

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.03.005

# 咽炎片超高效液相色谱特征图谱研究

张春辉<sup>1,2</sup>, 焦琦<sup>3</sup>, 王国平<sup>4</sup>

(1. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003; 2. 山东省青岛市食品药品检验研究院, 山东 青岛 266071;  
3. 董家口港出入境检验检疫局, 山东 青岛 266555; 4. 青岛大学附属医院东区, 山东 青岛 266061)

**摘要:**目的 建立咽炎片的超高效液相色谱(UHPLC)特征图谱。方法 色谱柱为 Dikma Endeavorsil C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温为 30℃, 流速为 0.2 mL/min, 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱, 检测波长为 278 nm。结果 建立了以(R, S)-告依春、哈巴俄苷为参照峰的咽炎片特征图谱, 并指认了(R, S)-告依春、芍药苷和哈巴俄苷 3 个特征峰。结论 建立的特征图谱可更好地控制咽炎片的质量。

**关键词:**咽炎片; 特征图谱; 超高效液相色谱法; (R, S)-告依春; 芍药苷; 哈巴俄苷

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)03-0019-03

## UHPLC Specific Chromatograms of Yanyan Tablets

Zhang Chunhui<sup>1,2</sup>, Jiao Qi<sup>3</sup>, Wang Guoping<sup>4</sup>

(1. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, China 266003; 2. Qingdao Institute for Food and Drug Control, Qingdao, Shandong, China 266071; 3. Dongjiakou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong, China 266555; 4. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China 266061)

**Abstract: Objective** To establish the UHPLC specific chromatogram of Yanyan Tablets. **Methods** Dikma Endeavorsil C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was adopted, the column temperature was 30℃, the flow rate was 0.2 mL/min, the mobile phase was methanol-water with gradient elution, and the detection wavelength was 278 nm. **Results** The specific chromatogram of Yanyan Tablets was established with (R, S)-epigallocatechin gallate and harpagoside as the reference peaks. Three characteristic peaks in the specific chromatogram were identified as (R, S)-epigallocatechin gallate, paeoniflorin and harpagoside. **Conclusion** The specific chromatogram established by this method can better control the quality of Yanyan Tablets.

**Key words:** Yanyan Tablets; specific chromatogram; UHPLC; (R, S)-epigallocatechin gallate; paeoniflorin; harpagoside

咽炎片是由玄参、板蓝根、天冬、麦冬、牡丹皮、制百部、青果、制款冬花、木蝴蝶、地黄、蝉蜕、薄荷油等 12 味中药组方的中药制剂。其现行质量标准收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第二册)》。咽炎片有养阴润肺、清热解毒、清利咽喉、镇咳止痒之功效, 用于慢性咽炎引起的咽干、咽痒、刺激性咳嗽等症。目前, 关于咽炎片质量控制研究主要集中在黄芩苷、没食子酸、丹皮酚、肉桂酸及芍药苷等的含量测定。为了达到多成分控制咽炎片质量的目的, 本试验中参考了 2015 年版《中国药典(一部)》<sup>[1]</sup>及文献[2-16], 采用超高效液相色谱(UHPLC)法及双标峰相对保留时间定位法建立了咽炎片的特征图谱, 以有效控制其内在质量。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartoris 公司, 精度为 0.01 mg); AUTO SCIENCE AS10200BT 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

### 1.2 试药

(R, S)-告依春对照品(批号为 111753-201505, 含量为 100%), 芍药苷对照品(批号为 110736-

201539, 含量为 96.4%), 哈巴俄苷对照品(批号为 111730-201508, 含量为 96.0%), 均购自中国食品药品检定研究院; 咽炎片(国内 12 家药品生产企业, 批号分别为 JLJB151203, YC160603031, YCJBY16030148, XZ160117, XAKL151203, WTGK151001, CCYNK20151006, TG 20150601, HRSJ 1604009 Z, HXYX 35052002, CDDK151207, YCWJS20150506); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Dikma Endeavorsil C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱(0~4 min 时 90% B→80% B, 4~10 min 时 80% B→40% B, 10~14 min 时 40% B, 14~15 min 时 40% B→80% B, 15~18 min 时 80% B→90% B, 18~20 min 时 90% B); 柱温: 30℃; 流速: 0.2 mL/min; 检测波长: 278 nm; 进样量: 1 μL。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 10 000。

### 2.2 溶液制备

对照品溶液: 分别精密称取(R, S)-告依春、芍药苷、哈巴俄苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含(R, S)-告依春 41.40 μg、芍药苷 47.20 μg、哈巴俄苷 38.71 μg

的混合对照品溶液。

供试品溶液:取咽炎片样品 10 片,除去包衣,精密称定,研细,取粉末 1 g,精密称定,精密加入 20% 甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,称定质量,加 20% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

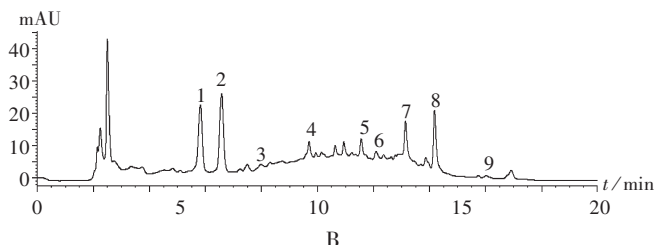
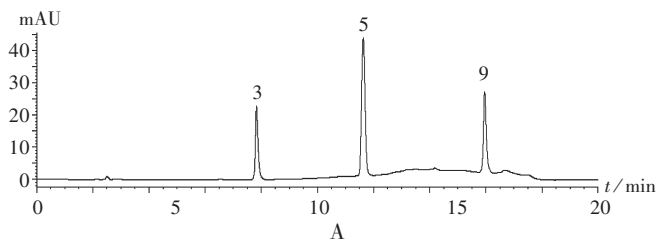
各单味药材溶液及阴性样品溶液:按咽炎片处方比例及工艺制备玄参、板蓝根、天冬、麦冬、牡丹皮、制百部、青果、制款冬花、木蝴蝶、地黄、蝉蜕、薄荷油单味药材,及分别缺少玄参、板蓝根、天冬、麦冬、牡丹皮、制百部、青果、制款冬花、木蝴蝶、地黄、蝉蜕、薄荷油的 12 种阴性样品,按拟订方法制备 12 种单味药材及 12 种阴性样品溶液。

### 2.3 方法学考察

共有特征峰标定:分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、各单味药材及阴性样品溶液各 1  $\mu$ L,依法测定,并以“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(国家药典委员会 2012. 130723 版)进行计算,生成咽炎片的特征图谱,选定共有特征峰 9 个。通过对照品溶液、供试品溶液、各单味药材及阴性样品溶液的比较,得出供试品溶液图谱中 9 个共有特征峰的归属。结果见表 1 和图 1。

表 1 咽炎片特征图谱中共有特征峰在药材中的归属

| 峰号 | 成分        | 保留时间(min) | 归属          |
|----|-----------|-----------|-------------|
| 1  | 未知成分      | 5.71      | 地黄          |
| 2  | 未知成分      | 6.54      | 百部、天冬、麦冬、青果 |
| 3  | (R,S)-告依春 | 7.90      | 板蓝根         |
| 4  | 未知成分      | 9.63      | 板蓝根、百部      |
| 5  | 芍药苷       | 11.55     | 牡丹皮         |
| 6  | 未知成分      | 12.14     | 木蝴蝶、牡丹皮     |
| 7  | 未知成分      | 13.13     | 百部、木蝴蝶、玄参   |
| 8  | 未知成分      | 14.12     | 百部、款冬花      |
| 9  | 哈巴俄苷      | 16.06     | 玄参          |



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 超高效液相色谱图

精密密度试验:取同一批样品(批号为 WTGK151001),依法制备供试品溶液,精密吸取 1  $\mu$ L,按拟订色谱条件进样 6 次。结果共有特征峰 9 个,1~4 号以 3 号峰为参照峰,5~9 号以 5 号峰为参照峰,各特征峰相对保留时间的  $RSD$  均小于 1.5% ( $n=6$ ),表明仪器精密密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 WTGK151001)样品,依法制备 6 份供试品溶液,分别按拟订色谱条件进样测定。结果共有特征峰 9 个,1~4 号以 3 号峰为参照峰,5~9 号以 5 号峰为参照峰,各特征峰相对保留时间的  $RSD$  均小于 1.5% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 WTGK151001)样品,依法制备供试品溶液,在拟订色谱条件下于 0,1,2,8,12,24 h 时进样,测定。结果共有特征峰 9 个,1~4 号以 3 号峰为参照峰,5~9 号以 5 号峰为参照峰,各特征峰相对保留时间的  $RSD$  均小于 1.5% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

相对保留时间确定:采用拟订色谱方法分析 6 批样品(批号分别为 JLJB151203, YC160603031, YCJ-BY16030148, XZ160117, XAKL151203, WTGK151001),各色谱峰相对保留时间见表 2。以 3 号峰为参照峰,1~4 号各共有特征峰相对保留时间均值分别为 0.73,0.82,1.00,1.22,  $RSD$  均为 0 ( $n=6$ );以 5 号峰为参照峰,5~9 号各共有特征峰相对保留时间均值分别为 1.00,1.04,1.14,1.23,1.39,  $RSD$  均为 0 ( $n=6$ );允许范围按  $\pm 5\%$  计算,各色谱峰相对保留时间均在规定范围内。

特征图谱测定结果:对 12 个样品进行特征图谱测定,相对保留时间测定结果见表 2。可见,8 号和 10 号样品未检出 9 号峰,其余样品 9 个特征峰相对保留时间均未见明显偏差,符合规定限度。

## 3 讨论

### 3.1 波长选择

在特征图谱建立过程中,对 210,220,245,278 nm 波长进行比较,结果在 278 nm 波长下色谱峰个数较多,且分离效果较好,可更全面地反映咽炎片的内在质量。因此,最终采用 278 nm 为特征图谱检测波长。

### 3.2 提取方法选择

取咽炎片样品 10 片,除去包衣,精密称定,研细,取粉末 1 g,精密称定,精密加入 20% 甲醇 20 mL,称定质量,分别超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min 和加热回流 30 min,放冷,称定质量,加 20% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。按拟订色谱条件进样测定,结果差异不大。因此,选用了简便的超声处理方法。

### 3.3 提取溶剂选择

本试验中参考文献[2-13],比较了以 20% 甲醇、30% 甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇、稀乙醇为提取溶

表2 相对保留时间测定结果

| 样品编号 | 批号            | 峰1   | 峰2   | 峰3   | 峰4   | 峰5   | 峰6   | 峰7   | 峰8   | 峰9   |
|------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1    | JLJB151203    | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 2    | YC160603031   | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 3    | YCJBY16030148 | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 4    | XZ160117      | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 5    | XAKL151203    | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 6    | WTGK151001    | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 7    | CCYNK20151006 | 0.72 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.05 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 8    | TG20150601    | 0.73 | 0.83 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 未检出  |
| 9    | HRSJ1604009Z  | 0.72 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.05 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 10   | HXY35052002   | 0.73 | 0.83 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.04 | 1.14 | 1.23 | 未检出  |
| 11   | CDDK151207    | 0.73 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.05 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |
| 12   | YCWJS20150506 | 0.72 | 0.82 | 1.00 | 1.22 | 1.00 | 1.05 | 1.14 | 1.23 | 1.39 |

剂超声(功率300 W,频率40 kHz)30 min的方法,发现采用加20%甲醇超声(功率300 W,频率40 kHz)30 min的方法提取效果最好,色谱峰数量较多,且峰高优势较明显。因此,选用20%甲醇作为提取溶剂。

### 3.4 流动相选择

咽炎片所含化学成分复杂,极性差异较大,采用等度洗脱难以达到满意的分离效果,因此考虑梯度洗脱方式。本试验中曾参考文献[2-15],分别考察了甲醇-水、甲醇-1.5%冰醋酸、甲醇-0.05%磷酸、乙腈-0.1%磷酸等不同比例的流动相,并对梯度比例进行了比较,最终确定以甲醇-水为流动相并梯度洗脱的分离效果最好,各特征峰与其他组分峰基本可达基线分离。

### 3.5 评判方法选择

查阅文献[2-13],未见建立咽炎片特征图谱的方法报道。传统的特征峰评判方法是采用单标峰相对保留时间法,因中药成分复杂,色谱峰重叠较严重,采用双标峰相对保留时间定位法<sup>[16]</sup>,以减小色谱系统波动对特征峰保留时间的影响,使特征峰的定位更加准确,保证了评价结果的可靠、准确和稳定。

通过采用所建立的特征图谱色谱评价系统,对12批次的样品进行测定,结果发现2个批次样品未检出9号特征峰,表明2批次样品可能存在少投料或成分提取不完全的问题,但按照现行质量标准检验均为合格样品,说明所建立的特征图谱能反映出样品的真实质量,可作为咽炎片质量控制的有效方法。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 59-61.
- [2] 庄云, 马尧. HPLC测定咽炎片中没食子酸含量[J]. 中成药, 2009, 31(3): 489-490.

- [3] 孙业成, 付凌燕, 程晓英, 等. 高效液相色谱法测定咽炎片中丹皮酚的含量[J]. 中国药师, 2007, 10(10): 999-1001.
- [4] 吴宏岩, 孙桂梅, 吴波, 等. 高效液相色谱法测定咽炎片中黄芩苷含量[J]. 中国药业, 2006, 15(17): 36-37.
- [5] 梁少强, 谢仕伟, 李国荣. 咽炎片质量标准的研究[J]. 中国医药指南, 2009, 7(23): 81-83.
- [6] 郭青, 朱文英. 咽炎片中丹皮酚的提取方法及其含量测定[J]. 中国药品标准, 2009, 10(2): 119-122.
- [7] 冯慧, 林月英. RP-HPLC法测定咽炎片中哈巴俄苷和肉桂酸的含量[J]. 天津药学, 2010, 22(3): 10-12.
- [8] 童立年, 陈翔. 一测多评法测定咽炎片中肉桂酸、丹皮酚、黄芩苷和没食子酸的含量[J]. 现代实用医学, 2013, 25(6): 697-699.
- [9] 付永慧, 彭绪玲, 熊志立, 等. RP-HPLC法测定咽炎片中哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2032-2035.
- [10] 赵佳丽, 肖国栋, 徐宏祥, 等. HPLC测定咽炎片中的黄芩苷、芍药苷和丹皮酚[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(4): 476-477.
- [11] 秦香芹, 任敬超. 高效液相色谱法测定咽炎片中芍药苷的含量[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(4): 529-530.
- [12] 王维礼, 付利, 程晓英. 高效液相色谱法测定咽炎片中没食子酸含量[J]. 中国药业, 2008, 17(11): 30-31.
- [13] 辛秀芳, 郑建锋, 任凤娇, 等. 咽炎片的质量标准研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2012, 29(6): 19-22.
- [14] 蔡少青, 谢丽华, 王建华, 等. 中药玄参中哈巴俄苷和肉桂酸的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 191-194.
- [15] 周长凯, 高静, 史士强, 等. HPLC法同时测定脉络宁注射液中的哈巴俄苷和哈巴俄苷的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(8): 173-175.
- [16] 胡晓茹, 杨思广, 戴忠, 等. 葛根芩连片特征图谱及含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1590-1596.

(收稿日期: 2017-08-16; 修回日期: 2017-11-01)