

对2015年版《中国药典》(一部)板蓝根【鉴别】(3)方法的改进[△]

郑国成^{1*},周永妍^{1,2#},张岩岩^{1,2},杨 琴¹,姜国志^{1,2},孙胜斌^{1,2},刘铁军^{1,2}(1.神威药业集团有限公司,石家庄 051430;2.河北省中药配方颗粒工程技术研究中心,石家庄 051430)

中图分类号 R921;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0657-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.16

摘要 目的:探讨2015年版《中国药典》(一部)(以下简称药典)中板蓝根【鉴别】(3)(*R,S*)-告依春薄层色谱(TLC)鉴别方法的合理性,并进行方法改进。方法:将3批板蓝根药材按药典板蓝根【炮制】方法制成饮片。首先按药典板蓝根【鉴别】(3)方法分别对板蓝根饮片和药材中(*R,S*)-告依春进行TLC鉴别(样品处理时以80%甲醇为溶剂,超声提取),考察药典方法的合理性。然后通过改变样品的提取溶剂及前处理方式(方法一:以水为溶剂,超声提取;方法二:先加水浸泡1 h,再加入甲醇超声提取;方法三:先将样品润湿,晾干后再以80%甲醇为溶剂,超声提取)进行方法改进,并对最优方法进行验证。最后按最优方法操作,分别采用不同厂家来源的色谱板,以及在低温低湿(7℃,相对湿度48%)和高温高湿(35℃,相对湿度75%)条件下进行(*R,S*)-告依春的TLC鉴别,考察方法的耐用性。结果:按药典方法进行检测,在饮片色谱中,与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,但在药材色谱中无相应斑点出现。按3种改进方法对样品进行处理后,在药材色谱中,与对照品色谱相应位置上均显相同颜色的斑点;但按方法一处理后色谱斑点单一,按方法二、三处理后色谱斑点均较多,且方法二较方法三耗时更短。验证试验结果和方法耐用性试验结果均显示,按方法二对板蓝根药材和饮片进行处理后,在饮片和药材色谱中,在与对照品色谱相应的位置上均显相同颜色的斑点。结论:改进后的TLC鉴别方法效果良好,色谱斑点清晰、重复性好。

关键词 2015年版《中国药典》(一部);板蓝根;(*R,S*)-告依春;薄层色谱鉴别;方法改进

Improvement of Identification Method (3) of *Isatis indigotica* from 2015 Edition of Chinese Pharmacopeia (Part I)

ZHENG Guocheng¹, ZHOU Yongyan^{1,2}, ZHANG Yanyan^{1,2}, YANG Qin¹, JIANG Guozhi^{1,2}, SUN Shengbin^{1,2}, LIU Tiejun^{1,2} (1.Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China; 2.Hebei TCM Formula Granule Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang 051430, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the rationality of TLC identification method (3) of (*R,S*)-epigoitrin in *Isatis indigotica* stated in 2015 edition of Chinese Pharmacopeia (part I) (later abbreviated as pharmacopeia), and make some improvements. METHODS: Three batches *I. indigotica* were collected and prepared into decoction pieces according to the processing method of *I. indigotica* in pharmacopoeia. TLC identification of (*R,S*)-goitrin in *I. indigotica* decoction piece and medicinal material were conducted according to identification method (3) in pharmacopeia (80% ethanol as solvent for sample treatment, ultrasound extraction); the rationality of pharmacopoeia method was investigated. Then the method was improved by changing the extraction solvent and pretreatment method (method one: using water as solvent, ultrasound extraction; method two: soaking in water for 1 h, then adding into methanol, ultrasound extraction; method three: the sample was wetted and then dried, using 80% methanol as solvent, ultrasound extraction) of samples, and the optimal method was verified. According to the optimal method, the TLC identification of (*R,S*)-goitrin was detected by using chromatographic plates from different manufacturers, under the conditions of low temperature and low humidity (7℃, relative humidity 48%) and high temperature and high humidity (35℃, relative humidity 75%) respectively, to investigate the durability of the method. RESULTS: According to the method of pharmacopeia, in the chromatograms of decoction pieces, the same color spots appeared at the corresponding chromatographic positions of reference substance, but no corresponding spots appeared in the medicinal material chromatograms. After the samples were treated by three improvement methods, in medicinal material chromatograms, the same color spots appeared in the corresponding chromatographic positions of reference substances. There were single chromatographic spot after medicinal materials were treated with method one, and there were more spots after medicinal materials were treated with method two and three, and method two consumed less time than method three. The results of validation tests and method durability tests showed that after the treatment of *I. indigotica* and its decoction pieces according to method two, the same color spots appeared in the corresponding positions of the decoction pieces and the medicinal materials chromatograms as those of the control. CONCLUSIONS: The improved TLC identification method is effective, the chromatographic spots are clear, and the repeatability is good.

KEYWORDS 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia (part I); *Isatis indigotica*; (*R,S*)-goitrin; TLC identification; Method improvement

[△]基金项目:河北省科技计划项目(No.17272505D)
*工程师。研究方向:药材种植、制剂生产工艺、质量标准研究及产业化。电话:0311-88030066-8260。E-mail:sjzswzheng@163.com
#通信作者:主管药师,硕士。研究方向:质量标准研究及产业化。电话:0311-88030066-6530。E-mail:zhouyongyan33004@163.com

板蓝根为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥根,具有清热解毒、凉血利咽的功效,临床上可用于上呼吸道感染、扁桃腺感染和流行性乙型肝炎以及肺炎等的治疗,是常用的中药材,全国各地均产^[1-6]。自1985年版《中国药典》(一部)开始收录板蓝根后^[7],至今为止其在各版药典中均有收录,且质量标准不断完善和提高。

(*R,S*)-告依春又名表告依春,是板蓝根中主要生物碱,具有较强的抗病毒活性,而且含量稳定,常作为板蓝根药材及相关制剂的含量控制指标^[8-12]。在2010年版《中国药典》(一部)板蓝根项下新增了【鉴别】(3)(*R,S*)-告依春的薄层色谱(TLC)鉴别^[13],并继续收载于2015年版《中国药典》(一部)(以下简称药典)中^[1]。但笔者在实际操作中发现,按药典板蓝根【鉴别】(3)方法鉴别时,板蓝根药材中(*R,S*)-告依春鉴别结果不呈阳性,并有相关文献佐证^[14-15]。故本研究通过探讨供试品处理方法,确定影响因素,改进板蓝根药材(*R,S*)-告依春的TLC鉴别方法,以期为新版药典中板蓝根药材(*R,S*)-告依春的TLC鉴别方法的修订提供参考。

1 材料

1.1 仪器

CPA225D型电子分析天平(德国赛多利斯集团);KH3200E型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);RHP-200型高速多功能粉碎机(永康市荣浩工贸有限公司);HH-2型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);REPROSTAR 3型薄层色谱数码相机成像系统(瑞士Camag公司)。

1.2 药品与试剂

3批板蓝根药材均采自甘肃民乐(批号:分别为1704012、1704013、1704014),经原河北省药品检验研究院孙宝惠主任中药师鉴定均为正品;(*R,S*)-告依春对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111753-201706,纯度:100.0%);试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 其他

药典检验筛(浙江上虞市华丰五金仪器有限公司);硅胶GF254板分别购自德国默克公司(批号:HC4317-0054)、青岛海洋化工有限公司(批号:015010)和烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂(批号:20101007)。

2 方法与结果

2.1 板蓝根饮片的制备

将上述3批板蓝根药材按照药典板蓝根饮片【炮制】项下方法——“除去杂质,洗净,润透,切厚片,干燥。”分别制备成相应3批药材饮片(批号:分别为1706181、1706182、1706183)。

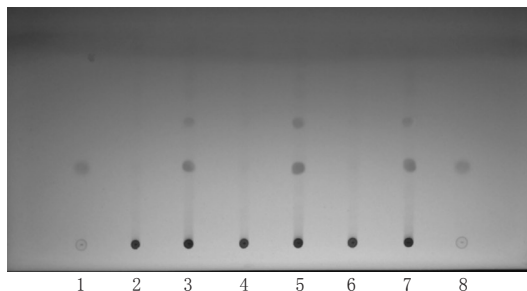
2.2 (*R,S*)-告依春TLC鉴别的药典方法

2.2.1 供试品溶液的制备 取板蓝根药材和饮片粉末

各1 g,分别加入80%甲醇20 mL,超声(频率:30 kHz、功率:250 W,下同)处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取(*R,S*)-告依春对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg(*R,S*)-告依春对照品的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 TLC鉴别条件及结果 吸取“2.2.1”“2.2.2”项下3种溶液各5~10 μ L,分别点样于同一硅胶GF254薄层板上(德国默克板),以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(1:1, *V/V*)为展开剂,展开,取出,晾干。置于紫外光灯(波长254 nm)下检视,TLC图见图1。



注:1,8.(*R,S*)-告依春对照品;2,4,6.药材(批号依次为1704012、1704013、1704014);3,5,7.饮片(批号依次为1706181、1706182、1706183)

Note:1,8. (*R,S*)-goitrin reference substance; 2, 4, 6. medicinal materials (batches of 1704012, 1704013, 1704014 in turn); 3, 5, 7. decoction pieces (batches of 1706181, 1706182, 1706183 in turn)

图1 药典方法的TLC图

Fig 1 TLC chromatograms of pharmacopoeia method

由图1可见,按照药典方法检验,在3批板蓝根饮片供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上均显相同颜色的斑点,结果呈阳性。但在3批板蓝根药材供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上均无相同颜色的斑点出现,结果不呈阳性。

2.3 对药典方法的改进

对“2.2”项下结果分析推断,板蓝根药材炮制过程可能对(*R,S*)-告依春鉴别结果产生影响,且(*R,S*)-告依春为水溶性成分。因此,本研究通过尝试改变板蓝根药材的提取溶剂及前处理方法,以期达到鉴别结果呈阳性的目的。

2.3.1 供试品溶液的制备 按改进方法一:取板蓝根药材(批号:1704012)粉末1 g,加水20 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液一。按改进方法二:取板蓝根药材(批号:1704012)粉末1 g,加水4 mL,浸泡1 h,再加甲醇16 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液二。按改进方法三:取板蓝根药材粉末(批号:1704012)适量,加少量水全部润湿,摊开,常温晾干(药材润湿和晾干后样品见图2),再取晾干后

粉末 1 g,加 80% 甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液三。

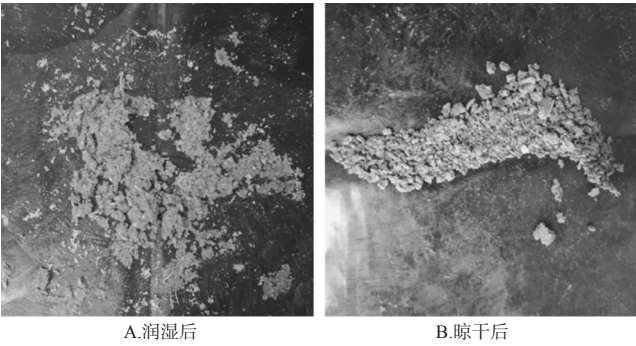
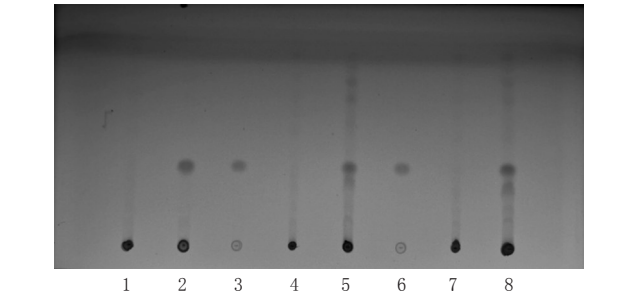


图 2 药材粉末润湿和晾干后的对比图
Fig 2 Comparison of medicinal material powder after wetting and drying

2.3.2 对照品溶液的制备 取 (R,S) -告依春对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备对照品溶液。

2.3.3 TLC 鉴别条件及结果 分别取对照品溶液、按药典方法制备的药材供试品溶液以及按 3 种改进方法制备的药材供试品溶液一、二、三,按“2.2.3”项下色谱条件及操作方法进行鉴别,TLC 图见图 3。



注:1、4、7.药典方法处理药材样品;3、6. (R,S) -告依春对照品;2.供试品溶液一;5.供试品溶液二;8.供试品溶液三
Note: 1, 4, 7. medicinal materials processed by pharmacopoeia method; 3, 6. (R,S) -goitrin reference substance; 2. test solution one; 5. test solution two; 8. test solution three

图 3 改进方法的 TLC 图
Fig 3 TLC chromatograms of improved method

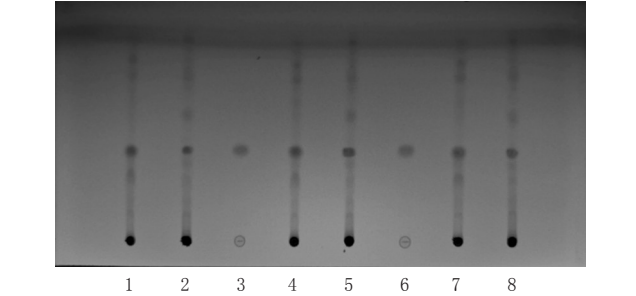
由图 3 可见,在按 3 种改进方法制备的药材供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,均显相同颜色的斑点,结果均呈阳性。供试品溶液一(点 2)用水提取所得的色谱图斑点单一,只有 (R,S) -告依春一个斑点,鉴别意义不大;且药材加水超声处理后,过滤蒸干,蒸干过程较慢,再用甲醇溶解过程较困难,且所得供试品溶液浑浊,需静置后取上清液点样。在供试品溶液二(点 5)及供试品溶液三(点 8)药材供试品色谱图中,斑点较多;但供试品溶液三药材润湿后再干燥,处理过程时间较长,而供试品溶液二样品处理方法较简便,且溶液澄清、易点样。因此,在以上 3 种改进方法中,优选改进方法二作为板蓝根中 (R,S) -告依春 TLC 鉴别的供试品前处理方法。

2.4 改进方法二的验证试验

2.4.1 供试品溶液的制备 分别取 3 批板蓝根药材粉末(批号:分别为 1704012、1704013、1704014)和饮片粉末(批号:分别为 1706181、1706182、1706183) 1 g,加水 4 mL,浸泡 1 h,再加甲醇 16 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。

2.4.2 对照品溶液的制备 取 (R,S) -告依春对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备对照品溶液。

2.4.3 TLC 鉴别条件及结果 分别取“2.4.1”项下供试品溶液和“2.4.2”项下对照品溶液各 5~10 μ L,按“2.2.3”项下色谱条件及操作方法进行 (R,S) -告依春的 TLC 鉴别,TLC 图见图 4。



注:1、4、7.药材(批号依次为 1704012、1704013、1704014);3、6. (R,S) -告依春对照品;2、5、8.饮片(批号依次为 1706181、1706182、1706183)
Note: 1, 4, 7. medicinal materials (batches of 1704012, 1704013, 1704014 in turn); 3, 6. (R,S) -goitrin reference substance; 2, 5, 8. decoction pieces (batches of 1706181, 1706182, 1706183 in turn)

图 4 验证试验的 TLC 图
Fig 4 TLC chromatograms of validation tests

由图 4 可见,按改进方法二进行检验,在 3 批药材及其对应 3 批饮片供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上均显相同颜色的斑点,结果均呈阳性。

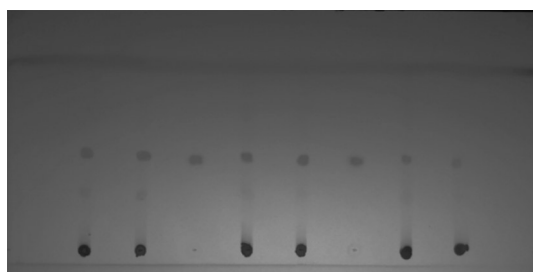
2.5 方法耐用性试验

按“2.4.1”项下方法制备对照品溶液和板蓝根药材和饮片的供试品溶液,采用另外两种不同来源的色谱板(山东烟台板和青岛海洋板)在常温常湿(25 $^{\circ}$ C、相对湿度 48%)条件下,以及在低温低湿(7 $^{\circ}$ C,相对湿度 30%)和高温高湿(35 $^{\circ}$ C,相对湿度 75%)条件下(此时均用默克板)分别按“2.2.3”项下色谱条件及操作方法进行 (R,S) -告依春的 TLC 鉴别,考察方法耐用性,TLC 图见图 5。

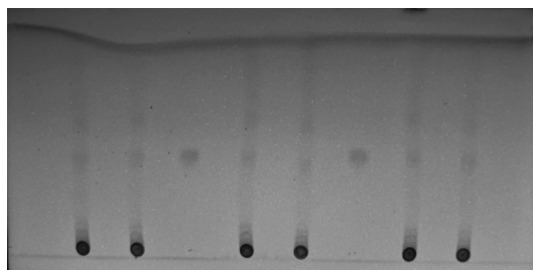
由图 5 可见,采用不同来源色谱板以及在不同温度和湿度条件下,在药材和饮片供试品图谱中,在与对照品色谱相应位置上均显相同颜色的斑点,结果均呈阳性。

3 讨论

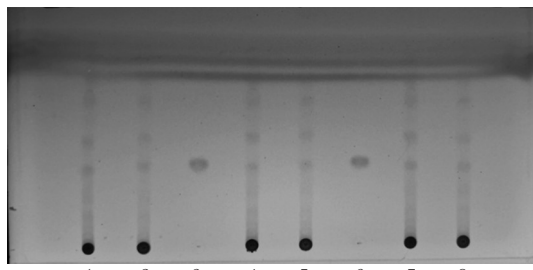
本研究结果显示,按照药典方法进行检验,3 批板蓝根药材检验结果均不呈阳性,但对应的 3 批饮片结果均呈阳性。据文献报道, (R,S) -告依春是一种水溶性成分^[16],而且药典板蓝根项下 (R,S) -告依春含量测定的供试品溶液也为加水煎煮制得^[1]。分析原因,笔者猜测可



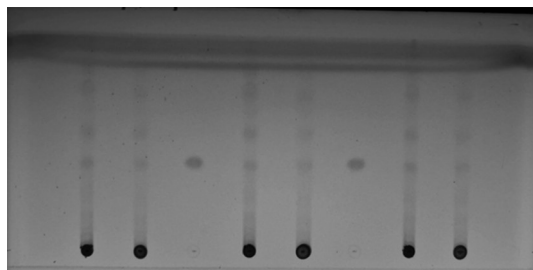
A.山东烟台板(常温常湿)



B.青岛海洋板手铺板(常温常湿)



C.低温低湿(默克板)



D.高温高湿(默克板)

注:1、4、7.药材(批号依次为1704012、1704013、1704014);3、6.(*R,S*)-告依春对照品;2、5、8.饮片(批号依次为1706181、1706182、1706183)

Note: 1, 4, 7. medicinal materials (batches of 1704012, 1704013, 1704014 in turn); 3, 6. (*R,S*)-goitrin reference substance; 2, 5, 8. decoction pieces (batches of 1706181, 1706182, 1706183 in turn)

图5 耐用性试验的TLC图

Fig 5 TLC chromatograms of durability tests

能是因为饮片经过了“洗净,润透,切厚片,干燥”的炮制过程,在饮片炮制的润透过程中(*R,S*)-告依春溶解于水中,在干燥过程中随水分往饮片表面迁移,水分干燥后, (*R,S*)-告依春附着于饮片表面,故而在TLC鉴别供试品处理时可更好地溶解于80%甲醇中,因此饮片鉴别呈阳性;而药材并未进行上述处理,故在鉴别时不呈阳性。

为验证上述推论是否合理,笔者尝试了3种不同的

供试品处理改进方法,改进方法一直接将提取溶剂改为水;改进方法二、三则均先用水将(*R,S*)-告依春浸出,然后再用相应醇溶液提取。结果显示,按上述3种改进方法进行样品处理后检验,板蓝根药材和饮片的鉴别结果均呈阳性。因此,可验证上述推论正确。通过综合比对在3种改进方法中样品的处理及点样的难易程度,优选改进方法二作为板蓝根中(*R,S*)-告依春TLC鉴别的供试品处理方法。

上述研究结果表明,方法改进后所得板蓝根药材和饮片色谱结果均呈阳性,且经过耐用性考察能适应不同厂家生产的预制薄层板及手铺板,较药典收载方法更可取。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:205-206.
- [2] 马俊梅.板蓝根的现代药理及临床新用分析[J].中国卫生标准管理,2016,5(6):65-66.
- [3] 刁燕春.浅析板蓝根在临床诊疗中的应用效果[J].中医临床研究,2014,6(31):21-22.
- [4] 潘以琳,陈翰,李进,等.板蓝根药效活性部位化学成分的研究[J].中成药,2014,36(4):780-785.
- [5] 何立巍,董伟,杨婧妍,等.板蓝根抗病毒有效部位的化学成分及其活性研究[J].中草药,2013,44(21):2960-2964.
- [6] 杨建昕,李峰,李娜,等.板蓝根抗病毒活性成分研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(7):141-143.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 1985年版.北京:中国医药科技出版社,1985:169.
- [8] 何立巍,吴晓培,杨婧妍,等.板蓝根总生物碱的提取纯化工艺及其抗病毒药理作用研究[J].中成药,2014,36(12):2611-2614.
- [9] 王璐,戴敬,牛小莲. HPLC法测定清开灵软胶囊中(*R,S*)-告依春的含量[J].中国药房,2013,24(28):2764-2765.
- [10] 张文懿,李居安,杨天寿,等.不同采收期板蓝根的质量考察[J].中国药房,2009,20(27):2145-2147.
- [11] 冯家龙. HPLC法测定小儿清热止咳口服液中(*R,S*)-告依春的含量[J].中国药房,2013,24(40):3825-3827.
- [12] 王亚琦,葛秀允.板蓝根饮片产地加工炮制技术研究[J].中国药房,2018,29(5):656-658.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:191.
- [14] 莫迎.不同的提取方法对板蓝根中(*R,S*)-告依春的影响[J].中医药导报,2011,17(6):89-91.
- [15] 潘遐,刘效瑞,王兴政,等.板蓝根新品系品质考察及板蓝根质量标准改进[J].现代中药研究与实践,2015,29(3):66-69.
- [16] 徐丽华,黄芳,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):359-360.

(收稿日期:2018-11-29 修回日期:2019-01-06)

(编辑:林 静)