

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.23.007

高效液相色谱法测定双料喉风散中靛蓝和靛玉红含量

王婷婷, 李 玲, 陈乃江

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要:目的 建立同时测定双料喉风散中靛蓝和靛玉红含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 Phenomenex Luna C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵 (75:25, V/V), 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 289 nm, 进样量为 10 μL。结果 靛蓝、靛玉红的质量浓度分别在 4.52~45.20 μg/mL 和 0.426~4.260 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.999$); 平均加样回收率分别为 98.89% 和 95.55%, RSD 分别为 1.12% 和 1.28% ($n=9$)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可用于双料喉风散的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 双料喉风散; 靛蓝; 靛玉红

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)23-0024-03

Simultaneous Determination of Indigotin and Indirubin in Shuangliaohefeng Powder by HPLC

WANG Tingting, LI Ling, CHEN Naijiang

(Lianyungang Institute for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of indigotin and indirubin in Shuangliaohefeng Powder.

Methods The chromatographic column was Phenomenex Luna C₁₈ reversed-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.02 mol/L ammonium acetate (75:25, V/V), the column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 289 nm and the sample size was 10 μL. **Results** Indigotin and indirubin showed good linear relationship with peak area in the ranges of 4.52-45.20 μg/mL and 0.426-4.260 μg/mL ($r > 0.999$), respectively. The average recoveries were 98.89% and 95.55%, respectively. RSDs were 1.12% and 1.28% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Shuangliaohefeng Powder.

Key words: HPLC; Shuangliaohefeng Powder; indigotin; indirubin

双料喉风散是由人工牛黄、青黛、黄连、珍珠、山豆根等 9 味中药组方的中药复方制剂, 主要用于治疗肺胃热毒炽盛所致咽喉肿痛、口腔糜烂、牙龈肿痛、鼻窦脓肿、皮肤溃烂等症^[1], 收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第十六册)》, 现行质量标准中的检验项目有性状、理化鉴别和散剂检查^[1-2], 无具体成分的定量项, 不能客观地反映双料喉风散的质量。处方中青黛的主要活性成分为靛蓝和靛玉红^[3], 为其主要有效成分, 故被选为测定指标。本研究中参照文献[4-6], 建立了测定双料喉风散中靛蓝和靛玉红含量的高效液相色谱法, 该方法操作简便、准确, 专属性强, 可有效控制该制剂质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司); Sartorius BP211D 型电子分析天平(十万分之一, 德国赛多利斯公司); KH-700DE 型数控超声波清洗器(700 W, 40 kHz, 昆山禾创超声仪器有限公司); 超纯水仪(Milli-Q 公司)。

1.2 试剂

靛蓝对照品(批号为 110716-201612, 纯度为 98.7%), 靛玉红对照品(批号为 110717-201805, 纯度

为 99.6%), 均购自中国食品药品检定研究院; 双料喉风散(市售, 广东嘉应制药股份有限公司, 批号分别为 20170302, 20170406, 20171205, 规格为 2.2 g); 乙酸铵为分析纯, 甲醇和 DMF 为色谱纯, 水为超纯水。

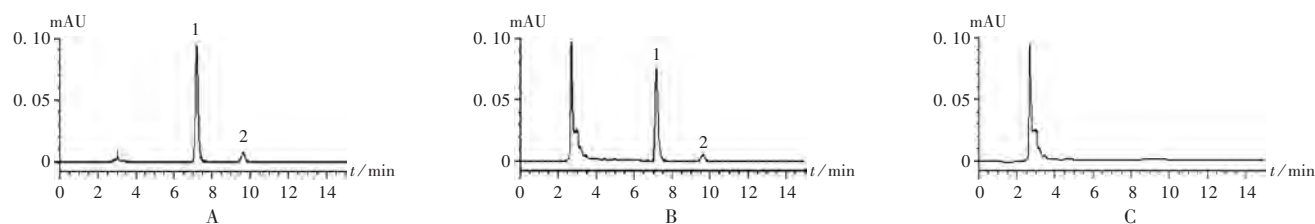
2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵 (75:25, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 289 nm。

2.2 溶液制备

避光操作。称取靛玉红对照品 10.64 mg, 精密称定, 置 100 mL 棕色容量瓶中, 加 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 10 mL 置 100 mL 棕色容量瓶中。称取靛蓝对照品 11.31 mg, 精密称定, 置同一容量瓶中, 加 DMF 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。取样品(批号为 20170406) 约 0.5 g, 精密称定, 置 25 mL 棕色容量瓶中, 加 DMF 适量, 超声处理 20 min, 加 DMF 稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按处方取缺青黛的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。



1. 靛蓝 2. 靛玉红
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 双料喉风散高效液相色谱图

表1 加样回收试验结果($n=9$)

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
557.9	51.37	446.5	42.39	995.6	91.67	98.03	95.07				
556.3	51.21	446.5	42.39	991.3	91.30	97.42	94.57				
559.7	51.53	446.5	42.39	996.2	91.79	97.76	94.98				
559.9	51.55	558.1	52.99	1109	101.6	98.39	94.45				
561.4	51.68	558.1	52.99	1121	103.2	100.27	97.23	98.89	95.55	1.12	1.28
556.2	51.20	558.1	52.99	1118	103.1	100.66	97.94				
564.6	51.98	669.8	63.58	1228	112.2	99.04	94.72				
557.7	51.35	669.8	63.58	1223	112.0	99.33	95.39				
566.0	52.11	669.8	63.58	1230	112.9	99.13	95.61				

注:A为靛蓝,B为靛玉红。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2项下3种溶液各10 μL ,按拟订色谱条件进样测定。结果,供试品溶液色谱图中,靛蓝色谱峰与相邻色谱峰达到了基线分离,阴性对照品溶液在与靛蓝峰、靛玉红峰相同保留时间处无相应色谱峰,阴性对照无干扰。结果见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下混合对照品溶液1,2,4,5,6,8,10 mL,分别置25 mL棕色容量瓶中,加DMF稀释至刻度,摇匀。依次进样,记录色谱图,以对照品质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程, $Y_{\text{靛蓝}} = 60183X - 25168$ ($r=0.9999$, $n=7$), $Y_{\text{靛玉红}} = 63191X - 4404.2$ ($r=0.9997$, $n=7$)。结果表明,靛蓝与靛玉红质量浓度分别在4.52~45.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.426~4.260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液10 μL ,按拟订色谱条件连续进样测定。结果靛蓝和靛玉红峰面积的RSD分别为0.71%和0.86% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20170406),分别于0,2,4,6,8,10,12 h时进样,记录色谱峰面积。结果靛蓝和靛玉红峰面积的RSD分别为1.12%,1.43% ($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

重复性试验:精密称取同一批(批号为20170406)样品,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按拟

订色谱条件进样测定峰面积,计算含量。结果靛蓝和靛玉红的平均含量分别为1.1090 mg/g和0.1021 mg/g, RSD分别为1.04%和1.36% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批样品(批号为20170406)9份,分别置50 mL容量瓶中,每份0.5 g,精密称定,3份1组,分别精密加入2.2项下混合对照品溶液4,5,6 mL。按供试品溶液制备方法制备溶液,进样测定,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取3批样品,依法制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL 进样测定,按拟订色谱条件测定,用外标法计算样品中靛蓝和靛玉红含量。结果见表2。

表2 双料喉风散中靛蓝和靛玉红的含量测定结果(mg/g)

批号	靛蓝	靛玉红
20170302	1.2094	0.1026
20170406	1.1090	0.1021
20171205	1.1219	0.1010

3 讨论

本研究中考察了氯仿、甲醇、DMF作为提取溶剂,超声提取、加热回流提取方法及20,30,40 min超声提取时间对结果的影响,结果表明,采用DMF提取效率最高,超声提取和回流提取所得靛蓝和靛玉红的含量接近,超声提取的样品杂质峰相对较少,超声提取20 min后测定值达到稳定。因超声提取比回流提取更简便,故本研究采用DMF作为提取溶剂,超声提取20 min。