

由样品的制备方法分析, 该物质应该也是季铵碱。查看该色谱峰的紫外吸收图谱发现其吸收光谱与水苏碱很相似, 具体为何物质有待进一步研究。在对抗宫炎片进行测定时发现, 水苏碱前面色谱峰的峰面积远大于水苏碱的峰面积, 而测定结果也显示, 比色法所得结果约为 HPLC 法所得结果的 10 倍。该结果验证了上述推断。

《卫生部药品标准》中药成方制剂第 13 册采用沉淀重量法对益母草片中的水苏碱进行控制, 应用该方法进行测定时样品定量符合要求, 但比色法或 HPLC 法测定结果较该方法低。将沉淀重量法中所得沉淀溶于丙酮发现很多不溶物, 可见, 沉淀不全是生物碱的雷氏盐沉淀, 其准确性值得进一步探讨。

References

- [1] Ruan Y L, Du J R, Zeng Q Z, *et al.* Advance in studies on chemical components, pharmacological effect and clinical application of *Leonurus japonicus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (11): S15-19.
- [2] Lu R G. Detemination of alkaloids in Yinucuo granule by UV spectrophotometry [J]. *Acta Pham Sin* (药学报), 1986, 21 (9): 522-524.
- [3] Zhang L, Shi Y Z, Yu Z Y, *et al.* Detemination of stachydrine hydrochloride in Yinucuo oral solution by TCLS [J]. *J China Pham Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27 (1): 16.
- [4] Jiang S Y. HPLC Analysis of stachydrine in *Leonurus japonicus* [J]. *Chin J Pham Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (4): 243-247.
- [5] Qin Y P, Mao X R, Liang M Z, *et al.* Detemination of stachydrine in Chanfu An oral solution by RP-HPLC [J]. *West China Pham Sci* (华西药科学杂志), 2003, 18 (4): 288-290.

板蓝根颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

柏 健¹, 王跃生¹, 张继华¹, 段 启², 王少军¹, 杨世林^{1*}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 性寒、味苦, 具有清热解毒、凉血利咽的功效。板蓝根颗粒在《中国药典》2005 版上以靛玉红为鉴定标准。但事实上现有的水煮醇沉的制剂工艺对脂溶性成分靛玉红的提取率极低。药理实验证明, 靛蓝、靛玉红并非其清热解毒的药效成分, 故选靛玉红作为板蓝根及其制剂的质控指标已不适合。为了从整体上控制板蓝根颗粒的质量, 同时进一步来控制原料质量及生产工艺的稳定性, 本实验采用高效液相色谱法建立了板蓝根颗粒的 HPLC 指纹图谱分析方法, 为进一步全面控制板蓝根颗粒的质量提供了依据。

1 实验材料

岛津 LC—VP 系列高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD—M 10A vp (PDA) 检测器 LC—10A Tvp 串联双柱塞泵, SIL—10A dvp 自动进样器, Class—VP 工作站; BS2000S 电子天平 (赛多利斯); KQ—250 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇 (色谱级), Millipore 超纯水, 磷酸 (分析纯)。板蓝根颗粒由江西汇仁制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱 (250 mm ×

4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A)—0.4% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序: 0~30 min, 100% B, 30~50 min, A:B (30/70), 50~70 min, A:B (35/65), 70~80 min, A:B (60/40), 80 min 以后, A:B (80/20); 体积流量: 0.7 mL/min; 检测波长: 219 nm; 柱温: 25℃; 进样体积: 5 μL。

2.2 供试品溶液的制备: 取本品研碎, 过六号筛, 称取粉末约 5.0 g, 精密称定, 精密量取 80 mL 氯仿, 水浴中索氏提取 3 h, 取氯仿提取液, 70℃ 挥干, 残渣加甲醇溶解于 2 mL 量瓶中, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验: 取同一份板蓝根颗粒供试品溶液, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.2%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD < 1.5%, 表明仪器系统精密度良好。

2.3.2 重现性试验: 取同一批板蓝根颗粒 (批号 0305120), 按供试品的制备方法制备 6 份, 按上述色谱条件依次检测, 结果显示, 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%, 主要共有峰面积的 RSD < 3%。

2.3.3 稳定性试验: 取同一份板蓝根颗粒供试品溶液, 按上述色谱条件, 分别在 0、1、2、4、8、16、24 h 检测, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 0.5%, 主要

共有峰面积 RSD < 3%, 结果表明板蓝根颗粒供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 板蓝根颗粒 HPLC 指纹图谱及技术参数: 共测定了 6 批板蓝根颗粒 (批号分别为 030510Q、030510I、030510J、030512Q、030512I、030512J), 获得 19 个色谱峰, 典型色谱图见图 1, 不同批次的板蓝根颗粒色谱叠加图见图 2。从图谱中可以看出 15 号峰较大, 分离度及峰形都很好, 因此选择 15 号峰为参考峰, 标记为 S。计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积, 各特征指纹峰的相对峰面积、相对保留时间均具有较好的重现性, 特征指纹峰的相对保留时间 RSD < 1%。

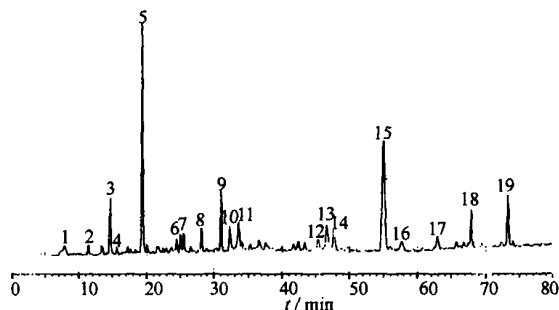


图 1 板蓝根颗粒 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC Fingerprint of Banlangen Granule

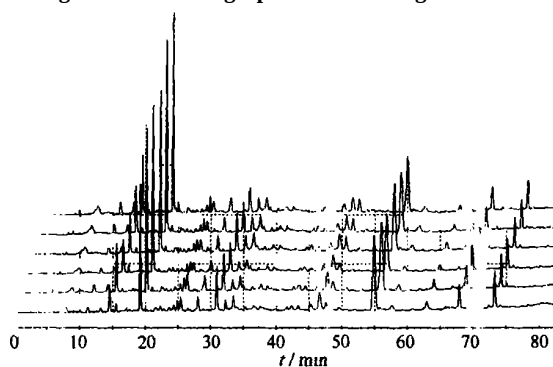


图 2 不同批次板蓝根颗粒 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC Fingerprint of Banlangen Granule in different batches

按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行)的要求, 初步得到板蓝根颗粒的指纹图谱的技术参数, 见表 1。

3 结论与讨论

本实验提取溶剂分别考察了甲醇、醋酸乙酯、乙醚与氯仿, 结果发现甲醇提取液成分太杂, 氯仿提取的效果最好; 提取方法分别考察了超声处理、索氏提取、回流提取、温浸 4 种方法, 结果以索氏提取的结

表 1 指纹图谱技术参数

Table 1 Parameters of fingerprint

共有峰号	相对保留时间	相对峰面积	共有峰号	相对保留时间	相对峰面积
1	0.204		11	0.610	
2	0.241		12	0.824	
3	0.265		13	0.850	
4	0.282		14	0.867	
5	0.350	0.762~1.144	15(S)	1.000	1.000
6	0.444		16	1.049	
7	0.455		17	1.146	
8	0.511		18	1.235	
9	0.563		19	1.333	
10	0.588				

果稳定、重现性好; 氯仿提取液挥干温度对成分也有较大的影响, 本实验分别考察了在 50、60、70、90 水浴温度下挥干对图谱的影响, 发现在 50、60、70 下挥干所测的图谱之间无显著性差异, 但较之 90 的, 则差异较大, 故选择控制水浴温度 70 挥干。

采用 DAD 紫外检测仪扫描, 发现在 219 nm 波长下供试液各峰吸收强度较大, 相对丰度合适, 故选用 219 nm 为指纹图谱的测定波长。分别考察了甲醇-水、甲醇-0.4% 磷酸、甲醇-0.07% 醋酸、乙腈-水、乙腈-0.4% 磷酸和乙腈-0.07% 醋酸系统, 结果发现在等度条件下, 均不能在合适流动相比例下, 达到良好的分离, 故而确定采用梯度洗脱的方式, 并在此基础上以甲醇-0.4% 磷酸为系统得到的图谱中色谱峰较多, 峰形更好, 故采用甲醇-0.4% 磷酸为流动相系统。考察体积流量时发现体积流量为 1.0 mL/min 时, 有部分峰始终分不开, 体积流量为 0.7 mL/min 时, 各峰均有较好的分离, 故采用体积流量 0.7 mL/min。

本实验考察了 6 批板蓝根颗粒, 建立了 HPLC 指纹图谱分析方法。用于判断板蓝根颗粒质量稳定性时, 一方面通过图谱的直观比较, 能够反映出各共有峰的有无及其大致比例, 从而判断其质量一致性的情况; 另一方面通过计算相对保留时间及相对峰面积, 判断是否符合所建立的指纹图谱的技术参数。

同时, 采用药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版 1.0 版对 6 批样品的数据进行处理, 得到相关系数分别为 0.975 1、0.962 5、0.957 7、0.942 9、0.983 5、0.970 8, 由此, 制定了板蓝根颗粒真伪鉴别及质量评价的标准, 即相关系数不低于 0.92, 特征指纹峰的相对保留时间 RSD 小于 2%, 并且符合上述指纹图谱的技术参数。