

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)19-0091-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.19.017



抗病毒合剂质量标准提升研究*

吴琦¹, 秦银燕¹, 陆华^{1△}, 何成章¹, 黄振光¹, 孔晓龙²

(1. 广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

摘要:目的 完善抗病毒合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的板蓝根、生地黄进行定性鉴别;采用化学鉴别法对制剂中的石膏进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定(R,S)-告依春和梓醇的含量,色谱柱为Shim-pack GIST C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), (R,S)-告依春和梓醇的流动相分别为甲醇-0.02%磷酸溶液(9:91, V/V)和乙腈-0.05%磷酸溶液(0.5:99.5, V/V),流速分别为1.0, 0.8 mL/min,检测波长分别为240, 205 nm,柱温分别为30, 25℃,进样量分别为10, 5 μL。结果 板蓝根、生地黄的TLC图斑点清晰,且阴性对照无干扰。石膏的钙盐和硫酸盐鉴别均呈阳性。含量测定中, (R,S)-告依春和梓醇的质量浓度分别在1~20 μg/mL、2~20 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9999$, $n=5$);精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.00%;(R,S)-告依春和梓醇的平均回收率分别为100.65%和97.93%,RSD分别为0.78% ($n=9$)和0.73% ($n=6$)。3批样品中, (R,S)-告依春和梓醇的含量分别为47.40~49.24 μg/mL、52.84~54.64 μg/mL。结论 所建立的方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确,可用于抗病毒合剂的质量控制。

关键词: 抗病毒合剂;薄层色谱法;化学鉴别法;高效液相色谱法;质量控制

Research on Quality Improvement of Kangbingdu Mixture

WU Qi¹, QIN Yinyan¹, LU Hua¹, HE Chengzhang¹, HUANG Zhenguang¹, KONG Xiaolong²

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangzhou, China 530021; 2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning, Guangzhou, China 530021)

Abstract: **Objective** To improve the quality standard of Kangbingdu Mixture. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify Isatidis Radix and Rehmanniae Radix in the preparation. Chemical identification method was used to identify gypsum in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to the contents of (R,S)-epigallocatechin gallate and catalpol in the preparation. The chromatographic column was Shim-Pack GIST C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phases for (R,S)-epigallocatechin gallate and catalpol were methanol-0.02% phosphoric acid solution (9:91, V/V) and acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous solution (0.5:99.5, V/V), with flow rates of 1.0 mL/min and 0.8 mL/min, detection wavelengths of 240 nm and 205 nm, column temperatures of 30℃ and 25℃, and injection volumes of 10 μL and 5 μL, respectively. **Results** The TLC chromatograms of Isatidis Radix and Rehmanniae Radix showed clear spots, and the negative control had no interference. The identification of calcium salts and sulfates in gypsum was positive. In the content determination, the linear ranges of (R,S)-epigallocatechin gallate and catalpol were 1-20 μg/mL and 2-20 μg/mL ($R^2=0.9999$, $n=5$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.00%. The average recovery rates of (R,S)-epigallocatechin gallate and catalpol were 100.65% and 97.93%, with RSDs of 0.78% ($n=9$) and 0.73% ($n=6$), respectively. In the three batches of samples, the contents of (R,S)-epigallocatechin gallate and catalpol were 47.40-49.24 μg/mL and 52.84-54.64 μg/mL, respectively. **Conclusion** The established method is simple, specific, reproducible, and accurate, which can be used for the quality control of Kangbingdu Mixture.

Key words: Kangbingdu Mixture; TLC; chemical identification; HPLC; quality control

抗病毒合剂是广西医科大学第一附属医院特色制剂,临床应用近30年,疗效确切。该制剂由板蓝根、生地黄、石膏、芦根组方,具有清肺火、祛湿排毒、凉血利咽等功效,主要用于治疗风热感冒、温热病、上呼吸道感染、咽喉炎、流行性感、肺炎等病毒感染性疾病。方

中,君药板蓝根为天然广谱抗病毒药物^[1-2],主要成分为(R,S)-告依春,有明显的抗病毒活性^[3],且含量稳定^[4-5],直接影响药物疗效,其含量高低是评估抗病毒合剂质量的重要指标。现代药理学研究表明,板蓝根中含有18种氨基酸,其中精氨酸含量最高,具有抗病毒、

*基金项目:广西壮族自治区中医药管理局中医药适宜技术开发与推广项目[GZSY22-63];广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题[GZZC2020168]。

第一作者:吴琦,女,硕士研究生,研究方向为医院制剂质量标准,(电子信箱)wq18377372039@163.com。

△通信作者:陆华,男,博士研究生,主任药师,研究方向为医院制剂开发,(电子信箱)hualude@sina.com。

抗炎功效^[6-7]。佐药生地黄具有调节免疫功能、抗炎、强心等作用^[8],具有清热凉血、养阴生津功效^[9],主要有效成分为梓醇,其极性大,易发生降解,难以控制。抗病毒合剂现行质量标准仅有理化鉴别及常规检查项,缺乏药材指标性成分的定性鉴别及定量测定,难以全面、有效地控制其质量。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的板蓝根、生地黄进行了定性鉴别,采用化学鉴别法对制剂中的石膏进行鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定了(R,S)-告依春和梓醇的含量,旨在完善抗病毒合剂的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030C 3D Plus型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);ME204型电子天平、ME155DU型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度均为0.01 mg);MC-BW03W3-011型恒温电热板(美的集团股份有限公司);JP-100S型超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司,功率为600 W,频率为40 kHz);硅胶G薄层板(烟台新诺化工有限公司)。

1.2 试药

抗病毒合剂(医院制剂,批号分别为20211105, 20211107, 20211110);精氨酸对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号为9061021);板蓝根对照药材(批号为121177-201608),生地黄对照药材(批号为121180-201506), (R,S)-告依春对照品(批号为111753-202007,含量为100%),梓醇对照品(批号为110808-202112,含量>98.8%),均购自中国食品药品检定研究院;石膏药材(安徽孚众药业有限公司,批号为20230201,含水硫酸钙含量不低于99.5%);乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

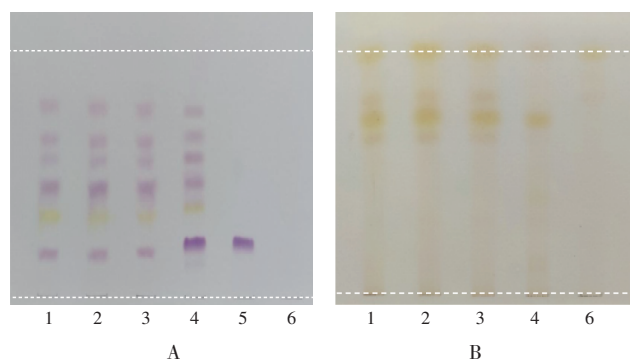
2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

板蓝根:取抗病毒合剂1 mL,置分液漏斗,加稀乙醇振摇提取2次,每次10 mL,滤液蒸干,残渣加稀乙醇1.5 mL溶解,即得供试品溶液。取板蓝根对照药材0.5 g,加稀乙醇20 mL,超声15 min,滤液蒸干,残渣加稀乙醇1 mL溶解,即得对照药材溶液。取精氨酸对照品适量,加稀乙醇制成质量浓度为0.5 mg/mL的对照品溶液。按抗病毒合剂制备方法制备缺板蓝根的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备缺板蓝根的阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[10]试验,吸取上述4种溶液各4 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,在正丁醇-冰醋酸-水(19:5:5, V/V/V)中展开,取出,晾干,喷茚三酮试液,于105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果供试品溶液

色谱中,在与对照品溶液和对照药材溶液色谱相应位置均显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 A。

生地黄:取抗病毒合剂30 mL,加乙酸乙酯振摇提取2次,每次30 mL,合并有机层,浓缩至1 mL,即得供试品溶液。取生地黄对照药材2.0 g,加水60 mL,加热回流2 h,滤过,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按抗病毒合剂制备方法制备缺生地黄的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备缺生地黄的阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[10]试验,吸取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,在石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(1:3:3:1, V/V/V/V)中展开,取出,晾干,喷2,4-二硝基苯肼乙醇试液,于105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同黄棕色主斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 B。



1-3. 供试品溶液(批号分别为20211105, 20211107, 20211110)
4. 对照药材溶液 5. 对照品溶液 6. 阴性对照品溶液
A. 板蓝根(日光) B. 生地黄(日光)

图1 薄层色谱图

1-3. Test solution (batch numbers: 20211105, 20211107, 20211110)
4. Reference medicinal solution 5. Reference solution 6. Negative reference solution
A. Isatidis Radix (sunlight) B. Rehmanniae Radix (sunlight)

Fig. 1 TLC chromatograms

2.2 石膏化学鉴别

溶液制备:取抗病毒合剂0.7 mL,加稀盐酸10 mL溶解,即得供试品溶液。同法制备石膏对照药材溶液和缺石膏的阴性对照品溶液。

钙盐鉴别:分别取上述3种溶液各1 mL,加甲基红指示液2滴,用氨试液中和,再滴加盐酸至恰好呈酸性,加草酸铵试液。结果供试品溶液、对照药材溶液立即生成白色沉淀,且沉淀不溶于醋酸,但可溶于盐酸,阴性对照品溶液无变化。

硫酸盐鉴别:分别取上述3种溶液各1 mL,加氯化钡试液。结果供试品溶液和对照药材溶液立即生成白色沉淀,且沉淀不溶于盐酸和硝酸,阴性对照品溶液无变化。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱条件见表 1。理论板数按 (R,S) -告依春峰和梓醇峰计均不低于 5 000。

表 1 色谱条件

Tab. 1 Chromatographic conditions

色谱条件	(R,S) -告依春	梓醇
色谱柱	Shim-pack GIST C ₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	
流动相	甲醇-0.02%磷酸溶液(9:91, V/V)	乙腈-0.05%磷酸溶液(0.5:99.5, V/V)
流速(mL/min)	1.0	0.8
检测波长(nm)	240	205
柱温(°C)	30	25
进样量(μL)	10	5

2.3.2 溶液制备

(R,S) -告依春:取 (R,S) -告依春对照品 2.50 mg, 精密称定, 置容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 制成质量浓度为 100 μg/mL 的对照品贮备液; 精密吸取对照品贮备液 0.2 mL, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 即得对照品溶液。精密量取样品 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 超声 15 min, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按抗病毒合剂制备方法制备缺板蓝根的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备缺板蓝根的阴性对照品溶液。

梓醇:取梓醇对照品 0.50 mg, 精密称定, 置容量瓶中, 加流动相溶解并定容, 制成质量浓度为 50 μg/mL 的对照品贮备液; 精密吸取对照品贮备液 1 mL, 置 5 mL

容量瓶中, 加甲醇定容, 即得对照品溶液。精密量取样品 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 超声 30 min, 滤过, 蒸干, 加流动相溶解并定容, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。按抗病毒合剂制备方法制备缺生地黄的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备缺生地黄的阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性试验:分别取 2.3.2 项下 6 种溶液各适量, 按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱中, 在与 (R,S) -告依春和梓醇色谱图相同保留时间处有相应色谱峰出现, 且阴性对照无干扰, 表明方法专属性良好。详见图 2。

线性关系考察:精密量取 2.3.2 项下 (R,S) -告依春对照品贮备液 5 mL, 加甲醇定容, 制成质量浓度为 50 μg/mL 的 (R,S) -告依春对照品溶液, 再精密吸取 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 mL, 分别置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 即得 (R,S) -告依春系列对照品溶液。精密吸取 2.3.2 项下梓醇对照品贮备液 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0 mL, 分别置 5 mL 容量瓶中, 加流动相定容, 即得梓醇系列对照品溶液。吸取上述系列对照品溶液各适量, 按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 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, 分别得回归方程 $Y_{\text{告}} = 75\,482.0 X_{\text{告}} + 4\,500.46 (R^2 = 0.999\,9, n = 5)$ 和 $Y_{\text{梓}} = 3\,398.7 X_{\text{梓}} - 1\,727.6 (R^2 = 0.999\,9, n = 5)$ 。结果表明, (R,S) -告依春和梓醇的质量浓度分别在

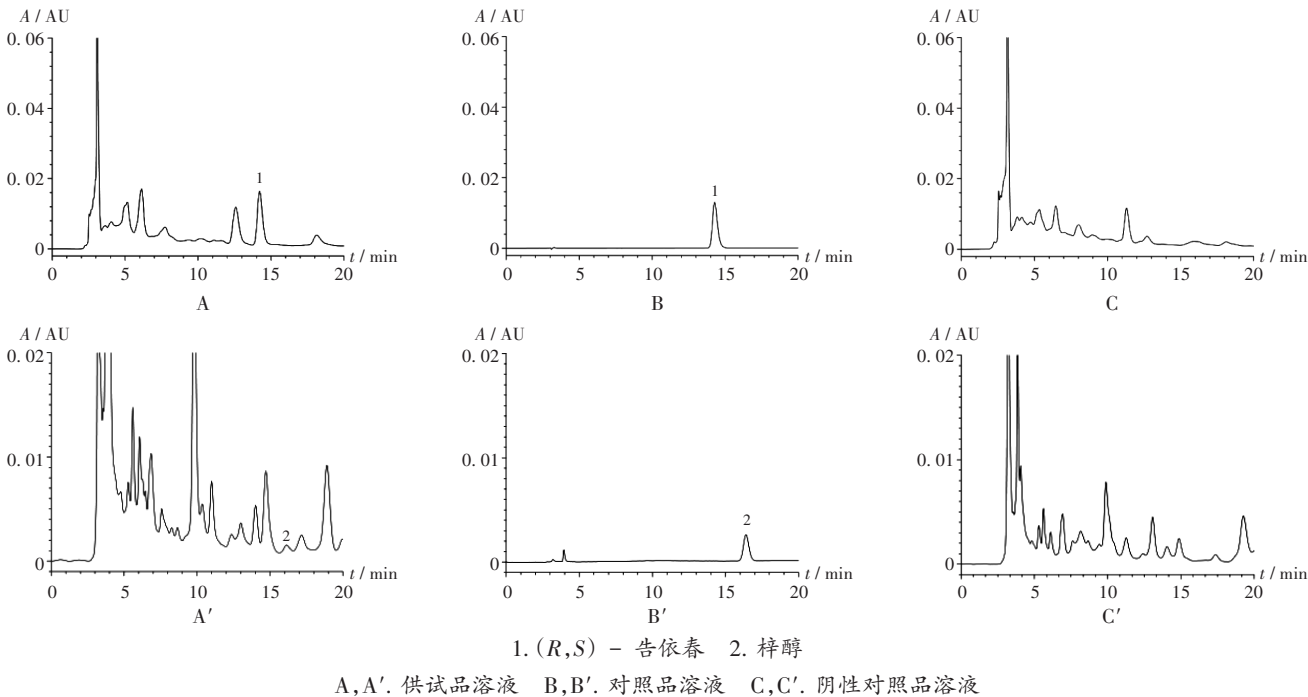


图 2 高效液相色谱图

1. (R,S) -Epigotrin 2. Catalpol

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

Fig. 2 HPLC chromatograms

1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:分别精密吸取2.3.2项下(R,S)-告依春和梓醇对照品溶液各适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果(R,S)-告依春和梓醇的RSD分别为0.16%和0.41%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取2.3.2项下(R,S)-告依春和梓醇供试品溶液各适量,分别于室温下0,2,4,6,8,12,24 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果(R,S)-告依春和梓醇的RSD分别为0.62%和1.40%($n=7$),表明(R,S)-告依春和梓醇供试品溶液室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品适量,按2.3.2项下方法分别制备(R,S)-告依春和梓醇供试品溶液,平行6份,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果(R,S)-告依春和梓醇的平均含量分别为49.30, 52.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD分别为0.73%和1.68%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密吸取已知含量的样品0.5 mL,置10 mL容量瓶中,平行9份,分别加入80%,100%,120%(R,S)-告依春对照品,按2.3.2项下方法制备加样供试品溶液;精密吸取已知含量的样品0.5 mL,平行6份,加入100%梓醇对照品,按2.3.2项下方法制备加样供试品溶液。取上述加样供试品溶液各适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果(R,S)-告依春、梓醇的平均回收率分别为100.65%和97.93%,RSD分别为0.78%($n=9$)和0.73%($n=6$),表明方法准确度良好。

2.3.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为20211105,20211107,20211110)各适量,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,平行2份,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算样品中(R,S)-告依春和梓醇的含量。结果见表2。

表2 3批样品中(R,S)-告依春和梓醇含量测定结果($\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=2$)

Tab.2 Results of the content determination of (R,S)-epigallocatechin and catalpol in three batches of samples ($\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=2$)

批号	(R,S)-告依春			梓醇		
	1	2	$\bar{X}$	1	2	$\bar{X}$
20211105	47.95	47.98	47.96	54.34	54.93	54.64
20211107	47.21	47.59	47.40	54.20	54.75	54.48
20211110	49.49	48.99	49.24	52.32	53.36	52.84

3 讨论

3.1 TLC鉴别

板蓝根TLC鉴别中,考察以甲醇、乙醇、稀乙醇为

提取溶剂进行超声提取的效果,展开剂选用正丁醇-冰醋酸-水(19:5:5,V/V/V)和(2:1:1,V/V/V)。结果显示,提取溶剂为稀乙醇时的提取率最高;以正丁醇-冰醋酸-水(19:5:5,V/V/V)为展开剂,斑点清晰,且阴性对照无干扰。故确定2.1项下板蓝根TLC鉴别条件。

生地黄TLC鉴别中,最初以甲苯-乙酸乙酯(1:1,V/V)为展开剂^[1],斑点模糊,且阴性对照有干扰。经多次试验,最终确定以乙酸乙酯提取、纯化成分,在石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(1:3:3:1,V/V/V/V)中展开,斑点清晰,分离度高,且阴性对照无干扰。故确定2.1项下生地黄TLC鉴别条件。

曾对样品中芦根进行TLC鉴别,因制剂含糖成分较多,用三氯甲烷提取时的乳化现象严重,高速离心或加热条件下会破乳。参考文献[11-12],分离效果差,阴性对照有干扰。调整展开剂比例、更换提取溶剂,仍达不到理想效果,故本研究中未将芦根纳入质量控制体系。

3.2 化学鉴别

石膏主要成分为含水硫酸钙($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),其中的金属离子可能为其抗病毒的有效成分^[2]。对石膏进行钙盐及硫酸盐化学鉴别,其内在质量基本可控制。

3.3 含量测定

(R,S)-告依春在板蓝根中的含量高,水溶性强^[5]。提取溶剂曾考察水、甲醇、70%甲醇溶液及流动相。结果显示,以甲醇提取,甲醇-0.02%磷酸溶液(9:91,V/V)进行洗脱,操作简便,待测成分峰形良好,基线分离,且阴性对照无干扰。

梓醇属环烯醚萜苷类化合物,极性强,在紫外区为末端吸收,吸收值低,干扰大^[13-14]。但梓醇HPLC图中峰形不佳,相邻峰分离度低,易对试验结果准确性造成影响^[15-16]。参照2020年版《中国药典(一部)》^[1]中生地黄药材梓醇含量测定方法,流动相为高水相,普通 C_{18} 柱无法耐受高水相,柱效不稳,故要选用能与水溶液兼容的色谱柱。预试验结果显示,梓醇在205 nm波长处有较强吸收且干扰小,故以205 nm作为检测波长。用乙腈-0.05%磷酸溶液(0.5:99.5,V/V)进行洗脱,梓醇HPLC图中峰形良好,保留时间适中,可与其他成分达到基线分离。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确,可用于抗病毒合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:129-315.
- [2] 梅全喜. 现代中药药理与临床应用手册(第3版)[M]. 北京: 中国中医药出版社,2016:94-144.
- [3] 邓九零,陶玉龙,何玉琼,等. 板蓝根抗流感病毒活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(8): 2029-2036.