

· 中药工业 ·

大卫颗粒的质量标准提高[△]

李晓*, 王学方, 张丽先, 李飞飞, 宁二娟, 魏悦

1. 河南省生物技术开发中心, 河南 郑州 450002;

2. 河南省植物天然产物开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450002

[摘要] 目的: 提高大卫颗粒的质量标准。方法: 对制剂中连翘、金银花、柴胡及甘草进行薄层色谱(TCL)鉴别; 采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定制剂中绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷的含量。结果: 连翘、金银花、柴胡及甘草的 TLC 图斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰。绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷检测质量浓度线性范围分别为 5.228~52.28($r=0.9999$)、5.92~59.20($r=0.9998$)、6.816~68.16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2.0%; 平均加样回收率分别为 101.84% (RSD = 0.44%, $n=6$)、99.07% (RSD = 0.79%, $n=6$)、101.30% (RSD = 0.62%, $n=6$)。结论: 该研究所建标准定性定量方法简便、专属性强、结果准确可靠, 可用于大卫颗粒的质量控制。

[关键词] 大卫颗粒; 薄层色谱鉴别; 含量测定; 质量控制

[中图分类号] R286; R944.2+6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)04-0517-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180919002

Improvement of Quality Standard of Dawei Granules

LI Xiao*, WANG Xue-fang, ZHANG Li-xian, LI Fei-fei, NING Er-juan, WEI Yue

1. Biotechnology Developing Center of Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Plant Natural Products Development Engineering Technology Center, Zhengzhou 450002, China

[Abstract] **Objective:** To improve the quality standard of Dawei granules. **Methods:** TLC was applied for qualitative identification of *Forsythia suspensa*, *Lonicerae japonicae*, *Bupleurum chinense*, *Glycyrrhiza uralensis*. The contents of baicalin, chlorogenic acid and forsythoside A were determined by HPLC. **Results:** TLC spots of *F. suspensa*, *L. japonicae*, *B. chinense* and *G. uralensis* were clear and well-separated without negative interference. The linear ranges of chlorogenic acid, forsythoside A and baicalin were 5.228–52.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$), 5.92–59.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$) and 6.816–68.16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.0%. The average sample adding recovery rates of chlorogenic acid, forsythoside A and baicalin were 101.84% (RSD = 0.44%, $n=6$), 99.07% (RSD = 0.79%, $n=6$) and 101.30% (RSD = 0.62%, $n=6$), respectively. **Conclusions:** This method is accurate, sensitive, simple and specific in good repeatability, which is suitable for quality control of Dawei granules.

[Keywords] Dawei granules; TLC identification; Content determination; Quality standard

大卫颗粒由连翘、黄芩、柴胡、金银花、甘草、紫苏叶 6 味中药组成, 收载于《中药部颁标准》(第十册), 具有清热解毒、疏风透表之功效^[1]。临床主要用于感冒发烧、头痛、咳嗽、鼻塞流涕、咽喉肿痛等症, 研究表明, 大卫颗粒治疗小儿病毒性上呼吸道感染总有效率达 92.4%, 明显优于利巴韦林对照组(79.1%)^[2]; 此外, 大卫颗粒对妊娠期急

性上呼吸道感染的临床症状有明显缓解、可增强机体免疫力, 总有效率为 92.31%^[3]。

但该制剂现行标准较为落后, 只收载了薄层鉴别法鉴别绿原酸和相关检查项目, 前期有文献报道了大卫颗粒中绿原酸、黄芩苷等成分的含量测定方法^[4-5], 但是其全面的质量标准研究未见报道。大卫颗粒已上市多年, 临床应用量大^[6], 尤其是在儿

[△] [基金项目] 河南省科技攻关项目(152102110115); 河南省科学院科研开发项目(18KF13003)

* [通信作者] 李晓, 硕士, 研究方向: 中药质量标准研究与新药开发; E-mail: 67430218@qq.com

科^[7],故有必要加强其质控方法和标准研究,保证其临床疗效与安全性。

为此,本研究对制剂中主要药味连翘、金银花、柴胡等进行薄层色谱(TLC)鉴别,并对其中绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷的含量进行高效液相色谱(HPLC)测定,为其质量标准提高提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津, CMA-20A 系统、LC-20AT 二元高压泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-M20A 检测器、LC Soutation 工作站); GoodSee-20E 薄层色谱成像系统(上海科哲生化科技有限公司); ME204 型万分之一分析天平[托利多仪器(上海)有限公司]; AYW220D 十万分之一分析天平(日本岛津)。

1.2 试药

大卫颗粒(陕西兴邦药业有限公司,批号分别为:160902、161001、161101,规格:6 g/袋);绿原酸对照品(批号:110753-201415,纯度96.2%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201619,纯度93.5%)、连翘酯苷A对照品(批号:111810-201606,纯度93.4%)、连翘苷对照品(批号:110821-201615,纯度94.9%)、甘草苷对照品(批号:111610-201607,纯度93.1%)、金银花对照药材(批号:121060-201608)、连翘对照药材(批号:120908-201216)、柴胡对照药材(批号:120992-201509)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板、硅胶H薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈为色谱纯;水为屈臣氏纯净水;正丁醇、甲醇、三氯甲烷等其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

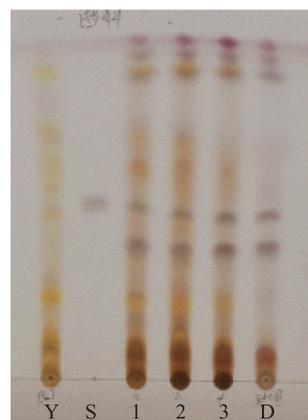
2.1 定性鉴别

2.1.1 连翘 供试品溶液:取本品4 g,加60 mL水溶解,用40 mL水饱和的正丁醇振摇提取,重复操作3次,将正丁醇液合并,分取60 mL供柴胡鉴别用,剩余的正丁醇液减压回收至干,残渣加2 mL甲醇溶解,即得^[8]。

对照药材溶液:取连翘对照药材0.5 g,加40 mL水,加热煮沸1 h,滤过,滤液按供试品溶液制备方法制备,即得。

对照品溶液:取连翘苷对照品10 mg,加甲醇制成 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

阴性对照溶液:按大卫颗粒处方取缺连翘的其他药味,按其制剂工艺制备缺连翘的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备,即得。吸取上述4种溶液各 $5 \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶G薄层板上,展开剂为三氯甲烷-甲醇按体积比5:1配置,将薄层板展开,取出,晾干,采用10%硫酸乙醇溶液为显色剂,在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。结果阴性对照对检测无干扰,供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,见图1。



注:1~3. 供试品; D. 对照药材; S. 对照品; Y. 阴性对照。

图1 连翘的薄层色谱图

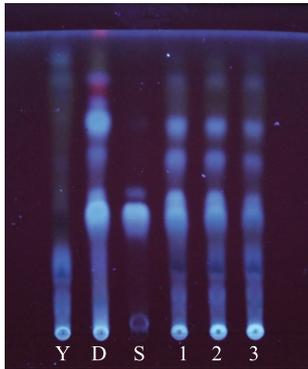
2.1.2 金银花 供试品溶液:取2 g本品,加15 mL甲醇,超声处理20 min,用甲醇补足减失的溶剂量,滤过,取续滤液,即得。

对照药材溶液:取0.5 g金银花对照药材,加15 mL甲醇,按供试品溶液制备方法制成,即得。

对照品溶液:取绿原酸对照品10 mg,加甲醇制成质量浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

阴性对照溶液:按大卫颗粒处方取缺金银花的其他药味,按其制剂工艺制备缺金银花的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备,即得。

吸取上述4种溶液各 $6 \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶H薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水按体积比7:2.5:2.5配置,静置,取上层溶液为展开剂,将薄层板展开,取出,晾干,置365 nm紫外光灯下检视^[9]。结果阴性对照对检测无干扰,供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相应的位置上,均显蓝色荧光斑点,见图2。



注: 1~3. 供试品; D. 对照药材; S. 对照品; Y. 阴性对照。

图2 金银花的薄层色谱图

2.1.3 柴胡 供试品溶液: 取2.1.1中剩余的正丁醇液, 加入等体积的氨试液洗涤, 再用等体积正丁醇饱和的水洗涤, 弃去水层, 正丁醇液减压回收至干, 残渣加1 mL 甲醇溶解, 即得。

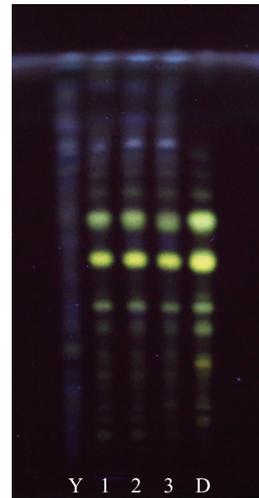
对照药材溶液: 取柴胡对照药材0.5 g, 加40 mL 水, 加热煮沸1 h, 滤过, 滤液按供试品溶液制备方法制备, 即得。

阴性对照溶液: 按大卫颗粒处方取缺柴胡的其他药味, 按其制剂工艺制备缺柴胡的阴性样品, 并按供试品溶液制备方法制备, 即得。吸取上述3种溶液各2 μL , 分别点于同一硅胶G薄层板上, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-水按体积比13:7:2配置后, 在10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置的下层溶液, 将薄层板展开, 取出, 晾干, 采用1%对二甲氨基苯甲醛的硫酸乙醇溶液(1 \rightarrow 10)为显色剂, 在70 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰后30 min, 置紫外光灯(365 nm)下检视^[10], 结果阴性对照对检测无干扰, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 见图3。

2.1.4 甘草 对照品溶液: 取甘草苷对照品10 mg, 加甲醇制成质量浓度为0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得。

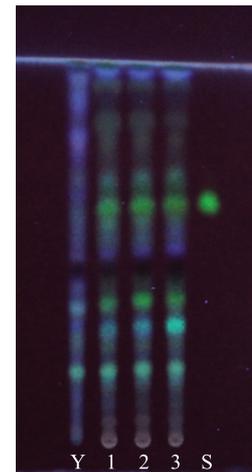
阴性对照溶液: 按大卫颗粒处方取缺甘草的其他药味, 按其制剂工艺制备缺甘草的阴性样品, 并按供试品溶液制备方法制备, 即得。

吸取2.1.1项下的供试品溶液及上述两种溶液各2 μL , 分别点于同一硅胶G薄层板上, 展开剂以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水按体积比15:1:1:2配置, 将薄层板展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视^[11]。结果阴性对照对检测无干扰, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 见图4。



注: 1~3. 供试品; D. 对照药材; Y. 阴性对照。

图3 柴胡的薄层色谱图



注: 1~3. 供试品; S. 甘草苷; Y. 阴性对照。

图4 甘草的薄层色谱图

2.2 含量测定

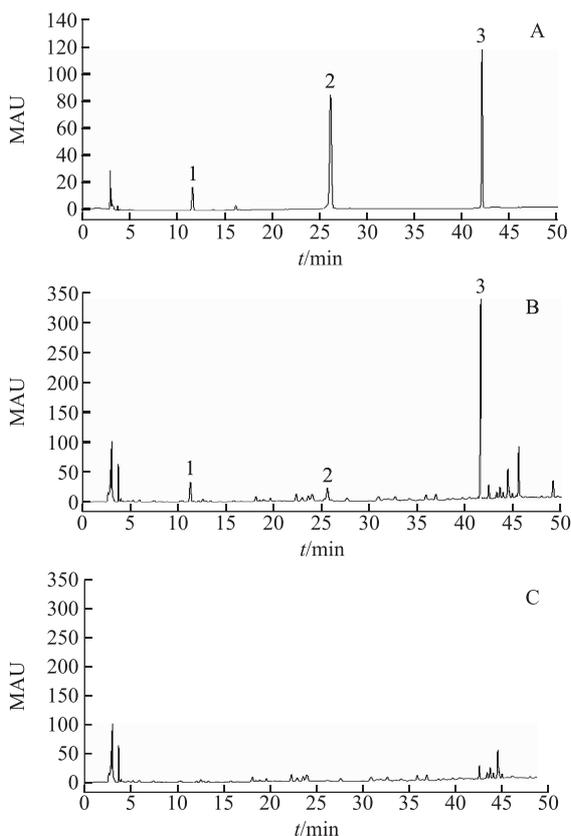
2.2.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~15 min, 13% A, 87% B; 15~20 min, 13%~15% A, 87%~85% B; 20~28 min, 15% A, 85% B; 28 min~38 min, 15%~35% A, 85%~65% B; 3~50 min, 35% A, 65% B)^[12]; 流速为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长为320 nm; 柱温35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为10 μL 。在上述色谱条件下, 待测成分分离良好, 分离度 >1.5 。

2.2.2 对照品溶液制备 取绿原酸13.70 mg、连翘酯苷A 14.80 mg、黄芩苷17.04 mg, 精密称量, 置50 mL容量瓶中, 加50%甲醇适量使溶解, 再加

50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得(临用新制)。

2.2.3 制备供试品溶液 取本品适量, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 超声处理 20 min, 放冷, 再加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 专属性试验 按大卫颗粒处方取缺金银花、连翘、黄芩的其他药味, 按其制剂工艺制备阴性样品, 并按 2.2.3 供试品溶液制备方法制备, 制成阴性对照溶液。分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 5。结果, 供试品中绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷对照品在相同保留时间处有相同色谱峰, 并与其他组分峰基线分离较好, 且相应的阴性对照不出峰。表明该方法可以用于该制剂中 3 种成分的测定。



注: A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 绿原酸; 2. 连翘酯苷 A; 3. 黄芩苷。

图 5 大卫颗粒的高效液相色谱图

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.0、1.5、2.0 mL, 分别置

于 10 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇定容制成系列对照品溶液。在 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 以待测成分浓度(X)为横坐标进行线性回归, 绘制标准曲线, 得绿原酸回归方程: $Y=31\ 859.2 X-30\ 585$, $r=0.999\ 8$; 连翘酯苷 A 回归方程: $Y=777\ 875 X-3316$, $r=0.999\ 9$; 黄芩苷回归方程: $Y=36\ 127.9 X+839.84$, $r=0.999\ 9$; 结果表明, 绿原酸在 $5.228 \sim 52.28\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 连翘酯苷 A 在 $5.92 \sim 59.20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 黄芩苷在 $6.816 \sim 68.16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 进样精密度 取 2.2.3 项下供试品溶液(批号: 160901), 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积并计算绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷含量。结果 3 种成分的平均质量分数分别为 2.9、5.0、7.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 峰面积 RSD 分别为 1.10%、0.76%、1.28%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批样品(批号: 160901)适量, 共 6 份, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷含量。结果 3 种成分的平均质量分数分别为 2.9、4.9、7.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 峰面积 RSD 分别为 1.62%、1.83%、1.38%, 表明本方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取 2.2.3 项下供试品溶液(批号: 160901), 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录峰面积并计算绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷含量。结果 3 种成分的平均质量分数分别为 2.8、4.9、7.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 峰面积 RSD 分别为 0.96%、1.25%、0.84%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 稳定。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取同一批样品(批号: 160901)适量, 共 6 份, 分别加入实际质量浓度为 $105.84\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸对照品溶液 2 mL, $276.46\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 连翘酯苷 A 对照品溶液 2 mL, $254.37\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷对照品溶液 3 mL, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 1。

2.2.10 含量测定 取 3 批本品各适量, 分别按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷含量, 结果见表 2。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

待测成分	取样量/g	供试品中的含量/ μg	对照品加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.102 0	295.80	211.68	518.38	102.15	101.84	0.44
	0.100 4	291.16	211.68	511.43	101.71		
	0.100 0	290.00	211.68	507.66	101.19		
	0.100 4	291.16	211.68	515.22	102.46		
	0.101 4	294.06	211.68	515.62	101.95		
	0.105 0	304.50	211.68	524.17	101.55		
连翘酯苷 A	0.100 5	502.50	552.92	1 040.07	98.55	99.07	0.79
	0.100 7	503.50	552.92	1 059.41	100.28		
	0.100 5	502.50	552.92	1 051.28	99.61		
	0.100 3	501.50	552.92	1 042.73	98.89		
	0.100 9	504.50	552.92	1 047.38	99.05		
	0.100 2	501.00	552.92	1 033.52	98.06		
黄芩苷	0.100 0	720.00	763.08	1 489.00	100.40	101.30	0.62
	0.112 0	806.40	763.08	1 585.01	100.99		
	0.111 6	803.52	763.08	1 596.18	101.89		
	0.104 0	748.80	763.08	1 524.92	100.86		
	0.102 4	737.28	763.08	1 525.14	101.65		
	0.104 0	748.80	763.08	1 541.92	101.99		

表2 样品含量测定结果($n=3$)

批号	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		
	绿原酸	连翘酯苷 A	黄芩苷
160902	2.9	5.0	7.2
161001	2.4	4.2	6.8
161101	2.7	4.6	8.4

3 讨论

在TCL鉴别中,原标准中仅收录了绿原酸的薄层鉴别方法,本研究在此基础上,对方剂中6味药材的TCL鉴别方法均进行了研究,其中黄芩薄层鉴别中,采用对照药材作对照,阴性样品有干扰,采用黄芩苷对照品作为对照无干扰,但考虑到含量测定中对制剂中黄芩苷的含量进行测定,故本研究未收录黄芩的薄层鉴别,另外紫苏叶的薄层鉴别中阴性样品对鉴别有干扰,未能建立较好的TCL鉴别方法。综上,通过研究最终建立了大卫颗粒中连翘、金银花、柴胡、甘草的TLC鉴别方法。同时,为了

考察TLC系统的耐用性,实验中对不同温度(4、25、35℃)、不同厂家薄层板进行实验。结果表明,TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照均无干扰。

根据中药质量标准的研究要求,复方中药含量测定方法中,应首选君臣药、贵重药、毒性药,不建议选取含量较低成分。连翘、金银花为大卫颗粒的君药,绿原酸为金银花中的主要功效成分,可作为大卫颗粒的质量控制性成分,连翘中的主要成分有连翘苷、连翘酯苷等,现有大部分连翘制剂多测定其连翘苷含量,但大量研究表明,连翘酯苷是连翘发挥抗菌、抗病毒等作用的主要功能成分^[13],且连翘中连翘酯苷的含量远高于连翘苷^[14-15],所以本研究将连翘酯苷A也作为大卫颗粒的质量控制性成分之一。另外,黄芩药材中指标性成分黄芩苷含量较高($\geq 9.0\%$),且黄芩苷常作为黄芩相关制剂的含量测定成分^[16]。综上,本研究选择绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷作为大卫颗粒的质量控制性成分,并采用高效液相法对3种成分同时进行含量测定。

含量测定方法耐用性研究中,我们考察了不同厂家、不同品牌的3种色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna 5u C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对制剂中绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷成分的分离情况,3种色谱柱对测定成分的分离均较好;另外实验中还考察了流动相的不同酸度(甲醇-0.1%、0.2%、0.3%磷酸水、乙腈-0.2%、0.5%、0.8%醋酸水溶液)、不同柱温(30、35、40℃)对分离效果的影响,结果表明,流动相pH值与柱温在一定的范围内波动,对成分的测定无影响,说明该方法耐用性良好。

综上,本研究所建立的标准可用于大卫颗粒的质量控制,为其质量标准提高提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:第十册[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:6.
- [2] 杨波,王辉. 大卫颗粒治疗小儿病毒性上呼吸道感染疗效观察[J]. 现代医药卫生,2013,29(19):2972-2973.
- [3] 李占彪. 中成药治疗妊娠期急性上呼吸道感染观察[J]. 现代临床医学,2013,39(5):332-333.
- [7] 邱宇晴. 儿科门诊应用中成药物的监督管理[J]. 中国卫生产业,2016,20(7):153-155.
- [8] 赵永慧,王国华,张保献,等. 双黄连凝胶质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):17-19.
- [9] 徐春燕,刘希望,杨亚军,等. 银翘蓝芩口服液薄层色谱鉴别方法研究[J]. 动物医学进展,2015,36(11):40-43.
- [10] 刁娟娟,李小玲,李新霞,等. 益肤丸的薄层色谱鉴别[J]. 中国现代中药,2016,18(10):1335-1340.
- [11] 赵玥,王光函,吴怡,等. 芩双片的薄层鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(6):1394-1395.
- [12] 李金玉. 复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和测定及指纹图谱的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):65-69.
- [13] 周伟,狄留庆,毕肖林,等. 双波长高效液相色谱法同时测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A的含量[J]. 中华中医药杂志,2011,26(9):2111-2113.
- [14] 付鹏亮,王东强,李志军. 连翘酯苷药理作用研究进展[J]. 长春中医药大学学报,2011,27(6):1062-1063.
- [15] 陈随清,王三姓,董诚明,等. 连翘果实化学成分积累动态的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(11):1096-1097.
- [16] 裴香萍,张淑蓉,闫艳,等. 不同采收期青翘中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量测定[J]. 中国药事,2011,25(5):438-440.
- [17] 兰杨,谯志文,唐桂英,等. 健脾止泻宁颗粒的质量标准提高研究[J]. 中国药房,2017,28(18):2568-2572.

(收稿日期:2018-09-19 编辑:王笑辉)