samples

2.2 线性关系的考察 标准溶液的制备。精密称取胆红素对照品适量, 加二氯甲烷制成每 ml 含 0.05 mg 的溶液, 再用二氯甲烷-甲醇 (1:1) 制成含 2.5 μg/ml 的对照品溶液, 分别精密吸取上述对照液 10、15、20、25、30 μl, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以胆红素进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。计算回归方程: $Y = 7\,451\,829.79X + 8\,085.6$, $r = 0.999\,4$, 结果表明, 胆红素的进样量在 0.023 5 ~ 0.070 5

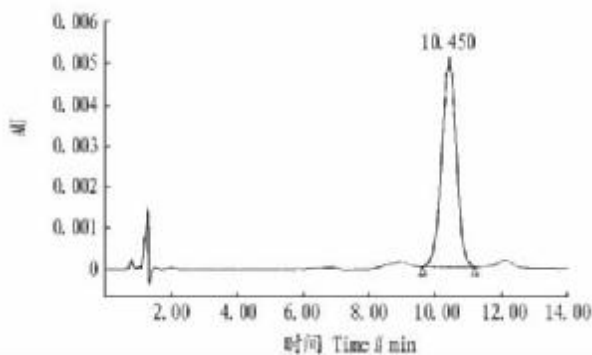


图3 人工牛黄液相色谱

Fig.3 The liquid chromatogram of artificial bezoar

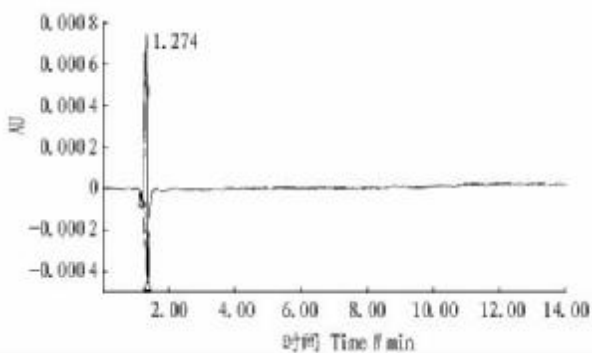


图4 阴性对照液相色谱

Fig.4 The liquid chromatogram of negative control

μg 范围内与峰面积呈线性关系。

2.3 精密度试验 分别精密吸取胆红素对照品溶液 20 μl ，按上述色谱条件，重复进样 5 次，测定峰面积值， $RSD = 0.6\%$ ，结果表明精密度较好。

2.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μl ，按上述色谱条件，分别于制备后 0、1、2、3、4 h 测定， $RSD = 0.39\%$ ，结果表明样品在 4 h 内稳定。

2.5 重现性试验 精密吸取同一批号的供试品溶液 5 份，按含量测定方法分别测定含量，结果表明样品测定重现性好。

2.6 加样回收试验 精密吸取已知含量的供试品溶液共 5 份，分别加入一定量的胆红素对照品溶液，按含量测定方法分别测定，并按下列公式计算回收率，结果见表 1。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{胆红素测得量} - \text{制剂中胆红素量}}{\text{添加胆红素的量}} \times 100$$

(上接第 9833 页)

件。对流动相之比作以下变动：甲醇:0.1% 磷酸缓冲液(三乙胺调 pH 值 6.0)的变化范围为 55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、45:55、40:60、35:75、30:70；柱温的变化范围为 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 。经过初步筛选，以分离程度和峰形为标准，结果表明甲醇:0.1% 磷酸缓冲液(三乙胺调 pH 值 6.0)为 35:65 为流动相，延胡索乙素、原阿片碱与其他成分之间的分离效果最好。

延胡索是陕西汉中发展的重点药材品种，面积和产量都有相当的规模，研究建立同时测定延胡索乙素、原阿片碱的检测方法及测定结果可为陕西延胡索药材生产、加工提供一

表 1 加样回收试验结果

Table 1 The results of addition recovery test

样品中胆红素量/ μg Bilirubin quantity in samples	加入胆红素量/ μg Addition of bilirubin	测得胆红素总量/ μg Total measured amount of bilirubin	回收率/% Recovery
24.189	28.4	52.790	100.71
26.191	28.4	54.483	99.62
26.275	28.4	54.616	99.79
24.488	28.4	52.832	100.80
25.681	28.4	53.808	99.04

3 结论与讨论

(1) 色谱条件的选择中检测波长在该条件下其他峰对胆红素峰无干扰，能达到基线分离。试验中曾比较了甲醇-四氢呋喃-0.5% 醋酸溶液(80:10:10)、甲醇-乙腈-1% 冰醋酸溶液(88:10:2)等流动相系统，并通过不同比例的筛选，最终确定以甲醇-乙腈-1% 冰醋酸溶液(82:10:8)为较佳流动相。

(2) 以二氯甲烷为溶剂制成对照液，胆红素色谱峰变形较严重，根据胆红素的特性，改加二氯甲烷-甲醇(1:1)溶液制得对照液，结果胆红素色谱峰不变形，因此确定用二氯甲烷-甲醇(1:1)溶液制备对照品液。

(3) 供试液的制备方法，比较用二氯甲烷、氯仿进行超声处理，结果以二氯甲烷为溶剂的提取率较高，杂质少，故最后确定加二氯甲烷进行超声提取制备供试液。

(4) 在进行人工牛黄胆红素含量测定时，操作应避免在日光直射环境下，在 4 h 内完成，这样测得的结果较准确^[4]。

(5) 中国药典 2005 版对人工牛黄采用紫外分光光度法测定，由于受其他药品辅料的干扰，测得的结果相差较大。薄层色谱鉴定限于人工牛黄的鉴别。笔者采用高效液相色谱法对人工牛黄中胆红素进行含量测定，经方法学考察，该方法线性关系、精密度、重现性和稳定性均良好，经阴性对照试验、回收率试验及 10 批样品测定，结果表明该方法可行，专属性好。因此可通过测定人工牛黄中胆红素的含量有效控制产品质量。

参考文献

- [1] 王秋生, 翟红, 杨惠民, 等. 复方小儿退热栓中人工牛黄的薄层鉴别[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(9): 435.
- [2] 国家药典委员会. 国家药品标准(新药转正标准第十六至二十六册)[S]. 2002: 119.
- [3] 谢循策, 张随措, 高慧球. 高效液相色谱法测定小儿氨酚黄那敏颗粒中人工牛黄的含量[J]. 医药导报, 2005(7): 629-930.
- [4] 曹流, 孙洽, 曹澜. 人工牛黄中胆红素含量测定的影响因素[J]. 中国卫生工程学, 2005, 4(2): 91-92.

定的数据参考。

参考文献

- [1] 杨云, 冯卫生. 中药化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 149.
- [2] 翟云鹏, 周媛, 邢淑华. 左旋四氢巴马汀对苯丙胺大鼠行为敏感化的影响[J]. 徐州医学院学报, 2002, 22(2): 103.
- [3] 阎清, 舒思洁. 延胡索乙素对大鼠试验性心肌梗死的保护作用[J]. 中国基础医药, 2000, 8(5): 430.
- [4] 陈丽娟, 郭新, 王青梅, 等. 左旋千金藤立定和左旋四氢巴马汀阻遏突触前 D1 受体的反馈调控作用[J]. 中国药理学报, 1992, 13(5): 442.
- [5] 刘泓, 杨亚莉, 范斌. 高效液相色谱法测定延胡索药材中原阿片碱及延胡索乙素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007(7): 9-10.
- [6] 刘迎春, 牛晚扬, 段丽颖, 等. RP-HPLC 法测定不同产地延胡索中延胡索乙素含量[J]. 化学试剂, 2007(2): 97-98.