

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.07.016

## 新型冠状病毒预防Ⅱ号方质量标准研究

郭舟<sup>1</sup>,王康<sup>1</sup>,张勤<sup>1△</sup>,闫俊锋<sup>1</sup>,唐松<sup>2</sup>

(1. 湖北省襄阳市公共检验检测中心,湖北 襄阳 441004; 2. 湖北省药品监督管理局襄阳分局,湖北 襄阳 441022)

**摘要:**目的 建立新型冠状病毒预防Ⅱ号方的质量评价方法。方法 采用薄层色谱法对方中黄芪、连翘进行定性鉴别;采用高效液相色谱-蒸发光散射法测定方中黄芪甲苷的含量,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(32:68, V/V),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃,进样量为 5~20 μL,漂移管温度为 60℃,气体压力为 30 Psi;采用高效液相色谱-二极管阵列检测法测定方中连翘苷的含量,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(20:80, V/V),流速为 1.0 mL/min,柱温为 30℃,检测波长为 277 nm,进样量为 10 μL。结果 黄芪、连翘的薄层色谱图斑点显色清晰,分离效果良好,阴性对照无干扰。黄芪甲苷进样量在 1.044 5~8.356 7 μg 范围内的对数值与其峰面积对数值线性关系良好( $r=0.999\ 6$ ,  $n=5$ ),平均回收率为 97.66%,RSD 为 1.29% ( $n=6$ );连翘苷在 6.029 3~120.586 8 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ,  $n=6$ ),平均回收率为 99.75%,RSD 为 1.12% ( $n=6$ )。结论 该方法操作简便、准确可靠、重复性好,可用于新冠病毒预防Ⅱ号方的质量评价。  
**关键词:**新型冠状病毒预防Ⅱ号方;薄层色谱法;高效液相色谱法;黄芪;连翘;黄芪甲苷;连翘苷

中图分类号:R932;R289;R254.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)07-0058-05

### Quality Standard of Prevention Prescription II for Coronavirus Disease 2019

GUO Zhou<sup>1</sup>, WANG Kang<sup>1</sup>, ZHANG Qin<sup>1</sup>, YAN Junfeng<sup>1</sup>, TANG Song<sup>2</sup>

(1. Xiangyang Public Inspection and Testing Center, Xiangyang, Hubei, China 441004; 2. Xiangyang Branch of Hubei Provincial Drug Supervision Administration, Xiangyang, Hubei, China 441022)

**Abstract: Objective** To establish a quality evaluation method of the Prevention Prescription II for Coronavirus Disease 2019(COVID-19).

**Methods** Thin-layer chromatography(TLC) was used for the qualitative identification of *Astragal Radix* and *Forsythiae Fructus*. High-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector(HPLC-ELSD) was used for the content determination of astragaloside IV in the prescription, the chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(32:68, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35℃, the injection volume was 5~20 μL, the temperature of drift tube was 60℃, and the gas pressure was 30 Psi. HPLC-diode array detector(DAD) was used for the content determination of phillyrin in the prescription, the chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(20:80, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30℃, the detection wavelength was 277 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of *Astragal Radix* and *Forsythiae Fructus* were clear and well separated without negative control interference. The linear range of astragaloside IV was 1.044 5~8.356 7 μg( $r=0.999\ 6$ ,  $n=5$ ), the average recovery was 97.66% with RSD of 1.29% ( $n=6$ ). The linear range of phillyrin was 6.029 3~120.586 8 μg/mL( $r=0.999\ 9$ ,  $n=6$ ), the average recovery was 99.75% with RSD of 1.12% ( $n=6$ ).

**Conclusion** The method is simple, accurate, reliable and repeatable, which can be used for the quality evaluation of the Prevention Prescription II for COVID-19.

**Key words:** Prevention Prescription II for Coronavirus Disease 2019; TLC; HPLC; *Astragal Radix*; *Forsythiae Fructus*; astragaloside IV; phillyrin

新型冠状病毒(简称新冠病毒)预防Ⅱ号方为由湖北省襄阳市疫情防控指挥部批准同意,指定医院配制并调剂使用的中药制剂,用于预防新型冠状病毒肺炎(简称新冠肺炎),效果良好,具有益气固表、祛浊排毒功效。方中,黄芪性甘微温,内可补益肺脾,外可固表止汗,为君药<sup>[1]</sup>;炒白术、连翘、金银花补气健脾、清热解毒、消炎排毒,有助于加强黄芪益气固表功效,为臣药;其他药味具有佐药或使药功效。但该方剂为特殊时期临时调剂使用,无国家的制剂批准文号,其质量无法进行评价。黄芪在各类新冠肺炎预防方剂中出现的频次最高,故测定黄

芪的含量十分必要<sup>[2-5]</sup>,而黄芪甲苷是黄芪的活性成分,具有调节免疫、抗炎和抗病毒等作用<sup>[6-8]</sup>。连翘苷是连翘中含量较高的主要活性成分,具有极强的抗菌、抗病毒和抗炎作用<sup>[9-10]</sup>。本研究采用薄层色谱法对主要药味黄芪、连翘进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法对其主要活性成分黄芪甲苷、连翘苷进行含量测定。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪[配有 2424 型蒸

第一作者:郭舟,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物分析与药品检验,(电子信箱)314857690@qq.com。

△通信作者:张勤,女,大学本科,主任药师,研究方向为中药鉴定与中药检验,(电子信箱)710083016@qq.com。

发光散射检测器(ELSD),美国 Waters 公司];岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪[配有二极管阵列检测器(DAD),日本岛津公司];XS205 型电子天平(精度为 0.01 mg),AL204 型电子天平(精度为 0.1 mg),均购自瑞士梅特勒-托利多公司;HU-6150B 型超声波清洗器(天津恒高电气科技有限公司,功率为 250 W,频率为 40 kHz);G201990806 型硅胶 G 板(青岛海洋化工有限公司);ZF-I 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);202-1AB 型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

## 1.2 试药

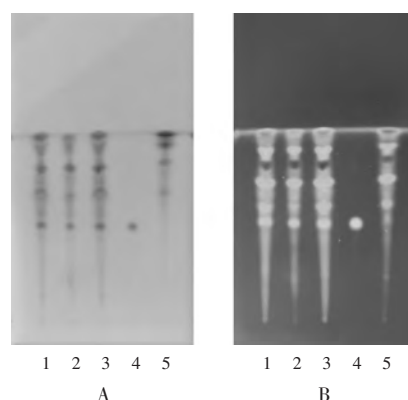
乙腈(色谱纯, Sigma-Aldrich 公司),超纯水,其余试剂均为分析纯;黄芪甲苷对照品(批号为 110781-201717,含量为 96.9%),连翘苷对照品(批号为 110821-201816,含量为 95.1%),均购自中国食品药品检定研究院;新冠病毒预防 II 号方(由指定的医院制作,批号分别为 20200229,20200324,20200527,规格为每瓶 200 mL);黄芪阴性样品(按处方比例取除黄芪外的药材,按指定医院工艺制备);连翘阴性样品(按处方比例取除连翘外的药材,按指定医院工艺制备)。黄芪(批号为 200101),炒白术(批号为 200101),均购自湖北同仁恒康中药饮片公司;防风(批号为 20191201),连翘(批号为 20200101),金银花(批号为 20200102),佩兰(批号为 20200202),焦山楂(批号为 20190901),均购自武汉市汉口国药公司;陈皮(批号为 20200101,襄阳华源天盛药业公司);紫苏(批号为 20200021,国药控股襄阳公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层色谱鉴别

黄芪:取 3 批样品,各 30 mL,用 30 mL 水饱和的正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇液,用 40 mL 氨试液洗涤 3 次,弃去水液,正丁醇液蒸干,加 1 mL 甲醇溶解残渣,作为供试品溶液。取黄芪阴性样品,按供试品溶液制备方法制备黄芪阴性对照品溶液。另取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,用甲醇制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。吸取供试品溶液、黄芪阴性对照品溶液、对照品溶液各 5  $\mu$ L,点于同一硅胶 G 板上,以氯仿-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)下层液为展开剂,预饱和 30 min,展开,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇液,105  $^{\circ}$ C 烘箱加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的棕褐色斑点,黄芪阴性对照品溶液色谱无此斑点;置紫外灯(365 nm)下检视,供试品溶液和对照品溶液显相同颜色的橙黄色荧光斑点,而黄芪阴性对照品溶液色谱无此斑点。详见图 1。

连翘:取 3 批样品,各 30 mL,用 30 mL 水饱和的正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇液,用 40 mL 氨试液洗涤 3 次,弃去水液,再用正丁醇饱和的水洗至近中性,正丁醇液



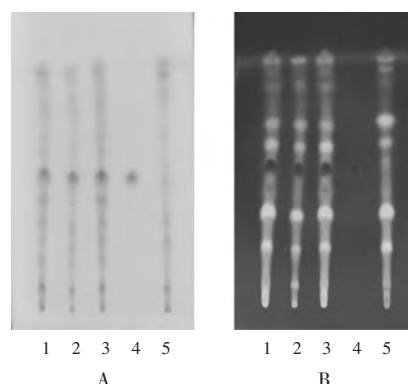
1-3. 供试品溶液 4. 对照品溶液 5. 阴性对照品溶液  
A. 日光检视 B. 紫外灯检视

图 1 黄芪薄层色谱图

1-3. test solution 4. reference solution 5. negative reference solution  
A. Sunlight B. Ultraviolet lamp

Fig.1 TLC chromatograms of Astragalus Radix

蒸干,残渣加 1 mL 甲醇溶解,作为供试品溶液。取连翘阴性样品,按供试品溶液制备方法制得连翘阴性对照品溶液。另取连翘苷对照品适量,精密称定,用甲醇制成质量浓度为 60  $\mu$ g/mL 的对照品溶液。吸取供试品溶液、连翘阴性对照品溶液、对照品溶液各 5  $\mu$ L,点于同一硅胶 G 板上,以氯仿-甲醇(5:1, V/V)为展开剂,预饱和 30 min,展开,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇液,105  $^{\circ}$ C 烘箱加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,而连翘阴性对照品溶液色谱无此斑点;置紫外灯(365 nm)下检视,供试品溶液与对照品溶液显相同颜色的荧光斑点,而连翘阴性对照品溶液色谱无此斑点。详见图 2。



1-3. 供试品溶液 4. 对照品溶液 5. 阴性对照品溶液  
A. 日光检视 B. 紫外灯检视

图 2 连翘薄层色谱图

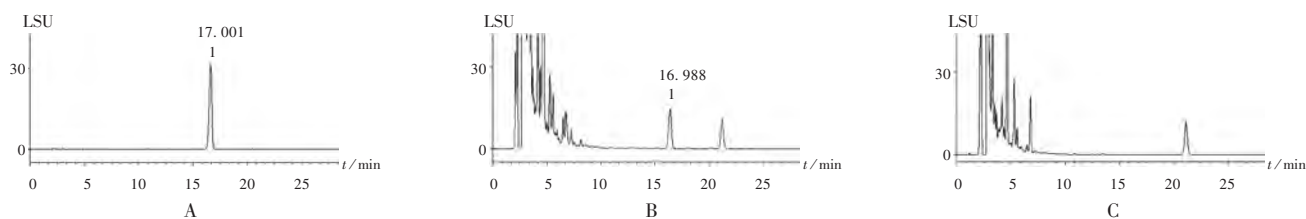
1-3. test solution 4. reference solution 5. negative reference solution  
A. Sunlight B. Ultraviolet lamp

Fig.2 TLC chromatograms of Forsythiae Fructus

### 2.2 黄芪甲苷含量测定

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm,



1. 黄芪甲苷  
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 黄芪甲苷含量测定高效液相色谱图

1. astragaloside IV

A. Test solution B. Reference solution C. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms for content determination of astragaloside IV

5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈 - 水 (32 : 68,  $V/V$ ); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 5 ~ 20  $\mu\text{L}$ 。ELSD 参数: 喷雾器为冷却模式, 漂移管温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ , 气体压力为 30 Psi。

### 2.2.2 溶液制备

取黄芪甲苷 10.78 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 即得质量浓度为 0.2089 mg/mL 的对照品溶液。精密量取供试品 25 mL, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 再用氨试液洗涤 3 次, 每次 40 mL, 弃去水层, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇溶解, 定容至 5 mL, 摇匀, 取上清液, 即得供试品溶液。按供试品溶液制备方法制备黄芪阴性对照品溶液。

### 2.2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2.2 项下 3 种溶液, 依法测定。结果对照品溶液和供试品溶液在 16 ~ 17 min 处有相同色谱峰, 黄芪阴性对照品溶液则无此色谱峰。详见图 3。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 (质量浓度为 10.2089 mg/mL) 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{L}$ , 依法测定, 以峰面积的对数 ( $\lg A$ ) 为纵坐标、黄芪甲苷进样量的对数为横坐标 ( $\lg C, \mu\text{g}$ ) 绘制标准曲线, 得回归方程  $\lg A = 1.56138 \lg C + 4.647017$ ,  $r = 0.9996$  ( $n = 5$ )。结果表明, 黄芪甲苷进样量在 1.0445 ~ 8.3567  $\mu\text{g}$  范围内对数值与其峰面积对数值线性关系良好。

检测限与定量限考察: 以信噪比 ( $S/N$ ) = 3:1 为标准测得黄芪甲苷的最低检测限为 0.2434  $\mu\text{g}$ , 以  $S/N = 10:1$  为标准测得黄芪甲苷的定量限为 0.8113  $\mu\text{g}$ 。

精密度试验: 精密吸取对照品溶液 (质量浓度为 0.2089 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 依法测定。结果黄芪甲苷峰面积的  $RSD$  为 0.68% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密良好。

重复性试验: 取同一批 (批号为 20200324) 样品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果样品中黄芪甲苷的平均含量为 0.0372 mg/mL,  $RSD$  为 1.01% ( $n = 6$ ), 表明方法重复

性良好。

稳定性试验: 取同一批 (批号为 20200324) 样品, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时进样测定。结果黄芪甲苷峰面积含量的  $RSD$  为 1.33% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 精密量取同一批 (批号为 20200324, 含量为 0.0372 mg/mL) 样品 6 份, 各 20 mL, 分别精密加入对照品溶液 1.00, 1.00, 2.00, 2.00, 3.00, 3.00 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 依法测定含量, 并计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芪甲苷加样回收试验结果 ( $n = 6$ )

Tab. 1 Recovery test of astragaloside IV ( $n = 6$ )

| 样品含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | $\bar{X}$ (%) | $RSD$ (%) |
|-----------|----------|----------|---------|---------------|-----------|
| 0.7440    | 0.2089   | 0.9435   | 95.50   | 97.66         | 1.29      |
| 0.7440    | 0.2089   | 0.9466   | 96.94   |               |           |
| 0.7440    | 0.4178   | 1.1566   | 98.76   |               |           |
| 0.7440    | 0.4178   | 1.1557   | 98.54   |               |           |
| 0.7440    | 0.6267   | 1.3562   | 97.69   |               |           |
| 0.7440    | 0.6267   | 1.3616   | 98.55   |               |           |

### 2.2.4 样品含量测定

精密量取 3 批 (批号分别为 20200229, 20200324, 20200527) 样品各 25 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 对照品溶液分别进样 5  $\mu\text{L}$  和 20  $\mu\text{L}$ , 供试品溶液进样 10  $\mu\text{L}$ , 依法测定峰面积, 按外标两点法对数方程计算含量。结果样品中黄芪甲苷的含量分别为 0.032, 0.037, 0.040 mg/mL。

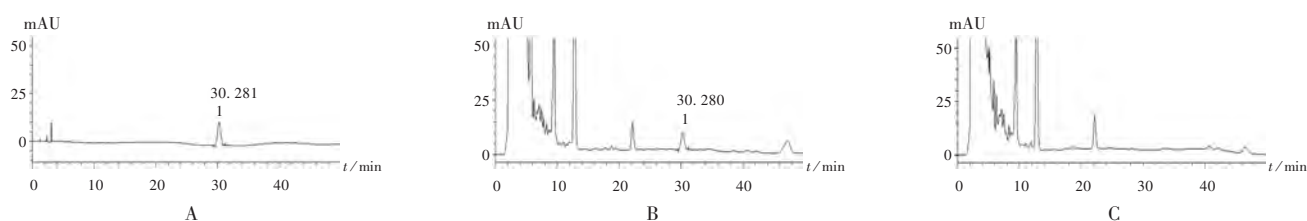
### 2.3 连翘苷含量测定

#### 2.3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈 - 水 (20 : 80,  $V/V$ ); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 277 nm; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

#### 2.3.2 溶液制备

取连翘苷 15.85 mg, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密量



1. 连翘苷  
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图4 连翘苷含量测定高效液相色谱图

1. phillyrin

A. Test solution B. Reference solution C. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms for content determination of phillyrin

取对照品贮备液 5 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得连翘苷质量浓度为 60.29  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。精密量取本品 10 mL, 加甲醇适量, 超声处理 (功率为 250 W, 频率为 40 kHz) 30 min, 冷却后定容至 25 mL, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。按供试品溶液制备方法制备连翘阴性对照品溶液。

### 2.3.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.3.2 项下 3 种溶液, 依法测定。结果连翘苷对照品和供试品溶液在 30~31 min 处有相同色谱峰, 连翘阴性对照品溶液无此色谱峰。详见图 4。

线性关系考察: 精密量取对照品溶液 (质量浓度为 60.29  $\mu\text{g/mL}$ ), 加甲醇制成系列质量浓度为 6.029 3, 12.058 7, 30.146 7, 60.293 4, 90.440 1, 120.586 8  $\mu\text{g/mL}$  的溶液, 依法测定峰面积。以连翘苷质量浓度 ( $X$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标、峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $Y = 6\,535.279\,27X - 3\,455.049\,39$ ,  $r = 0.999\,9$  ( $n = 6$ )。结果表明, 连翘苷质量浓度在 6.029 3~120.586 8  $\mu\text{g/mL}$  范围内与峰面积线性关系良好。

检测限、定量限考察: 以  $S/N = 3:1$  为标准测得连翘苷的最低检测限为 0.016 4  $\mu\text{g}$ , 以  $S/N = 10:1$  为标准测得黄芪甲苷的定量限为 0.054 5  $\mu\text{g}$ 。

精密度试验: 取对照品溶液, 连续进样 6 次, 依法测定。结果连翘苷峰面积的  $RSD$  为 0.62% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批 (批号为 20200527) 样品, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 依法测定。结果连翘苷的平均含量为 0.174 1 mg/mL,  $RSD$  为 0.92% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一批 (批号为 20200527) 样品, 依法制备供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时进样测定。结果连翘苷峰面积含量的  $RSD$  为 1.02% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 精密量取同一批 (批号为 20200527, 含量为 0.174 1 mg/mL) 样品 6 份, 各 5 mL,

分别精密加入对照品溶液 5 mL, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 依法测定含量, 并计算回收率。结果见表 2。

表2 连翘苷加样回收试验结果 ( $n = 6$ )

Tab. 2 Recovery test of phillyrin ( $n = 6$ )

| 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | RSD(%) |
|----------|---------|---------|--------|---------------|--------|
| 0.870 5  | 0.301 5 | 1.165 9 | 97.98  | 99.75         | 1.12   |
| 0.870 5  | 0.301 5 | 1.169 0 | 99.00  |               |        |
| 0.870 5  | 0.301 5 | 1.174 3 | 100.76 |               |        |
| 0.870 5  | 0.301 5 | 1.174 0 | 100.66 |               |        |
| 0.870 5  | 0.301 5 | 1.170 6 | 99.54  |               |        |
| 0.870 5  | 0.301 5 | 1.173 7 | 100.56 |               |        |

### 2.3.4 样品含量测定

精密量取 3 批 (批号分别为 20200229, 20200324, 20200527) 样品, 各 10 mL, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液, 对照品溶液和供试品溶液各进样 10  $\mu\text{L}$ , 依法测定峰面积, 按外标法计算含量。结果样品中连翘苷的含量分别为 0.178, 0.188, 0.174 mg/mL。

## 3 讨论

### 3.1 薄层色谱鉴别

黄芪的薄层鉴别通过增加氨试液洗涤, 以减少酸性组分干扰, 结果黄芪甲苷斑点显示清晰、分离效果较好。连翘苷属木脂素类大极性化合物, 水溶性好, 其薄层鉴别采用水饱和的正丁醇提取, 有效提取了有效成分; 比较了以氯仿-甲醇-水 (13:7:2,  $V/V/V$ ) 下层液、氯仿-甲醇 (8:1,  $V/V$ ) 和氯仿-甲醇 (5:1,  $V/V$ ) 作为展开剂的薄层色谱情况, 结果采用氯仿-甲醇 (5:1,  $V/V$ ) 为展开剂, 展程达到 15 cm 时, 连翘苷可完全分离, 比移值适中, 且斑点显色清晰。

### 3.2 色谱条件优化

紫外光谱测定发现, 黄芪甲苷溶液与空白溶剂在 190~400 nm 波长范围内无明显紫外吸收差异, 故 HPLC-DAD 法不适合测定其含量。参考文献 [11-13], 采用 HPLC-ELSD 法测定黄芪甲苷的含量, 当流动相