中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2023)06－0078－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.06.019

高效液相色谱法测定小儿咽扁颗粒中胆红素含量*

周绪华[1]，袁启恒[1]，王赟泽[1]，张德柱[1,2△]，张志鹏[3]

（1. 陕西盘龙药业集团股份有限公司，陕西 商洛 711400；2. 陕西盘龙医药研究院，陕西 西安 710025；
3. 西安国联医药技术有限公司，陕西 西安 710116）

摘要：目的 建立测定小儿咽扁颗粒中胆红素含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱为Scientific Acclaim™ 120 C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为甲醇－三氯甲烷－0.1%磷酸溶液(88∶6∶6，*V*/*V*/*V*)，流速为1.0 mL/min，检测波长为450 nm，柱温为30 ℃，进样量为10 μL。**结果** 胆红素进样量在33.47～133.89 ng范围内与峰面积积分值线性关系良好(*r*=1.000)；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于6%；平均提取回收率为98.77%，*RSD*为7.79%(*n*=9)。**结论** 该方法操作简便，结果准确，专属性强，可用于制剂中体外培育牛黄的含量测定。

关键词：小儿咽扁颗粒；体外培育牛黄；胆红素；高效液相色谱法；含量测定

Content Determination of Bilirubin in Xiao′er Yanbian Granules by HPLC

ZHOU Xuhua[1], *YUAN Qiheng*[1], *WANG Yunze*[1], *ZHANG Dezhu*[1,2], *ZHANG Zhipeng*[3]

(1. *Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shangluo, Shaanxi, China* 711400; 2. *Shaanxi Panlong Pharmaceutical Research Institute, Xi'an, Shaanxi, China* 710025; 3. *Xi'an Guolian Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China* 710116)

Abstract: Objective To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of bilirubin in Xiao′er Yanbian Granules. **Methods** The chromatographic column was Scientific Acclaim™ 120 C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－trichloromethane－0.1% phosphoric acid solution (88∶6∶6, *V*/*V*/*V*), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 450 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of bilirubin was 33.47－133.89 ng (*r*=1.000). The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were lower than 6%. The average recovery of bilirubin was 98.77% with an *RSD* of 7.79% (*n*=9). **Conclusion** The method is simple, accurate and specific, which can be used for the content determaination of *in－vitro*－cultured calculus bovis (ICCB) in the preparation.

Key words: Xiao′er Yanbian Granules; *in－vitro*－cultured calculus bovis; bilirubin; HPLC; content determination

小儿咽扁颗粒有清热利咽、解毒止痛功效，其现行质量标准收载于2020年版《中国药典(一部)》[1]。该药处方中有人工牛黄等8味药材。根据《关于牛黄及其代用品使用问题的通知》(国食药监注[2004]21号)及《关于加强含牛黄等药材中成药品种监督管理的通知》(国食药监注[2012]355号)，经批准，将处方中的人工牛黄改为用等量的体外培育牛黄进行投料。后者具有清心、豁痰、开窍、凉肝、熄风等作用。现代药理学研究表明，牛黄能通过血脑屏障，具有抑制中枢和保护大脑的作用[2]，但现行质量标准中未制定2种牛黄的质量控制方法。胆红素类成分是上述2种牛黄中共有的第一大类成分，也是主要药效成分[3]，为此，本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法检测小儿咽扁颗粒中胆红素的含量，以为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Waters e2695－2489型高效液相色谱仪，包括2489型紫外检测器，Empower 3色谱工作站(美国Waters公司)；Evolution 201型紫外－可见分光光度(UV)计(美国Thermo Fisher公司)；SQP型分析天平(精度分别为千分之一、万分之一、十万分之一)；arium® pro超纯水机(德国Sartorius公司)；KQ－500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2　试药

小儿咽扁颗粒(陕西盘龙药业集团股份有限公司，批号分别为20190503，20190504，20191201，20191202，20191203，20210303，20210305，20210804，20210813，20210814，20210901，20210903，20210904，20210905，20210906，规格均为每袋4 g)；体外培育牛黄原料(陕西

*基金项目：陕西省重点研发计划项目[S2023－YF－YBSF－0271]。

第一作者：周绪华，男，大学本科，药师，研究方向为药物分析，(电子信箱)344436000@qq.com。

△通信作者：张德柱，男，大学本科，主任药师，研究方向为药品研发及质量控制，(电子信箱)569496815@qq.com。

盘龙药业集团股份有限公司，批号分别为200102，201205，210604）；胆红素对照品［中国食品药品检定研究院，批号为100077－202009，含量为98.8%（HPLC法），99.4%（UV法）］；甲醇、磷酸（85%～90%）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[4-5]

色谱柱：Thermo Scientific Acclaim™ 120 C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－三氯甲烷－0.1%磷酸溶液（88∶6∶6，*V*/*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测波长：450 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

取胆红素对照品适量，精密称定，置棕色容量瓶中，加三氯甲烷溶液，制成每1 mL约含6.5 μg的对照品溶液。取样品适量，研细，取约3 g，精密称定，置棕色具塞锥形瓶中，精密加入三氯甲烷－甲醇－水－盐酸（90∶10∶0.3∶0.02，*V*/*V*/*V*/*V*）混合溶液25 mL，称定质量，超声（功率500 W，频率40 kHz；下同）处理20 min，放冷，再次称定质量，用上述混合溶液补足减失的质量，摇匀，经0.45 μm滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按2020年版《中国药典（一部）》中小儿咽扁颗粒处方及工艺，制备缺体外培育牛黄的阴性样品，按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。溶液制备过程均需避光操作。

2.3 方法学考察

专属性试验：取上述3种溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰，且阴性对照无干扰，表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察：取胆红素对照品适量，精密称定，加三氯甲烷溶解并稀释制成质量浓度分别为3.35，5.02，6.69，8.37，10.04，13.39 μg/mL的系列对照品溶液，各取10 μL，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积积分值。以胆红素的进样量（*X*，ng）为横坐标、胆红素峰面积积分值（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y = 5\,696.831X + 3\,416.324$（$r = 1.000$）。结果表明，胆红素进样量在33.47～133.89 ng范围内与峰面积积分值线性关系良好。

检测限与定量限考察：取2.2项下对照品溶液适量，以信噪比（*S*/*N*）为2.17∶1和10∶1时待测成分（胆红素）的进样量记为检测限和定量限。结果分别为0.05 ng和0.91 ng。

精密度试验：取对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积积分值。结果胆红素色谱峰面积积分值的*RSD*为0.55%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批样品（批号为20210305）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，记录峰面积积分值，并计算含量。结果胆红素平均含量为每袋0.254 1 mg，*RSD*为5.12%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

稳定性试验：分别依法制备对照品溶液和供试品溶液，室温下放置0，4，8，16，24，48 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积积分值。结果对照品溶液中胆红素峰面积积分值的*RSD*为1.15%（$n = 6$），表明其在室温下放置48 h内基本稳定；供试品溶液中胆红素峰面积积分值的*RSD*为1.68%（$n = 5$），表明其在室温下放置24 h内基本稳定。

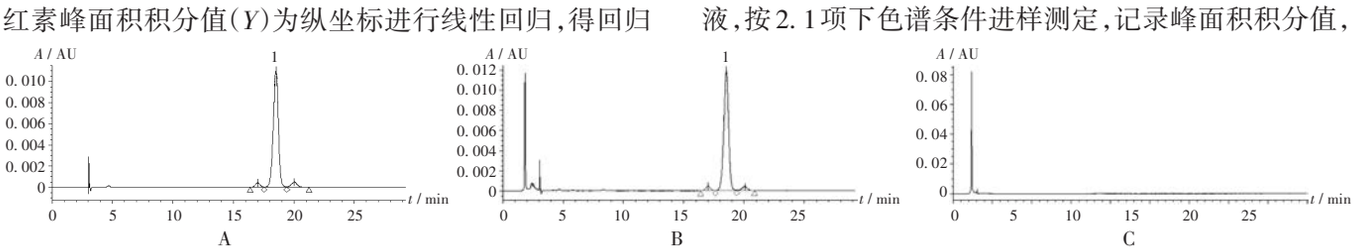
提取回收试验：取阴性样品共9份，分别精密加入含0.095，0.189，0.284 mg的胆红素对照品，按2.2项下方法制备供试品溶液，记录峰面积积分值，并计算提取回收率。结果均在标准规定的80%～115%[6]范围内，详见表1。

2.4 胆红素转移率

取体外培育牛黄适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，测得其中胆红素含量为36.0%。按其含量及处方进行计算，样品中胆红素的转移率为56.92%。

2.5 样品含量测定与限度拟订

取各批样品适量，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，记录峰面积积分值，



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

1. Bilirubin

A. Reference solution　B. Test solution　C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 提取回收试验结果（$n=9$）

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

加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\overline{X}$(%)	RSD(%)
0.094 6	0.080 3	84.88		
0.094 6	0.089 4	94.50		
0.094 6	0.087 1	92.07		
0.189 2	0.180 4	95.35		
0.189 2	0.202 1	106.82	98.77	7.79
0.189 2	0.201 4	106.45		
0.283 8	0.279 7	98.56		
0.283 8	0.299 2	105.43		
0.283 8	0.297 7	104.90		

并计算含量。结果为每袋0.225～0.358 g（以胆红素计，见表2）。考虑批间差异、药材差异等的影响，含量限度暂定为每袋（4 g）小儿咽扁颗粒含体外培育牛黄［以胆红素（$C_{33}H_{36}N_4O_6$）计］不得少于0.214 mg。

表2 样品含量测定结果（mg/袋）

Tab. 2 Results of the content determination of bilirubin in samples (mg/bag)

批号	含量	批号	含量	批号	含量
20190503	0.311	20210303	0.225	20210901	0.227
20190504	0.358	20210305	0.231	20210903	0.225
20191201	0.295	20210804	0.239	20210904	0.255
20191202	0.332	20210813	0.251	20210905	0.232
20191203	0.253	20210814	0.226	20210906	0.247

3 讨论

预试验中，质量浓度为2.26 μg/mL的对照品溶液在190～1 100 nm波长范围内用UV计扫描，结果胆红素在453 nm波长处有最大吸收，但在450～455 nm波长范围内吸收值变化平缓；采用双波长（450 nm和453 nm）检测，未发现色谱峰面积值有明显差异，故参照2020年版《中国药典（一部）》，以450 nm作为胆红素含量测定的检测波长。

2020年版《中国药典（一部）》中十香返生丸、万氏牛黄清心丸、万应胶囊、小儿百寿丸、牛黄抱龙丸、六应丸、西黄丸、安儿宁颗粒、安宫牛黄丸、局方至宝散、珠黄散、梅花点舌丸等制剂品种以胆红素为含量测定指标，进行牛黄类药材（包括牛黄、人工牛黄和体外培育牛黄）的质量控制指标。色谱条件，多采用C_{18}柱，以乙腈－1%醋酸溶液（95∶5，V/V）为流动相（安儿宁颗粒除外），检测波长为450 nm。理论板数按胆红素峰计应不低于3 000。预试验中发现，以乙腈－1%醋酸（95∶5，V/V）为流动相时出现峰形不对称情况，推测为胆红素的3种同分异构体（胆红素Ⅲα、Ⅸα和Ⅻα）不能完全分离（或完全重合）所致[7]。按文献[4－5]所述，选择C_{18}柱，以甲醇－三氯甲烷－0.1%磷酸溶液（88∶6∶6，$V/V/V$）为流动相时，胆红素对照品溶液出现3个色谱峰且峰形较好，推测原因可能为此3种同分异构体可达到基线分离。本研究中还发现，以乙腈－1%醋酸溶液（95∶5，V/V）为流动相、三氯甲烷为溶剂的胆红素对照品溶液，进样量为10 μL时出现明显的溶剂效应，色谱峰分叉，即使减少进样量至5 μL，色谱峰仍有出现肩峰的趋势，且方法的耐用性欠佳。综合考虑后选择甲醇－三氯甲烷－0.1%磷酸（88∶6∶6，$V/V/V$）为流动相，此3种同分异构体能较好地分离。

胆红素是牛黄类药材中的主要成分，多以游离、结合和共价形式存在[8－9]，游离胆红素易通过血脑屏障，产生神经毒性，是牛黄类药材中的限量成分，因此2020年版《中国药典（一部）》中对体外培育牛黄中游离胆红素进行了限量检查，以保证患者的用药安全。体外培育牛黄中胆红素主要以结合胆红素和共价胆红素形式存在，仅极少量为游离胆红素（未超过限量标准）[3,10]。预试验中，采用先加入10%草酸溶液后涡旋混匀，再精密加入水饱和二氯甲烷后超声处理的方法，制得供试品溶液胆红素色谱峰峰面积远小于按拟订方法制备的供试品溶液，推测该提取溶剂和提取方法中，草酸对结合胆红素和共价胆红素的解离及稳定作用有限（24 h内稳定），可能达不到供试品中胆红素被准确检测的效果。其原因可能为制剂成分较复杂，提取溶剂中酸的强度和用量对结合胆红素和共价胆红素的解离作用及稳定性有较大影响。本研究中发现，采用文献[4]中所述的三氯甲烷－甲醇－水－盐酸（90∶10∶0.3∶0.03，$V/V/V/V$）混合液进行超声提取，能较好地将供试品中结合胆红素和共价胆红素解离为游离胆红素的作用。后续试验将上述提取溶剂中盐酸的比例调整为0.02，能较好地满足稳定性试验要求。另外，提取方法开发中还参考文献[11]考察了提取时间和水浴温度的影响情况，最终确定本研究中所述的样品提取与处理方法。

同文献[8－16]报道的情况一致，本研究中出现胆红素不稳定的情况，发现即使无阳光直射，仅在有室内照明灯光存在的环境中处理，供试品溶液在加入提取溶剂的3～5 min内仍会从浅黄色变成绿色，胆红素含量测定结果降低，表明溶液中胆红素已变质。为保证结果的准确性，制备供试品溶液及测定过程中，宜选用棕色瓶且全程避光，或选择光线较暗的环境进行试验。

综上所述，该方法操作简便，结果准确，专属性强，可用于制剂中体外培育牛黄的含量测定。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：181－183，568－569.

[2] 吴 琼，陈凤仪，杨 翠. 小儿咽扁颗粒治疗上呼吸道感染伴热性惊厥的临床效果[J]. 中国医药导报，2019，16（11）：73－76.

[3] 夏 晶，曹 帅，沙祎炜，等. 天然牛黄和体外培育牛黄中不