

# 咽灵合剂的质量标准研究

朱璐璐<sup>1\*</sup>, 宋英<sup>2#</sup>, 袁强华<sup>1</sup>, 陈佳<sup>1</sup>, 赵雪丽<sup>1</sup>(1.成都中医药大学, 成都 610072; 2.成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

中图分类号 R283.665; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1787-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.21

**摘要** 目的:建立咽灵合剂的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中玄参、麦冬、赤芍进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>与牛蒡苷的含量;色谱柱为Welchrom-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为270 nm(丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>)和280 nm(牛蒡苷)。结果:TLC鉴别分离度好、专属性强。丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>与牛蒡苷的进样量分别在0.420 5~5.256 0、0.128 1~3.203 0 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r$ 均为0.999 9);二者精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<3%;平均加样回收率分别为100.41%和100.83%,RSD分别为1.98%和2.44%( $n$ 均为6)。结论:所建标准可用于咽灵合剂的质量控制。

**关键词** 咽灵合剂;质量标准;丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>;牛蒡苷;薄层色谱法;高效液相色谱法

## Study on Quality Standard of Yanling Mixture

ZHU Lu-lu<sup>1</sup>, SONG Ying<sup>2</sup>, YUAN Qiang-hua<sup>1</sup>, CHEN Jia<sup>1</sup>, ZHAO Xue-li<sup>1</sup>(1.Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 2. The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard for Yanling mixture. METHODS: TLC was used to identify *Scrophularia ningpoensis*, *Ophiopogon japonicus* and *Paeoniae Radix Rubra*; the content of tanshinone II<sub>A</sub> and arctiin were determined by HPLC; the determination was performed on Welchrom-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 270 nm for tanshinone II<sub>A</sub> and 280 nm for arctiin. RESULTS: The identification by TLC was well-separated and highly specific. The linear ranges of tanshinone II<sub>A</sub> and arctiin were 0.420 5-5.256 0 μg( $r=0.999 9$ ) and 0.128 1-3.203 0 μg( $r=0.999 9$ ), respectively. RSDs of precision test, stability test and reproducibility test were all lower than 3%. The average recoveries were 100.41% (RSD=1.98,  $n=6$ ) and 100.83% (RSD=2.44%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSION: The established standard can be used for the quality control of Yanling mixture.

**KEY WORDS** Yanling mixture; Quality standard; Tanshinone II<sub>A</sub>; Arctiin; TLC; HPLC

咽灵合剂是由丹参、牛蒡子、玄参、赤芍、麦冬、余甘子6味中药制成的合剂,具有滋阴润燥、活血化瘀、散结利咽的功效,临床用于治疗阴虚血瘀、邪毒滞留所致的咽喉干燥、咽痛不适、咽内异物感等慢性咽炎症状,疗效确切。为控制药品质量,保证临床用药的安全性和有效性,笔者建立了定性鉴别本品中玄参、麦冬、赤芍3味药材的薄层色谱(TLC)法;同时采用高效液相色谱(HPLC)法对方中丹参的有效成分丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>与牛蒡子的有效成分牛蒡苷进行含量测定,所建定性定量方法简便、准确、专属性强,可有效地控制本品质量。

## 1 材料

### 1.1 仪器

AS10200 超声清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率:280 W,频率:40 kHz);BP211D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);HP-1100 HPLC 仪,含四元梯度泵、自动进样器、柱温箱(美国惠普公司)。

### 1.2 药品与试剂

\* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型、新技术。E-mail: zll989@126.com

# 通信作者:主任中药师。研究方向:中药新制剂、新剂型、新技术。电话:028-87783735

咽灵合剂(批号:111020、111025、111030)及各阴性样品均由成都中医药大学附属医院药剂科提供;丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对照品(供含量测定用,批号:110766-200619)、牛蒡苷对照品(供含量测定用,批号:110819-201007)、芍药苷对照品(批号:110736-201035)、玄参对照药材(批号:121008-201007)、麦冬对照药材(批号:121013-200607)、赤芍对照药材(批号:1092-200001)均购于中国食品药品检定研究院;硅胶G(成都市药品检验所);甲醇为色谱纯,水为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

## 2 定性鉴别

### 2.1 玄参的 TLC 鉴别<sup>[1]</sup>

取本品15 ml,用乙酸乙酯萃取2次,每次20 ml,弃去乙酸乙酯液,用水饱和的正丁醇振荡提取2次,每次20 ml,合并2次正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液;另取按处方比例制成的缺玄参的阴性样品适量,同法制成阴性对照溶液;再取玄参对照药材粉末1 g,加20 ml水饱和的正丁醇,超声提取30 min,滤过,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为对照药材溶液。吸取上述溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(12:4:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,于105 ℃烘至斑

点显色清晰,日光下检视。结果,供试品在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。玄参的TLC图见图1。

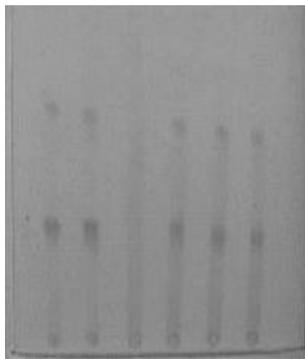


图1 玄参的TLC图

1~2.玄参对照药材;3.阴性对照;4~6.供试品

Fig 1 TLC of *S. ningpoensis*

1-2.Scrophulariae Radix reference substance; 3. negative control; 4-6. test samples

## 2.2 麦冬的TLC鉴别

取本品5 ml,加入稀盐酸0.5 ml,摇匀,于沸水浴中放置10 min,放冷,滤过,滤液用三氯甲烷萃取2次,每次10 ml,合并萃取液,浓缩至2 ml,作为供试品溶液;另取麦冬对照药材粉末0.5 g,加10 ml水超声提取20 min,滤过,滤液加稀盐酸0.5 ml,照供试品溶液制备方法制备对照药材溶液;再取按处方比例制成的缺麦冬的阴性样品适量,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。吸取上述溶液各10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-丙酮(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105  $^{\circ}$ C烘至斑点显色清晰,日光下检视。结果,供试品在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。麦冬的TLC图见图2。

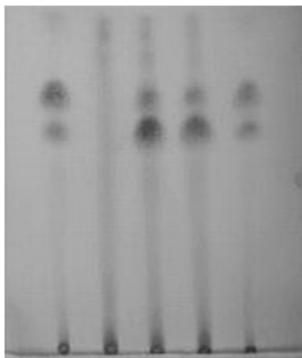


图2 麦冬的TLC图

1.麦冬对照药材;2.阴性对照;3~5.供试品

Fig 2 TLC of *O. japonicus*

1.Ophiopogonis Radix reference substance; 2.negative control; 3-5.test samples

## 2.3 赤芍的TLC鉴别

取本品10 ml,用水饱和的正丁醇振荡提取2次,每次20 ml,合并2次正丁醇液,蒸干,残渣加无水乙醇1 ml使溶解,作为供试品溶液;再取赤芍对照药材粉末0.5 g,加乙醇10 ml,振荡5 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇2 ml使溶解,作为

对照药材溶液;另取芍药苷对照品适量,加无水乙醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液;最后取按处方比例制成的缺赤芍的阴性样品适量,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。吸取上述溶液各10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-甲酸(40:10:5:0.2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,于105  $^{\circ}$ C烘至斑点显色清晰,日光下检视。结果,供试品在与对照药材及对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。赤芍的TLC图见图3。

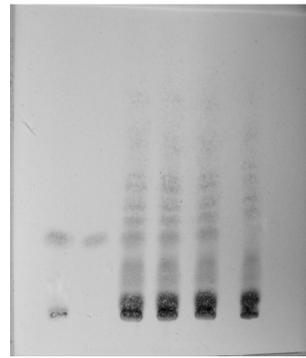


图3 赤芍的TLC图

1.赤芍对照药材;2.芍药苷对照品;3~5.供试品;6.阴性对照

Fig 3 TLC of *Paeoniae Radix Rubra*

1. *Paeoniae Radix Rubra* reference substance; 2. paeoniflorin control; 3-5. test samples; 6. negative control

## 3 含量测定

### 3.1 丹参酮II<sub>A</sub>的含量测定

3.1.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom-C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-水(80:20, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30  $^{\circ}$ C<sup>[2-6]</sup>;检测波长:270 nm。理论板数按丹参酮II<sub>A</sub>峰计算应不低于2 000。

3.1.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮II<sub>A</sub>对照品适量,加20%甲醇制成每1 ml含0.525 6 mg的对照品溶液,即得。

3.1.3 供试品溶液的制备 精密量取本品2 ml,置50 ml量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,微孔滤膜(0.45  $\mu$ m)滤过,取续滤液,即得。

3.1.4 阴性对照溶液的制备 取按处方除去丹参的阴性样品适量,按“3.1.3”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

3.1.5 专属性考察 分别取丹参酮II<sub>A</sub>对照品溶液、供试品溶液与缺丹参的阴性对照溶液各适量,按“3.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,阴性对照溶液在丹参酮II<sub>A</sub>对照品色谱峰相同保留时间处未显色谱峰,表明阴性对照无干扰。丹参酮II<sub>A</sub>的HPLC图见图4。

3.1.6 线性关系考察 精密吸取丹参酮II<sub>A</sub>对照品溶液(0.525 6 mg/ml)2、5、7、10、25 ml,分别置25 ml量瓶中,加20%甲醇定容,作为系列对照品溶液。精密吸取以上各对照品溶液10  $\mu$ l,按“3.1.1”项下色谱条件进样测定。以丹参酮II<sub>A</sub>的峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品的进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=5\ 325.8x+13.18$ ( $r=0.999\ 9$ ,  $n=5$ )。结果表明,丹参酮II<sub>A</sub>的进样量在0.420 5~5.256 0  $\mu$ g范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

3.1.7 精密度试验 精密吸取丹参酮II<sub>A</sub>对照品溶液10  $\mu$ l,按“3.1.1”项下色谱条件重复进样6次,测定峰面积。结果,

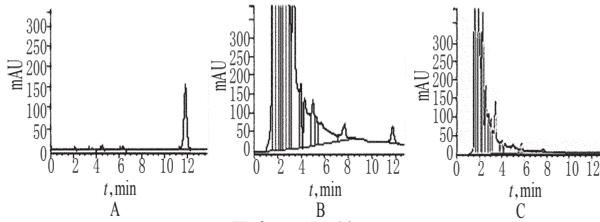


图4 丹参酮II<sub>A</sub>的HPLC图

A.丹参酮II<sub>A</sub>对照品;B.供试品;C.缺丹参的阴性对照

Fig 4 HPLC chromatograms of tanshinone II<sub>A</sub>

A.tanshinone II<sub>A</sub> control; B.test sample; C.negative control without *Salvia miltiorrhiza*

RSD=0.77%(n=6),表明仪器精密度良好。

3.1.8 重复性试验 精密吸取同一批号样品适量,共6份,分别按“3.1.3”项下方法制备供试品溶液,照“3.1.1”项下色谱条件进样,测定峰面积。结果,样品中丹参酮II<sub>A</sub>的平均质量浓度为0.389 1 mg/ml,RSD=1.51%(n=6),表明本方法重复性良好。

3.1.9 稳定性试验 精密吸取重复性试验的第1份供试品溶液适量,照“3.1.1”项下色谱条件进样,分别于0、2、4、6、8 h测定峰面积。结果,RSD=1.16%(n=5),表明供试品溶液在8 h内稳定。

3.1.10 加样回收率试验 精密吸取已知含量的同一批样品1 ml,共6份,分别精密加入丹参酮II<sub>A</sub>对照品溶液(0.131 4 mg/ml)3 ml,按“3.1.3”项下方法制备供试品溶液,照“3.1.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量与加样回收率,结果见表1。

表1 丹参酮II<sub>A</sub>的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests of tanshinone II<sub>A</sub>(n=6)

取样量,ml	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.389 1	0.394 2	0.793 3	102.54		
1	0.389 1	0.394 2	0.779 4	99.01		
1	0.389 1	0.394 2	0.781 5	99.54	100.41	1.98
1	0.389 1	0.394 2	0.776 9	98.38		
1	0.389 1	0.394 2	0.796 1	103.25		
1	0.389 1	0.394 2	0.782 4	99.77		

### 3.2 牛蒡苷的含量测定

3.2.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(45:55,V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃<sup>[7-8]</sup>;检测波长:280 nm。理论板数按牛蒡苷峰计算应不低于4 000。

3.2.2 对照品溶液的制备 精密称取牛蒡苷对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.320 3 mg的对照品溶液,即得。

3.2.3 供试品溶液的制备 同“3.1.3”项下方法操作,即得。

3.2.4 阴性对照溶液的制备 取按处方除去牛蒡子的阴性样品适量,按“3.1.3”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

3.2.5 专属性考察 分别取牛蒡苷对照品溶液、供试品溶液与缺牛蒡子的阴性对照溶液各适量,按“3.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,阴性对照溶液在牛蒡苷对照品色谱峰相同保留时间处未显色谱峰,表明阴性对照无干扰。牛蒡苷的HPLC图见图5。

3.2.6 线性关系考察 精密吸取牛蒡苷对照品溶液(0.320 3 mg/ml)1、2、5、15、25 ml,分别置25 ml量瓶中,加甲醇定容,即得系列对照品溶液。精密吸取以上各对照品溶液10 μl,按“3.2.1”项下色谱条件进样测定峰面积。以牛蒡苷的峰面积

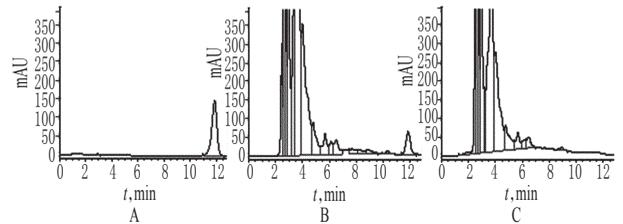


图5 牛蒡苷的HPLC图

A.牛蒡苷对照品;B.供试品;C.缺牛蒡子的阴性对照

Fig 5 HPLC chromatograms of arctiin

A.arctiin control; B.test sample; C.negative control without *Arctium lappa*

分值(y)为纵坐标,对照品的进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=5\ 777.4x-32.9$ ( $r=0.999\ 9$ , $n=5$ )。结果表明,牛蒡苷的进样量在0.128 1~3.203 0 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

3.2.7 精密度试验 精密吸取牛蒡苷对照品溶液10 μl,按“3.2.1”项下色谱条件重复进样6次,测定峰面积。结果,RSD=0.95%(n=6),表明仪器精密度良好。

3.2.8 重复性试验 精密吸取同一批号样品适量,共6份,分别按“3.2.3”项下方法制备供试品溶液,照“3.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,样品中牛蒡苷的平均质量浓度为5.680 mg/ml,RSD=2.65%(n=6),表明本方法重复性良好。

3.2.9 稳定性试验 精密吸取重复性试验的第1份供试品溶液适量,照“3.2.1”项下色谱条件进样,分别于0、2、4、6、8 h测定峰面积。结果,RSD=1.11%(n=5),表明供试品溶液在8 h内稳定。

3.2.10 加样回收率试验 精密吸取已知含量的同一批样品1 ml,共6份,分别精密加入牛蒡苷对照品溶液(1.067 8 mg/ml)5 ml,按“3.2.3”项下方法制备供试品溶液,照“3.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量与加样回收率,结果见表2。

表2 牛蒡苷的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test of arctiin (n=6)

取样量,ml	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	5.680	5.339	11.19	103.20		
1	5.680	5.339	10.89	97.58		
1	5.680	5.339	11.13	102.08	100.83	2.44
1	5.680	5.339	11.18	103.02		
1	5.680	5.339	10.92	98.15		
1	5.680	5.339	11.07	100.96		

3.2.11 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“3.1.3”项下方法制备供试品溶液,再分别按“3.1.1”与“3.2.1”项下色谱条件进样测定峰面积,以外标法计算样品中丹参酮II<sub>A</sub>和牛蒡苷的质量浓度,结果见表3。

## 4 讨论

在玄参的TLC鉴别试验中,比较了3种不同展开系统<sup>[9]</sup>的展开效果,分别为展开系统I:丙酮-三氯甲烷-甲醇-水(4:2:2:0.5,V/V/V/V),展开系统II:三氯甲烷-甲醇-水(12:4:1,V/V/V),展开系统III:三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(2:2:4:0.5,V/V/V/V)。结果发现,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置处,均显相同紫红色斑点,阴性对照均无干扰。3种展开剂系统相比较,分离效果均较好,且斑点清晰可见,但是展开系统I斑点拖尾,且靠近展开剂前沿;展开系统III的斑点R<sub>f</sub>值过

# 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)