

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.04.018

文章编号: 1006-4931(2023)04-0079-04



复方乙醇手消毒液中连翘质量标准研究*

郭 娅¹, 向春艳^{1△}, 何世新¹, 杜 彪²

(1. 重庆市万州食品药品检验所·三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆 404000; 2. 重庆大学附属三峡医院, 重庆 404000)

摘要:目的 建立复方乙醇手消毒液中连翘的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的连翘进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中连翘酯苷A和连翘苷的含量,色谱柱为中谱红RD-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为235 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。结果 连翘的TLC图斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。连翘酯苷A和连翘苷的质量浓度分别在9.79~195.75 μg/mL($r=0.999\ 9$)和2.02~40.48 μg/mL($r=0.999\ 8$)范围内与峰面积线性关系良好;精密性、重复性、稳定性试验结果的RSD均小于1.0%,平均加样回收率分别为100.04%和97.36%,RSD分别为0.93%和1.05%($n=6$)。结论 所建标准可用于复方乙醇手消毒液中连翘的质量控制。

关键词: 复方乙醇手消毒液;连翘;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定

Quality Standard of Forsythiae Fructus in Compound Ethanol Hand Sanitizer

GUO Ya¹, XIANG Chunyan¹, HE Shixin¹, DU Biao²

(1. Chongqing Wanzhou Food and Drug Inspection Institute · Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing, China 404000; 2. Department of Pharmacy, Chongqing University Three Gorges Hospital, Chongqing, China 404000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Forsythiae Fructus in Compound Ethanol Hand Sanitizer. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of Forsythiae Fructus in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of forsythoside A and forsythrin in the preparation, the chromatographic column was medium spectrum red RD-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 235 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of Forsythiae Fructus were clear with good separation, and the negative control had no interference. The linear ranges of forsythoside A and forsythrin were 9.79-195.75 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 2.02-40.48 μg/mL ($r=0.999\ 8$), respectively. The RSDs of the precision, repeatability and stability tests were less than 1.0%, the average recoveries of forsythoside A and forsythrin were 100.04% and 97.36% with RSDs of 0.93% and 1.05% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The established standard can be used for the quality control of Forsythiae Fructus in the Compound Ethanol Hand Sanitizer.

Key words: Compound Ethanol Hand Sanitizer; Forsythiae Fructus; TLC; HPLC; content determination

*基金项目:重庆市科卫联合中医药技术创新与应用发展项目[2020ZY023832];重庆市万州区第二批新冠肺炎防控应急科技攻关专项项目[wzstc-2020027]。

第一作者:郭娅,女,大学本科,主管中药师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)603725622@qq.com。

△通信作者:向春艳,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)584421381@qq.com。

- tivity from Iranian populations of *Achillea wilhelmsii* K. Koch[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 112: 274-280.
- [7] ANNA H, MIROSLAW H, RYSZARD S, et al. Chemometric analysis based on high-performance liquid chromatographic data in the fingerprint construction of selected *Achillea* species[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2018, 41(1): 1-5.
- [8] 赵磊,孙艳涛,咎珂. 建立从云南薯蓣中分离提取薯蓣皂苷的方法[J]. 中国卫生工程学, 2021, 20(6): 969-970.
- [9] CARBARA L, MATHIAS Z, ANN-KATRIN H, et al. The Alkamide trans-Pellitorine Targets PPAR γ via TRPV1 and TRPA1 to Reduce Lipid Accumulation in Developing 3T3-L1 Adipocytes[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8(10): 1-11.
- [10] VERYSER L, BRACKE N, WYNENDAELE E, et al. Quantitative *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Intestinal and Blood-Brain Barrier Transport Kinetics of the Plant N-Alkylamide Pellitorine[J]. Biomed Res Int, 2016, 22(4): 1-11.
- [11] SINGH DK, NIRWAN S, BABBAR SB. Micropropagation of *Anacyclus pyrethrum* and chemical profiling of the regenerated plants for pellitorine, the active principle[J]. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 2015, 122(1): 249-255.
- [12] VERYSER L, LIESELOTTE L, ROCHE N, et al. Quantitative transdermal behavior of pellitorine from *Anacyclus pyrethrum* extract[J]. Phytomedicine, 2014, 21(14): 1801-1807.
- [13] KU SK, LEE IC, KIM JA, et al. Anti-septic Effects of Pellitorine in HMGB1-Induced Inflammatory Responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Inflammation, 2014, 37(2): 338-348.

(收稿日期: 2022-06-13; 修回日期: 2022-08-27)

复方乙醇手消毒液由重庆大学附属三峡医院开发,主要药物连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,有清热解毒、消肿散结、疏散风热功效^[1],《本草图经》誉其为“疮家圣药”^[2]。现代药理学研究表明,连翘具有抑菌、抗炎、抗病毒、保肝、抗肿瘤、免疫调节和抗氧化作用^[3]。近年来,国家卫生管理部门推荐以其配伍的多种中成药预防新型冠状病毒感染^[4-5],有一定疗效。王小敏等^[6]的研究结果表明,连翘果乙醇提取物抑菌活性与其中含有的多种醇类、酚类、醛类、酮类、烷烃、烯烃类物质相关,且45%~90%乙醇溶液也有抑菌作用^[7],二者联用能进一步增强抑菌消毒作用,故可用于疫情防控期间的日常消毒。2020年版《中国药典(一部)》中连翘含量测定项下包含连翘苷和连翘酯苷A,为快速、方便、有效地测定两种成分含量,多采用高效液相色谱(HPLC)法、超高效液相色谱(UPLC)法及一测多评等法^[8-11]。为进一步完善质量标准,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中连翘药材进行定性鉴别,并采用HPLC法同时测定制剂中连翘酯苷A和连翘苷含量,以建立复方乙醇手消毒液中连翘的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪,含紫外检测器(美国Agilent公司);GC-2010plus型气相色谱仪(日本Shimadzu公司,内含FID);AB204S型分析天平(瑞士Mettler公司,精度为万分之一);ME215S型分析天平(德国Sartorius公司,精度为十万分之一);KQ-800DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

连翘酯苷A对照品(批号为111810-201606,含量93.4%)、连翘苷对照品(批号为110821-201816,含量95.1%)、连翘对照药材(批号为120908-201817),均购自中国食品药品检定研究院;复方乙醇手消毒液(重庆大学附属三峡医院,批号分别为211013,211018,211020);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

2 方法与结果

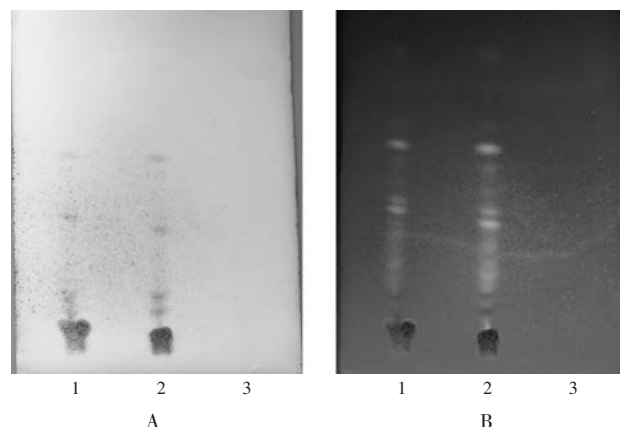
2.1 性状鉴别

肉眼观察,样品为棕色液体;嗅之,微臭;pH试纸检测得pH为4.5~6.0。

2.2 TLC鉴别

取样品5 mL,水浴浓缩至干,残渣加乙醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取连翘对照药材1 g,加石油醚(30~60℃)20 mL,密塞,超声(功率800 W,频率40 kHz)处理15 min,滤过,滤液浓缩至干,残渣加乙醇2 mL,作为对照药材溶液。按复方乙醇手消毒液处方和

工艺制备连翘的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述溶液各5 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-甲酸乙酯-甲酸(15:10:0.25, V/V/V)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,分别置日光灯及紫外光灯(365 nm)下检视^[1]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点,阴性对照无干扰,详见图1。



A. 日光灯 B. 紫外光灯

1. 供试品溶液 2. 对照药材溶液 3. 阴性对照品溶液

图1 连翘薄层色谱图

A. Fluorescent lamp B. Ultraviolet lamp

1. Test solution 2. Reference medicinal material solution 3. Negative reference solution

Fig. 1 TLC chromatograms of Forsythiae Fructus

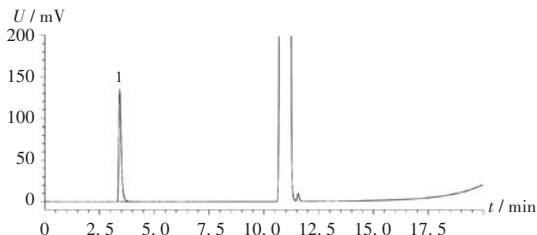
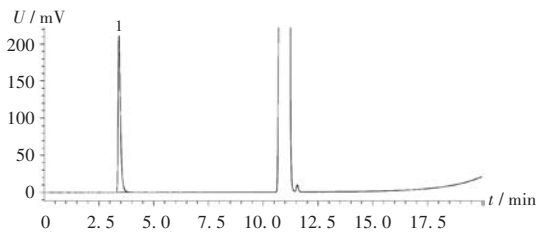
2.3 乙醇体积分数检查

精密量取无水乙醇适量,加N,N-二甲基甲酰胺溶解并稀释,制成每1 mL中含乙醇8 mg的对照品溶液。另精密量取样品适量,同法操作,得供试品溶液。精密量取上述溶液各1 μL,分别注入气相色谱仪,按2020年版《中国药典(四部)》通则0711乙醇量测定法,色谱柱为HR-5毛细管柱(30 m×0.32 mm,0.25 μm),载气为氮气,流速为1.0 mL/min,进样量1 μL,分流比50:1,进样口温度150℃,检测器温度230℃;柱温先在50℃维持5 min,再以20℃/min的升温速率升至150℃,维持3 min,依法进行测定,按相关规定进行精密性、稳定性、重复性试验。结果的RSD均小于2.0%,表明仪器精密性良好,对照品溶液、供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定,方法重复性良好。按外标法计算峰面积,结果批号为2011013,2011018,2011020的复方乙醇手消毒液中乙醇体积分数分别为56.2%,55.8%,56.3%(均不少于50%),符合标准。详见图2。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱:中谱红RD-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,



1. 乙醇

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图2 气相色谱图

1. Ethanol

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 2 GC chromatograms

5 μm);流动相:0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min时85%A,10~22 min时85%A $\rightarrow$ 77%A;22~33 min时77%A $\rightarrow$ 60%A,33~39 min时60%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:235 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.4.2 溶液制备

取连翘酯苷A、连翘苷对照品各适量,精密称定,加50%甲醇,制得含连翘酯苷A 0.391 5 mg/mL、连翘苷0.202 4 mg/mL的单一对照品贮备液;分别精密量取上述连翘酯苷A对照品贮备液3.0 mL、连翘苷对照品贮备液1.2 mL,置同一10 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液。精密量取样品1.0 mL,置10 mL容量瓶中,用50%甲醇溶解并定容,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。按复方乙醇手消毒液处方和工艺制备缺连翘的阴性样品,按供试品溶液制

备方法制成阴性对照品溶液。

2.4.3 方法学考察

专属性试验:取2.4.2项下3种溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定。结果2种被测成分分离完全,且阴性对照无干扰,表明专属性良好。详见图3。

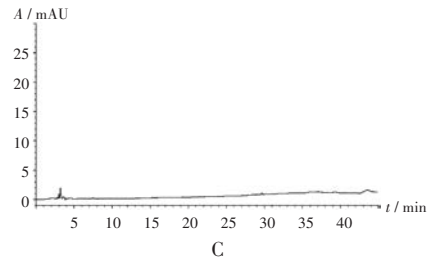
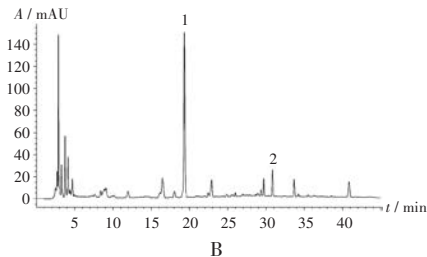
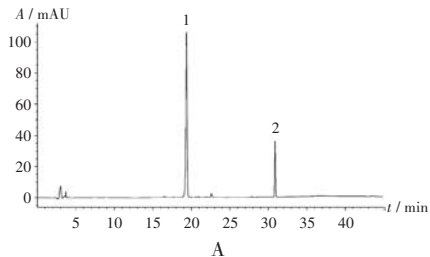
线性关系考察:分别精密量取2.4.2项下连翘酯苷A对照品贮备液0.25,0.50,1.00,2.00,3.00,5.00 mL;连翘苷对照品贮备液0.10,0.20,0.40,0.80,1.20,2.00 mL,分别置10 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,制得系列混合对照溶液。按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,连翘酯苷A为 $Y_1 = 10.635\ 74X_1 + 3.492\ 08$ ($r = 0.999\ 9$),连翘苷为 $Y_2 = 11.979\ 04X_2 - 2.958\ 86$ ($r = 0.999\ 8$)。结果表明,连翘酯苷A和连翘苷质量浓度分别在9.79~195.75 $\mu\text{g/mL}$ 和2.02~40.48 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取混合对照品溶液,按2.4.1项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果连翘酯苷A、连翘苷峰面积的 RSD 分别为0.11%和0.29% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为211013),按2.4.2项下方法制备供试品溶液,分别在室温下放置0,2,4,8,12,24 h时,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果连翘酯苷A、连翘苷峰面积的 RSD 分别为0.35%和0.68% ($n = 6$),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号为211013),按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定,平行6次,记录峰面积并计算含量。结果连翘酯苷A、连翘苷含量的 RSD 分别为0.11%和0.27% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品(批号为211013)6份,每份0.5 mL,分别精密加入连翘酯苷A



1. 连翘酯苷A 2. 连翘苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Forsythoside A 2. Forsythinin

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

Fig. 3 HPLC chromatograms

(0.392 mg/mL)1.0 mL、连翘苷(0.202 mg/mL)0.5 mL,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.1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。

表1 加样回收试验结果($n=6$)
Tab.1 Results of the recovery test ($n=6$)

待测成分	取样量 (mL)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
连翘酯苷A	0.5	0.790	0.392	1.189	101.79	100.04	0.93
	0.5	0.790	0.392	1.183	100.26		
	0.5	0.790	0.392	1.180	99.49		
	0.5	0.790	0.392	1.182	100.00		
	0.5	0.790	0.392	1.179	99.23		
	0.5	0.790	0.392	1.180	99.49		
连翘苷	0.5	0.083	0.101	0.181	97.03	97.36	1.05
	0.5	0.083	0.101	0.183	99.01		
	0.5	0.083	0.101	0.180	96.04		
	0.5	0.083	0.101	0.182	98.02		
	0.5	0.083	0.101	0.181	97.03		
	0.5	0.083	0.101	0.181	97.03		

2.4.4 样品含量测定

取3批样品各1.0 mL,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果批号为211013,211018,211020的样品中,连翘酯苷A含量分别为1.580,1.557,1.572 mg/mL,连翘苷分别为0.166,0.164,0.165 mg/mL。

3 讨论

由于连翘酯苷不稳定,高温下易分解,有研究表明,提取溶剂的种类和浓度在连翘酯苷A和连翘苷提取工艺研究中影响较大^[12-14],故最终选择甲醇提取。GUO等^[14]及王姝君等^[11]分别选用50%及70%甲醇为溶剂,结果选择50%甲醇时,目标成分提取率较高、干扰峰少、分离度较高,且方法简单,成本低。同时对比文献^[15-16],参考不同方法,比较了检测波长分别为235,275,330 nm时的结果;考察了0.1%磷酸溶液-乙腈、水-乙腈、0.4%醋酸-乙腈流动相体系;研究了0.1%,0.2%,0.4%磷酸溶液对结果的影响。结果表明,当检测波长为235 nm,流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱)时,色谱峰的峰形和分离度最佳。

本研究中建立的复方乙醇手消毒液质量标准结果准确可靠,配制简单、易得、价格低,是一种可灭活病毒,杀灭肠道致病菌、化脓性球菌、致病性酵母菌及医院感染常见细菌的速效消毒液。但本研究也存在一定局限性,虽然按2020年版《中国药典(一部)》中连翘药材的规定对连翘苷、连翘酯苷A进行了含量测定^[1],但连翘中含有的化学成分复杂,如绿原酸、咖啡酸、没食

子酸、阿魏酸等^[17],因此其余成分的质量标准有待进一步提升。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 177-178.

[2] 郝菲菲. 连翘及其在保和丸中对胃肠动力作用的实验研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.

[3] 夏伟, 董诚明, 杨朝帆, 等. 连翘化学成分及其药理学研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(12): 1670-1674.

[4] 齐丽娜, 陈炫好, 金 华, 等. 中药连翘化学成分及药理活性研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(2): 168-175.

[5] 侯雯倩, 宁艳梅, 苏 敬, 等. 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)全国66个预防方的用药特点分析[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1443-1449.

[6] 王小敏, 陈 乔, 郭丽丽, 等. 连翘果、连翘叶乙醇提取物的抑菌活性及成分分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 89-94.

[7] 雷 毅, 蒋丽娟, 陈宝宝, 等. 不同浓度乙醇溶液杀菌效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(9): 656-658.

[8] 张淑蓉, 吴 婷, 魏 珊, 等. 以连翘苷为内参物的一测多评法用于山西连翘药材品质评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(3): 304-308.

[9] 孔晶晶, 朱晶晶, 王智民, 等. 一测多评法测定连翘中多种不同类型成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(17): 1301-1304.

[10] 梁 军, 郭信东, 夏永刚, 等. UPLC同时测定不同产地连翘中8种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 68-72.

[11] 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.

[12] 雷敬卫, 张 强, 谢彩侠, 等. 不同采收期连翘的含量测定及HPLC指纹图谱[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(12): 1181-1185.

[13] 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): 579-582.

[14] GUO H, LIU AH, LI L, et al. Simultaneous determination of 12 major constituents in Forsythia suspensa by high performance liquid chromatography — DAD method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(3): 1000-1006.

[15] 李洪彬, 徐信峰, 王 静. 高效液相一测多评法测定鼻炎片中羧基苍术苷、苍术苷、连翘酯苷B、连翘酯苷A、连翘苷、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和玄茅酚苷[J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1681-1687.

[16] 梁 军, 郭信东, 夏永刚, 等. UPLC同时测定不同产地连翘中8种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 68-72.

[17] 刘 畅, 温 静, 阎新佳, 等. 连翘中酚酸类成分的研究进展[J]. 中国药房, 2020, 31(12): 1516-1522.

(收稿日期: 2022-04-29; 修回日期: 2022-09-26)