

# 咽炎丸的HPLC指纹图谱研究

马艳\*,于士龙#(解放军第463医院药剂科,沈阳 110042)

中图分类号 R283.64;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1790-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.22

**摘要** 目的:建立咽炎丸的高效液相色谱指纹图谱。方法:色谱柱为ElitSino Chrom ODS-AP(250 mm×4.6 mm,5 μm),柱温为30 ℃,流动相为1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”软件确定指纹图谱的共有峰,并计算相似度。结果:建立了10批咽炎丸的对照指纹图谱,确定了31个共有峰,其中9批样品的相似度>0.900。结论:所建立的HPLC指纹图谱准确、方便,有较好的精密度和稳定性,能够表征咽炎丸的质量特点,可为其生产和质量控制提供依据。

**关键词** 咽炎丸;高效液相色谱法;指纹图谱

## Study on HPLC Fingerprint of Yanyan Pills

MA Yan, YU Shi-long (Dept. of Pharmacy, No. 463 Hospital of PLA, Shenyang 110042, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a HPLC fingerprint of Yanyan pills. METHODS: An Elit SinoChrom ODS-AP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with 1% phosphoric acid-acetonitrile as mobile phase by gradient elution at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was maintained at 30 ℃ and the detection wavelength was 254 nm. *Fingerprint Similarity Evaluation Software* (2004 A edition) was used to determine common fingerprint peaks and calculate the similarity. RESULTS: Fingerprints of 10 batches of Yanyan pills were established and 31 common peaks were identified. The similarity of 9 batches was more than 0.900. CONCLUSIONS: Established method is accurate and convenient with good precision and stability, which can manifest the quality characteristics of Yanyan pills. It provides basis for the production and quality control of Yanyan pills.

**KEY WORDS** Yanyan pills; HPLC; Fingerprint

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=3)

样品批号	丹参酮Ⅱ <sub>A</sub>			牛蒡苷		
	质量浓度,mg/ml	$\bar{x}$ ,mg/ml	RSD,%	质量浓度,mg/ml	$\bar{x}$ ,mg/ml	RSD,%
111020	0.391 7			5.567		
	0.382 3	0.390 0	1.81	5.736	5.648	1.50
	0.396 1			5.641		
111025	0.379 3			5.724		
	0.377 9	0.381 9	1.49	5.765	5.782	1.19
	0.388 4			5.858		
111030	0.392 1			5.638		
	0.384 6	0.386 7	1.22	5.792	5.738	1.52
	0.383 4			5.785		

小;而展开系统Ⅱ的斑点圆整、清晰、集中,故本文选择Ⅱ作为玄参TLC鉴别的展开系统。

笔者还对处方中的余甘子进行了TLC鉴别,但试验中发现缺余甘子的阴性对照在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,阴性对照有干扰,故未收入正文。

在牛蒡苷的含量测定试验中,比较了3种不同比例的甲醇-水(55:45, V/V)、(50:50, V/V)、(45:55, V/V)作为流动相<sup>[10]</sup>的结果,发现以甲醇-水(45:55, V/V)作为流动相时分离度较高、峰形好,故选其作为牛蒡苷含量测定的流动相。

\* 副主任药师。研究方向:临床药学。E-mail: mayanyaoyi@163.com

# 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药物化学。E-mail: 5022863ysl@gmail.com

## 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, 2010:71.
- [2] 李伟, 陈兴. 丹参中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>醇提取工艺研究[J]. 中国实用医药, 2010, 5(6):37.
- [3] 郑琴, 胡鹏翼, 杨明, 等. 丹参制剂中丹参不同提取方法的合理性评价[J]. 中国药房, 2011, 22(35):3 293.
- [4] 李绍林, 张建军. 丹参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):45.
- [5] 孔祥文, 韩杰. 不同产地丹参中隐丹参酮、丹参酮Ⅰ和丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(19):1 794.
- [6] 陈日来, 李玉珍, 陈晓凯, 等. 复方丹参片与滴丸中丹酚酸B和丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含量的比较研究[J]. 中国药房, 2005, 16(20):1 595.
- [7] 郑莉, 宋英. HPLC法测定羚羊感冒片中牛蒡苷的含量[J]. 中药与临床, 2011, 2(2):23.
- [8] 宋伟峰, 李瑞明. HPLC法测定银翘解毒颗粒中连翘苷和牛蒡子苷的含量[J]. 中国医药导报, 2011, 8(1):56.
- [9] 覃兴贵, 孙兰珍, 蔡涛. 咽炎茶中生地、麦冬、玄参的薄层色谱鉴别实验[J]. 中国当代医药, 2012, 19(5):65.
- [10] 刘雅茹, 周立娜, 郑杰, 等. 高效液相色谱法测定感冒舒颗粒中牛蒡子苷含量[J]. 医药导报, 2010, 30(2):247.

(收稿日期:2012-06-18 修回日期:2012-08-15)

咽炎丸是我院专家依据经验自行组方开发的医院制剂,由金银花、射干、生地黄、黄芪等十余味中药组成,功效为活血通络、益阴散结、利咽止痛,适用于咽喉出现干痛、有异物感、发痒灼热等症状的治疗,疗效肯定。本制剂药味较多,但由于技术原因尚无十分完整、全面的质量评价体系,现行质量控制标准中仅用薄层扫描法测定制剂中黄芪甲苷的含量<sup>[1]</sup>。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴定手段,其建立在中药化学成分系统研究的基础上,主要用于评价中药材以及中药制剂质量的真实性、优良性和稳定性<sup>[2]</sup>。以指纹图谱作为中药制剂的质量控制方法,目前正逐渐成为国际共识,其在中药各研究领域的应用也日益广泛<sup>[3]</sup>。鉴于此,为了更好地控制咽炎丸的质量,进一步提高其质量标准,保证其制剂工艺和质量的稳定性,确保患者用药安全,笔者建立了咽炎丸的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HPLC仪,包括二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、UV6000紫外检测器、数据处理工作站(美国Waters公司);BS 224S电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];超声波清洗仪(上海超声波仪器厂,功率:100 W,频率:50 kHz)。

### 1.2 药品与试剂

咽炎丸(解放军第463医院制剂室,批号:20110104、20110214、20110408、20110512、20110613、20111212、20120227、20120409、20120630、20120910);绿原酸、次野鸢尾黄素、梓醇、没食子酸、肉桂酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200413、111557-200602、110808-201009、110831-200803、110786-200503,供含量测定用);乙腈、甲醇(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备<sup>[4-5]</sup>

分别精密称取绿原酸、次野鸢尾黄素、梓醇、没食子酸、肉桂酸对照品各适量,加甲醇溶解并配制成质量浓度分别为196、512、405、289、507 μg/ml的对照品溶液。

### 2.2 供试品溶液的制备<sup>[4-5]</sup>

取于50℃干燥30 min的咽炎丸20 g,精密称定,加水100 ml超声提取1 h,滤过,残渣加50%甲醇100 ml继续超声提取1 h,滤过,合并2次滤液,水浴下浓缩至20 ml,加75%乙醇醇沉24 h,滤过,滤液浓缩至10 ml,用水定容至25 ml量瓶中,摇匀,作为供试品溶液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱:Elit SinoChrom ODS-AP(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:1%磷酸溶液-乙腈,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μl。

### 2.4 方法学考察<sup>[4,6]</sup>

2.4.1 系统适用性试验 将供试品溶液和绿原酸、肉桂酸、没食子酸、梓醇、次野鸢尾黄素的对照品溶液分别进样10 μl,记录色谱图(见图1)。比较保留时间和在线紫外吸收光谱,确定2号峰(10.36 min)为没食子酸峰,15号峰(20.02 min)为绿原酸

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 The program of gradient elution

时间,min	乙腈,%	1%磷酸溶液,%
0~5	0~5	100~95
>5~15	5~10	95~90
>15~30	10~20	90~80
>30~50	20~40	80~60
>50~60	40~50	60~50

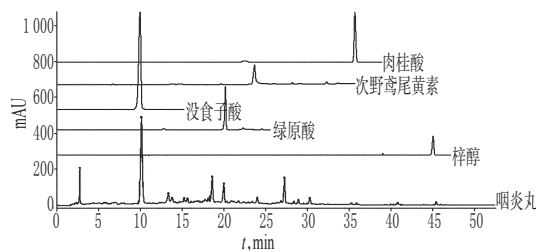


图1 肉桂酸、次野鸢尾黄素、没食子酸、绿原酸、梓醇对照品和咽炎丸的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of cinnamic acid, irisyflorentin, gallic acid, chlorogenic acid, catalpol control and Pharyngitis pills

峰,23号峰(24.13 min)为次野鸢尾黄素峰,29号峰(36.36 min)为肉桂酸峰,31号峰(45.89 min)为梓醇峰。其中,绿原酸峰的强度与保留时间适中,且分离度较好,因此选其作为参照物峰(S)。在此系统下,各对照品与供试品中的绿原酸峰理论板数均≥40 000。

2.4.2 精密度试验 取同一供试品(批号:20110408)溶液适量,按“2.3”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以绿原酸峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD为1.53%~2.69%,相对峰面积的RSD为0.98%~2.48%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品(批号:20110408)溶液适量,按“2.3”项下色谱条件分别于0、2、4、8、16、32、48 h进样分析,记录色谱图。以绿原酸峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD为1.69%~2.38%,相对峰面积的RSD为0.86%~2.08%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一批(批号:20110408)咽炎丸适量,共6份,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.3”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以绿原酸峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD为1.60%~2.86%,相对峰面积的RSD为0.93%~2.68%,表明本方法重复性良好。

## 3 指纹图谱的建立及分析<sup>[4,7]</sup>

### 3.1 咽炎丸HPLC指纹图谱的建立

按“2.2”项下方法分别制备10批咽炎丸的供试品溶液,照“2.3”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以绿原酸峰为参照物峰,按峰出现率100%计,确定31个共有峰,其峰面积占总峰面积的90%以上。

### 3.2 咽炎丸样品的聚类分析

将各色谱峰峰面积导入SPSS13.0软件得到10×31矩阵,同时对其进行系统聚类分析,采用类间平均锁链法(Between groups linkage),以欧式距离平方(Squared Euclidean distance)为测度。将10批咽炎丸样品分为两类,结合色谱峰峰面积与称样量,可判定第I类样品质量较好,第II类为一般品<sup>[8]</sup>。咽炎丸的聚类谱系图见图2。

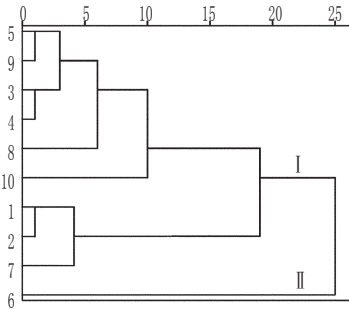


图2 咽炎丸的聚类谱系图

Fig 2 Hierarchical cluster analysis of Yanyan pills

### 3.3 相似度评价

将10批咽炎丸的积分信号导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”软件,选取“时间窗口”宽度为0.5 min,经校准后,软件即生成10批样品的指纹图谱及对照指纹图谱,详见图3、图4。

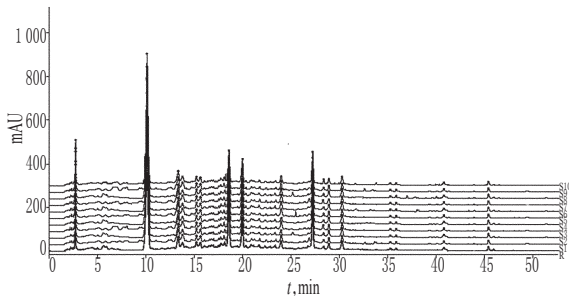


图3 10批样品的HPLC指纹图谱

R. 对照指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprints of 10 batches of Yanyan pills

R. reference fingerprints

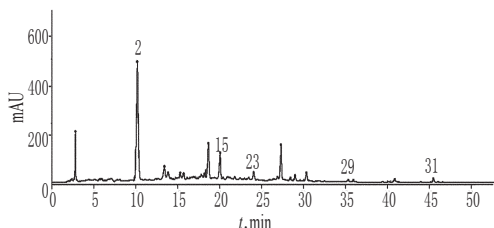


图4 咽炎丸的对照指纹图谱

Fig 4 Reference fingerprint of Yanyan pills

将对照指纹图谱和10批样品的积分信号导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B版)”软件,进行数据处理,以中位数法计算出样品与对照指纹图谱的相似度数据,结果见表2。由表2中数据结合系统聚类信息对比分析,可知二者结果一致,两种方法得到了相互印证。根据相似度和聚类分析结果,结合色谱峰峰面积和称样量可知,相似度在0.90以上的样品质量较好,0.90以下的为一般品。

表2 10批咽炎丸的相似度数据

Tab 2 Similarity of 10 batches of Yanyan pills

项目	相似度	项目	相似度
S1	0.916	S6	0.892
S2	0.973	S7	0.953
S3	0.961	S8	0.965
S4	0.938	S9	0.922
S5	0.939	S10	0.917

## 4 讨论

本试验最初采用50%甲醇、50%乙醇、甲醇分别超声提取样品,结果得到的色谱峰均较少,而且杂质峰较多,干扰严重。而采用水、50%甲醇连续超声提取的方法,可除去大部分杂质峰,各组分能够得到良好分离,且谱图包含的色谱峰信息较多。另外,由于本制剂包含药味较多,各化合物紫外吸收差异较大,因此笔者采用紫外扫描的方法,考察在190~400 nm区间不同波长的吸光度,结果在254 nm波长下供试品有最大吸收,故选择254 nm作为指纹图谱的检测波长。流动相的pH值和温度对分离效果影响较大,故笔者分别以甲醇、乙腈和醋酸溶液、磷酸溶液、三氟乙酸溶液以不同配比、不同质量分数的流动相系统进行梯度洗脱,最终确定以乙腈-1%磷酸溶液体系进行梯度洗脱得到的色谱峰峰形和分离度较好,基线漂移较小。

笔者通过参考各类文献<sup>[4-8]</sup>,确立了文中色谱条件,得到了31个共有峰,并对绿原酸等进行了归属,发现各色谱峰的保留时间稳定;通过相似度计算可知咽炎丸的批间稳定性较高,故该指纹图谱技术可用于对咽炎丸成品进行质量控制,以保证不同批次产品质量的一致性,为提高其质量标准提供依据。

## 参考文献

- [1] 马艳,袁慧星,岳莉,等. 咽炎丸质量标准研究[J]. 中国药房,2009,20(33):2 610.
- [2] 李昕,王月茹,马利,等. 中药色谱指纹图谱在中药质量评价中的应用[J]. 生物医学工程杂志,2012,29(1):192.
- [3] 詹雪艳,林兆洲,段天璇,等. 色谱指纹图谱相似度方法的适用性研究[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(5):61.
- [4] 孙国祥,史香芬. 基于高效液相色谱指纹图谱的系统指纹定量法鉴定玄参药材质量[J]. 中南药学,2009,7(8):618.
- [5] 朱立彬,黄志军,韩妮娜,等. 开郁宁片的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 医药导报,2012,31(2):238.
- [6] 丁国瑜,孙国祥. 逍遥丸高效液相色谱数字化指纹图谱研究[J]. 中南药学,2011,9(3):218.
- [7] 王云龙,李延雪,邵礼梅,等. 元胡止痛片HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药,2011,42(3):495.
- [8] 李斌,程秀民,周永妍,等. 山东产半夏药材的高效液相指纹图谱分析[J]. 山东大学学报:医学版,2010,48(8):120.

(收稿日期:2012-12-05 修回日期:2013-04-02)