

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.23.019

高效液相色谱法同时测定喉康散中靛蓝和靛玉红含量

李 玲,王婷婷,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 222006)

摘要:目的 建立同时测定喉康散中靛蓝和靛玉红含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.05 mol/L 醋酸铵溶液(75:25, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 289 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 靛蓝和靛玉红质量浓度分别在 5.664~56.640 μg/mL($r=0.999\ 9$)和 0.428 8~4.288 0 μg/mL($r=0.999\ 2$)范围内与峰面积线性关系良好;靛蓝、靛玉红平均回收率分别为 96.28%和 91.55%,RSD 分别为 1.06%和 1.43%($n=6$);精密性、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均低于 2.00%。结论 该方法操作简便,结果准确可靠,专属性强,重复性和稳定性均较好,可用于同时测定喉康散中靛蓝和靛玉红的含量。

关键词:高效液相色谱法;喉康散;靛蓝;靛玉红;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)23-0065-03

Simultaneous Determination of Indigotin and Indirubin in Houkang Powder by HPLC

LI Ling, WANG Tingting, CHEN Naijiang

(Lianyungang Institute for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of indigotin and indirubin in Houkang Powder. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Gemini C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.05 mol/L ammonium acetate solution (75:25, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 289 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of indigotin and indirubin were 5.664~56.640 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.428 8~4.288 0 μg/mL($r=0.999\ 2$), respectively. The average recoveries of indigotin and indirubin were 96.28% and 91.55% with RSDs of 1.06% and 1.43% ($n=6$), respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were lower than 2.00%. **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable, specific, reproducible and stable, which can be used for the content determination of indigotin and indirubin in Houkang Powder.

Key words: HPLC; Houkang Powder; indigotin; indirubin; content determination

喉康散处方来源于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第五册)》,由冰片、硼砂、青黛、玄明

第一作者:李玲,女,硕士,副主任药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)lilinghappy@163.com。

- [2] 姜 畅. 小儿健脾丸治疗小儿厌食症的临床分析[J]. 内蒙古中医药,2018,37(4):24-25.
- [3] 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,2020:552.
- [4] 李湘平,袁樾樾,李 汶. 薄层色谱法定性鉴别胃可舒片中的陈皮、甘草、木香[J]. 中国医药指南,2014,12(10):51-53.
- [5] 王晓斌,郝素平,陈 欢,等. 参芪益气散质量标准的研究[J]. 中成药,2016,38(10):2180-2183.
- [6] 袁小淋,余晓玲,魏丹霞,等. 清热润燥口服液的定性鉴别研究[J]. 中国民族民间医药,2017,26(12):18-21.
- [7] SHIN CY, LEE WJ, LEE EB, et al. Platycodin D and D₃ increase airway mucin release *in vivo* and *in vitro* in rats and hamsters[J]. Planta Med,2002,68(3):221-225.
- [8] LI Y, YILI A, LI J, et al. New isosteroidal alkaloids with tracheal relaxant effect from the bulbs of *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(8): 1983-1987.
- [9] 童晓东,陈志军,杨水英,等. 益视明目颗粒的质量标准研究[J]. 现代中药研究与实践,2016,30(1):42-44.
- [10] ZHANG H, GUO ZM, LI W, et al. Purification of flavonoids and triterpene saponins from the licorice extract using preparative HPLC under RP and TLC mode[J]. J Sep Sci, 2009, 32(4): 526-535.
- [11] 李姝梅. 柴藿颗粒制剂的质量标准研究[D]. 昆明:云南中医药大学,2012.
- [12] 李卫霞. 陈皮的药理分析及临床应用研究[J]. 医学理论与实践,2018,31(10):1521-1555.
- [13] HUANG TM, CHEN NZ, WANG DL, et al. Infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in licorice root[J]. Anal Methods,2014,6(15):5986.
- [14] 汝秋明,韩润淑. 痔瘕止血丸质量标准研究[J]. 中国现代中药,2013,15(6):503-506.
- [15] 陈海云,吴 珺,袁 易,等. 胃肠清口服液的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2012,21(1):28-29.
- [16] 阎雪梅,贾 凡. 扶肾颗粒质量标准研究[J]. 天津中医药大学学报,2011,30(4):234-237.

(收稿日期:2021-07-26)

粉、珍珠层粉等10味中药组方,用于治疗急、慢性咽炎,喉炎,扁桃体炎,口腔溃疡等咽喉疾病^[1]。方中,青黛味咸,性寒,具有清热解毒、凉血消斑、泻火定惊等功效,主要活性成分为脂溶性成分靛蓝和靛玉红^[2-5]。由于市售的青黛药材质量差异大,造假严重,伪劣品较多^[6]。现有质量标准中仅采用薄层色谱法对靛蓝和靛玉红进行定性鉴别,缺乏对制剂中有效成分的含量测定^[1]。本研究建立了同时测定喉康散中靛蓝和靛玉红含量的高效液相色谱法,以改进现有质量评价方法,确保产品质量可控。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),配有 Waters 2998 光电二极管阵列(PDA)检测器,Empower 色谱工作站;Sartorius BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);KH-700DE 型数控超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为700 W,频率为40 kHz)。

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;喉康散(市售,桂林葛仙翁药业有限公司,批号分别为180407,181217,190112);*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和甲醇均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05 mol/L 醋酸铵溶液(75:25, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:289 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。取阴性对照品溶液、对照品溶液和供试品溶液各10 μL,按拟订色谱条件进样测定,理论板数按靛蓝和靛玉红峰计均不低于3 000,拖尾因子均不超过1.5。色谱图见图1。可见,靛蓝与靛玉红及相

邻色谱峰均能完全分离,且阴性对照无干扰。

2.2 溶液制备

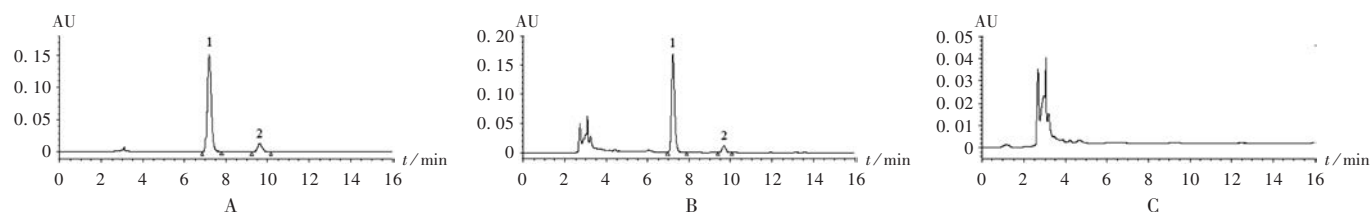
取靛玉红对照品21.44 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加DMF适量,超声(功率为700 W,频率为40 kHz)使溶解,稀释至刻度,摇匀,作为靛玉红对照品贮备液。取靛蓝对照品28.32 mg,精密称定,置200 mL容量瓶中,加DMF适量,超声使溶解,精密量取靛玉红对照品贮备液10 mL,置同一200 mL容量瓶中,加DMF稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取混合对照品贮备液5 mL,置25 mL容量瓶中,用DMF稀释至刻度,摇匀,即得靛蓝和靛玉红质量浓度分别为28.32 μg/mL和2.144 μg/mL的混合对照品溶液。取样品粉末0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入DMF 50 mL,密塞,称定质量,超声提取30 min,放冷,再称定质量,用DMF补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方工艺制备不含青黛的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下混合对照品贮备液1,2,4,5,6,8,10 mL,分别置25 mL容量瓶中,加DMF稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。取上述溶液分别进样测定,以质量浓度(*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: $Y_{\text{靛蓝}} = 5.7856 \times 10^4 X_{\text{靛蓝}} - 5.0488 \times 10^4$, $r = 0.9999$ ($n = 7$); $Y_{\text{靛玉红}} = 6.3657 \times 10^4 X_{\text{靛玉红}} - 6.391 \times 10^3$, $r = 0.9992$ ($n = 7$)。结果表明,靛蓝与靛玉红质量浓度分别在5.664~56.640 μg/mL和0.4288~4.2880 μg/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适量,按2.1项下色谱条件连续进样6次。结果靛蓝和靛玉红峰面积的RSD分别为0.35%和0.68% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为181217)样品,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色



1. 靛蓝 2. 靛玉红

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. indigotin 2. indirubin

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

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 1 Results of the recovery test($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.252 3	0.701 4	0.054 75	0.698 8	0.053 39	1.365 3	0.103 4	95.01	91.12				
0.250 8	0.697 2	0.054 42	0.698 8	0.053 39	1.376 8	0.104 5	97.25	93.80				
0.251 1	0.698 1	0.054 49	0.698 8	0.053 39	1.364 1	0.103 6	95.31	91.98	96.28	91.55	1.06	1.43
0.253 2	0.703 9	0.054 94	0.698 8	0.053 39	1.384 2	0.103 3	97.35	90.58				
0.252 6	0.702 2	0.054 81	0.698 8	0.053 39	1.372 2	0.102 9	95.88	90.07				
0.249 8	0.694 4	0.054 21	0.698 8	0.053 39	1.371 6	0.103 2	96.91	91.76				

注:A为靛蓝,B为靛玉红。

Note:A is indigotin, and B is indirubin.

谱条件进样测定,依法计算含量。结果靛蓝和靛玉红含量的RSD分别为0.78%和1.14%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为181217)样品,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,2,4,8,12,18,24 h时进样测定,记录色谱图。结果靛蓝和靛玉红峰面积的RSD分别为1.12%和1.86%($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为181217)样品0.25 g,精密称定,共6份,分别置具塞锥形瓶中,精密加入2.2项下混合对照品贮备液5 mL,依法制备供试品溶液。按2.1项下色谱条件依法进样测定靛蓝和靛玉红的含量,计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为180407,181217,190112)样品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,并按外标法计算样品中各成分的含量。结果3批样品中靛蓝的含量分别为2.81,2.78,2.89 mg/g,靛玉红的含量分别为0.225,0.217,0.232 mg/g。

3 讨论

3.1 流动相选择

采用高效液相色谱法测定靛蓝和靛玉红的含量,以待测色谱峰的峰形和与其他色谱峰的分离度作为考察指标,曾考察不同流动相(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸铵体系、乙腈-醋酸铵体系、甲醇-磷酸盐缓冲液、乙腈-磷酸盐缓冲液),发现以甲醇-0.05 mol/L醋酸铵溶液为流动相时,可满足靛蓝与靛玉红的分离要求,且峰形好、柱效高。

3.2 样品前处理过程选择

靛蓝和靛玉红均为脂溶性成分,分别比较了甲醇、乙醇、三氯甲烷、DMF及乙酸乙酯对样品的提取效果。结果表明,DMF提取效率最好,最终确定以DMF作为提取溶剂。曾考察提取方法,比较了超声提取法和回流提取法及在不同超声时间时对样品的提取效果,发现超

声提取法易于操作,简便快捷,提取效果好。故最终确定以超声提取30 min作为提取条件。

3.3 检测波长选择

通过PDA进行全波长光谱扫描,测得靛蓝于285 nm波长处有最大吸收,靛玉红于289 nm波长处有最大吸收,由于样品中靛蓝与靛玉红含量相差较大,靛玉红的峰面积远小于靛蓝的峰面积。故选择靛玉红的最大吸收波长289 nm作为2种成分的共同检测波长。

3.4 样品含量测定结果分析

2015年版《中国药典(一部)》中规定青黛药材中靛蓝含量不得少于2.0%,靛玉红含量不得少于0.13%。按照喉康散的质量标准^[1],方中青黛药材占比为10.42%,按处方比例,计算制剂中靛蓝的理论含量应不低于0.208%(即2.08 mg/g),靛玉红的含量应不低于0.0135%(即0.135 mg/g)。结果表明,同一生产企业不同批号样品中靛蓝与靛玉红的含量基本一致,且含量均符合药典要求。

3.5 方法评价

本研究中的方法操作简便,结果准确可靠,专属性强,稳定性和重复性均较好,可用于同时测定喉康散中靛蓝和靛玉红的含量。

参考文献

- [1] WS₃-B-1040-91,中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第五册)[S].
- [2] 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,2015:199.
- [3] 牛宇东,张鑫,葛西航. HPLC法同时测定绿袍散中靛蓝与靛玉红[J]. 西北药学杂志,2018,33(4):459-461.
- [4] 刘泽玉,苏拓,高亚男,等. HPLC法同时测定青黛有效成分靛蓝和靛玉红的含量[J]. 中国药师,2010,13(3):324-326.
- [5] 姚金,刘兵兵,王建中. HPLC测定口疮膜中靛蓝及靛玉红的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(11):2082-2084.
- [6] 周世玉,彭善贵,刘莉. 青黛与其劣质品伪制品的鉴别研究[J]. 现代医药卫生,2011,27(4):495-496.

(收稿日期:2020-10-30;修回日期:2021-04-28)