

# 抗病毒咀嚼片的质量标准研究<sup>Δ</sup>

唐靖雯\*,潘梅<sup>#</sup>(贵州威门药业股份有限公司,贵阳 550018)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3420-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.37

**摘要** 目的:建立抗病毒咀嚼片的质量标准。方法:采用薄层色谱法对抗病毒咀嚼片中连翘、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苷的含量。色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(20:80, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:薄层色谱图中,供试品在与对照品相应位置上显相同颜色的斑点。连翘苷进样量在0.053 5~2.675 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系( $r=0.999 9$ );精密性、稳定性、重现性试验的RSD≤1.74%;平均加样回收率为98.94%,RSD为1.84%( $n=6$ )。结论:该方法操作简便、快速,结果准确、可靠,重复性好,可用于抗病毒咀嚼片的质量控制。

**关键词** 抗病毒咀嚼片;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法

## Study on the Quality Standard of Anti-virus Chewable Tablet

TANG Jing-wen, PAN Mei (Guizhou Weimen Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard for Anti-virus chewable tablet. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of *Forsythia suspensa*, *Anemarrhena asphodeloides* and *Pogostemon cablin* in Anti-virus chewable tablet, and HPLC was conducted to determine the content of forsythoside in *F. suspensa*. The column was Diamonsil C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile - water (20:80, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 230 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The test sample and the reference sample displayed same color spots on the corresponding position in TLC diagram. The linear range of forsythoside was 0.053 5-2.675 μg ( $r=0.999 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.74%; average recovery was 98.94% (RSD=1.84%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate, reliable and reproducible, and can be used for quality control of Anti-virus chewable tablet.

**KEYWORDS** Anti-virus chewable tablet; Quality standard; TLC; HPLC

抗病毒咀嚼片由板蓝根、石膏、地黄、广藿香、连翘、芦根、郁金、石菖蒲、知母9味中药组成,具有清热祛湿、凉血解毒的功效,主要用于风热感冒、瘟病发热及上呼吸道感染、流感、腮腺炎等病毒性感染性疾病。抗病毒咀嚼片原为素片,为增加该产品的稳定性,避免片剂在储存、运输过程中发生因吸潮导致的花片、成分变化等影响产品质量的情况发生,故对原素片进行了薄膜包衣。为确保制剂的安全性和有效性,本研究对其进行了质量标准研究,采用薄层色谱(TLC)法鉴别制剂中连翘、知母、广藿香3味中药材,并用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中连翘的主要有效成分连翘苷的含量进行定量分析。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括二极管阵列检测器、ChemStation色谱工作站、1200型自动进样器(美国Agilent公司);AG135型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);CH-250型超声波清洗机(天津恒奥科技公司,功率:250 W,频率:40 kHz);硅胶G(青岛海洋化工厂分厂,批号:20100201)。

<sup>Δ</sup> 基金项目:贵州省中药现代化专项计划立项项目(No.黔科合中药字[2013]5028号)

\* 高级工程师。研究方向:中药新药、保健食品研发及质量控制。电话:0851-86312620。E-mail:cyun819@163.com

<sup>#</sup> 通信作者:高级工程师。研究方向:中药新药、保健食品研发及质量控制。电话:0851-86312620。E-mail:panmei33295@163.com

## 1.2 药品与试剂

抗病毒咀嚼片(批号:120201、120202、120203,规格:0.75 g/片)、缺连翘的阴性样品、缺知母的阴性样品、缺广藿香的阴性样品均由贵州威门药业股份有限公司自制。连翘苷对照品(批号:11081-201112,纯度:96.8%)、菝葜皂苷元对照品(批号:110744-200509,纯度:95.0%)、百秋李醇对照品(批号:110772-201206,纯度:99.1%)均购于中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,乙酸乙酯、三氯甲烷、冰醋酸、环己烷、无水乙醇、高氯酸、石油醚(60~90 ℃)均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 定性鉴别

2.1.1 连翘的TLC鉴别 取抗病毒咀嚼片6片,研细,加甲醇30 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml使溶解,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次20 ml;合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。取缺连翘的阴性样品和连翘对照药材各适量,按上述供试品溶液的制备方法制成缺连翘的阴性样品溶液和连翘对照药材溶液。另取连翘苷对照品适量,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按TLC法<sup>[1]</sup>试验,吸取上述供试品溶液、缺连翘的阴性样品溶液、连翘对照药材溶液及对照品溶液各4 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-冰醋酸(17:2:1, 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 ℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品无干扰,详见图1。

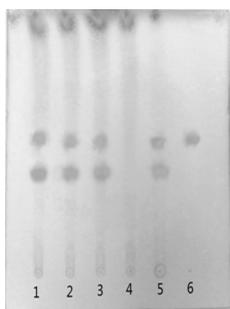


图1 连翘的TLC图

1~3.供试品(批号分别为120201、120202、120203);4.缺连翘的阴性样品;5.连翘对照药材;6.连翘苷对照品

Fig 1 TLC chromatogram of *F. suspensa*

1-3.test samples (batch number: 120201, 120202 and 120203); 4. negative sample without *F. suspensa*; 5.reference substance of *F. suspensa*; 6.reference substance of phillyrin

2.1.2 知母的TLC鉴别 取抗病毒咀嚼片4片,研细,加甲醇30 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml使溶解,加盐酸1.5 ml,摇匀;再加甲苯10 ml,加热回流1 h,放冷;分取甲苯层,蒸干,残渣加三氯甲烷1 ml使溶解,作为供试品溶液。取缺知母的阴性样品和知母对照药材各适量,按上述供试品溶液的制备方法制成缺知母的阴性样品溶液和知母对照药材溶液。另取菝葜皂苷元对照品适量,加三氯甲烷制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。按TLC法<sup>[1]</sup>试验,吸取上述供试品溶液、缺知母的阴性样品溶液、知母对照药材溶液各6 μl、对照品溶液2 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(9:3, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以8%香草醛无水乙醇溶液与20%高氯酸溶液的混合溶液(1:4, V/V),于85 ℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品无干扰,详见图2。

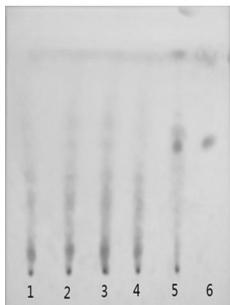


图2 知母的TLC图

1~3.供试品(批号分别为120201、120202、120203);4.缺知母的阴性样品;5.知母对照药材;6.菝葜皂苷元对照品

Fig 2 TLC chromatogram of *A. asphodeloides*

1-3.test samples (batch number: 120201, 120202 and 120203); 4. negative samples without *A. asphodeloides*; 5.reference substance of *A. asphodeloides*; 6.reference substance of sarsasapogenin

2.1.3 广藿香的TLC鉴别 取抗病毒咀嚼片8片,研细,加水60 ml,连接挥发油测定器,测定管用超纯水充满刻度,再加入石油醚(60~90 ℃)1 ml,回流提取2 h,放置至室温,取石油醚层作为供试品溶液。取缺广藿香的阴性样品和广藿香对照药

材各适量,按上述供试品溶液的制备方法制成缺广藿香的阴性样品溶液和广藿香对照药材溶液。另取百秋李醇对照品适量,加三氯甲烷制成每1 ml含1 mg的对照品溶液。按TLC法<sup>[1]</sup>试验,吸取上述供试品溶液、缺广藿香的阴性样品溶液、广藿香对照药材溶液及对照品溶液各2 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(9:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以8%香草醛无水乙醇溶液与20%高氯酸溶液的混合溶液(1:4, V/V),于105 ℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品无干扰,详见图3。

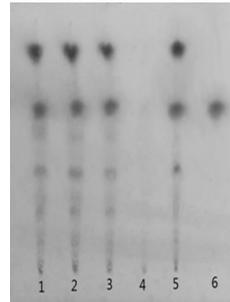


图3 广藿香的TLC图

1~3.供试品(批号分别为120201、120202、120203);4.缺广藿香的阴性样品;5.广藿香对照药材;6.百秋李醇对照品

Fig 3 TLC chromatogram of *P. cablin*

1-3.test samples (batch number: 120201, 120202 and 120203); 4. negative sample without *P. cablin*; 5.reference substance of *P. cablin*; 6. reference substance of patchouli alcohol

## 2.2 连翘苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-水(20:80, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

2.2.2 溶液的制备 (1)供试品溶液。取本品10片,除去包衣膜,研细,取约1.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过;精密量取续滤液25 ml,蒸干,用水30 ml分次溶解,加于已处理好的D101大孔树脂柱(内径1.5 cm,长20 cm)上,以每分钟约3~4 ml的流速,用水80 ml洗脱;弃洗脱液,再用30%甲醇100 ml洗脱,弃洗脱液;用甲醇100 ml洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解,移至10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。(2)对照品溶液。取连翘苷对照品适量,精密称定,用甲醇配制成每1 ml约含0.01 mg的溶液,即得。(3)缺连翘的阴性样品。按处方量称取缺连翘的群药,按上述供试品溶液的制备方法制成缺连翘的阴性样品溶液。

2.2.3 系统适用性试验<sup>[2-4]</sup> 取“2.2.2”项下对照品、供试品、缺连翘的阴性样品溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。理论板数按连翘苷峰计算>3 000,分离度>1.5。色谱详见图4。

2.2.4 线性关系考察 取连翘苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释制成5.35、26.75、53.50、80.25、107.00、133.75、267.50 μg/ml的系列质量浓度溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,各进样10 μl,测定峰面积。以连翘苷进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行回归分析,得回归方程为y=1 938.9x-6.774 3(r=0.999 9)。结果表明,连翘苷进样量

在0.053 5~2.675  $\mu\text{g}$  范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

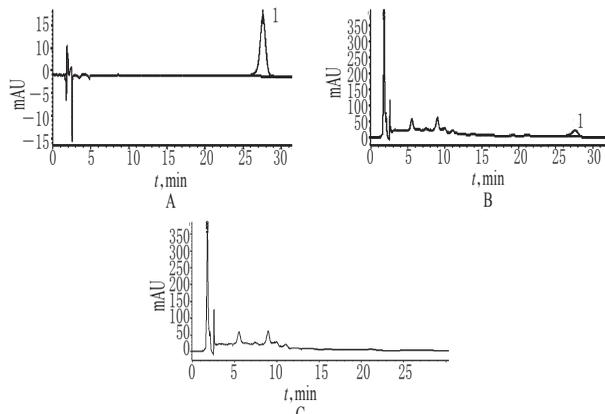


图4 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.缺连翘的阴性样品;1.连翘苷

Fig 4 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.negative samples without *F. suspensa*; 1.forsythin

2.2.5 精密度试验 取连翘苷对照品适量,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,精密吸取10  $\mu\text{l}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果,峰面积的RSD为1.68%,表明仪器精密度较好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品(批号:120201)溶液适量,于放置0、3、6、7.5、9、11 h时,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱峰。结果,峰面积的RSD为1.74%,表明供试品溶液在11 h内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品(批号:120201)6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,以外标一点法计算连翘苷的含量。结果,含量的RSD为0.87%,表明本方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号:120201,连翘苷含量为0.485 3 mg/g)6片,研细,平行称取6份,每份约1.0 g,分别精密称定,再分别精密加入连翘苷对照品溶液(49.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )10 ml,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,计算连翘苷的加样回收率,结果详见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery tests ( $n=6$ )

称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.981 1	0.474 4	0.490 0	0.954 5	98.0		
0.970 4	0.469 2	0.490 0	0.950 4	98.2		
0.955 1	0.461 8	0.490 0	0.935 3	96.6	98.94	1.84
1.083 6	0.523 9	0.490 0	1.019 6	101.2		
0.991 2	0.479 2	0.490 0	0.962 0	98.5		
1.083 4	0.523 8	0.490 0	1.019 2	101.1		

2.2.9 样品含量测定 取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,精密吸取10  $\mu\text{l}$ 注入HPLC仪,按“2.2.1”项下色谱条件记录色谱图;另取“2.2.2”项下对照品溶液,同法测定。按外标法以峰面积计算供试品的含量,结果详见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of content determination of samples ( $n=3$ )

批号	连翘苷含量,mg/片	RSD,%
120201	0.37	1.12
120202	0.38	0.98
120203	0.38	0.83

### 3 讨论

本研究对方中连翘进行TLC定性鉴别时<sup>[4]</sup>,曾分别采用石油醚超声提取后经甲醇提取、甲醇索氏提取后经三氯甲烷萃取、甲醇超声提取后经乙酸乙酯萃取等方法。结果发现,样品经甲醇超声提取后再以乙酸乙酯萃取对应的色谱斑点清晰、分离效果较好、灵敏度较高,故选择该样品处理方法。广藿香TLC定性鉴别时,显色剂的选择曾采用5%三氯化铁乙醇溶液、5%香草醛无水乙醇溶液,最终以8%香草醛无水乙醇溶液与20%高氯酸溶液的混合溶液(1:4, V/V)为展开剂所得的样品斑点较为清晰。

在选择本品的含量测定指标时,因方中连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的作用,与制剂的功能主治一致,因此选用连翘中的主要指标成分连翘苷作为本品的质量控制指标。据文献报道,连翘苷含量的测定方法主要有TLC法<sup>[6]</sup>、HPLC法<sup>[6-8]</sup>、紫外分光光度法<sup>[9]</sup>等。本试验采用HPLC法进行含量测定。在前处理方法选择时,曾考察了甲醇、50%甲醇和乙腈-水(20:80, V/V)对提取效果的影响,结果以甲醇为提取溶剂提取的连翘苷含量最高;超声处理和加热回流提取效果相当,为了操作简单,故选超声提取方法。据文献报道,测定连翘苷含量多采用的流动相为乙腈-水(25:75, V/V)<sup>[10-11]</sup>,但该流动相用于本品,其样品杂质峰干扰太大;经流动相比比例调整为乙腈-水(20:80, V/V)后,可使连翘苷峰与杂质峰分开,且能保证基线平稳、峰形对称、分离度好。

综上所述,本方法操作简便、快速,结果准确、可靠,重复性好,可用于抗病毒咀嚼片的质量控制。

### 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,2010:159、附录VI B.
- [2] 叶丛丛,傅红兴,周伟忠,等.RP-HPLC法同时测定自制复方雷帕霉素栓剂中雷帕霉素和他克莫司的含量[J].中国药房,2015,26(3):388.
- [3] 许舒瑜,彭军,陈小玲,等.金牡感冒片的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(39):3682.
- [4] 丁菊英,夏晓君,黄新刚,等.清肺止咳胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(27):2553.
- [5] 张贞丽,韩莉,袁敏,等.连翘薄层鉴别方法研究[J].中药材,2007,30(1):31.
- [6] 王荔,陈勇敢.芩连片中连翘苷的含量测定[J].河南大学学报:医学版,2004,23(2):26.
- [7] 周礼玲.双黄连滴丸中连翘苷的含量测定[J].齐鲁药事,2008,27(8):475.
- [8] 孔宪平.清热解毒口服液连翘苷的含量测定[J].中国医药指南,2008,6(22):171.
- [9] 王昌利,孙静,王海燕.连翘素胶囊质量标准的研究[J].中国中医药科技,2006,13(6):407.
- [10] 王洁梅,吴昭怡.高效液相色谱法测定抗病毒颗粒中连翘苷的含量[J].中国现代药物应用,2007,1(7):7.
- [11] 张伶俐,谢华,赵应华,等.抗病毒片中连翘苷的含量测定[J].四川大学学报:医学版,2003,34(3):590.

(收稿日期:2015-01-06 修回日期:2015-04-17)

(编辑:余庆华)