

高效液相色谱法测定 小儿咳喘灵颗粒中靛蓝与靛玉红含量

仇济韵¹ 赵士冶²

(1. 湖南省人民医院药剂科,长沙 410005; 2. 湖南省常德市药品检验所 415000)

[摘要] 目的 建立小儿咳喘灵颗粒中靛蓝与靛玉红含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法,依利特 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm 5 μm);流动相:甲醇-水(70:30);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:289 nm;柱温:30 ℃。结果 靛蓝的线性范围为 0.002 4~0.047 0 μg($r=0.999 6$),平均回收率为 99.53%,RSD=0.74%($n=6$);靛玉红的线性范围为 0.002 8~0.055 0 μg($r=1.000 0$),平均回收率为 99.16%,RSD=1.04%($n=6$)。结论 该方法准确可靠、简单快速,可用于小儿咳喘灵颗粒质量控制。

[关键词] 小儿咳喘灵颗粒;靛蓝;靛玉红;色谱法;高效液相

[中图分类号] R286;R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)10-1353-03

小儿咳喘灵颗粒是由麻黄、金银花、苦杏仁、板蓝根、石膏等组成的中药制剂,具有宣肺清热、止咳祛痰、平喘等功效。收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第 4 册,该标准无有效成分含量测定内容。已有该制剂中麻黄碱、绿原酸两种组分含量测定文献报道^[1-2],笔者未见靛蓝与靛玉红测定的报道。板蓝根是小儿咳喘灵颗粒中具有清热药效的主要成分,而靛蓝与靛玉红是板蓝根中的活性成分,为更好地控制该制剂质量,笔者在本实验建立高效液相色谱(HPLC)法同时测定靛蓝与靛玉红含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),包括 SPD-20A 工作泵、SPD-M20A DAD 检测器、Lc-solution 工作站;AG135 天平(METLER TOLEDO)。

1.2 试剂 靛蓝、靛玉红(购自中国药品生物制品检定所,批号分别为:110716-200509,110717-200204);甲醇(色谱纯)。小儿咳喘灵颗粒(湖北午时药业有限公司,批号:080401;四川禾邦阳光制药有限公司,批号:080104;湖北纽兰药业有限公司,批号:070602);规格均为每袋 2 g。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm 5 μm);流动相:甲醇-水(70:30);柱温:30 ℃;流速:1.0 mL·min⁻¹;紫外检测波长:289 nm;进样量:20 μL。

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取靛蓝

5.93 mg、靛玉红 6.88 mg,用三氯甲烷水浴回流 30 min 溶解后,转移至 100 mL 量瓶中,再用三氯甲烷稀释至刻度,摇匀,精密量取此液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,水浴蒸干三氯甲烷后加异丙醇-甲醇(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

2.3 供试品溶液的配制 取本品 10 包研细混匀后,精密称取约 2 g,用三氯甲烷 100 mL 水浴回流提取 1 h,共提取 3 次,滤过,合并滤液,水浴蒸干滤液,残渣用异丙醇-甲醇(1:1)溶解并定容至 10 mL。

2.4 阴性对照溶液的制备 取缺板蓝根的小儿咳喘灵颗粒处方制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.5 干扰实验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定。供试品溶液中靛蓝与靛玉红分离良好,靛蓝出峰时间为 6.4 min,靛玉红出峰时间为 9.7 min,均与相应对照品一致,阴性对照溶液在相同保留时间处无干扰。结果见图 1。

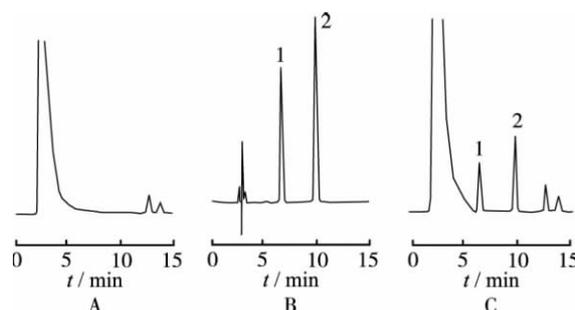


图 1 阴性样品、对照品和供试品的 HPLC 图

A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 靛蓝; 2. 靛玉红

2.6 线性关系考察 取“2.2”项下对照品溶液分别进样 2.5, 10, 20, 30, 40 μL,以实际进样量为横坐标,

[收稿日期] 2010-12-20 **[修回日期]** 2011-02-06

[作者简介] 仇济韵(1974-),女,湖南长沙人,主管药师,学士,从事医院药学工作。电话:0731-82278229,E-mail:4618538@163.com。

峰面积为纵坐标,进行线性回归,其回归方程分别为:靛蓝: $Y = 4\,794.4X - 3\,145.6$,线性范围为 $0.002\,4 \sim 0.047\,0 \mu\text{g}$ ($r = 0.999\,6$);靛玉红: $Y = 8\,227.6X - 744.4$,线性范围为 $0.002\,8 \sim 0.055\,0 \mu\text{g}$ ($r = 1.000\,0$)。可见该法线性关系良好。

2.7 精密度实验 取对照品溶液在“2.1”项下色谱条件下进样,共进样6次,记录峰面积,靛蓝与靛玉红峰面积的RSD分别为0.26%和0.24% ($n=6$)。

2.8 稳定性实验 取同一供试品溶液,于0.2, 4, 6, 8, 10, 12 h进样,记录色谱图,靛蓝与靛玉红RSD分别为0.75%和0.53% ($n=7$),实验结果表明供试品溶液放置12 h内稳定。

2.9 重复性实验 按“2.3”项下同法配制样品6份,样品I供试品溶液,进样,记录色谱图并计算含量,靛蓝与靛玉红平均含量分别为 $7.5\,2.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为0.98%和0.86% ($n=6$)。结果表明该法重复性良好。

2.10 加样回收率实验 精密称取已知含量的样品I约1 g(含靛蓝 $7.53 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,靛玉红 $2.96 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),分别称取6份,每份均加入 $1.186 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 靛蓝对照品溶液6 mL与 $1.376 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 靛玉红对照品溶液2.5 mL,用三氯甲烷100 mL水浴回流提取1 h,共提取3次,滤过,合并滤液,水浴蒸干滤液,残渣用异丙醇-甲醇(1:1)溶解并定容至10 mL。按外标法计算二种组分含量,并计算回收率。结果靛蓝平均回收率99.53%,RSD=0.74%,靛玉红平均回收率99.16%,RSD=1.04%,见表1。

表1 靛蓝和靛玉红回收率测定结果

样品	称样量/	样品含量	加入量	测得量	回收率/
	g	μg	μg	μg	%
靛蓝	1.013	7.629	7.116	14.698	99.34
	1.033	7.775	7.116	14.789	98.57
	1.005	7.564	7.116	14.656	99.67
	1.048	7.890	7.116	15.033	100.38
	1.049	7.898	7.116	15.036	100.31
	1.051	7.915	7.116	14.953	98.91
靛玉红	1.013	2.999	3.440	6.407	99.07
	1.033	3.056	3.440	6.429	98.06
	1.005	2.973	3.440	6.429	100.47
	1.048	3.101	3.440	6.494	98.64
	1.049	3.105	3.440	6.488	98.35
	1.051	3.111	3.440	6.564	100.38

2.11 样品含量测定 按“2.3”项下方法制备供试品溶液,共3批,取制备的供试品溶液及“2.2”项下对照品溶液进样,按外标法计算靛蓝与靛玉红含量,测定结果见表2。

表2 3批样品中靛蓝与靛玉红含量测定结果

样品	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	
	靛蓝	靛玉红
080401	7.53	2.96
080104	11.32	3.92
070602	8.99	2.30

3 讨论

本实验采用水浴加热直接回流提取法样品,操作简便、费时少,靛蓝与靛玉红提取完全,与文献[3]报道的索氏提取法比较,测定结果差异无统计学意义。因此选用直接加热提取法测定本品。

从DAD检测器全波长扫描中可得:靛蓝在189, 242及286 nm波长处有最大吸收,其中286 nm处吸收最强;靛玉红在208, 230及289 nm处有最大吸收,其中在289 nm处吸收最强;选择靛蓝与靛玉红吸收均较强的289 nm处测定,可增加检测灵敏度。

靛蓝与靛玉红在三氯甲烷中溶解度均不大^[4-5],文献采用三氯甲烷在超声条件溶解靛蓝与靛玉红对照品^[4,6],本实验在冬天进行,因室温较低,靛蓝与靛玉红溶解度降低,在超声及加热条件下均难以完全溶解,因此采用加热回流溶解对照品。

因靛蓝与靛玉红在水中难溶,参考文献报道^[3,7],考虑使用异丙醇作为溶剂,经过进一步摸索最终采用异丙醇-甲醇(1:1)溶解与稀释对照品。靛蓝与靛玉红在异丙醇中溶解度比甲醇中大。采用100%异丙醇为溶解与稀释剂,蒸干后的对照品溶解快速;而且因流动相极性与异丙醇相差较大,靛蓝与靛玉红溶解度减少幅度较大,实验中发现进样后靛蓝在色谱柱内慢慢洗脱出来,导致峰扩张,峰较宽且无峰尖。用100%甲醇为溶解与稀释剂,对照品溶解时间比较长。采用异丙醇-甲醇(1:1)稀释对照品,能保证对照品溶解快而且充分,又能与流动相极性更接近而改善峰形。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.10.035

[参考文献]

[1] 张立峰,赵国强,刘灿仿. HPLC法测定小儿咳喘灵颗粒中盐酸麻黄碱的含量[J]. 中国药师, 2008, 11(2): 209-210.

[2] 张薇,卫昌华,傅勇. 高效液相色谱法测定小儿咳喘灵颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(10): 19-20.

[3] 彭文进,赵士治,冯秀珍. 高效液相色谱法测定小儿感冒颗粒中靛蓝与靛玉红含量[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(6): 1-3.

[4] 游勇基,黄碧云. 青黛中靛玉红含量测定方法的研究[J]. 海峡药学, 2007, 19(12): 38-41.

- [5] 中国医药公司上海化学试剂采购供应站. 试剂手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 808.
- [6] 楼云雁, 田涛, 葛卫红. 高效液相色谱法测定溃疡宁胶囊中靛蓝的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(1): 74-77.
- [7] 冯秀珍, 姚瑶, 丁燕飞. 反相高效液相色谱法测定注射用辅酶 Q10 冻干乳含量及有关物质[J]. 中南药学, 2008, 6(3): 298-300.

牡丹皮药材及饮片中丹皮酚的动态变化

杨名宇¹, 邓桂明^{2,3}, 张志国²

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410013; 2. 湖南中医药大学第一附属医院药剂科, 长沙 410013; 3. 华南师范大学生物光子学研究院, 广州 510631)

【摘要】 目的 考察牡丹皮药材和饮片的有效期。方法 以丹皮酚为检测指标, 用水蒸汽蒸馏法提取丹皮酚, 采用紫外分光光度法, 以 274 nm 为测定波长。结果 丹皮酚在 2.4 ~ 12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈现良好线性关系 $r = 0.9999$, 平均回收率为 99.94%, RSD 为 0.12% ($n=5$)。牡丹皮药材的有效期为 15.2 个月, 牡丹皮饮片的有效期为 12.4 个月。结论 牡丹皮药材及饮片中丹皮酚随时间变化, 含量变化较大, 应严格控制牡丹皮药材及饮片的储存时间和储存条件。

【关键词】 牡丹皮; 丹皮酚; 有效期

【中图分类号】 R282.71 **【文献标识码】** A

【文章编号】 1004-0781(2011)10-1355-02

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 的干燥根皮, 性微寒, 味苦、辛, 具有清热凉血、活血化淤之功^[1], 具有调节心血管系统、抗惊厥、保肝、调节泌尿系统、调节免疫细胞、抗菌抗炎作用等^[2], 在医药、香料、化学领域具有广泛的用途^[3]。牡丹皮的主要有效成分是丹皮酚, 其含量高低是衡量牡丹皮质量的主要指标, 《中华人民共和国药典》2010 年版规定, 按干燥品计算, 丹皮酚含量不得少于 1.20%^[1]。因此, 应加强对牡丹皮质量的管理, 做到按季节采挖, 科学加工炮制, 科学贮藏保管, 确保牡丹皮中丹皮酚含量符合标准。

1 仪器与试剂

岛津 UV-2501PC 可见-紫外分光光度计, KQ-600 型超声波清洗器(昆山市定山湖检测仪器厂生产), 丹皮酚对照品(购自中国药品生物制品检定所, 批号: 110708-200505), 牡丹皮(购于湖南省药材公司, 批号: 080301, 080325, 080410, 080524, 080628); 纯化水(自制)。

2 方法与结果

2.1 贮备液的制备 精密称取丹皮酚对照品 15.0 mg 置 250 mL 量瓶中, 加适量的纯化水超声溶解后, 加纯

化水稀释至刻度, 即得 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的贮备液。

2.2 测定波长的选择 精密量取贮备液 2.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 加纯化水至刻度; 另采用水蒸气蒸馏法配制阴性对照液, 以纯化水为空白, 于 200 ~ 300 nm 波长范围内扫描, 在 274 nm 波长处有最大吸收, 而阴性对照溶液在 274 nm 波长处无干扰吸收, 因此确定 274 nm 为测定波长。

2.3 标准曲线的绘制 用纯化水将贮备液稀释成 2.4, 4.8, 7.2, 9.6, 12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照液, 以纯化水作空白, 采用紫外分光光度(UV)法, 分别在 274 nm 波长处测定吸光度(A)。将浓度(C)对 A 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 0.07594X + 0.0009823$, $r = 0.9999$ 。结果表明丹皮酚在 2.4 ~ 12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内, 吸光度与浓度的线性关系良好。

2.4 重复性与稳定性实验 取“2.3”项下的丹皮酚对照品溶液(7.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 采用 UV 法, 在 274 nm 波长处测定 A, 连续 5 次, A 基本无变化, RSD 为 0.21% ($n=5$)。测定液分别于室温下 0, 6, 12, 24, 48 h 测定, A 基本无变化, RSD 为 0.32% ($n=5$)。

2.5 回收率实验 精密量取贮备液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 用样品液稀释至刻度, 以纯化水为空白, 分别在波长 274 nm 波长处测定 A, 计算含量, 求得平均回收率为 99.94%, RSD 为 0.12% ($n=5$)。

2.6 样品测定 取同批次牡丹皮饮片和药材各 3 份,

【收稿日期】 2011-04-06 **【修回日期】** 2011-06-08

【作者简介】 杨名宇(1990-), 女, 河北人, 从事药物化学研究。电话: 0731-8651242, E-mail: ylp68208@126.com。

【通讯作者】 邓桂明(1974-), 女, 湖南宁乡人, 硕士生导师, 在读博士, 主要从事药物新制剂与新技术研究。电话: 0731-85369137, E-mail: guiming1004@yahoo.com.cn。