

连知解毒胶囊质量标准研究

胡亮^{1,2}, 陈征^{1,2}, 李瑞莲^{1,2}, 周明^{1,2*} [1. 湖南省药品检验研究院(湖南药用辅料检验检测中心), 长沙 410001; 2. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心, 长沙 410001]

摘要 目的: 完善连知解毒胶囊的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对方中连翘、知母、广藿香进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定连翘中连翘酯苷A的含量, 使用Hypersil BDS色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86)为流动相, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长330 nm, 柱温35℃。结果: 薄层色谱法中均检出连翘、知母和广藿香, 阴性对照无干扰, 斑点清晰, 分离度较好; 连翘酯苷A进样量在0.0209~3.141 μg范围内具有良好的线性关系($r=0.9994$), 平均回收率为100.5%, RSD为1.42%。15批次样品中连翘酯苷A含量范围为5.4~12.6 mg·粒⁻¹。结论: 该拟定的质量标准专属性强, 重复性好, 检测指标合理, 可用于连知解毒胶囊的质量控制。

关键词: 连知解毒胶囊; 连翘酯苷A; 质量控制; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R28; R92 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)11-1308-06
doi:10.16153/j.1002-7777.2020.11.009

Study on Quality Standard of Lianzhi Detoxication Capsules

Hu Liang^{1,2}, Chen Zheng^{1,2}, Li Ruilian^{1,2}, Zhou Ming^{1,2*} [1. Hunan Institute for Drug Control (Hunan Pharmaceutical Excipients Testing and Inspection Center), Changsha 410001, China; 2. Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Changsha 410001, China]

Abstract Objective: To improve the quality standard of Lianzhi Detoxication Capsules. **Methods:** TLC method was used for the qualitative identification of the Forsythiae Fructus, Anemarrhenae Rhizoma and Pogostemonis Herba. HPLC method was used for the content determination of Forsythia Fructus. Hypersil BDS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted for the content determination of Forsythoside A in Forsythia Fructus, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(14 : 86), the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was set at 330 nm, and the column temperature was 35℃. **Results:** Forsythiae Fructus, Anemarrhenae Rhizoma and Pogostemonis Herba were detected by TLC. The negative control showed no interference, the spots were clear and the separation degree was good. Forsythoside A (injection volume 5 μL) had considerable linear relationship ($r=0.9994$) in the range of 0.0209-3.141 μg. The average recovery rate was 100.5% and RSD was 1.42%. The content of Forsythoside A in 15 batches of samples ranged from 5.4 to 12.6 mg · capsule⁻¹. **Conclusion:** The proposed quality standard has strong specificity, good repeatability and reasonable detection indexes, so it could be used to be the quality control of Lianzhi Detoxication Capsules.

Keywords: Lianzhi Detoxication Capsules; Forsythoside A; quality control; TLC; HPLC

基金项目: 国家药品标准提高工作(中药)(编号131)

作者简介: 胡亮, 主管药师, 主要从事药品检验及质量标准研究; Tel: (0731) 82275853; E-mail: 530289007@qq.com

通信作者: 周明, 主管药师, 从事药品检验及质量标准研究; Tel: (0731) 82275853; E-mail: 402840949@qq.com

连知解毒胶囊由连翘、桑白皮、知母、广藿香4味中药组成,具有清热解毒、泻肺解表的功效,用于急性上呼吸道感染属外感风热证,症见发热微恶寒、咽部肿痛、头痛咳嗽等^[1-2]。连知解毒胶囊批准文号为国药准字Z20080061,现行质量标准为国家食品药品监督管理局标准YBZ01402008,收载知母、广藿香薄层鉴别法等。连知解毒胶囊为国家药品标准提高项目,本研究对原质量标准进行验证;同时,摸索桑白皮的薄层鉴别方法,由于阴性存在干扰,故本研究未做桑白皮薄层鉴别;新增连翘的薄层鉴别法,建立连翘中连翘酯苷A的高效液相色谱含量测定方法^[3-5]。修订后的方法简便易行、重复性较好,可为该制剂的质量控制提供检验依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 液相色谱仪、2998二极管阵列检测器(沃特世科技有限公司);METTLER AE240型万分之一电子天平、XSE205DU型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多);TLC Silica gel 60硅胶G预制板(10 cm×20 cm, Merck公司);KQ500DE超声波清洗仪(500 W, 40 KHz, 昆山市超声仪器有限公司)。

连翘对照药材(批号 120908-201216)、连翘酯苷A对照品(批号 111810-201606, 97.2%)、广藿香对照药材(批号 121135-200402)、菝葜皂苷元对照品(批号 110744-200509, 94.8%)、桑白皮对照药材(批号 121124-201207)、百秋李醇对照品(批号 110772-201407, 100.0%)均购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯(Fisher Chemical公司),磷酸、甲醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、正丁醇和乙醚(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯。

连知解毒胶囊样品共15批次(批号140901、140902、150701、150601、150602、150603、170501、170502、170701、170702、170703、170704、180101、180102、180103),均由湖南金沙药业提供。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 连翘

取样品内容物2 g,加水40 mL,煮沸5 min,放冷,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次30 mL,合并

乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,即得供试品溶液。另取连翘对照药材1 g,同上法制成对照药材溶液。再取连翘苷对照品,加甲醇制成每1 mL含0.25 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方工艺制成不含连翘的样品,同供试品溶液制备方法制成连翘阴性对照溶液。吸取供试品溶液和阴性对照溶液各5 μL、对照药材溶液和对照品溶液各3 μL,分别点于同一硅胶G预制薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(8:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,在日光下检视。样品色谱中,在与对照药材色谱和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,斑点清晰,分离度较好,表明方法可行(见图1A)。

2.1.2 知母

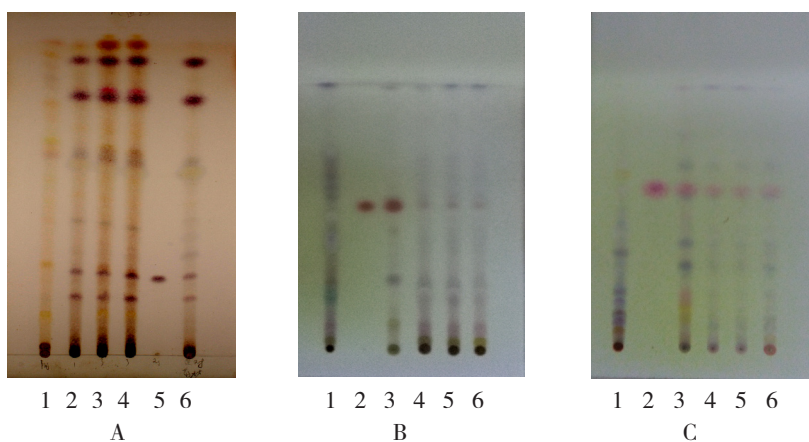
取本品内容物2 g,加10%乙醇30 mL,超声处理15 min,滤过,滤液加水饱和正丁醇10 mL振摇提取,分取正丁醇液,加盐酸1 mL,加热回流1 h,减压回收正丁醇至干,残渣加无水乙醇2 mL使溶解,即得供试品溶液。另取菝葜皂苷元对照品,加无水乙醇制成每1 mL含2 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方工艺制成不含知母的样品,同供试品溶液制备方法制成知母阴性对照溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述3种溶液各5 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以8%香草醛无水乙醇溶液与硫酸溶液(7→10)的混合液(0.5:5),在100℃加热至斑点显色清晰,在日光下检视。样品色谱中,在与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,斑点清晰,分离度较好,表明方法可行(见图1B)。

2.1.3 广藿香

取本品内容物5 g,加乙醚30 mL,超声处理15 min,冷浸6 h,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯2 mL使溶解,即得供试品溶液。另取广藿香对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。再取百秋李醇对照品,加乙酸乙酯制成每1 mL含2 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方工艺制成不含广藿香的样品,同供试品溶液制备方法制成广藿香阴性对照溶液。照薄层色谱法试验,吸取供试品溶液和对照品溶液各5 μL、对照药材溶液10 μL、阴性对照

溶液 $5\mu\text{L}$ 分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙醚(7:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以1%香草醛硫酸溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,在日光下检视。样品色谱中,

在与对照药材色谱和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,斑点清晰,分离度较好,表明方法可行(见图1C)。



A: 1. 阴性样品溶液; 2~4. 供试品溶液; 5. 连翘苷对照品溶液; 6. 连翘对照药材溶液。B: 1. 阴性样品溶液; 2. 菝葜皂苷元对照品溶液; 3~6. 供试品溶液。C: 1. 阴性样品溶液; 2. 百秋里醇对照品溶液; 3. 广藿香对照药材; 4~6. 供试品溶液。

图1 薄层色谱图

2.2 连翘中连翘酯苷A含量测定

2.2.1 溶液制备

精密称取连翘酯苷A对照品10.47 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液①($0.2094\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);精密称取连翘酯苷A对照品6.28 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液②($0.1256\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);精密量取对照品溶液①($0.2094\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1 mL置100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液③($2.094\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

取样品内容物,混匀,研细,取约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称量,超声处理20 min(功率500 W,频率40 kHz),放冷,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.2 色谱条件

采用Hypersil BDS C18色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86)为流动相,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长330 nm,柱温35℃。以连翘酯苷A峰计算理论塔板数应不低于5000,分离度大于1.5。对照品及样品的色谱

图见图2。

2.2.3 专属性试验

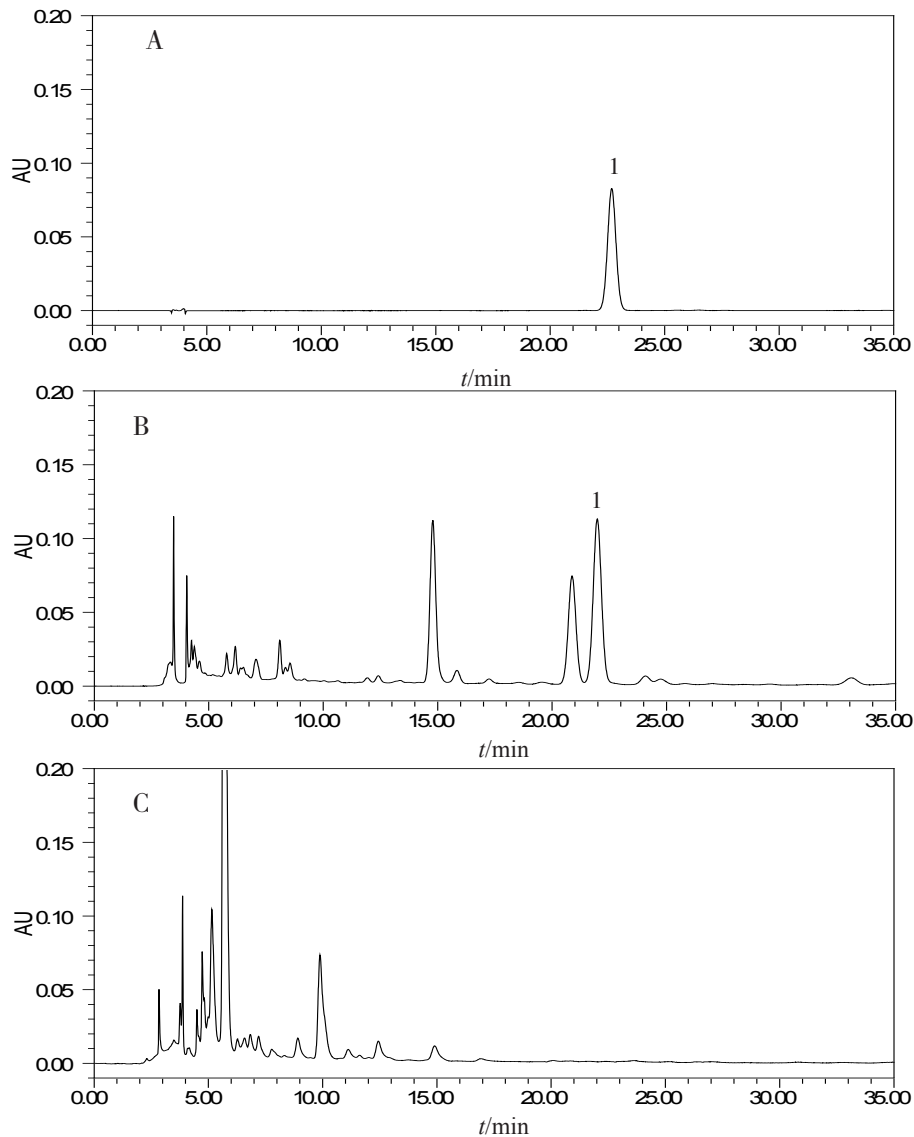
取不含连翘的阴性样品0.2 g,按“2.2.1”节溶液制备方法制备阴性对照溶液,进样 $5\mu\text{L}$,依法测定。结果阴性对照溶液对测定无干扰,专属性好,色谱图见图2。

2.2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”节溶液制备下连翘酯苷A对照品溶液①($0.2094\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1、2、5、10、15 μL 及对照品溶液③($2.094\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 10 μL 注入高效液相色谱仪,按“2.2.2”节色谱条件进样测定,记录色谱图,求得峰面积积分值。以峰面积积分值 Y 为纵坐标,进样量 X (μg)为横坐标,进行线性回归,得回归方程: $Y=1954609.72X+47053.56$ ($r=0.9994$)。结果表明:连翘酯苷A进样量在 $0.0209\sim 3.141\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”节下对照品溶液①($0.2094\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 μL ,连续进样6次,记录峰面积。结果连翘酯苷A峰面积的RSD为0.86%($n=6$),表明仪器精密度良好。



A. 对照品; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 连翘酯苷A。

图2 连翘中连翘酯苷A高效液相色谱图

2.2.6 重复性试验

取同一批样品(批号140902)6份,分别按“2.2.1”节方法制备供试品溶液,进样 $5\mu\text{L}$,进行测定,求得峰面积积分值,计算含量。结果6份样品中连翘酯苷A平均含量为 $16.93\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD为1.40%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验

取“2.2.6”节下一份供试品溶液,室温下放置,在0、6、12、18、24 h分别进样 $5\mu\text{L}$,进行测定求得峰面积积分值,计算RSD为1.30%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验

取已测定含量的同一批号样品(批号140902,含连翘酯苷A $16.93\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 0.1 g ,共6份,分别精密称定,置于已精密加入对照品溶液①($0.2094\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 8.5 mL 蒸干后的具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL ,密塞,称量,超声处理(500 W , 40 KHz) 20 min ,放冷,称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试溶液。按“2.2.2”节色谱条件进样测定(进样量 $5\mu\text{L}$),按外标法计算加样回收率,6批样品平均回收率为100.5%,RSD为1.42%。结果表明该法加样回收率较好(见表1)。

表1 连翘酯苷A回收率试验结果表

取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.1096	1.8555	1.7799	3.66	101.3		
0.1109	1.8775	1.7799	3.66	100.1		
0.1072	1.8148	1.7799	3.64	102.5		
0.1036	1.7539	1.7799	3.54	100.3	100.5	1.42
0.1082	1.8318	1.7799	3.58	98.2		
0.1065	1.8030	1.7799	3.59	100.3		

2.2.9 检测下限和定量下限

取“2.2.1”节下连翘酯苷A对照品溶液,用甲醇进行逐步稀释,进样量均为5 μ L,以信噪比3:1时浓度作为仪器检测下限,信噪比10:1时浓度为仪器定量下限,结果分别为4.28 ng和10.47 ng。

2.2.10 样品测定

按照“2.2.1”节下方法制备供试品溶液及0.1 mg \cdot mL⁻¹的对照品溶液,分别进样5 μ L,依法测定($n=2$),结果15批样品含量分别为8.7、8.6、9.1、11.3、12.1、12.6、5.4、5.9、5.8、6.4、6.7、6.5、5.8、5.7、5.9 mg \cdot 粒⁻¹。

3 讨论

本文新增了连翘的薄层色谱鉴别,对供试品溶液不同制备方法进行了考察,采用石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)超声处理后弃去石油醚(30~60 $^{\circ}$ C),再用甲醇超声处理方式进行提取^[1]。结果,由于供试品中含蔗糖辅料等原因,用甲醇较难完全溶解,且点样时样品黏稠,分离效果不佳,故最终选择乙酸乙酯振荡提取方式进行处理。供试品溶液斑点清晰,分离度较好,阴性无干扰,方法耐用性较好,因此建议列入质量标准。

连翘主要包括青翘和老翘,含有化学成分较多,由于受不同产地、不同采摘时间、不同加工方法等因素的影响,连翘中连翘苷和连翘酯苷A的含量差异较大^[6-9],连翘酯苷A对金黄色葡萄球菌等多种致病菌有极强的抑制作用,同时还具有很强的抗真菌、抗病毒作用^[10-13],因此有必要对这2个成分的含量进行控制。原质量标准中已有连翘苷的含量

测定方法,新拟定的质量标准中增加了连翘酯苷A的含量测定方法。

试验中考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水、乙腈-磷酸水4种流动相体系,结果表明乙腈-磷酸水分离效果最好,进一步比较不同浓度磷酸水溶液(0.1%、0.2%、0.4%),最终选择乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相;同时,对比超声和回流提取方法,研究显示不同提取方法含量测定结果无显著性差异,超声提取具有耗时短、操作方便等特点,故最终选择超声处理方式。

2015年版《中华人民共和国药典》中未将青翘和老翘的限度分列,在连翘项下其规定为“按干燥品计算,含连翘酯苷A(C₂₉H₃₆O₁₅)不得少于0.25%”。本品中连翘的投料药材为青翘,而青翘中连翘酯苷A含量远高于老翘^[14-15]。《中华人民共和国药典》2020年版公示稿中,连翘项下规定“本品按干燥品计算,青翘含连翘酯苷A(C₂₉H₃₆O₁₅)不得少于3.5%;老翘含连翘酯苷A(C₂₉H₃₆O₁₅)不得少于0.25%。”^[16],从样品和对应投料药材中连翘酯苷A含量数据表明,投料药材中连翘酯苷A含量均大于3.5%,但其在制备过程中的转移率仅为17%~24%。折算本品含连翘酯苷A理论值不得少于1.111 \times 3.5% \times 1000=38.885 mg \cdot 粒⁻¹,但由于本研究样本量较少,故暂按最低转移率的75%进行折算,拟定限度为5.0 mg \cdot 粒⁻¹(38.885 \times 0.17 \times 0.75),经检验,15批次样品均符合规定。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2015: 418.
- [2] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[S]. 2009: 292.
- [3] 胡静, 马琳, 张坚, 等. 连翘的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(10): 760-763.
- [4] 雷建林, 李艳桃, 聂会生, 等. HPLC法测定不同产地连翘药材中连翘苷的含量[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 202-203.
- [5] 原江锋, 邱智军, 刘建利, 等. 河南和山西连翘叶中总木脂素、连翘醋苷A、连翘醋苷B和连翘苷的含量比较[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 845-848.
- [6] 邹琼宇, 邓文龙, 丁立生, 等. 连翘果实中的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1): 57-60.
- [7] 原江锋, 赵君峰, 孙军杰, 等. 河南、山西连翘叶黄酮类和三萜酸类化合物含量比较[J]. 良品科学, 2015, 36(10): 164-167.
- [8] 刘妍如, 唐志书, 白宏博, 等. 贯叶连翘不同部位黄酮类成分差异与抗炎活性相关性分析[J]. 中草药, 2017, 48(21): 104-109.
- [9] 王姝君, 李石飞, 张立伟. 连翘含量测定方法优化及青(老)翘质量控制标准建立探讨[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(15): 3157-3162.
- [10] 徐春媚, 王文生, 曹艳红, 等. 连翘护肝作用的实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2001, 24(1): 10-12.
- [11] 冯淑怡, 李先荣, 孙建宁. 连翘酯苷抗感染、解热作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2006, (10): 73-75.
- [12] 秦宇, 张文丽, 林媛媛, 等. 连翘化学成分与抗氧化活性成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, (10): 149-152.
- [13] 冯芹, 夏文凯, 王现珍, 等. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(3): 426-430.
- [14] 闫瑞, 杨印军, 刘红卫, 等. “抢青”采摘对青翘中连翘酯苷A和连翘苷含量的影响[J]. 中国现代中药, 2016, 18(5): 579.
- [15] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020年版连翘公示稿.

(收稿日期 2020年4月10日 编辑 郑丽娥)