

高效液相色谱法测定溃疡宁胶囊中靛蓝的含量

楼云雁¹, 田涛², 葛卫红³, 杭清⁴ (1. 杭州第四医院, 杭州 310002; 2. 成都军区联勤部成都药材供应站; 3. 浙江中医药大学; 4. 杭州市疾病预防控制中心预防保健门诊部)

摘要: 目的 为溃疡宁胶囊质量控制提供新方法。方法 色谱柱: Agilent hypersil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(70:30); 检测波长: 280 nm; 柱温: 35℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。结果 靛蓝线性范围: 0.077 63 ~ 0.580 2 μg·mL⁻¹, 相关系数 r 分别为 0.999 8, 回收率为 100.1%, RSD 为 1.24%。结论 本方法简便、可靠、重现性好, 能起到控制溃疡宁胶囊中靛蓝含量的作用。

Quantitative Determination of Indigotin in Kuizhangning Capsules by RP-HPLC

LOU Yun-yan¹, TIAN Tao², GE Wei-hong³, HANG Qing⁴ (1. The Fourth Hospital in Hangzhou, Hangzhou 310002, China; 2. Chengdu Military Area; 3. Zhejiang Traditional Chinese Medical College; 4. The Prevention Clinic of the Diseases Control Center in Hangzhou)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an effective quality control method for Kuizhangning capsules. **METHODS** Indigotin in Kuizhangning capsules was determined by RP-HPLC, using Agilent hypersil ODS(4.6 × 250mm, 5μm) column, methanol-water (70:30) as mobile phase and UV detector was set at 280 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The linearity range of indigotin was 0.07763 ~ 0.5802 μg·mL⁻¹, the average recovery was 100.1% with RSD 1.24%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and repeatable. It can be used for determination of indigotin in Kuizhangning capsules.

KEY WORDS: Kuizhangning capsules; indigotin; HPLC

溃疡宁胶囊由青黛、象牙屑、蚕茧(炭)、人指甲(滑石烫)、珍珠、珍珠层粉、牛黄、冰片等组成的复方制剂,具有清热解毒、生肌止痛之功能,用于十二指肠球部溃疡、胃溃疡、糜烂性胃炎属胃热肝郁证。收载于卫生部药品标准中药成方制剂第十八册。

溃疡宁胶囊处方的君药为青黛。化学、药理研究表明,青黛有效成分为靛蓝和靛玉红,靛蓝含量较高,本研究以靛蓝为指标对溃疡宁胶囊进行定量。采用 HPLC测定靛蓝含量可以有效地排除干扰,方法成熟,可靠。

1 仪器与药品

高效液相色谱仪 Waters 1515 型、2487 紫外检测器。

溃疡宁胶囊及其阴性样品(实验室自制)。靛蓝供含量测定用对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0716-200005);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果^[1-5]

2.1 色谱条件

参照文献青黛项下,高效液相色谱法测定样品的靛蓝含量采用的色谱条件为:Agilent hypersil ODS 分析柱(4.6mm × 250mm, 5μm)流动相:甲醇-水(70:30);检测波长:280nm;流速:1.0mL/min;柱温:35℃。

2.2 系统适应性实验

按样品测定项下方法制备供试品、阴性对照品及对照品溶液,照“2.1”项下色谱条件,各进样 20μL,测的 HPLC 图谱,图谱表明阴性空白溶液色谱没有干扰。理论板数按靛蓝峰计算,应不低于 3 500。

2.3 线性试验

精密称取靛蓝对照品 9.67mg,置 250mL 棕色量瓶中,加氯仿适量,超声溶解,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,即得 38.68 μg/mL 的靛蓝对照品溶液,精密吸取 5mL 靛蓝对照品溶液置 250mL 棕色量瓶中,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,即得 0.7736 μg/mL 的靛蓝对照品储备溶液。分别精密量取 2, 3, 5, 10, 15mL 靛蓝对照品储备溶液分别置 20mL 棕色量瓶中,加氯仿制成浓度为 0.07763, 0.11604, 0.1934, 0.3868, 0.5802

μg/mL 的靛蓝对照品溶液。分别量取各供试液 20μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,将峰面积 A 与相应靛蓝浓度 C(μg/mL)进行线性回归,得回归方程: $A = 78\,818.8C + 345.4$, $r = 0.999\,8$,表明样品浓度在 0.077 63 ~ 0.580 2 μg/mL 范围内,靛蓝峰面积 A 与浓度 C 呈良好的线性关系。

2.4 定量测定

精密称取靛蓝对照品 9.82mg,置 100mL 棕色量瓶中,加氯仿适量,超声溶解,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,精密量取 1mL 置 100mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,得 0.98 μg/mL 的溶液,分别精密量取 5, 2mL 置 50mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试液 1[#], 2[#],精密量取 1[#]中 25mL 置 50mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试液 3[#],精密量取 3[#]中 25mL 置 50mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试液 4[#]。供试液 1[#] ~ 4[#](浓度分别为:0.0982, 0.0491, 0.0392, 0.02455 μg/mL)。分别量取各供试液 20μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,结果浓度为 0.02455 μg/mL 的样品色谱信号约为噪音的 10 倍,靛蓝的定量限为 0.55 ng。

2.5 样品提取方法考察

2.5.1 提取溶剂的考察 参照文献青黛项下的提取溶剂和靛蓝的性质选择氯仿为提取溶剂。

2.5.2 提取方法的考察 青黛药材的提取用索氏提取器进行提取,因本品为经提取加工的中成药,用索氏提取费时费力,超声提取可能更为有效方便。本试验比较两种提取方法对本品中靛蓝的提取效果,具体试验如下:取本品(批号:020301)20粒,研匀,精密称取两份,每份 0.3g,一份置具塞锥形瓶中,精密加入氯仿 50mL,密塞,称定重量,超声处理 60min,放冷至室温,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,摇匀,静置,精密吸取上清液 1mL 至 200mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀。另一份置索氏提取器中,回流提取至无色(6h),放冷,回收溶剂至适量,转移至 50mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,精密吸取上述溶液 1mL 溶液,至 200mL 棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀。取上述两种

提取方法所得溶液经 0.45μm 滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件测定,结果索氏提取 6h 靛蓝含量为 3.22mg/粒;超声提取 1h 为 3.30mg/粒。

试验结果表明,索氏提取和超声提取效果相当,但超声提取简单,省时省力,故选择超声提取。

2.5.3 提取时间的考察 取本品(批号:020301)20粒,研匀,精密称取4份,每份0.3g,分别置具塞锥形瓶中,精密加入氯仿50mL,密塞,称定重量,分别超声处理10、20、40、60min,放冷至室温,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,摇匀,静置,精密吸取上清液1mL至200mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀。取上述溶液经0.45μm滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件测定,结果见表1。

表 1 提取时间考察结果

Tab 1 Comparison of various extraction time	
提取时间 /min	靛蓝 /(mg/粒)
10	0.86
20	3.28
40	3.30
60	3.28

测定结果表明,提取40min效果已达到最大提取率,故提取时间选用40min。

2.6 溶液制备

供试品溶液的制备:依据样品提取方法考察试验结果,确定样品提取方法为:取本品20粒,取出内容物,研匀,精密称取0.3g(约为1粒溃疡宁胶囊的量),置具塞锥形瓶中,精密加入氯仿50mL,密塞,称定重量,超声处理40min,放冷至室温,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,摇匀,静置,精密吸取上清液1mL至200mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

对照品溶液的制备:精密称取靛蓝对照品约10mg,置250mL棕色量瓶中,加氯仿适量,超声溶解,并加氯仿稀释至刻度,摇匀;精密吸取2mL靛蓝对照品溶液置250mL棕色量瓶中,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

阴性供试品溶液的制备:按溃疡宁胶囊制备方法制得缺青黛药材的阴性样品制剂。取阴性样品制剂,按供试品溶液的制备方法制得阴性供试品溶液。

2.7 重复性试验

分别精密吸取取溶液制备项下对照品溶液20μL,连续进样6次,按上述色谱条件测定,记录色谱图,靛蓝峰面积的RSD=0.23%(n=6),结果表明精密度良好。

2.8 对照品溶液及供试品溶液的稳定性试验

分别精密吸取取溶液制备项下对照品和供试品溶液20.0μL,分别于0、1、2、4、6、8、10、12h注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定靛蓝峰面积积分值。对照品和供试品溶液的靛蓝峰面积RSD分别为2.1%和2.2%。试验结果表明,对照品溶液和供试品溶液制备后12h内测定,色谱峰面积无明显变化,在此时间内测定供试品溶液稳定。

2.9 回收率试验

分别精密称取靛蓝对照品适量,加入020301批样品适

量,使总量约为标示量的80%,100%,120%的样品各三份,同上提取处理,分别作为供试品溶液1[#]~6[#],另精密称取靛蓝对照品,同上操作,得对照品溶液。分别量取对照品溶液和各供试品溶液20μL注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算样品中含靛蓝的量,减去加入样品中含靛蓝的量,即为测得靛蓝的量,除加入靛蓝对照品的量即为回收率,结果见表2。

表 2 回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery test (n=3)					
样品编号	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率	平均回收率 /%	RSD /%
1	1.70	1.68	98.82	100.06	1.24
2	1.73	1.74	100.58		
3	1.75	1.73	98.86		
4	1.79	1.82	101.68		
5	1.83	1.81	98.91		
6	1.76	1.78	101.14		
7	2.12	2.15	101.42		
8	2.23	2.20	98.65		
9	2.17	2.18	100.46		

2.10 重现性试验

取020301批样品内容物6份,每份约0.3g,精密称定,分置6个100mL量瓶中,加氯仿约40mL,超声溶解,40min,加氯仿稀释至刻度,摇匀,滤过,分别精密量取续滤液1mL置100mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别作为供试品溶液1[#]~6[#]。分别量取各供试液20μL注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见表3。

表 3 重现性试验结果

Tab 3 Results of repeatability test(n=6)				
样品编号	称样量 /g	峰面积	含量 /mg	RSD /%
1 [#]	0.2908	23798	3.17	1.73
2 [#]	0.3093	24614	3.08	
3 [#]	0.2867	23430	3.17	
4 [#]	0.3190	25102	3.05	
5 [#]	0.2934	23145	3.06	
6 [#]	0.2965	23623	3.09	

经以上方法学研究表明,用此方法测定样品中靛蓝的含量线性关系好,准确度高,精密度较好,完全能够满足样品的含量测定。

2.11 样品含量测定及含量限度的确定

分别量取对照品溶液和各供试品溶液20μL注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算样品中含靛蓝的量。含量测定结果见表4。

表 4 6批溃疡宁胶囊的含量测定结果 (n=3)

Tab 4 Determination of indigotin in Kuiyangning capsules (n=3)	
批号	靛蓝的含量 /(mg/粒)
020301	3.12
020302	3.02
020303	3.08
020910	3.28
020911	3.24
020912	3.33

3 讨论

靛蓝在光照下不稳定,因此在配制样品时用棕色量瓶。稳定试验结果表明在此条件下样品稳定,可以达到分析要求。

本方法简便快捷、重复性好、分析结果准确可靠,可作为中成药溃疡宁胶囊的质量控制方法之一。

参考文献

- [1] WS3-B-3112-98, Traditional Chinese Medicine VolX VI (中成药方剂第十六册) [S]. 1997:180.
- [2] LING Q S. Ingredient of Herbal Chemistry(中草药成分化学) [M]. Vol. Beijing: People' s Medical Press 1981. 208-215.
- [3] Ch. P(2000) Vol I (中国药典 2000年版.一部) [S]. 2000: 18.

收稿日期: 2005-09-07