

小儿感冒颗粒的质量标准研究

杨 堃

(重庆市食品药品检验所,重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心,重庆,401121)

摘要 目的:建立小儿感冒颗粒的质量标准。方法:用 TLC 法鉴别了小儿感冒颗粒中广藿香、菊花、连翘和用 HPLC 法测定了小儿感冒颗粒中连翘苷的含量;色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱(5 μm,4.6 mm×250 mm),柱温为 30 ℃,以乙腈-水(24:76)为流动相,检测波长为 202 nm,流速 1.0 mL/min。结果:在 TLC 色谱中均能检出百秋李醇、菊花、连翘苷;且特征斑点明显,阴性无干扰;连翘苷在 0.023 62 μg~0.590 5 μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.99999$ ($n=6$),平均回收率为 99.06%,RSD=1.5%。结论:方法简便、准确、重现性好;可用于小儿感冒颗粒的质量控制。

关键词 小儿感冒颗粒;质量标准;TLC;HPLC;连翘苷

Study of Quality Standard of Xiao'er Ganmao Granules

Yang Kun

(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing Engineering research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control 401121, China)

Abstract Objective: To establish the quality standards for Xiao'er Ganmao Granules. **Methods:** Pogostemonis herba, chrysanthemi flos, and forsythiae fructus were identified with TLC. Phyllirin was measured by HPLC. Diamonsil™ C₁₈ (5 μm,4.6 mm×250 mm) column was used. The column temperature was at 30 ℃. Acetonitrile-water (24:76) was used as a mobile phase. The detection wavelength was at 202 nm. The flow rate was 1.0 mL/min. **Results:** Patchouli alcohol, chrysanthemi flos, and forsythiae could be detected by TLC, with the feature spot obvious, negative interference-free. Phyllirin showed a good linear relationship at the range of 0.02362~0.5905 μg, $r=0.99999$ ($n=6$), The average recovery rate was 99.06% and RSD was 1.5%. **Conclusion:** TLC method proves to be simple, accurate and with good reproducibility, thus can be used for quality control of Xiao'er Ganmao Granule.

Key Words Xiao'er Ganmao Granules; Quality standards; TLC; HPLC; Phyllirin

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.03.032

小儿感冒颗粒是由广藿香、菊花、连翘、地黄、白薇、地骨皮、石膏、大青叶、板蓝根等共 10 味药组成的复方制剂,收载于《中华人民共和国药典》2010 年版一部^[1],功用为疏风解表,清热解毒。原标准仅收载大青叶、板蓝根的薄层色谱鉴别。本文在既往研究的基础上,本文采用薄层色谱法对方中广藿香、连翘、菊花进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱法制定了方中连翘(以连翘苷计)含量测定方法,为更好地控制小儿感冒颗粒的质量提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 小儿感冒颗粒(批号为:20120206、20120207、20120208,云南白药集团股份有限公司生产,广藿香、连翘、菊花等处方中的各味药材由太极集团重庆桐君阁药厂有限公司提供。百秋李醇(批号:772-200008)、菊花(批号:121384-200801)、连翘苷(批号:110821-200805),购自中国药品生物制品检定研究院。

1.2 仪器 高效液相色谱仪:Agilent HP1100(包括四元泵,柱温箱,自动进样器,二级管阵列检测器);KQ3200B 型超声波清洗器(功率 500W,频率 40KHZ)。

1.3 试剂 硅胶 G(化学纯,青岛海洋化工厂),其余试剂、试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 薄层鉴别

2.1.1 广藿香的薄层鉴别^[2] 取本品 24 g,研细,加乙醚适量,浸泡 24 h 以上,时时振摇,滤过,滤液低温蒸干,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取百秋李醇对照品,加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取供试品溶液 20~30 μL,对照品溶液 1~2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 ℃)-乙酸乙酯-冰醋酸(95:5:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香

草醛硫酸试液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。(见图1)

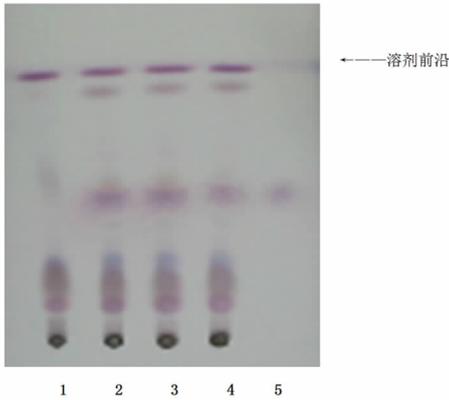


图1 小儿感冒颗粒广藿香的TLC鉴别图谱

注:1. 阴性对照(缺广藿香)25 μL;2. 样品(云南白药集团,批号:20120206)20 μL;3. 样品(云南白药集团,批号:20120207)20 μL;4. 样品(云南白药集团,批号:20120208)20 μL;5. 百秋李醇对照品2 μL

2.1.2 菊花的薄层鉴别^[3-4] 取本品6g,研细,加甲醇30mL,超声处理20min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20mL使溶解,用稀盐酸调pH值至2~3,用乙酸乙酯振摇提取3次,每次20mL,合并乙酸乙酯提取液,蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液。另取菊花对照药材1g,加稀盐酸1mL和乙酸乙酯20mL,超声处理30min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯1mL使溶解,作为对照药材溶液。照薄层色谱法(附录VI B)试验,吸取供试品溶液1~2 μL,对照药材溶液2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(7:3:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%三氯化铝乙醇试液,加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365nm)下检视。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,且阴性对照无干扰。(见图2)

2.1.3 连翘的薄层鉴别^[5-7] 取本品6g,研细,加甲醇30mL,超声处理20min,滤过,滤液蒸干。残渣加0.2%氢氧化钠溶液20mL,加热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取3次,每次20mL;取正丁醇提取液,再用正丁醇饱和的水洗涤2次,每次30mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加0.2%氢氧化钠溶液20mL,加热使溶解,再用三氯甲烷振摇提取3次,每次20mL;合并三氯甲烷提取液,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液。另取连翘苷对照品,加甲醇制成每1mL含1mg的溶

液,作为对照品溶液。吸取供试品溶液10 μL~15 μL和对照品溶液10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-甲酸(9:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸试液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰^[8]。(见图3)

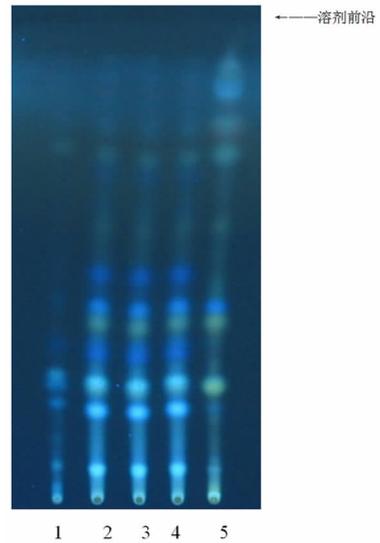


图2 小儿感冒颗粒菊花的TLC鉴别图谱

注:1. 阴性对照(缺菊花)2 μL;2. 样品(云南白药集团,批号:20120206)1 μL;3. 样品(云南白药集团,批号:20120207)1 μL;4. 样品(云南白药集团,批号:20120208)1 μL;5. 菊花对照药材3 μL



图3 小儿感冒颗粒连翘的TLC鉴别图谱

注:1. 阴性对照(缺连翘);2. 样品(云南白药集团,批号:20120206);3. 样品(云南白药集团,批号:20120207);4. 样品(云南白药集团,批号:20120208);5. 连翘苷对照品

2.2 含量测定

2.2.1 药味的选择 按处方中君臣药味的要求,我们先对方中广藿香^[9-10](百秋李醇计)的GC含量测定^[11]方法进行了研究,其含量太低,无测定意义,故对连翘^[12](以连翘苷计)含量测定方法进行了研究,

通过试验考察,建立了 HPLC 含量测定方法。

2.2.2 色谱条件^[13] 色谱柱:用十八烷基硅烷键和硅胶为填充剂;流动相:乙腈-水(24:76);检测波长:202 nm;柱温 30 ℃;流速:1.0 mL/min;理论塔板数:按连翘苷峰计应不低于 3 000。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取在 110 ℃ 干燥至恒重的连翘苷对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液,即得。

2.2.4 供试品溶液的制备^[14-15] 取装量差异项下的本品,研细,取约 6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,蒸干,残渣加适量 70% 乙醇使溶解,加在中性氧化铝柱(100~200 目,5 g,内径 1.5 cm)上,用 70% 乙醇溶液 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加 50% 甲醇适量使溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。精密量取 10 μL,进样,记录色谱图^[6-9]。

2.2.5 阴性对照试验 取缺连翘的阴性对照约 6 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液,注入液相色谱仪,结果在连翘苷对照品出峰时间处无对应色谱峰出现,表明阴性对照无干扰。(见图 4)

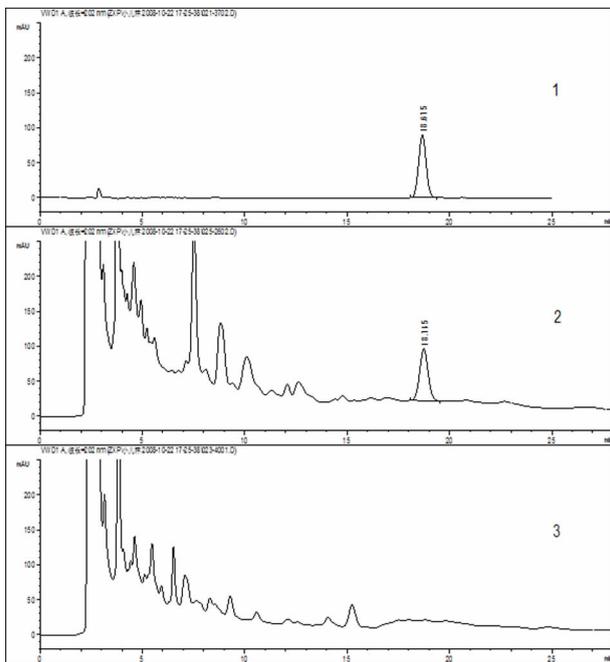


图 4 小儿感冒颗粒 HPLC 图

注:1. 连翘苷对照品;2. 小儿感冒颗粒样品;3. 阴性对照(缺连翘)

2.2.6 测定波长的选择 我们用二级管阵列检测器分别对连翘苷对照品、小儿感冒颗粒样品进行光

谱分析,结果发现 202 nm 为连翘苷最大吸收,且其他成分峰在此处吸收值很小,故选用 202 nm 作为测定波长。

2.2.7 线性范围 分别精密吸取连翘苷对照品溶液(浓度 0.023 62 mg/mL) 1 μL、5 μL、10 μL、15 μL、20 μL、25 μL,注入液相色谱仪测定峰面积,结果见表 1。

表 1 线性关系试验结果

连翘苷进样量(g)	0.0236	0.1181	0.2362	0.3543	0.4724	0.5905
峰面积(A)	235.31	1161.7	2322.6	3450.4	4612.4	5723.9

以连翘苷峰面积(A)为纵坐标,连翘苷对照品进样量(g)为横坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归,得回归方程: $y = 9692.2x + 17.929r = 1$ 。

上述结果表明,连翘苷对照品进样量在 0.023 62 μg~0.590 5 μg 的范围内,与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.8 精密度实验 精密吸取连翘苷对照品溶液(浓度 0.023 62 mg/mL)10 μL,重复进样 5 次,按上述色谱条件测定峰面积,结果见下表。试验结果表明,仪器精密度良好。

表 2 仪器精密度试验结果

进样次数	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD
峰面积	2250.8	2268.7	2217.2	2237.7	2214.3	2292.9	2246.9	1.4%

2.2.9 稳定性试验 分别吸取常温下放置的同一供试品溶液 10 μL,于 0、2、4、8、12 h 进样,测定,结果见下表。试验结果表明,供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

表 3 供试品溶液稳定性试验结果

放置时间(h)	0	2	4	8	12	平均值	RSD
峰面积	1993.4	2043.8	2027.9	2044.5	2023.0	2026.5	1.0%

2.2.10 重复性试验 取同一批号样品(批号 20120207),按含量测定项下供试品制备方法平行制备 5 份供试品溶液,并测定含量,结果见下表。试验结果表明,方法重复性良好。

表 4 重复性试验结果

试验号	1	2	3	4	5	平均值	RSD
含量(mg/g)	0.0456	0.0462	0.0457	0.0464	0.0463	0.0460	0.8%

2.2.11 回收率试验 取本品(批号 20120207,已测定连翘苷含量为 0.046 0 mg/g)3 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入连翘苷对照品溶液(5.905 μg/mL)25 mL,称定重量,同供试品溶液的制备方法制

备,并按拟订的色谱条件测定连翘苷含量,按下式计算回收率,结果见表5。试验结果表明,加样回收率均在95%~105%间,符合有关的技术要求。

$$\text{回收率} = \frac{\text{测出的连翘苷总量} - \text{样品中连翘苷量}}{\text{加入连翘苷对照品量}}$$

× 100%

表5 加样回收试验结果

编号	取样量(g)	样品中连翘苷量(mg)	加入连翘苷量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	3.2642	0.1502	0.1476	0.2998	101.40	100.6	1.5
2	3.5321	0.1625	0.1476	0.3124	101.56		
3	3.1854	0.1465	0.1476	0.2984	102.90		
4	3.1113	0.1431	0.1476	0.2906	99.93		
5	3.6552	0.1681	0.1476	0.3136	98.58		
6	3.6721	0.1689	0.1476	0.3153	99.19		

2.2.12 方法耐用性试验 按正文拟订的含量测定方法,分别对样品2采用不同牌号的色谱柱,分别测定连翘苷的含量,计算,结果见表6。试验结果表明,方法耐用性试验良好。

表6 方法耐用性试验结果

含量(mg/g) 批号	色谱条件	色谱仪:Agilent 1100 色谱柱:Agilent C ₁₈ (5 μm,250×4.6 mm)	色谱仪:Agilent 1100 色谱柱:迪马 C ₁₈ (5 μm,250×4.6 mm)
	20120207		0.0457

2.2.13 样品测定 取样品3批,按上述色谱条件和方法测定连翘苷的含量,测定结果见表7。

表7 小儿感冒颗粒中连翘苷的含量测定结果

批号	含量 mg/g	平均袋重(g/袋)	含量(mg/袋)
20120206	0.0465	6.0521	0.28
20120207	0.0460	6.1148	0.28
20120208	0.0477	6.0377	0.29

3 讨论

在连翘的TLC鉴别方法中,若采用含量测定的方法处理样品,所得样品中连翘苷的斑点显色不理想,整个样品斑点底色较重,故采用的是正文中样品处理办法,结果很好。我们曾选用连翘同法制备对照药材溶液,结果显示:其在与样品相应位置上的斑点显色不清晰,较小,且阴性对照有个别斑点干扰,故放弃。

样品含量测定的处理方法参照文献经过试验摸索,曾对连翘苷的提取方法考察了:TLC法中样品处理方法;直接甲醇超声提取进样;和甲醇超声提取蒸干后,水溶解再用三氯甲烷提取等方法。所得样品

存在杂质峰较多,主峰与杂质峰不能分离,重现性不好和回收率低等问题。同时我们考察了正文方法中甲醇超声时间,过柱用中性氧化铝用量,洗脱溶剂的浓度和用量,最终确定的正文方法能将样品中所含的连翘苷提取完全,回收率平均在100%上,且样品溶液色谱图中连翘苷色谱峰分离度好、峰形尖锐、对称性好,理论板数大于3000,各项参数能满足HPLC的相关要求。

小儿感冒颗粒为儿科常用药,有有糖型和无糖型两种剂型;且生产厂家众多,包装规格也不同,我们当时选取市面上上述两种剂型和不同厂家规格的共18批次进行试验,按此质量标准,均能检出;此标准可行。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 500-501.

[2] 韩桂茹, 董占军. 小儿感冒颗粒的薄层鉴别和定量测定研究[J]. 中成药, 2004, 26(11): 445-446.

[3] 田雅琴. HPLC法测定小儿感冒颗粒中绿原酸及连翘苷含量[J]. 中成药, 2009, 31(12): 484-485.

[4] 范磊. 小儿感冒颗粒的质量控制方法研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(35): 661-663.

[5] 国家中医药管理局. 国家中成药标准汇编—外科妇科分册[S], 483-484.

[6] 国家中医药管理局. 国家中成药标准汇编—口腔肿瘤儿科分册[S], 49-50.

[7] 孙武强, 李海峰. 小儿感冒颗粒质量标准研究[J]. 河南中医, 2004, 24(8): 223-224.

[8] 国家中医药管理局. 桑菊感冒合剂[M]. 国家中成药标准汇编—内科—肺系(一), 2002.

[9] 张颖梅. HPLC法同时测定广藿香中雷杜辛黄酮醇及广藿香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 254-256.

[10] 张小龙, 孙晓, 马新飞. 气相色谱法同时测定小儿感冒颗粒中百秋李醇、薄荷脑、α-蒎烯、β-蒎烯的含量[J]. 首都医药, 2014(22): 311-312.

[11] 王春燕. 气相色谱法测定小儿感冒颗粒中百秋李醇的含量[J]. 首都医药, 2011(4): 187-188.

[12] 吴平平, 李桂龙. 小儿感冒颗粒中绿原酸测定方法的改进[J]. 中草药, 2011, 42(6): 212-214.

[13] 张伟, 张汉明, 等. HPLC法测定连翘药材及感冒退热颗粒中连翘苷的含量[J]. 中成药, 1999, 21(9): 329-330.

[14] 《卫生部药品标准》. 新药转正标准第二册[S]. 1993, 7.

[15] 刘杰, 陈卓, 马开. 薄层扫描法测定双黄连制剂中连翘苷的含量[J]. 中成药, 1999, 21(8): 314-316.