

复方板蓝根颗粒质量标准提升研究*

谭敏洁, 江 勋, 彭婷婷, 周 峰, 傅黎春

(湖南省衡阳市食品药品监督管理局, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 建立复方板蓝根颗粒的薄层色谱鉴别和含量测定方法,提升复方板蓝根颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法,以脯氨酸、亮氨酸、靛玉红作为指标成分进行定性鉴别;采用高效液相色谱法,以(R,S)-告依春和腺苷为指标成分进行定量测定,并对34批市售复方板蓝根颗粒样品进行质量分析评估。结果 薄层色谱斑点清晰,分离度好;(R,S)-告依春和腺苷质量浓度分别在0.98~19.60 μg/mL($r=1.000\ 0$),3.144~62.880 μg/mL($r=1.000\ 0$)与峰面积线性关系良好;(R,S)-告依春和腺苷的平均回收率分别为99.52%和101.83%,RSD分别为3.69%和1.99%($n=9$)。结论 不同厂家的样品中(R,S)-告依春和腺苷含量差异较大,故提升质量标准对其质量控制很有必要。

关键词:复方板蓝根颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准提升

中图分类号:R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)15-0020-05

Study on Improvement of Quality Standard of Compound Banlangen Granules

Tan Minjie, Jiang Xun, Peng Tingting, Zhou Feng, Fu Lichun

(Hengyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Hengyang, Hunan, China 421001)

Abstract: Objective To establish a thin layer chromatography (TLC) and content determination method for Compound Banlangen Granules, in order to improve the quality standard of Compound Banlangen Granules. **Methods** TLC method was adopted, the contents of proline, leucine and indirubin were taken as index components for qualitative identification. HPLC method was adopted, (R, S)-goitrin and adenosine were taken as index components for quantitative determination, and 34 batches of commercially available Compound Banlangen Granules samples were taken for quality analysis and evaluation. **Results** The TLC spots were clear and the degree of separation was good. (R, S)-goitrin and adenosine had good linear relationship in the range of 0.98–19.60 μg/mL ($r=1.000\ 0$), 3.144–62.880 μg/mL ($r=1.000\ 0$), the average recoveries of (R, S)-goitrin and adenosine were 99.52% and 101.83%, respectively. RSDs were 3.69% and 1.99% ($n=9$). **Conclusion** There is a great difference in the contents of (R, S)-goitrin and adenosine in different manufacturers. Therefore, it is necessary to improve the quality standard for the quality control of Compound Banlangen Granules.

Key words: Compound Banlangen Granules; TLC; HPLC; promotion of quality standard

复方板蓝根颗粒是我国常用非处方中成药,由板蓝根和大青叶经提取精制而成^[1]。板蓝根为十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根^[2],含有大量生物碱、氨基酸、有机酸、核苷、多糖等^[3-4]。大青叶为十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶^[2],其有效成分与板蓝根基本类似,主要含吲哚类生物碱、有机酸、苷类、甾醇等^[5]。复方板蓝根颗粒具有清热解毒、凉血利咽的功效,主要用于温病发热、风热感冒、咽喉肿痛、流行性乙型脑炎等^[1],临床使用广泛,疗效明确。经国家食品药品监督管理局网站查证,全国共有153家生产企业。复方板蓝根颗粒现行检验标准中仅有2个化学反应鉴别,无专属性指标成分定性鉴别和定量测定方法,无法有效控制其质量。板蓝根中含18种氨基酸,其中精氨酸、脯氨酸、谷氨酸、亮氨酸等含量高,具有抗病毒、抗炎功效^[6-8]。靛蓝、靛玉红是大青叶的主要抑菌物质^[9];(R,S)-告依

春是板蓝根的主要生物碱,具有较强的抗病毒活性^[10];腺苷和尿苷是板蓝根中具有抗病毒活性的核苷类成分^[11]。参考文献[12-15]方法及2015年版《中国药典(一部)》板蓝根和大青叶项下方法,以脯氨酸、亮氨酸、靛玉红作为指标成分,建立薄层色谱法进行定性鉴别,以(R,S)-告依春和腺苷为指标成分建立高效液相色谱法进行定量测定,有利于对其质量进行科学分析和评估,为提高产品质量和保障疗效提供数据支持和方法验证。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:AE 240型电子分析天平(Mettler公司);DK-41OHT型超声波清洗机(深圳市得康洗净电器有限公司);薄层色谱版加热器(CAMAG);LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括四元泵、柱温箱、自动进样器、DAD检测器和色谱工作站。

*基金项目:湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目[湘食药科 R201624]。

第一作者:谭敏洁(1985-),在职硕士研究生在读,主管中药师,主要从事中药鉴定与检验工作,(电子信箱)156594795@qq.com。

通信作者:傅黎春(1966-),女,大学本科,主任中药师,主要从事中药鉴定与检验工作,(电子信箱)1968675502@qq.com。

试药:大青叶对照药材(批号为121367-200602),板蓝根对照药材(批号为121177-201407),脯氨酸对照品(批号为140677-201507),亮氨酸对照品(批号为140687-201102),腺苷对照品(批号为110879-200202), (R, S) -告依春对照品(批号为111753-201505),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,美国Honeywell公司);薄层色谱预制硅胶G板(德国Merck公司);复方板蓝根颗粒[市售,共34批,规格为每袋15g(相当于原生药15g)];超纯水(湖南中沃水务环保科技有限公司);其余试剂均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

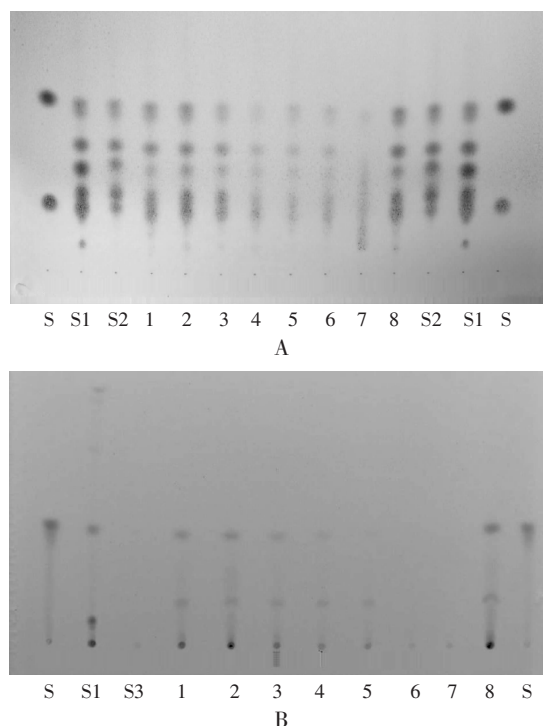
氨基酸:取本品2g,研细,加乙醇10mL,超声处理30min,滤过,滤液浓缩至2mL,作为供试品溶液。另取大青叶对照药材、板蓝根对照药材各0.5g,加乙醇20mL,同法制得对照药材溶液。再取脯氨酸对照品、亮氨酸对照品,加乙醇制成每1mL各含1mg的混合溶液,作为对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》薄层色谱法试验,分别取对照品溶液2 μ L、供试品溶液及对照药材溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G板上,以正丁醇-冰醋酸-水(19:5:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱和对照品溶液色谱相应位置上显相同的斑点,见图1A(S从上至下分别为亮氨酸、脯氨酸)。

靛玉红:取本品15g,研细,加氯仿40mL,加热回流1h,滤过,滤液浓缩至1mL,作为供试品溶液。取大青叶对照药材0.5g,加氯仿20mL,加热回流1h,滤液浓缩至1mL,制得对照药材溶液。再取靛玉红,加氯仿,制得每1mL含1mg的溶液,作为对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》薄层色谱法试验,分别取对照品溶液5 μ L、供试品溶液及对照药材溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G板上,以环己烷-氯仿-丙酮(5:4:2)为展开剂,展开,取出,晾干。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应的位置上显相同的斑点,见图1B。

2.2 定量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shimadzu Shim-pack GIST C₁₈柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m);流动相:甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~5min, 2%~2%A; 5~15min, 2%~10%A; 15~20min, 10%~10%A; 20~25min, 10%~12%A; 25~41min, 12%~12%A; 41~42min, 12%~30%A; 42~45min, 30%~30%A);流速:0.8mL/min;检测波长:245nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。理论板数按 (R, S) -告依



S. 对照品溶液 S1. 板蓝根对照药材溶液
S2. 大青叶对照药材溶液 S3. 大青叶阴性对照溶液
1-8. 供试品溶液

A. 氨基酸 B. 靛玉红

图1 薄层色谱图

春和腺苷峰计算均不低于10000。在此色谱条件下,复方板蓝根颗粒中的 (R, S) -告依春和腺苷与其他组分均能达到基线分离,色谱图见图2。

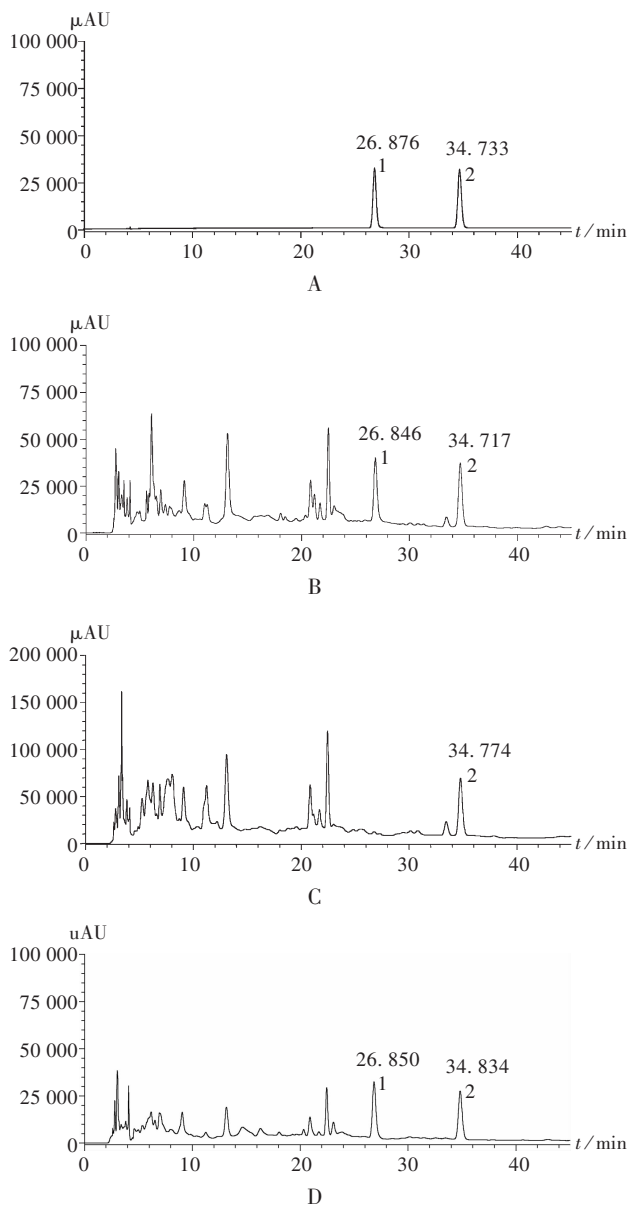
2.2.2 溶液制备

取 (R, S) -告依春和腺苷对照品适量,精密称定,加水制成每1mL含 (R, S) -告依春19.6 μ g,含腺苷62.88 μ g的混合对照品溶液。取本品约4g,置具塞锥形瓶中,精密加水25mL,密塞,称定质量,60 $^{\circ}$ C超声(功率为300W,频率为40kHz)45min使溶解,放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按照部颁标准中处方量及生产制备方法,分别制备不含板蓝根、大青叶的样品,按供试品溶液项下操作,得阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

阴性干扰试验:取2.2.2项下3种溶液,按拟订色谱条件进样测定。色谱图见图2。

线性关系考察:分别取对照品溶液适量,加水稀释成含 (R, S) -告依春0.98, 1.96, 3.92, 7.84, 9.80, 11.76, 15.68, 19.60 μ g/mL,含腺苷3.144, 6.288, 12.576, 25.152, 31.440, 37.728, 50.304, 62.880 μ g/mL的系列溶液,按拟订色谱条件测定,进样量为20 μ L,分别以对照品溶液的质量浓度(X)为横坐标、色谱峰峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表1。



1. (R,S)-告依春 2. 腺苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液
C. 板蓝根阴性对照品溶液 D. 大青叶对照品溶液

图2 高效液相色谱图

表1 回归方程、线性范围、定量限和检测限

成分	回归方程	相关系数(<i>r</i>)	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	检测限(ng)	定量限(ng)
A	$Y=173\,871X-12\,066$	1.000 0	0.98~19.60	9.80	30.0
B	$Y=58\,118X-10\,729$	1.000 0	3.144~62.880	31.44	104.8

注:A为(R,S)-告依春,B为腺苷。下表同。

定量限和检测限试验:精密量取对照品溶液,用水依次稀释成由高到低的溶液,测得(R,S)-告依春和腺苷的检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)。结果见表1。

精密度试验:取同一对照品溶液,精密吸取20 μL ,按拟订色谱条件连续进样5次。结果(R,S)-告依春和腺苷色谱峰面积的RSD分别为0.03%和0.11% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为160517)约4 g,精密称定,分别于配制后0,3,8,12,18,24 h时按拟订色谱条件进样测定。结果,供试品溶液中(R,S)-告依春和腺苷的色谱峰峰面积的RSD分别为1.13%和0.94% ($n=6$),表明供试品溶液制备后24 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为160517)样品,精密称定,分别依法制备6份供试品溶液,并测定含量。结果,(R,S)-告依春和腺苷的RSD分别为1.87%和1.65% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为160517)样品9份,精密称定,分别精密加入(R,S)-告依春和腺苷对照品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表2。

2.2.4 样品含量测定

分别取复方板蓝根颗粒样品约4 g,精密称定,依法制成供试品溶液。分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各20 μL ,注入液相色谱仪,每份样品平行测定2次,计算(R,S)-告依春和腺苷含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 测定波长选择

(R,S)-告依春和腺苷对照品溶液的紫外吸收光

表2 样品中(R,S)-告依春与腺苷加样回收试验结果($n=9$)

取样量 (g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3.751 0	0.107 0	0.340 8	0.117 6	0.377 3	0.223 0	0.720 5	98.64	100.64				
3.750 2	0.106 9	0.340 8	0.117 6	0.377 3	0.221 6	0.728 5	97.53	102.76				
3.750 8	0.107 0	0.340 8	0.117 6	0.377 3	0.223 6	0.727 0	99.15	102.36				
3.750 6	0.107 0	0.340 8	0.078 4	0.251 5	0.185 0	0.596 3	99.49	101.59				
3.750 0	0.106 9	0.340 7	0.078 4	0.251 5	0.180 7	0.593 7	94.13	100.60	99.52	101.83	3.69	1.99
3.750 7	0.107 0	0.340 8	0.078 4	0.251 5	0.182 1	0.586 5	95.79	97.69				
3.750 0	0.106 9	0.340 7	0.039 2	0.125 8	0.146 6	0.469 8	101.28	102.62				
3.749 8	0.106 9	0.340 7	0.039 2	0.125 8	0.147 9	0.472 3	104.59	104.61				
3.755 2	0.107 1	0.341 2	0.039 2	0.125 8	0.148 3	0.471 5	105.10	103.58				

表3 复方板蓝根颗粒成分定量测定结果

序号	生产企业	批号	每袋含量(mg)		序号	生产企业	批号	每袋含量(mg)	
			A	B				A	B
1	南京同仁黄山精制药业有限公司	1508022	-	0.340 7	18	广西维威制药有限公司	170116	0.093 0	0.412 3
2	太极集团重庆中药二厂有限公司	1509176	0.212 5	1.764 9	19	广州白云山和记黄埔中药有限公司	B17F022	0.116 3	0.641 4
3	四川康富来药业集团有限公司	150105	-	0.343 7	20	修正药业集团四川高原明珠制药有限公司	161005	0.075 1	0.291 6
4	河南辅仁堂制药有限公司	20160116	0.080 6	0.774 8	21	广州诺金制药有限公司	6302C14	0.199 0	0.804 8
5	四川彩虹制药有限公司	150307	-	0.339 0	22	四川省宜宾五粮液集团宜宾制药有限责任公司	160320	0.021 1	0.200 7
6	四川德元药业集团有限公司	150201	-	0.075 7	23	四川禾邦阳光制药股份有限公司	160703	0.139 6	0.282 8
7	四川菲德力制药有限公司	151101	-	0.031 3	24	太极集团重庆中药二厂有限公司	1607152	0.351 3	1.238 1
8	太极集团四川绵阳制药有限公司	1504040 B	-	1.148 3	25	广西圣特药业有限公司	170217	0.062 0	0.159 3
9	四川子仁制药有限公司	150505	-	0.425 5	26	广西药用植物园制药厂	170302	0.257 1	0.656 8
10	广西维威制药有限公司	151209	-	0.204 3	27	修正药业集团四川高原明珠制药有限公司	160402	0.027 1	0.314 4
11	河南辅仁堂制药有限公司	201511292	0.144 2	0.505 2	28	桂林裕民制药有限公司	161102	0.023 9	0.035 9
12	广西双蚁药业	160107	0.019 3	0.192 3	29	四川省宜宾五粮液集团宜宾制药有限责任公司	160602	0.038 6	0.316 2
13	江苏苏南药业实业有限公司	160517	0.422 9	1.347 6	30	四川禾邦阳光制药股份有限公司	160705	0.086 7	0.261 0
14	太极集团重庆中药二厂有限公司	1609221	0.257 1	1.275 2	31	桂林裕民制药有限公司	170103	0.020 4	0.043 8
15	华润三九(郴州)制药有限公司	1606014N	0.276 0	0.067 9	32	河南辅仁堂制药有限公司	20160715	0.235 8	0.739 2
16	华润三九(郴州)制药有限公司	1606007N	0.225 2	0.106 9	33	四川彩虹制药有限公司	160706	0.351 5	0.588 7
17	广西维威制药有限公司	170111	0.093 8	0.422 0	34	广州白云山和记黄埔中药有限公司	C17F012	0.171 3	0.474 0

谱测定结果显示, (R, S)-告依春在 240 nm 波长处有最大吸收, 腺苷在 258 nm 波长处有最大吸收。综合两者及文献[12-15], 选定 245 nm 作为测定波长。

3.2 流动相选择

分别考察了甲醇-水、乙腈-水、0.02% 磷酸-甲醇、0.1% 磷酸-甲醇及 0.1% 磷酸-乙腈的等度和梯度洗脱, 结果上述流动相系统均可对单个成分达到较好的分离效果, 但不能同时对 2 个成分进行较好地分离。最终, 选择甲醇-水梯度洗脱, 峰形好, 且 2 个成分分离效果均比较满意, 流动相本身干扰因素小, 较等度方法效果更好, 稳定可靠。

3.3 提取方法选择

(R, S)-告依春和腺苷均为水溶性成分, 故选取纯水为提取溶剂。分别在 40 ℃ 和 60 ℃ 条件下考查了提取时间为 30, 45, 60 min 时 (R, S)-告依春和腺苷的含量, 发现 60 ℃ 提取 45 min 提取效果最佳。

3.4 样品分析

收集到的 34 批复方板蓝根颗粒样品, 经检测, 有 8 批未检出 (R, S)-告依春或低于检出限, (R, S)-告依春含量范围为每袋 0~0.422 9 mg, 腺苷含量范围为每袋 0.031 3~1.764 9 mg。不同样品中 (R, S)-告依春和腺苷含量差异较大。考虑不同厂家的复方板蓝根颗粒有效成分含有量差异可能与原药材有关, 对收集来的 5 批板蓝根中药材和 5 批大青叶中药材检测 (R, S)-告依春和腺苷含量, 测得板蓝根中药材中 (R, S)-告依春含量范围为 1.186 1~3.452 0 mg/g, 腺苷含量范围为

0.042 5~0.188 0 mg/g; 大青叶中药材 (R, S)-告依春含量范围为 0~0.053 3 mg/g, 腺苷含量范围为 0.031 3~0.173 7 mg/g。可见, 不同来源的板蓝根和大青叶中 (R, S)-告依春和腺苷含量差异较大。原材料的有效成分含量直接影响复方板蓝根颗粒制剂的质量。34 批复方板蓝根颗粒样品, 有 1 批无论薄层鉴别和含量测定都无法得到阳性结果, 考虑和厂家投料真实性有关。

3.5 方法评价

复方板蓝根颗粒临床应用广泛, 疗效确切, 但其质量控制水平比较落后, 制剂质量差异很大, 故对其质量标准进行提升非常有必要。选择板蓝根中抗病毒成分脯氨酸、亮氨酸和大青叶中主要抑菌成分靛玉红作为薄层鉴别指标, 特征性强, 方法简单, 利于制剂的质量控制。以 (R, S)-告依春为代表的生物碱和以腺苷为代表的核苷类成分具有很强的抗病毒活性, 含量高, 且为水溶性物质, 在复方板蓝根制备工艺中能很好地溶出。以其作为指标用高效液相色谱法进行质量控制, 方法简单、准确, 能保证复方板蓝根颗粒的质量及疗效。

参考文献:

- [1] WS₃-B-2377-97, 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十二册)[S].
- [2] 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, 2015: 205.
- [3] 梁 球, 李朝晖. 板蓝根药材及制剂的质量研究概况[J]. 广东微量元素科学, 2003, 10(11): 18-21.
- [4] 肖珊珊, 金 郁, 孙毓庆. 板蓝根化学成分、药理及质量控制研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(6): 455-459.