

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)12-0088-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.12.021



高效液相色谱法同时测定清肝益脾胶囊中靛蓝和靛玉红含量*

徐明昊¹, 王斯琦², 苏子衡¹, 潘韵芝², 程军平^{2Δ}

(1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215000; 2. 江苏省苏州市第五人民医院, 江苏 苏州 215000)

摘要:目的 建立同时测定清肝益脾胶囊中靛蓝和靛玉红含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(70:30, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 290 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 7.63~122.00 μg/mL、5.00~80.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.9998$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 平均加样回收率分别为 96.93% 和 98.40%, RSD 分别为 1.36% 和 1.42% ($n=6$)。结论 所建立的方法简便, 结果准确, 重复性好, 可用于清肝益脾胶囊的质量控制。

关键词: 清肝益脾胶囊; 靛蓝; 靛玉红; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Indigo and Indirubin in Qinggan Yipi Capsules by HPLC

XU Minghao¹, WANG Siqi², SU Ziheng¹, PAN Yunzhi², CHENG Junping²

(1. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, Jiangsu, China 215000; 2. The Fifth People's Hospital of Suzhou, Suzhou, Jiangsu, China 215000)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of indigo and indirubin in Qinggan Yipi Capsules. **Methods** The chromatographic column was Hypersil ODS2 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water (70:30, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 290 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of indigo and indirubin were 7.63–122.00 μg/mL and 5.00–80.00 μg/mL respectively ($R^2 \geq 0.9998$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rates of indigo and indirubin were 96.93% and 98.40% respectively, with RSDs of 1.36% and 1.42% respectively ($n=6$). **Conclusion** The established method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the quality control of Qinggan Yipi Capsules.

Key words: Qinggan Yipi Capsules; indigo; indirubin; HPLC; content determination

清肝益脾胶囊系中医临床经验方, 具有改善肝功能、降酶、退黄, 增强细胞免疫功能, 有疏肝健脾、清利湿热功效。该方以泥鳅为君药, 清热疏肝、调节免疫, 辅以臣药青黛抗炎保肝, 最后佐以僵蚕提高机体免疫力, 全方配伍得当, 临床治疗慢性乙肝的疗效良好^[1-2]。但现行质量标准中检测项仅有制剂通则要求的项目, 不利于清肝益脾胶囊的质量控制。青黛药材中靛蓝和靛

玉红为发挥抗肝损伤的主要有效成分。本研究中通过查阅文献[3-5], 建立了同时测定清肝益脾胶囊中靛蓝和靛玉红含量的高效液相色谱(HPLC)法, 以为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型液相色谱仪(美国Agilent公司), 包括

*基金项目: 江苏省苏州市“科教兴卫”青年科技项目[KJXW2018044, KJXW2022048]; 江苏省苏州市科技发展计划项目[SKYXD2022099]。

第一作者: 徐明昊, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中药学, (电子信箱)2438443420@qq.com。

Δ通信作者: 程军平, 男, 博士, 副主任药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)19828955@qq.com。

红芪和黄芪中4种异黄酮类成分的含量对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 52-58.

[10] 孟祥才, 沈莹, 杜虹韦. 道地药材概念及其使用规范的探讨[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6135-6141.

[11] 何春萍, 何庭, 张莉, 等. 不同加工方法不同采收期对湖南灰毡毛忍冬药材质量的影响[J]. 中药材, 2016, 39(8): 1817-1819.

[12] 韩亚平, 李安平, 雷振宏, 等. 浅析药材质量的影响因素[J]. 农业开发与装备, 2015, 32(12): 88-89.

[13] 王宗权, 贾继明, 宋剑, 等. 不同产地黄芪中黄芪皂苷I、

黄芪皂苷II和黄芪皂苷IV含量测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7): 1191-1194.

[14] 王亚丽, 田曼, 李江, 等. HPLC-DAD-ELSD法同时测定黄芪中10个成分的含量[J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1268-1271.

[15] 马天成, 孙宇, 张金玲, 等. UPLC-MS同时测定黄芪中10种化合物含量[J]. 中药材, 2019, 42(4): 838-844.

[16] 张黄琴, 严辉, 钱大玮, 等. 不同产地百合药材中8种活性成分的分析与评价[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 311-318.

(收稿日期: 2022-11-10; 修回日期: 2023-02-15)

四元泵,全自动进样器,检测器,蒸发光散射检测器,工作站;XO-5200DTD型超声波清洗机(南京先欧仪器制造有限公司);1-14K型高速离心机(美国Sigma-Aldrich公司);PL203型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 试药

清肝益脾胶囊(苏州市第五人民医院自制,批号分别为20200808,20201019,20210228);靛蓝对照品(批号为J1726025,含量 $\geq 98\%$),靛玉红对照品(批号为20121805,含量 $\geq 98\%$),均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲醇(色谱纯,江苏强盛功能化学股份有限公司,批号为20210401); N,N -二甲基甲酰胺(色谱纯,生工生物工程上海股份有限公司,批号为G506BA1009);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 ODS2柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:甲醇-水(70:30, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:290 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

分别取靛蓝、靛玉红对照品13.20,11.40 mg,精密称定,分别置100 mL容量瓶中,加 N,N -二甲基甲酰胺适量,超声(功率250 W、频率40 kHz,下同)使溶解,再加 N,N -二甲基甲酰胺定容,摇匀,即得单一对照品贮备液;各取适量,加 N,N -二甲基甲酰胺制成混合对照品溶液。取样品内容物粉末约0.1 g,精密称定,置100 mL磨口锥形瓶中,精密加入 N,N -二甲基甲酰胺10 mL,称定质量,在25 $^{\circ}$ C下超声提取30 min,放冷,再次称定质量,用 N,N -二甲基甲酰胺补足减失的质量,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得质量浓度为10.00 mg/mL的供试品溶液。按清肝益脾胶囊处方及工艺制备不含青黛药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液^[6-9]。

2.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,与对照品溶液色谱有相同色谱峰,各色谱峰基线分离良好,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:取靛蓝、靛玉红对照品各适量,精密称定,分别加入 N,N -二甲基甲酰胺溶液制成质量浓度分别为7.63,15.25,30.50,61.00,122.00 μ g/mL和5.00,10.00,20.00,40.00,80.00 μ g/mL的系列对照品溶液。各取10 μ L,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以待测成分质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,靛蓝为 $Y_1 = 40.493X_1 + 76.128$ ($R^2 = 0.9998, n = 5$),靛玉红为 $Y_2 = 34.631X_2 - 9.0458$ ($R^2 = 1.0000, n = 5$)。结果表明,靛蓝和靛玉红质量浓度分别在7.63~122.00 μ g/mL和5.00~80.00 μ g/mL范围内与峰面积线性关系良好^[10]。

精密度试验:取2.2项下同一批(批号为20201019)供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果靛蓝、靛玉红峰面积的 RSD 分别为0.20%和2.13% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20201019)供试品溶液适量,分别于室温下放置0,2,4,6,8,10,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果靛蓝和靛玉红峰面积的 RSD 分别为0.46%和2.31% ($n = 8$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20201019)内容物适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行测定,记录峰面积,并计算含量。结果靛蓝、靛玉红含量的 RSD 分别为0.26%和2.10% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的供试品溶液6份,分别精密加入2.2项下混合对照品溶液适量,按

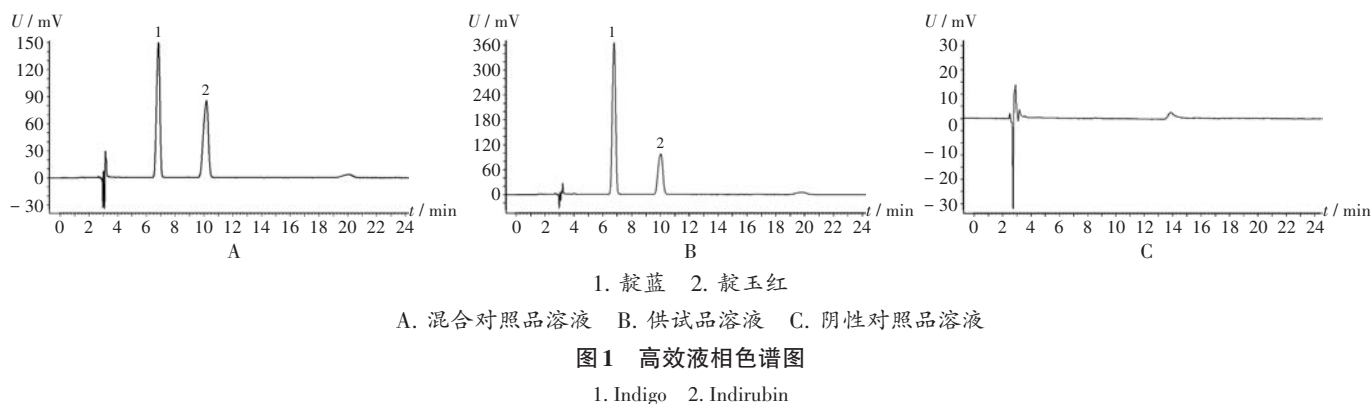


Fig. 1 HPLC chromatograms

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

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
26.70	4.70	27.00	4.60	53.45	9.20	99.07	97.83				
27.04	4.64	27.00	4.60	53.38	9.26	97.56	100.43				
26.97	4.66	27.00	4.60	53.16	9.22	97.00	99.13	96.93	98.40	1.36	1.42
26.94	4.73	27.00	4.60	53.01	9.18	96.56	96.74				
26.98	4.76	27.00	4.60	52.94	9.23	96.15	97.17				
27.01	4.70	27.00	4.60	52.72	9.26	95.22	99.13				

注:A为靛蓝,B为靛玉红。表2同。

Note:A refers to indigo,and B refers to indirubin (for Tab.1 - 2).

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3批样品内容物各适量,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,计算样品中靛蓝和靛玉红含量。结果见表2。

表2 样品中靛蓝和靛玉红含量测定结果($\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$)
Tab.2 Results of content determination of indigo and indirubin in samples ($\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$)

批号	A			B		
	1	2	3	1	2	3
20200808	2.71	2.71	2.61	0.40	0.40	0.40
20201019	2.63	2.62	2.62	0.40	0.41	0.40
20210228	2.62	2.61	2.61	0.40	0.40	0.40

3 讨论

3.1 色谱条件优化

预试验中,考察了甲醇-水流动相比比例,以待测色谱峰的峰形和分离度为考察指标,发现为甲醇-水为70:30(V/V)时靛蓝和靛玉红的出峰时间适宜,色谱峰峰形良好、柱效高;又考察了25,30℃柱温下的图谱,发现30℃时的色谱峰峰形好、柱效高;还考察了流速,发现1.0,0.5 mL/min流速下出峰时间适宜、峰形好,综合时效,最终选择流速为1.0 mL/min。

3.2 样品含量测定结果分析

清肝益脾胶囊是3味药材粉末填充胶囊,在制备供试品溶液时采取超声提取法,取胶囊中的混合药粉,精密称定,加入N,N-二甲基甲酰胺溶液,超声30 min提取靛蓝、靛玉红;此外,研究中还发现清肝益脾胶囊中靛蓝的含量受药品贮存时间的影响,其原因可能是青黛药材中靛蓝和靛玉红是同分异构体,由于光照、温度和时间等因素的影响,可能发生相互转化,但含量均在合理范围内,因此药品在贮存时应尽可能将其置避光处,并放入棕色瓶进行避光,同时要保证供试品溶液在24 h内测定完毕。制剂中靛玉红含量稳定性较好,说明

该检测方法具有科学性和准确性。

3.3 制剂质量标准提升的必要性

清肝益脾胶囊是苏州市第五人民医院的协定方,具有多年的临床实用经验,根据临床数据显示,该处方治疗肝纤维化效果较佳,在治疗肝损伤疾病方面有良好作用,用清肝益脾胶囊治疗1 000例乙肝患者,总有效率达85%,发现清肝益脾胶囊在调节机体免疫力、清除复合物及机体的肝细胞恢复等方面有重要作用^[11]。但清肝益脾胶囊现有质量标准不足以验证药品的安全性、稳定性及有效性^[12]。优化生产工艺、不断提高质量控制水平和质量标准是院内制剂发展的必由之路^[13]。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便,结果准确,专属性强,可用于清肝益脾胶囊的质量控制,保障院内制剂的品质和制剂工艺的稳定性,并可为制剂质量标准的提高提供依据。

参考文献

- [1] 裴玉,黄芝娟,霍志鹏,等.多波长HPLC法同时测定青黛药材中靛蓝和靛玉红的含量[J].天津药学,2017,29(2):14-18.
- [2] 肖喜银.中药制剂生产技术现代化的研究[J].当代化工研究,2020,23(3):66-67.
- [3] 孙燕,张露蓉,许恒,等.薏苡附子败酱散水煎液高效液相指纹图谱的建立及8种成分含量测定[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(8):19-23.
- [4] 崔雪惠,陈世洪,邱金娣,等.欧前胡素柔性脂质体凝胶的制备及质量评价[J].中国药房,2020,31(9):1074-1079.
- [5] 钮正睿,王如峰,荆宇,等.玄参配方颗粒的制备工艺和含量测定[J].中国中药杂志,2009,34(1):39-42.
- [6] 王巍嵩,朱贵贵,徐智宇.高效液相色谱-质谱法测定大青叶中靛蓝和靛玉红的含量[J].内蒙古医科大学学报,2020,42(1):59-60.
- [7] 王婷婷,李玲,陈乃江.高效液相色谱法测定双料喉风散中靛蓝和靛玉红含量[J].中国药业,2019,28(23):24-26.
- [8] 常宝勤,李梅梅,蔺华吉,等.板蓝根中生物碱靛蓝、靛玉红的提取与分析[J].农业科技与信息,2019,13(22):40-43.
- [9] 吴青青,黄和平,李玮,等.高效液相色谱法同时测定青黛中色胺酮、靛蓝及靛玉红的含量[J].化学世界,2019,60(2):105-110.
- [10] 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.
- [11] 孙媛,田秀秀,丁江生.南板蓝根不同提取物中靛蓝、靛玉红和色胺酮含量及其抑菌活性的研究[J].中医药通报,2021,20(3):63-67.
- [12] 高胜兰.清肝益脾胶囊治疗HBsAg阳性携带者1000例疗效观察[J].苏州大学学报(医学版),2002,12(4):443-445.
- [13] 李得堂,刘翠珍,宛鑫,等.医院中药制剂生产与质量控制要点浅析[J].中国医药导刊,2022,24(5):454-459.

(收稿日期:2022-10-16;修回日期:2022-12-07)