

# HPLC法测定口溃散中靛蓝的含量<sup>Δ</sup>

宋晓勇<sup>1\*</sup>, 侯彦涛<sup>2</sup>, 宋卫中<sup>3</sup>, 尹俊涛<sup>1</sup>, 张晓坚<sup>4#</sup>, 康文艺<sup>3</sup>, 张永州<sup>1</sup>, 王文生<sup>1</sup>, 刘瑜新<sup>1</sup>, 田慧<sup>1</sup>(1.河南大学淮河医院, 河南开封 475000; 2.河南省医药学校, 河南开封 475003; 3.河南大学中药研究所, 河南开封 475004; 4.郑州大学第一附属医院, 郑州 450052)

中图分类号 R283.62<sup>4</sup>; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3698-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.16

**摘要** 目的:建立测定口溃散中靛蓝含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(75:25, V/V), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为289 nm, 柱温为30 ℃。结果:靛蓝的进样量在0.198~1.188 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999\ 8$ ); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<2%; 平均加样回收率为99.61%, RSD=0.69% ( $n=6$ )。结论:该方法操作简便、准确可靠、专属性强、重复性好, 可用于口溃散中靛蓝的含量测定及其质量控制。

**关键词** 口溃散; 青黛; 靛蓝; 高效液相色谱法; 含量测定

## Content Determination of Indigo in Koukui Powder by HPLC

SONG Xiao-yong<sup>1</sup>, HOU Yan-tao<sup>2</sup>, SONG Wei-zhong<sup>3</sup>, YIN Jun-tao<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-jian<sup>4</sup>, KANG Wen-yi<sup>3</sup>, ZHANG Yong-zhou<sup>1</sup>, WANG Wen-sheng<sup>1</sup>, LIU Yu-xin<sup>1</sup>, TIAN Hui<sup>1</sup>(1.Huaihe Hospital of Henan University, Henan Kaifeng 475000, China; 2.Henan Pharmaceutical School, Henan Kaifeng 475003, China; 3.The Institute of TCM, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China; 4.The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of indigo in Koukui powder. METHODS: HPLC was used. The determination was performed on Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water(75:25, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 289 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of indigo was 0.198-1.188 μg ( $r=0.999\ 8$ ) with an average recovery of 99.61% (RSD=0.69%,  $n=6$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reliable, specific and reproducible for the content determination and quality control of indigo in Koukui powder.

**KEY WORDS** Koukui powder; *Indigo naturalis*; Indigo; HPLC; Content determination

口溃散是由冰片、硼砂、青黛、黄连、黄柏等9味药材组成的中药散剂,为河南大学淮河医院口腔科的经验方,具有清热解毒、消肿止痛之功效,临床上主要用于热毒蕴结所致咽喉疼痛、牙龈肿痛、口舌生疮的治疗。青黛为口溃散的臣药,性寒,味咸,具有清热解毒、凉血消肿、散结止痛、消斑化痰之功效,主要用于治疗温毒发斑、血热吐衄、胸痛咳血、口疮、疔腮、喉痹<sup>[1]</sup>、小儿惊痫等证<sup>[2]</sup>。近期研究表明,青黛还具有镇痛、消炎的作用<sup>[3]</sup>。靛蓝是青黛的主要活性成分之一<sup>[4]</sup>,为了有效地控制该制剂的质量,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定了口溃散中靛蓝的含量。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010A型HPLC仪系统(日本岛津公司);KQ-500 DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-2000型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];101型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司);AL104型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

Δ 基金项目:河南省科技厅科技发展计划项目(No.112102310306)

\* 主任药师。研究方向:医院药学。电话:0378-3906304

# 通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0371-66913047

## 1.2 药品与试剂

口溃散(河南大学淮河医院自制,批号:20120905,20121124、20130118);靛蓝对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110716-201111);*N,N*-二甲基甲酰胺(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,韩国SK Chemicals公司);水为娃哈哈纯净水,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:Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(75:25, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:289 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,靛蓝与其他成分峰均分离良好,分离度>1.5,理论板数按靛蓝峰计算应不低于1 800。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取口溃散适量,置烘箱中于50 ℃干燥至恒质量,粉碎,量取粉末(过四号筛)约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入*N,N*-二甲基甲酰胺25 ml,称定质量,放置30 min,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用*N,N*-二甲基甲酰胺补足减失的质量,摇匀,吸取上清液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.2.2 对照品贮备液的制备 精密称取靛蓝对照品0.99 mg,

置于10 ml量瓶中,加入*N,N*-二甲基甲酰胺至刻度使之充分溶解,摇匀,即得对照品贮备液(0.099 mg/ml),备用。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按标准处方比例配制缺青黛的阴性样品,再按“2.2.1”项下方法制成阴性对照溶液,备用。

### 2.3 专属性试验

精密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液各10 μl,分别注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件测定。结果表明,阴性对照在与靛蓝对照品相同保留时间处未显色谱峰,故认为阴性对照对靛蓝的含量测定无干扰。色谱见图1。

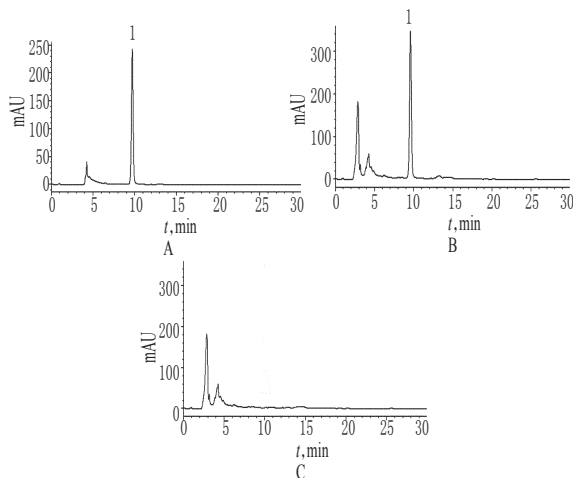


图1 高效液相色谱图

A. 靛蓝对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 靛蓝

Fig 1 HPLC chromatograms

A. indigo control; B. test sample; C. negative control; 1. indigo

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品贮备液2、4、6、8、10、12 μl,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件依次测定,记录峰面积。以进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积积分值( $y$ )为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=4\ 913\ 067.532\ 5x-191\ 785.800\ 0$  ( $r=0.999\ 8, n=6$ )。结果表明,靛蓝的进样量在0.198~1.188 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度试验

精密量取对照品贮备液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,  $RSD=0.59\%$  ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 重复性试验

称取同一批样品(批号:20120905)适量,共6份,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果显示,样品中靛蓝的平均含量为24.87 μg/g,  $RSD=0.63\%$  ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.7 稳定性试验

精密量取同一批供试品溶液(批号:20120905)适量,于制备后2、4、8、12、18、24 h按“2.1”项下色谱条件分别进样10 μl,记录峰面积。结果显示,  $RSD=0.56\%$  ( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知靛蓝含量的口溃散(批号:20120905)样品9份,每份约1 g,分别置50 ml具塞锥形瓶中,每3份为一组,分别精密加入对照品贮备液0.8、1.0、1.2 ml,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面

积,以外标法定量,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	$\bar{x}, \%$	RSD, %
1.023 0	25.44	79.20	105.10	100.58		
1.114 5	27.72	79.20	105.78	98.56		
1.054 9	26.24	79.20	105.54	100.13		
1.112 4	27.67	99.00	125.98	99.30		
1.078 3	26.82	99.00	125.45	99.63	99.61	0.69
1.021 6	25.41	99.00	123.83	99.41		
0.981 0	24.40	118.80	143.10	99.92		
1.011 0	25.14	118.80	144.26	100.27		
0.997 0	24.80	118.80	142.08	98.72		

### 2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品含量。结果,3批样品(批号分别为20120905、20121124、20130118)中靛蓝的含量分别为24.87、25.12、24.03 μg/g。

### 3 讨论

2010年版《中国药典》(一部)青黛项下规定靛蓝的质量分数不得少于2.0%。本试验结果表明,不同批次的口溃散样品中靛蓝的质量分数均符合规定。

靛蓝与靛玉红是青黛的主要有效成分,两者为同分异构体<sup>[3]</sup>。因此,笔者在预试验中也采用相同的色谱条件测定了口溃散中靛玉红的含量。但发现其响应值太低,含量也太低,影响结果的准确性,故在正式试验中放弃,仅采用HPLC法<sup>[5-7]</sup>测定制剂中靛蓝的含量。

笔者参考文献<sup>[5-7]</sup>考察了多种流动相,最终选择甲醇-水(75:25, *V/V*),分离效果较好,能达到分析要求。笔者还分别对样品提取溶媒、提取方法、提取时间等进行了考察,结果发现以*N,N*-二甲基甲酰胺为提取溶媒、超声30 min为最佳提取方法。

另外,靛蓝对光线较敏感,在样品提取和测定过程中应注意避光操作。

综上,本方法操作简便、准确可靠、专属性强、重复性好,可用于口溃散中靛蓝的含量测定及其质量控制。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:201.
- [2] 郝微微,温红珠,李佳,等. 靛玉红对溃疡性结肠炎小鼠CD<sub>4</sub>CD<sub>25</sub>Treg细胞FOXP<sub>3</sub>表达的影响[J]. 上海中医药杂志,2011,45(12):82.
- [3] 罗巍伟,贺英菊,王凌,等. HPLC测定板蓝根提取物中靛蓝和靛玉红的含量[J]. 华西药学杂志,2004,19(6):455.
- [4] 谢友良,何百寅,李远彬,等. 青黛药材中的靛蓝和靛玉红含量的同时测定[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(4):452.
- [5] 王艳,刘玉明,杨明,等. 靛蓝与异构体靛玉红的量子化学研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2004,41(1):143.
- [6] 谌立巍,廖婉,杨明,等. HPLC测定青黛中的靛蓝和靛玉红[J]. 华西药学杂志,2008,23(6):714.
- [7] 王小林,颜鲁青. HPLC法测定复方板蓝根胶囊中靛蓝、靛玉红的含量[J]. 中国药房,2007,18(27):2119.

(收稿日期:2013-07-31 修回日期:2013-08-26)