

毒宁注射液在稀释 120 倍时进行内毒素定量检测,同时与热原检查法进行对比试验,结果见表 4。

表 4 热毒宁注射液细菌内毒素的检测结果

Table 4 Determination of endotoxin in Reduning Injection

样品批号	阴性对照 应时间/s	120 倍液反 应时间/s	变异系 数/%	实测内毒素/ (EU · mL ⁻¹)	原液/ (EU · mL ⁻¹)	热原检 测结果
080309	>3 600	3 184	4.19	0.012 8	1.536	合格
080501	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080502	>3 600	3 123	2.40	0.018 1	2.172	合格
080601	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080610	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080701	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080801	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080809	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080901	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080905	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
081005	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格

3 讨论

干扰试验结果表明热毒宁注射液用定量鲎试剂检测在稀释 1~30 倍出现干扰,以致无法检测,将样品稀释至 60 倍时,方可完全排除干扰因素影响,内毒素回收率在 50%~200%。根据表 3 可得热毒宁注射液的日常检验取 120 倍稀释液即可。

对 10 批热毒宁注射液中的内毒素定量检测表明,热毒宁注射液内毒素实际检测值均远远低于限值(8.75 EU/mL);表明热毒宁注射液在生产过程中未被污染,较为安全。

中药注射剂由于组分较复杂,干扰因素多,加之原药材和制备工艺的变化使干扰因素变化不定,在用本法测定内毒素时,应同时进行加样加收考察以排除可能因素对实验结果的干扰。

HPLC 法测定板蓝根和板蓝根颗粒中 RS-告伊春和腺苷

王钢力¹, 聂黎行¹, 迟玉明², 姚令文¹, 刘莹², 刘丽丽^{*}, 张晓兰², 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 北京同仁堂科技发展股份公司, 北京 100075)

摘要:目的 建立板蓝根颗粒及药材中腺苷和 RS-告伊春的测定方法。方法 RS-告依春的测定采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-三乙胺(10:90:0.2, 用冰醋酸调 pH 值 5.2); 柱温: 室温; 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 245 nm; 腺苷的测定采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(5:95); 柱温: 室温; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 260 nm。结果 RS-告依春的线性范围为 0.676~13.1 μg/mL; 板蓝根颗粒和药材的平均回收率分别为 101.66%、99.74%, RSD 分别为 0.9%、1.4% (n=6); 腺苷的线性范围分别 0.005~0.05 mg/mL, 板蓝根颗粒和药材的平均回收率分别为 97.76%、97.32%, RSD 分别为 1.62%、0.62% (n=6)。结论 所建立的方法准确、可靠, 可用于板蓝根颗粒及药材的质量控制。

关键词: 板蓝根; 板蓝根颗粒; RS-告依春; 腺苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)10-1587-03

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 含有生物碱类、核苷类、氨基酸类及有机酸类成分, 具有清热解毒、凉血利咽之功效, 主要用于瘟毒发斑、舌绛紫暗、大头瘟疫、疔腮、烂喉丹痧、丹毒、痈肿等症。《中国药典》2005 年版一部板蓝根项下仅有以精氨酸为对照的薄层色谱鉴别和性状鉴别项。现有的板蓝根制剂包括颗粒剂、茶剂、片剂、注射剂、糖浆剂等多种剂型, 其中板蓝根颗粒是《中国药典》2005 年版一部收载品种, 仅收载了理化鉴别和检查项。现代药理研究表明: 板蓝根中的腺苷具有抗炎作用, 还可用于冠心病诊断, 具有较高的

敏感性和特异性^[1]; RS-告依春具有明显的抗流感病毒作用^[2]。因此本实验建立了高效液相色谱法, 分别测定腺苷和专属性成分 RS-告依春, 为板蓝根制剂及其原料质量标准的修订与完善和制剂生产的过程控制提供了可供借鉴的检测手段和科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695-2487 HPLC 色谱系统, Empower 色谱工作站。

乙腈(Merck)为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。RS-告依春对照品、腺苷对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 板蓝根颗粒(含糖型

* 收稿日期: 2009-01-28

基金项目: 北京市科技计划项目(H30230130011)

作者简介: 王钢力(1969—), 女, 北京人, 研究员, 2001 年毕业于北京中医药大学, 获博士学位, 从事有关中药活性成分及质量控制的研究工作。Tel: (010) 67095424 E-mail: dunneer@163.com

* 桂林医学院 2004 级药理学本科实习生

和无糖型)由北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂提供;板蓝根药材均产于河北唐山,由北京同仁堂河北中药材科技开发有限公司提供,经中国药品生物制品检定所中药标本馆张继馆长鉴定,为十字花科植物菘蓝 *L. indigotica* Fort. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 RS-告依春的测定

2.1.1 色谱条件: Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-三乙胺(10:90:0.2, 用冰醋酸调 pH 值 5.2); 柱温: 室温; 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 245 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备: 精密称取 RS-告依春对照品 8.45 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取该溶液适量, 分别加甲醇制成 6.84、1.37 μg/mL 溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备: 取板蓝根颗粒, 研细, 精密称取 1 g 置 50 mL 量瓶中, 加入蒸馏水 40 mL, 充分震荡使溶解, 再用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

取板蓝根药材, 粉碎, 过 3 号筛, 精密称取 1 g 置锥形瓶中, 精密加入蒸馏水 100 mL, 精密称定质量, 回流提取 1 h, 放冷, 用蒸馏水补足减少的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 线性关系考察: 精密量取 RS-告依春对照品储备液, 逐级稀释得到质量浓度分别为 13.1、6.76、2.7、1.31、0.676 μg/mL 的溶液, 摇匀, 按上述色谱条件分别进样 10 μL, 测定峰面积。以质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。结果表明 RS-告依春在 0.676 ~ 13.1 μg/mL 与峰面积的线性关系良好, 回归方程为 $Y = 71351.177.09X + 920$, $r = 0.9999$ 。

2.1.5 精密度试验: 取板蓝根颗粒(批号 7112630)和药材(5[#])供试品溶液各 1 份, 按上述色谱条件, 分别重复测定 6 次 RS-告依春峰面积值, 计算得其 RSD 分别为 0.9%、0.1%。

2.1.6 重现性试验: 取板蓝根颗粒(批号 7112630)和药材(5[#]), 平行制备 6 份供试品溶液, 分别测定, 计算 RS-告依春的质量分数, 其 RSD 分别为 0.6%、0.2%。

2.1.7 稳定性试验: 取板蓝根颗粒(批号 7112630)和药材(5[#])供试品溶液, 分别于 0、1、3、6、9、12 h 进样 10 μL, 测定 RS-告依春峰面积值, 计算得其 RSD 分别为 1.5%、0.1%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.8 回收率试验: 精密称取批号 7112630 板蓝根颗粒 6 份, 每份 0.5 g, 分别精密加入 1 mL 1.24

mg/mL RS-告依春对照品溶液, 制备供试品溶液, 并按色谱条件进行测定, 计算得表告依春的平均回收率为 101.66%, RSD 为 0.9%。取 5[#] 板蓝根药材, 精密称定 6 份, 每份 0.5 g, 分别精密加入 3 mL 1.24 mg/mL RS-告依春对照品溶液, 制备供试品溶液, 并按色谱条件进行测定, 计算得 RS-告依春的平均回收率为 99.74%, RSD 为 1.3%。

2.1.9 样品测定: 按上述方法, 分别测定板蓝根颗粒和药材中 RS-告依春的质量分数, 采用外标法计算, 结果见表 1, 色谱图见图 1。

表 1 板蓝根颗粒和板蓝根药材中 RS-告依春和腺苷的测定结果(n=2)

Table 1 Determination of RS-goitrin and adenosine in Banlangen Granula and Radix Isatidis (n=2)

规格	批号/编号	RS-告依春/ (mg · g ⁻¹)	腺苷/ (mg · g ⁻¹)			
颗粒	含糖型	7112606	0.267	0.559		
		7112607	0.225	0.508		
		7112609	0.223	0.506		
		7112611	0.232	0.466		
		7112630	0.339	0.484		
		7111807	0.327	0.298		
	无糖型	7111809	0.297	0.252		
		7111811	0.333	0.256		
		7111815	0.398	0.246		
		7112614	0.322	0.279		
		药材	2002 年	1	0.600	0.249
				2	0.368	0.197
			2003 年	3	0.766	0.113
				4	0.546	0.115
2006 年	5		0.470	0.237		
	6		0.239	0.237		

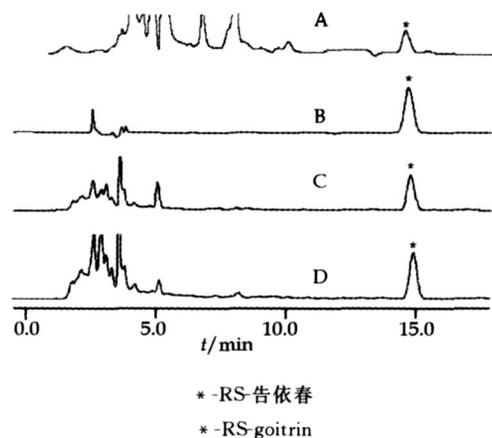


图 1 RS-告依春对照品(A)、板蓝根药材(B)、板蓝根颗粒(含糖型,批号 7112630)(C)和板蓝根颗粒(无糖型,批号 7111807)(D)的色谱图

Fig 1 Chromatograms of RS-goitrin reference substance (A), Radix Isatidis (B), Banlangen Granula (sugar, Batch 7112630) (C), and Banlangen Granula (sugar free, Batch 7111807) (D)

2.2 腺苷的测定

2.2.1 色谱条件^[3]: Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (5:95); 柱温: 室温; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 260 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取腺苷对照品 5 mg 于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取该溶液适量, 分别加甲醇制成 0.05、0.005 mg/mL 的溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备: 取板蓝根颗粒, 研细, 精密称取 1 g 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 40 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

取板蓝根药材, 粉碎, 过 3 号筛, 精密称取 1 g 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 40 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察: 精密量取腺苷对照品储备液, 逐级稀释得到质量浓度分别为 0.05、0.04、0.02、0.01、0.005 mg/mL 的溶液, 摇匀, 按上述色谱条件分别进样 10 μL, 测定峰面积值。以质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明腺苷在 0.005 ~ 0.05 mg/mL 与峰面积线性关系良好, 其回归方程为 $Y = 28\ 564\ 656 X - 3\ 793$, $r = 0.999\ 9$ 。

2.2.5 精密度试验: 取板蓝根颗粒 (批号 7112607) 和药材 (5[#]) 供试品溶液各 1 份, 按上述色谱条件, 分别重复测定 6 次腺苷峰面积值, 计算得其 RSD 分别为 1.6%、1.8%。

2.2.6 重现性试验: 取板蓝根颗粒 (批号 7112630) 和药材 (5[#]), 平行制备 6 份供试品溶液, 测定, 计算腺苷的质量分数, 其 RSD 分别为 1.2%、1.4%。

2.2.7 稳定性试验: 取板蓝根颗粒 (批号 7112607) 和药材 (5[#]) 供试品溶液, 分别于 0、1、3、6、9、12 h 各进样 10 μL, 测定腺苷峰面积值, 计算得其 RSD 分别为 0.8%、1.7%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.8 回收率试验: 精密称取批号 7112630 板蓝根颗粒样品 6 份, 每份 0.5 g, 分别精密量取 2 mL 0.05 mg/mL 腺苷对照品溶液, 制备供试品溶液, 按色谱条件进行测定, 结果腺苷的平均回收率为 97.32%, RSD 为 1.6%。

取 5[#] 板蓝根药材, 精密称定 6 份, 每份 0.5 g, 分别精密量取 2 mL 0.05 mg/mL 腺苷对照品溶液, 制备供试品溶液, 按色谱条件进行测定, 结果腺苷的

回收率平均值为 97.76%, RSD 为 0.6%。

2.2.9 样品测定: 按上述方法, 分别测定板蓝根颗粒和药材中腺苷的质量分数, 采用外标法计算, 结果见表 1, 色谱图见图 2。

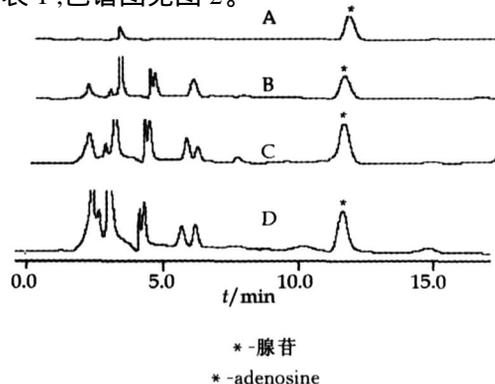


图 2 腺苷对照品 (A)、板蓝根颗粒 (含糖型, 批号 7112630) (B)、板蓝根颗粒 (无糖型, 批号 7111807) (C) 和板蓝根药材 (D) 的色谱图

Fig 2 Chromatographs of adenosine reference substance (A), Banlangen Granula (sugar, Batch 7112630) (B), Banlangen Granula (sugar free, Batch 7111807) (C), and Radix Isatidis (D)

由表 1 可知, RS-告依春在含糖型颗粒中的质量分数在 0.2 mg/g 左右, 在无糖型颗粒中的则在 0.3 mg/g 左右, 腺苷在含糖型颗粒中的质量分数约为 0.2 mg/g, 在无糖型颗粒中的则约为 0.5 mg/g。

3 讨论

提取溶剂考察: 分别以水、50% 甲醇、甲醇为溶剂, 对同一板蓝根药材进行提取, 测定供试品提取液中 RS-告依春的峰面积值, 计算其质量分数。结果以水作为提取溶剂时, 测定 RS-告依春的质量分数最高, 故确定以水作为提取溶剂。以水、50% 甲醇、甲醇为溶剂, 对同一板蓝根药材进行提取, 结果显示, 以甲醇作为溶剂, 图谱中没有其他组分的干扰, 腺苷峰的分度良好, 故确定以甲醇作为提取溶剂。

提取时间选择: 取板蓝根药材粉末, 分别回流提取 2 次, 每次 0.5、1、1.5 h 和提取 1 次, 每次 1、2 h。结果提取时间为 1.5 h 时, RS-告依春的质量分数最高, 故确定提取时间为 1.5 h。取板蓝根药材粉末, 分别超声提取 15、30、45、60 min, 结果显示: 甲醇超声 30 min, 腺苷的质量分数最高, 故确定提取时间为 30 min。

参考文献:

- [1] 徐丽华, 曹芳, 陈婷, 等. 板蓝根中的抗病毒活性成分[J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 1095.
- [2] 黄芳, 熊雅婷, 徐丽华, 等. 板蓝根不同提取物中抗病毒成分表告依春在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(6): 519.
- [3] 许润春, 杨明, 苏艳桃, 等. HPLC 测定板蓝根中腺苷含量[J]. 中成药, 2005, 27(6): 742.