

## HPLC 法同时测定口腔溃疡散 II 号中靛蓝和靛玉红的含量

赵电红, 张殿云, 谢来洪, 韩蕊, 郑利光, 林红\*

(北京大学口腔医学院 口腔医院, 北京 100081)

**摘要 目的:** 建立同时测定口腔溃疡散 II 号中靛蓝和靛玉红含量的 HPLC 方法, 用以检测该制剂的质量。**方法:** 采用正交设计优化超声提取方法, 以溶剂体积、提取时间、提取温度为主要影响因素, 以靛蓝和靛玉红的提取总量为评价指标。采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相组成为乙腈-水 (65:35), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 286 nm, 柱温 20 °C。**结果:** 确定最佳提取方法为 0.3 g 供试品用 30 mL *N,N*-二甲基甲酰胺在 40~45 °C 条件下超声提取 40 min。靛蓝和靛玉红进样量分别在 59.77~1 195 ng (*r*=1.000) 和 6.300~126.0 ng (*r*=0.999 8) 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 99.1% 和 100.4%, RSD 分别为 2.8% 和 2.1% (*n*=6)。6 批样品中靛蓝、靛玉红的含量分别为 6.219~6.423、0.495~0.631 mg · g<sup>-1</sup>。**结论:** 本文建立的方法经方法验证, 可用于口腔溃疡散 II 号中靛蓝和靛玉红的定量分析。

**关键词:** 医院制剂; 口腔溃疡散 II 号; 靛蓝; 靛玉红; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 07-1234-06  
doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.07.11

## Simultaneous determination of indigo and indirubin in Kouqiangkuiyang powders II by HPLC

ZHAO Dian-hong, ZHANG Dian-yun, XIE Lai-hong, HAN Rui,  
ZHENG Li-guang, LIN Hong\*

(Dental Hospital, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of indigo and indirubin in Kouqiangkuiyang powders II, so as to control the quality of this preparation. **Methods:** Orthogonal array design was used to optimize the extracting process. The main influential factors of extracting were solvent volume, extracting time and extracting temperature. The conditions of the extracting were evaluated by the total content of indigo and indirubin. The sample was separated by a ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile-water (65:35) at the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, UV detection wavelength at 286 nm and the column temperature at 20 °C. **Results:** The analysis indicated that the optimum conditions for indigo and indirubin from Kouqiangkuiyang powders II were as follows: the sample (0.3 g) was extracted with 30 mL

\* 通信作者 Tel:(010)82195266; E-mail: hong196lin@sina.com

第一作者 Tel:(010)82195409; E-mail: z.dh0518@163.com

*N,N*-dimethyl formamide under ultrasonic extractor of 40–45 °C for 40 min. Indigo and indirubin had good linearity in the ranges of 59.77–1 195 ng ( $r=1.000$ ) and 6.300–126.0 ng ( $r=0.999$ ). The average recovery and RSD were 99.1%, 100.4% and 2.8%, 2.1% respectively ( $n=6$ ). The content of indigo and indirubin in six samples was 6.219–6.423 mg · g<sup>-1</sup>, 0.495–0.631 mg · g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The method is simple, reliable, specific, repeatable and could be applied to quantitative determination of indigo and indirubin in Kouqiangkuiyang powders II.

**Key words:** hospital preparations; Kouqiangkuiyang powders II; indigo; indirubin; HPLC

口腔溃疡散 II 号收载于北京市《医疗单位制剂规程》<sup>[1]</sup>, 是我院使用量最大的口腔外用制剂<sup>[2]</sup>, 由青黛、雄黄、人工牛黄、龙胆、黄柏、冰片和甘草七味药材经过筛混匀、灭菌后制成, 具解毒收敛作用, 用于口腔溃疡可促进溃疡面愈合。方中青黛性味咸、寒, 清热解毒、凉血消肿, 为君药, 主要的活性成分是靛蓝和靛玉红<sup>[3]</sup>。该制剂项下未设置质量标准, 为保证临床用药安全有效, 笔者在建立处方中青黛、人工牛黄、黄柏和龙胆 4 味药物的薄层色谱定性鉴别方法<sup>[4]</sup>的基础上, 对方剂君药青黛中 2 个指标性成分靛蓝和靛玉红的含量同时进行测定。中国药典 2015 年版(一部)青黛项下, 靛蓝和靛玉红分别以不同溶剂提取, 在不同的液相条件进行检测<sup>[3]</sup>, 操作烦琐。近年来也有一些采用 HPLC 法同时测定靛蓝和靛玉红含量的文献报道<sup>[5–11]</sup>, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺<sup>[5–7]</sup>、氯仿<sup>[8–9]</sup>、一定比例的氯仿–甲醇<sup>[10–11]</sup>、甲醇–1% 冰醋酸溶液(50:50)<sup>[12]</sup>等不同溶剂进行样品提取, 提取方式由回流提取<sup>[8–10]</sup>改进到操作更为简便的超声提取<sup>[5–7, 12]</sup>, 采用不同的液相色谱条件进行测定, 分析时间普遍较长, 多在 20~40 min, 仅有 1 篇测定单一药材青黛的文献分析时间小于 10 min<sup>[7]</sup>, 但试验发现不适用于多种药味组成、成分复杂的复方制剂。本文采用正交设计对超声提取方法进行优化, 建立了同时测定口腔溃疡散 II 号中靛蓝和靛玉红含量的 HPLC 方法, 可在 5 min 内快速完成测定, 简便、准确, 重复性好, 为该制剂的质量控制提供了实验依据。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、化学工作站); SK3310 HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); DT-100 型单盘分析天平(北京光学仪器厂); XA205DU 电子分析天平(瑞士梅特勒–托利多公司); SHB-III A 型循环水式多用真空泵(郑州长城

科工贸有限公司)。

### 1.2 试药

靛蓝对照品(纯度: 98.3%, 批号: 110716–201111)、靛玉红对照品(批号: 110717–200204), 均购自中国食品药品检定研究院; 口腔溃疡散 II 号(批号: 130901, 131101, 140101, 140201, 140301, 140401)、青黛的阴性对照样品均为北京大学口腔医院自制, 所用饮片购自中国药材公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 混合对照品溶液** 精密称取靛蓝对照品 7.60 mg、靛玉红对照品 2.52 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 *N,N*-二甲基甲酰胺适量, 超声(功率 180 W, 频率 53 kHz)使溶解, 加 *N,N*-二甲基甲酰胺至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。依次精密吸取靛蓝储备液 0.8 mL、靛玉红储备液 0.25 mL 置于同一 10 mL 量瓶中, 加 *N,N*-二甲基甲酰胺稀释至刻度, 摇匀, 得到每 1 mL 含靛蓝 59.77 μg、6.30 μg 的混合对照品溶液, 备用。

**2.1.2 供试品溶液** 取本品约 0.3 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 30 mL, 称定重量, 在 40~45 °C 条件下超声(功率 180 W, 频率 53 kHz)提取 40 min, 放冷, 称定重量, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺补足减失的重量, 滤过, 续滤液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

**2.1.3 阴性对照品溶液** 取缺青黛的阴性对照样品 0.3 g, 按“2.1.2”项下制成阴性对照溶液。

### 2.2 正交设计优化提取条件

参考文献<sup>[5–12]</sup>, 预实验分别考察了 0.3 g 供试品以 30 mL 不同的溶剂—*N,N*-二甲基甲酰胺、三氯甲烷、甲醇、三氯甲烷–甲醇(2:8)和甲醇–1% 冰醋酸(50:50)等超声提取 30 min 时的效果, 结果 *N,N*-二甲基甲酰胺对供试品中靛蓝和靛玉红的提取率

最高,确定提取溶剂为 *N,N*-二甲基甲酰胺。选择溶剂用量、提取时间、提取温度为主要考察因素,采用正交表  $L_9(3^4)$  进行正交试验优化提取条件,以每 1 mg 样品中靛蓝、靛玉红峰面积为指标,将 9 个试验中靛蓝、靛玉红峰面积最大者计为 100 分,其余 8 个按比例折算,2 个指标得分之和计为总分,对结

果进行分析,正交试验结果见表 1、表 2。由表中结果可知,影响靛蓝和靛玉红提取的因素大小依次为  $A>C>B$ , A 因素有显著性差异, B、C 因素无显著性影响。确定最优提取方法为  $A_2B_3C_3$ , 即 0.3 g 供试品用 *N,N*-二甲基甲酰胺 30 mL 在 40~45 °C 条件下超声提取 40 min。

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验结果Tab. 1 Results of  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment

试验号 (test number)	溶剂体积 (solvent volume) /mL A	提取时间 (extracting time)/min B	提取温度 (extracting temperature) /°C C	每 1 mg 样品中 靛蓝峰面积 ( indigo's peak area )	每 mg 样品中 靛玉红峰面积 ( indirubin's peak area )	总分 (total score)
1	20	20	20~25	13 843.80	2 333.80	139.25
2	20	30	30~35	15 082.80	2 190.80	138.69
3	20	40	40~45	20 704.20	2 334.60	165.48
4	30	20	30~35	22 983.00	2 701.80	187.77
5	30	30	40~45	26 184.60	2 635.20	197.53
6	30	40	20~25	21 395.68	2 605.89	178.16
7	40	20	40~45	23 805.20	2 251.60	174.25
8	40	30	20~25	21 193.95	2 130.06	159.78
9	40	40	30~35	23 221.20	2 142.40	167.98
$K_1$	443.42	501.27	477.19			
$K_2$	563.47	496.00	494.44			
$K_3$	502.01	511.62	537.26			
$k_1$	147.81	167.09	159.06			
$k_2$	187.82	165.33	164.81			
$k_3$	167.34	170.54	179.09			
R	40.02	5.21	20.02			

表 2 正交试验方差结果分析

Tab. 2 Variance analysis for the orthogonal test

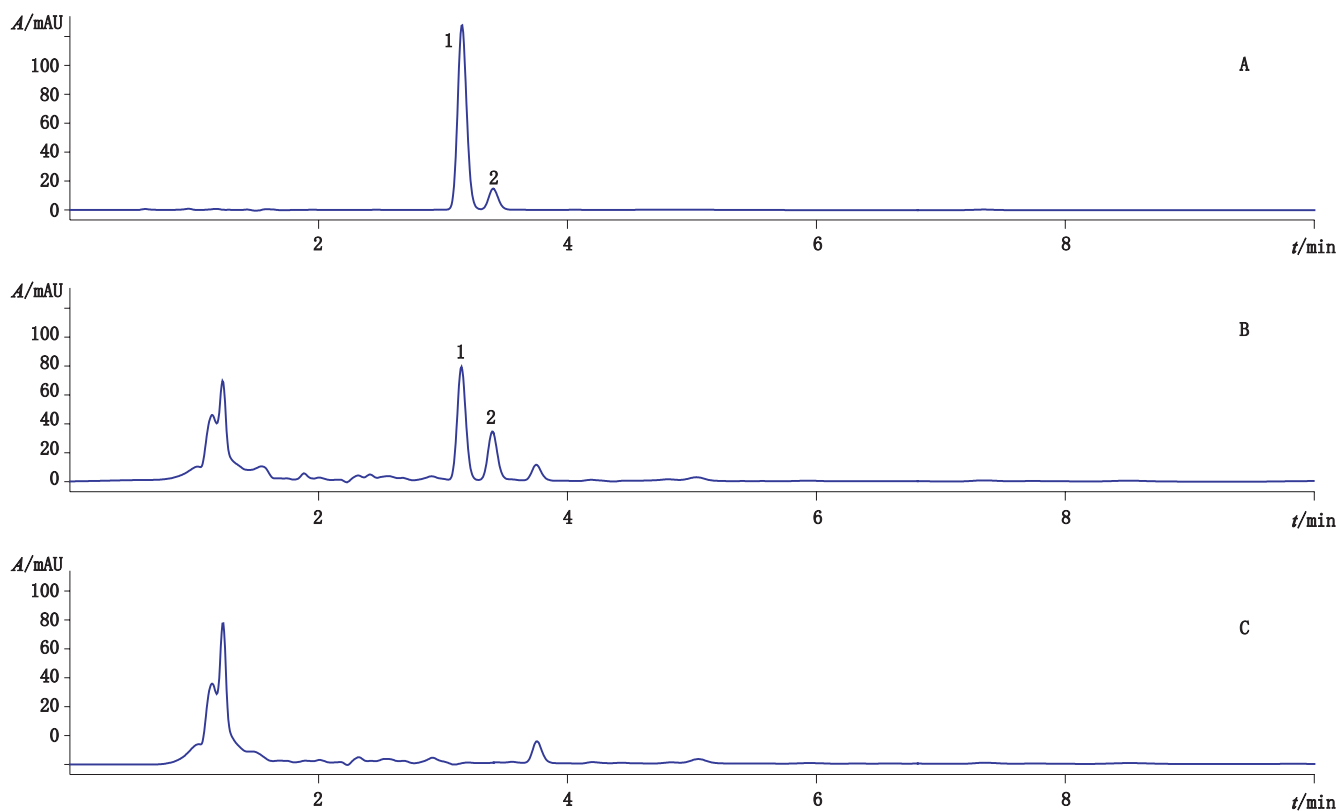
方差来源 (source of variation)	离差平方和 (sum of squares of deviations)	自由度 (degree of freedom)	<i>F</i> 比 ( <i>F</i> -ratio)	<i>F</i> 临界值 (critical value of <i>F</i> )	显著性 (significance)
A	2 402.54	2	58.76	19.00	< 0.05
B	42.07	2	1.03	19.00	
C	637.83	2	15.60	19.00	

### 2.3 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB- $C_{18}$ ( 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶, 4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m ); 流动相: 乙腈-水 (65:35); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 286 nm, 柱温: 20 °C, 进样量: 10  $\mu$ L。在上述色谱条件下, 靛蓝、靛玉红的理论塔板数均大于 3 000。

### 2.4 专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液, 按上述色谱条件进样, 比较 3 种溶液的 HPLC 图。结果表明, 供试品中靛蓝和靛玉红与相邻组分组色峰分离良好, 阴性对照品溶液色谱峰对测定无干扰, 见图 1。



1. 靛蓝 (indigo) 2. 靛玉红 (indirubin)

图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性对照品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 Typical HPLC chromatograms of reference substances (A), Kouqianguiyang powders II (B) and negative sample without Indigo naturalis

## 2.5 线性关系的考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、3、5、8、10、12、15、20  $\mu\text{L}$ , 在上述色谱条件下分别进样进行测定。以进样量 ( $X$ , ng) 为横坐标, 峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得靛蓝和靛玉红回归方程分别为:

$$Y=3.774X-21.90 \quad r=1.000$$

$$Y=4.190X+2.938 \quad r=0.9998$$

结果表明, 靛蓝和靛玉红分别在 59.77~1 195 ng 和 6.300~126.0 ng 范围内的线性关系良好。

## 2.6 精密度试验

取样品 (批号: 140401), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测得靛蓝、靛玉红峰面积的 RSD ( $n=6$ ) 分别为 0.06%、0.79%。结果表明, 仪器精密度良好。

## 2.7 重复性试验

取样品 (批号: 140401), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样, 测得靛蓝、

靛玉红的平均含量 ( $n=6$ ) 分别为 6.23、0.52  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 2.3%、2.3%。

## 2.8 稳定性试验

取“2.6”项下供试品溶液, 在室温下放置, 分别于 0、2、4、6、8、12、18、20、24 h 进样分析, 测定峰面积。靛蓝、靛玉红峰面积的 RSD ( $n=9$ ) 分别为 1.7%、2.5%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批号 (批号: 140401, 靛蓝、靛玉红的含量分别为 6.233、0.523  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 样品 6 份, 每份约 0.15 g, 分别准确加入靛蓝、靛玉红的对照品储备液 1.24、0.38 mL, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算回收率。结果靛蓝、靛玉红的平均回收率 ( $n=6$ ) 分别为 99.1%、100.4%, RSD 分别为 2.8%、2.1%。

## 2.10 样品含量测定

取 5 批样品, 分别按“2.1.2”项下方法制备供

试品溶液,每批次溶液制备 5 份,在上述色谱条件下进样,测定每批次 5 份样品中靛蓝、靛玉红的峰面积。采用外标法计算靛蓝、靛玉红的含量,结果见表 3。

表 3 口腔溃疡散 II 号样品中靛蓝、靛玉红

含量测定结果 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n=5$ )

Tab. 3 Analytical results of indigo and indirubin in Kouqiangkuiyang powders II

批号 (batch number)	靛蓝 (indigo)	RSD/%	靛玉红 (indirubin)	RSD/%
130901	6.423	0.86	0.631	1.91
131101	6.331	1.40	0.495	2.23
140101	6.271	1.42	0.540	2.05
140201	6.381	1.03	0.535	2.29
140301	6.219	1.05	0.544	2.17
140401	6.233	0.97	0.523	2.31

### 3 结论与讨论

#### 3.1 流动相系统的选择

在有关文献的基础上,分别考察了不同比例的甲醇-水<sup>[5-6,9-11]</sup>、甲醇-0.1%醋酸溶液、乙腈-水<sup>[7]</sup>、乙腈-0.1%醋酸溶液<sup>[12]</sup>等流动相系统。结果表明:供试品中靛蓝、靛玉红在甲醇-水(70:30)、甲醇-0.1%醋酸溶液(70:30)、乙腈-水(65:35)、乙腈-0.1%醋酸溶液(65:35)4种流动相系统中均能得到基线平稳的色谱图,分离效果无明显差别。而甲醇-水(0.1%醋酸溶液)为流动相时的仪器色谱柱压力是乙腈-水(0.1%醋酸溶液)的2倍,可能影响仪器和色谱柱的稳定及性能,且后者的分析效率可以提高一倍,考虑到操作简便、保护仪器、经济实用,最终选用乙腈-水作为流动相系统。

#### 3.2 柱温的选择

柱温直接影响色谱峰区域展宽和分析速度<sup>[13]</sup>,本文分别考察了20、25、30、35℃不同柱温对供试品被测成分色谱图的影响。结果表明:色谱柱压力随柱温升高呈线性下降,每升高1℃,柱压下降约0.656 bar;柱温每升高5℃,靛蓝、靛玉红的保留时间分别前移约0.10 min、0.12 min,靛玉红比靛蓝受柱温的影响较大;柱温为20、25、30、35℃时,靛蓝、靛玉红与相邻色谱峰的分离度分别为3.08、2.74、2.49、2.00,选用分离度最佳的20℃作为柱温。

#### 3.3 检测波长的选择

本试验通过PDA全波长扫描,靛蓝、靛玉红分别在286 nm、290 nm有最大吸收。同时将靛蓝、靛玉红在286 nm和290 nm时的色谱峰面积与各自最大吸收波长的色谱峰面积进行比较,靛蓝(3 000.8、3 536.3)、靛玉红(556.0、586.0)色谱峰面积分别减少15.1%、5.1%,靛蓝比靛玉红更易受到检测波长的影响,最终选定靛蓝有最大吸收的286 nm作为测定波长。

#### 3.4 小结

本文采用HPLC法,同时测定口腔溃疡散II号君药青黛中靛蓝和靛玉红的含量,方法简便、准确、可靠,可为该制剂的质量控制提供参考。中国药典2015年版(一部)规定青黛项下靛蓝、靛玉红的含量分别不得少于2.0%、0.13%<sup>[3]</sup>,本文中样品测定结果表明不同批次的口腔溃疡散II号两指标成分的含量均符合规定。靛蓝和靛玉红为同分异构体,溶解性受温度影响很大,见光易分解,制备和储存应尽量避免光<sup>[5]</sup>。试验发现,供试品溶液放置36 h时靛蓝含量减少6.35%,靛玉红增加1.16%,两者可能相互转化,建议1 d内完成提取测定。

#### 参考文献

- [1] 北京市卫生局. 医疗单位制剂规程(1984)[S]. 1984: 166  
Beijing Municipal Bureau of Health. Hospital Preparation Regulation (1984)[S]. 1984: 166
- [2] 赵电红,杨建森,陈燕铭,等. 我院2007-2011年医院制剂的应用情况分析[J]. 中国药房, 2012, 23(46): 4347  
ZHAO DH, YANG JS, CHEN YM, et al. Analysis of the utilization of hospital preparations in our hospital during 2007-2011 [J]. J China Pharm, 2012, 23(46): 4347
- [3] 中国药典2015年版. 一部[S]. 2015: 199  
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 199
- [4] 赵电红,谢来洪,郑利光. 口腔溃疡散II号的薄层色谱定性鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1649  
ZHAO DH, XIE LH, ZHENG LG. Study on the qualitative identification of Kouqiangkuiyang powders II by TLC [J]. Lishizheng Med Mater Med Res, 2014, 25(7): 1649
- [5] 姚金,刘兵兵,王建中. HPLC测定口疮膜中靛蓝及靛玉红的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2082  
YAO J, LIU BB, WANG JZ. Determination of indigo and indirubin in Kouchang Mo by HPLC method [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(11): 2082
- [6] 周燕萍,张诗龙,周旭,等. HPLC法同时测定残黄片中靛蓝和靛玉红的含量[J]. 解放军药学报, 2013, 29(2): 160

- ZHOU YP, ZHANG SL, ZHOU X, *et al.* Simultaneous determination of indigo and indirubin in Canghuang tablets by HPLC [J]. *Pharm J Chin PLA*, 2013, 29(2): 160
- [7] 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
- XIE YL, HE BY, LI YB, *et al.* Simultaneous determination of indigo and indirubin in medicinal material of *Indigo naturalis* [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2011, 22(4): 452
- [8] 范丽芳, 张兰桐, 袁志芳, 等. HPLC 法测定板蓝根药材中靛蓝和靛玉红的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(4): 540
- FAN LF, ZHANG LT, YUAN ZF, *et al.* HPLC determination of the contents of indigo and indirubin in *Radix Isatidis* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2008, 28(4): 540
- [9] 闫玮, 张楠, 刘建利. HPLC 法测定口腔溃疡散中色胺酮、靛蓝、靛玉红的含量 [J]. *中成药*, 2009, 31(5): 743
- YAN W, ZHANG N, LIU JL. HPLC determination of tryptanthrin, indigo and indirubin in *Kouqiangkuiyang powder* [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2009, 31(5): 743
- [10] 马莉, 孙琴, 李友, 等. HPLC 法测定板蓝根药材及制剂中靛蓝和靛玉红含量 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(9): 1642
- MA L, SUN Q, LI Y, *et al.* HPLC determination of indigo and indirubin in *Radix isatidis* and *Banlangen granules* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(9): 1642
- [11] 曲园, 张振秋, 张杰, 等. HPLC 法同时测定儿茶青黛复合膜中 4 个成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(10): 1698
- QU Y, ZHANG ZQ, ZHANG J, *et al.* HPLC simultaneous determination of four constituents in *Catechu* and *Indigo naturalis* composite membrane [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(10): 1698
- [12] 胡艳红, 李志浩. HPLC 测定小儿清咽颗粒中靛蓝和靛玉红的含量 [J]. *现代仪器与医疗*, 2013, 19(4): 58
- HU YH, LI ZH. Determination of indigo and indirubin in *Xiaoer Qingyan Keli* by HPLC [J]. *Mod Instr Med Treat*, 2013, 19(4): 58
- [13] 赵轶男. 高效液相色谱技术 (HPLC) 影响因素的选择 [J]. *分析试验室*, 2007, 26(增刊): 340
- ZHAO YN. Selection of factors for high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Chin J Anal Lab*, 2007, 26(Suppl): 340

(本文于 2016 年 7 月 28 日收到)