

双波长HPLC法同时测定鼻渊宁颗粒中栀子苷和靛玉红的含量^Δ

张红梅*, 鲁 杨, 白 妮(延安市中医医院, 陕西延安 716000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4088-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.19

摘要 目的:建立同时测定鼻渊宁颗粒中栀子苷和靛玉红含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Shim-pack VP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.5%醋酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为238、289 nm。结果:栀子苷和靛玉红的质量浓度分别在3.5~52.5、2.0~40.0 mg/L范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 均为0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.69%;平均加样回收率分别为98.9%和99.9%,RSD分别为1.2%和0.6%(n 均为6)。结论:该方法简便、快速、专属性强,结果准确、可靠,可用于鼻渊宁颗粒的质量控制。

关键词 鼻渊宁颗粒;栀子苷;靛玉红;双波长高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Geniposide and Indirubin in Biyuanning Granules by Dual-wavelength HPLC ZHANG Hong-mei, LU Yang, BAI Ni(Yan'an Municipal Hospital of TCM, Shaanxi Yan'an 716000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of geniposide and indirubin in Biyuanning granules. METHODS: Dual-wavelength HPLC was adopted. The determination was performed on Shim-pack VP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelengths were set at 238 and 289 nm. RESULTS: The linear ranges were 3.5-52.5 mg/L for geniposide and 2.0-40.0 mg/L for indirubin($r=0.999\ 9$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.69%. The average recoveries were 98.9% and 99.9% ($n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, which can provide reference for quality evaluation of Biyuanning granules.

KEYWORDS Biyuanning granules; Geniposide; Indirubin; Dual-wavelength HPLC

鼻渊宁颗粒为延安市中医医院独家生产的医院制剂,由栀子、大青叶等多味中药组成,具有清热解毒、通窍除涕的功能,临床一般用于治疗急慢性鼻炎、鼻窦炎所引起的鼻塞、流涕、喷嚏等。栀子、大青叶的主要活性成分分别为栀子苷和靛玉红,其具有明显的清热泻火、解毒等作用。原标准仅记载了白芷对照药材的薄层色谱鉴别,为有效控制鼻渊宁颗粒的制剂质量,本试验在其现行标准的基础上,参考有关文献^[1-3],优化色谱条件,建立了利用双波长高效液相色谱(HPLC)法同时测定栀子苷、靛玉红含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

2010AHT型HPLC仪(日本岛津公司);KQ-500E型超声波清洗器(上海安亭科学仪器公司);TG328B型分析天平(上海精科天平仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

鼻渊宁颗粒(延安市中医医院自制,批号:20140428、20140317、20140212、20140106、20131212、20131106、20131011、20130903、20130807、20130703,规格:12 g/袋);栀子苷对照品(批号:110749-200714,纯度:99.6%)、靛玉红对照品(批号:717-200204,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

^Δ基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目(No.2012SF2-06-4)

*副主任中药师。研究方向:中药制剂质量控制与新药研发。电话:0911-2889850。E-mail:zhmmini@163.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shim-pack VP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 25%→45% A; 20~40 min, 45%→25% A; 40~45 min, 25% A);检测波长:栀子苷238 nm,靛玉红289 nm;流速:0.8 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,两种待测成分均达到了基线分离,理论板数以栀子苷和靛玉红计均≥6 000;分离度>1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取栀子苷、靛玉红对照品各适量,分别置于10.0 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别制成质量浓度为52.5、40.0 mg/L的对照品贮备液。

2.2.2 混合对照品溶液 精密称取栀子苷、靛玉红对照品适量,置于同一10.0 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为52.5、40.0 mg/L的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取本品适量,研细,取约20.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定质量,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 按处方比例及制备工艺分别制备缺栀子和大青叶的样品,按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各10 μl,按上

述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,供试品溶液中栀子苷和靛玉红的色谱峰与其他色谱峰均能达到基线分离,且保留时间与对照品溶液一致;各阴性对照溶液在其相同保留时间处无色谱峰,表明其他组分对栀子苷和靛玉红的测定无干扰。色谱见图1。

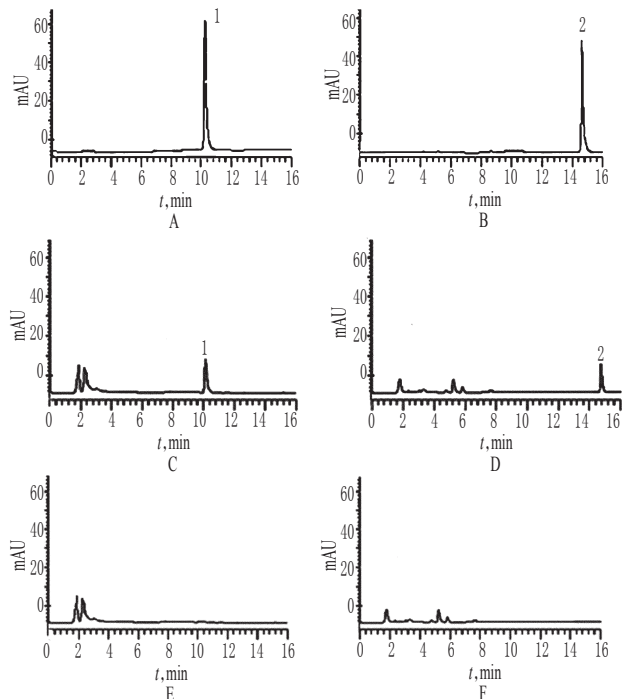


图1 高效液相色谱图

A. 栀子苷对照品(238 nm); B. 靛玉红对照品(289 nm); C. 供试品(238 nm); D. 供试品(289 nm); E. 栀子阴性对照(238 nm); F. 大青叶阴性对照(289 nm); 1. 栀子苷; 2. 靛玉红

Fig 1 HPLC chromatograms

A. geniposide control (238 nm); B. indirubin control (289 nm); C. test sample (238 nm); D. test sample (289 nm); E. negative sample without *Gardenia jasminoides* (238 nm); F. negative sample without *Isatis indigotica* (289 nm); 1. geniposide; 2. indirubin

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液适量,用甲醇倍比稀释,制成栀子苷质量浓度为52.5、35.0、17.5、7.0、3.5 mg/L,靛玉红质量浓度为40.0、20.0、10.0、4.0、2.0 mg/L的对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以栀子苷、靛玉红质量浓度为横坐标(x, mg/L),以其各自峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得栀子苷的回归方程为 $y=33.561x-15.669$ ($r=0.9999$),线性范围为3.5~52.5 mg/L;靛玉红的回归方程为 $y=6.7662x-0.8458$ ($r=0.9999$),线性范围为2.0~40.0 mg/L。结果表明,栀子苷和靛玉红在各自线性范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液适量,按上述色谱条件重复进样5次,记录色谱图。结果,RSD=1.44%($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液适量,分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,栀子苷和靛玉红的峰面积的RSD分别为2.69%、2.38%($n=8$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批次的鼻渊宁颗粒适量,共6份,分别按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,栀子苷、靛玉红的平均含量分别为0.005 1、0.004 3 mg/g,RSD分别为1.44%、1.38%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:20140428)适量,分别精密加入“2.2.1”项下的对照品贮备液适量,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

成分	称样量,g	加入量,g	样品含量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
栀子苷	20.023 4	0.000 1	0.106 1	0.204 1	98.00	98.9	1.2
	20.006 7	0.000 1	0.106 0	0.205 6	99.60		
	20.003 4	0.000 1	0.114 0	0.214 4	100.40		
	20.046 7	0.000 1	0.114 3	0.213 8	99.50		
	20.056 2	0.000 1	0.114 3	0.213 3	99.00		
	20.064 3	0.000 1	0.116 4	0.213 4	97.00		
靛玉红	20.023 4	0.000 1	0.082 1	0.181 1	99.00	99.9	0.6
	20.006 7	0.000 1	0.092 0	0.193 0	101.00		
	20.003 4	0.000 1	0.096 0	0.195 7	99.70		
	20.046 7	0.000 1	0.086 2	0.186 0	99.80		
	20.056 2	0.000 1	0.092 3	0.192 2	99.90		
	20.064 3	0.000 1	0.092 3	0.192 0	99.70		

2.9 样品含量测定

取10批样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,用外标法计算样品中栀子苷和靛玉红的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Content determination of samples($n=3$)

批号	栀子苷,mg/g	靛玉红,mg/g
20130703	0.005 2	0.004 1
20130807	0.005 7	0.004 2
20130903	0.005 9	0.004 5
20131011	0.005 9	0.004 3
20131106	0.005 4	0.004 6
20131212	0.006 0	0.004 7
20140106	0.005 3	0.004 8
20140212	0.005 5	0.005 0
20140317	0.005 8	0.004 2
20140428	0.005 6	0.004 5

3 讨论

3.1 色谱条件的确定

鼻渊宁颗粒为中药复方制剂,所含成分复杂,极性差别较大,采用等度洗脱法难以达到有效分离,故考虑采用梯度洗脱。笔者参考相关文献^[4-6]对流动相进行了选择,结果发现乙腈的洗脱能力较强,柱压合适,分离效果较好,故本试验以乙腈(A)-0.5%醋酸溶液(B)进行梯度洗脱。

3.2 提取方法的选择

预试验中,笔者还比较了超声提取和加热回流提取两种方法,结果发现前者对栀子苷和靛玉红的提取率均高于后者,故最终选择超声提取的方法。

3.3 检测波长的选择

从样品的紫外扫描图可以看出,栀子苷、靛玉红的最大吸收波长分别为238、289 nm,因此本试验采用DAD检测器[®],设

紫草中萘醌类化学成分的快速高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术分析^Δ

毛艳^{1*}, 张瑞萍², 贺金华^{1#}, 贺玖明², 蔡晓翠¹, 严欢¹, 康雨彤¹(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐830004; 2.天然药物活性物质与功能国家重点实验室/中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京100050)

中图分类号 R283.65;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4090-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.20

摘要 目的:对紫草中萘醌类化学成分进行快速分离与鉴别。方法:采用快速高效液相色谱-飞行时间质谱(RRLC/Q-TOF/MS)法。色谱柱为Agilent SB-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为0.4 ml/min,柱温为30℃;使用甲喷雾离子源,正、负离子扫描模式,载气温度为450℃,质量扫描范围(*m/z*)为100~1 000。结果:推断出紫草中可能含有紫草素、β-羟基异戊酰紫草素、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、β,β-二甲基丙烯酰紫草素和α-甲基-正丁酰紫草素等10种化学成分。结论:该方法快速、高效,可为紫草的药效学和质量控制研究奠定基础。

关键词 紫草;萘醌;快速高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术

Analysis of Naphthaquinones in *Arnebia euchroma* by RRLC/Q-TOF-MS

MAO Yan¹, ZHANG Rui-ping², HE Jin-hua¹, HE Jiu-ming², CAI Xiao-cui¹, YAN Huan¹, KANG Yu-tong¹(1.Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines/Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and identify naphthaquinones in *Arnebia euchroma* rapidly. METHODS: RRLC/Q-TOF/MS was adopted. The separation was performed on Agilent SB-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm)column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The column temperature was 30℃. ESI was employed, and the sample was analyzed in the positive and negative-ion mode. The temperature of carrier gas was 450℃, mass scanning rang (*m/z*) was from 100-1 000. RESULTS: 10 kinds of naphthaquinones were identified by MS as sldkonin, β-hydroxyisovalerylshikonin, acetylshikonin, β-acetoxyisovalerylshikonin, isobutylshikonin, β, β-dimethylacrylshikonin and α-methylbutyrylalkannin etc, etc. CONCLUSIONS: The method is rapid and effective, and can provide experimental basis for pharmacodynamics and quality control of *A. euchroma*.

KEYWORDS *Arnebia euchroma*; Naphthaquinones; RRLC/Q-TOF/MS

定238、289 nm为检测波长,其能准确、快速地对鼻渊宁颗粒中两种成分的含量进行测定。

综上所述,本试验所建立的方法简便、快速、专属性强,结果准确、可靠,精密度好,可用于鼻渊宁颗粒的质量控制。

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,2010:20.
- [2] 金涛.高效液相色谱法测定康乐洗液中栀子苷的含量[J].中国医院药学杂志,2010,30(22):1 956.
- [3] 陈艳霞,宫立孟.HPLC法测定肝宁丸中栀子苷的含量[J].中国药师,2012,15(7):1 037.
- [4] 茅向军,许乾丽.HPLC法测定鑫肝乐胶囊中栀子苷的含量[J].药物分析杂志,2001,21(6):437.
- [5] 严安定,张永,高建.RP-HPLC法同时测定不同品种栀子及栀子金花丸中栀子苷[J].中成药,2012,34(5):965.
- [6] 肖佳尚,李晓蒙,叶向阳.复方三黄消炎片中栀子苷含量测定研究[J].中国药品标准,2006,7(5):34.
- [7] 周永梅,冯鑫,王巨存,等.HPLC法测定结肠炎散Ⅱ号中靛玉红的含量[J].天津药学,2007,19(5):22.
- [8] 韩光,孙茂峰,王荔.板蓝根含片中靛玉红的含量测定[J].中国药学杂志,2001,36(6):419.
- [9] 黄勤挽,王瑾,苏娟,等.双波长HPLC法同时测定杜仲雄花中3种成分的含量[J].中国药房,2011,22(7):2 565.

(收稿日期:2014-06-09 修回日期:2014-09-09)

Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No.201233146-8)

* 助理研究员,硕士研究生。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0991-2322941。E-mail:maoyan7529@163.com

通信作者:研究员,硕士研究生导师。研究方向:天然产物与化学。电话:0991-2326572。E-mail:hejh1216@163.com