



# 中药生产过程质量生物评控方法研究 ——以板蓝根颗粒为例

谭曼容<sup>1,2</sup>, 鄢丹<sup>1\*</sup>, 邱玲玲<sup>1</sup>, 陈龙虎<sup>1</sup>, 闫琰<sup>1</sup>, 金城<sup>1</sup>, 李寒冰<sup>3</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>

(1. 解放军第302医院中药研究所, 北京100039;

2. 江西中医学院, 江西南昌330004; 3. 河南中医学院, 河南郑州450008)

**[摘要]** 针对中药材-中间体-成品一体化质量管理体系中存在的方法学“短板效应”, 借鉴过程控制理念, 从中药生产实际出发, 建立符合中药特点的生产过程质量控制新策略、新方法。以疗效确切、临床应用广泛的板蓝根颗粒为示例, 采用性状鉴别、指标成分含量测定、化学指纹图谱和生物测定技术分别对板蓝根药材-中间体(水提醇沉)-成品进行质量评控, 以化学信息转移率和生物效价转移率为指标, 考察上述不同评控方法的效力性与传递性, 最终建立基于化学组分分析-生物测定关联分析的板蓝根颗粒生产过程质量控制方法, 有效地解决目前板蓝根颗粒生产厂家繁多、质量参差不齐的现状, 以确保与提升其临床疗效, 亦为中药生产过程质量控制的方法学构建提供了研究基础。

**[关键词]** 过程控制; 组分分析; 生物测定; 板蓝根颗粒

中药生产过程主要包括药材、中间品、成品3个层次的产品阶段, 不同阶段产品质量内涵的变异经1次或多次整合后构成了终产品的质量变异度, 其间包括物理、化学和生物等信息的传递或转变, 并最终影响产品效能的发挥, 即“产品是生产出来的, 质量是设计出来的”<sup>[1]</sup>。因此对产品物质内涵与生产过程质量评控就显得十分必要。然而, 现有的常规检查、化学组分分析因与药效、临床相关性不强, 难以全面评控中药生产过程质量控制<sup>[2]</sup>。生物测定因具有整体可控、药效相关等技术优势, 作为符合中医药特点的适用质量控制模式及方法, 渐已成为中药过程质量控制和评价的重要发展方向<sup>[3]</sup>。

板蓝根颗粒为板蓝根药材经水提醇沉后加辅料制成的颗粒剂<sup>[4]</sup>, 疗效确切、临床应用广泛, 但生产厂家众多、质量参差不齐, 缺乏有效的质量评控方法。除按药典标准加强板蓝根药材及颗粒质量关外, 引入抗流感病毒生物测定方法, 建立既能保证其质量“稳定可控”, 又能直接关切“安全有效”的质量评价方法, 从而实现对其过程质量的有效控制<sup>[5-10]</sup>。

本研究采用性状鉴别、指标成分含量测定、化学指纹图谱和生物测定技术分别对板蓝根药材-中间体(水提醇沉)-成品进行质量评控, 以化学信息转移率和生物效价转移率为指标, 考察上述不同评控方法的效力性与传递性, 最终建立基于化学组分分析-生物测定关联分析的板蓝根颗粒生产过程质量控制方法, 以期对中药生产过程质量控制的方法学研究提供技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

Alligent 1200 高效液相仪(安捷伦科技有限公司), 荧光酶标检测仪(美国 Bio-tek 公司)。

板蓝根药材为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根(经解放军302医院肖小河研究员鉴定), 中间体(水提醇沉)、板蓝根颗粒成品按《中国药典》2010年版标准经中试规模生产获得, (*R,S*)-告依春对照品纯度大于98%(中国食品药品检定研究院, 批号111753-201103)。

阳性对照药: 奥斯他韦酸(Oseltamivir acid, 0700980, Toronto Research Chemicals Lnc.), 奥司他韦酸为磷酸奥司他韦(达菲)的体内代谢活性化合物。流感病毒 H1N1 neuraminidase/NA (active) (11058-VNAHC, Sino Biological Inc.), 底物 MU-NANA (4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- $\alpha$ -*D*-neuraminic acid, Sigma 公司)。甘氨酸(北京索莱宝科技公

**[稿件编号]** 20111115006

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873385); 北京市自然科学基金项目(7112128)

**[通信作者]** \* 鄢丹, Tel: (010) 66933325, E-mail: yd277@126.com; \* 肖小河, E-mail: pharmacy302@126.com



司),2-(*N*-吗啡啉)-乙磺酸(MES)(Sigma公司),其余试剂为分析纯。

### 1.2 供试品溶液制备

**1.2.1 板蓝根药材** 称取用于生产板蓝根颗粒的同批板蓝根药材粗粉20g,加水10倍量,浸置30min,加热回流1h,放冷,称重,补足失重,滤过,滤液浓缩,加水40mL溶解,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

**1.2.2 中间体及板蓝根颗粒成品** 按《中国药典》2010年版标准经中试规模生产获得,称取与上述板蓝根药材制备项下相当量,加水40mL溶解,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

### 1.3 组分含量测定<sup>[4]</sup>

(*R,S*)-告依春为新版药典板蓝根项下收录的含量测定检测项,本研究将其纳入考察范围。色谱条件:Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.02%磷酸溶液(7:93),检测波长245 nm,流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温25 °C,进样量10 μL。

### 1.4 化学指纹图谱测定<sup>[11]</sup>

色谱条件:Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相A相为0.1%磷酸水溶液,B相

为乙腈,线性梯度洗脱0~10 min A~B(95:5),10~20 min A~B(90:10),20~55 min A~B(50:50),55~60 min A~B(50:50),60~65 min A~B(95:5),检测波长222 nm;流速1 mL · min<sup>-1</sup>;柱温25 °C,进样量10 μL。

### 1.5 抗流感病毒活性测定<sup>[12-17]</sup>

采取本课题组已建立的神氨酸酶(NA)活性检测法表达药物抗流感病毒作用强度。反应在96孔板荧光酶标板中进行,首先加入稀释的神氨酸酶25 μL和供试品溶液25 μL,室温下作用30 min后加底物MUNANA 50 μL,37 °C 孵育60 min后加入终止液MES(0.1 mol · L<sup>-1</sup>甘氨酸,以25%乙醇配制,10%氢氧化钠溶液调pH 10.7)200 μL终止反应。测定荧光强度,设置激发波360 nm,发射波长460 nm,检测温度37 °C。为便于活性比较,同时设样品测试组(NA+样品+MUNANA),背景对照组(样品+MUNANA,缓冲液补足至相同体积),空白荧光值(MUNANA,用缓冲液和样品溶剂补充至相同体积),酶活性对照组(NA+MUNANA,反应终止后再加入同体积样品溶液)。各组样品设复孔加样。

反应抑制率(IR)计算公式:

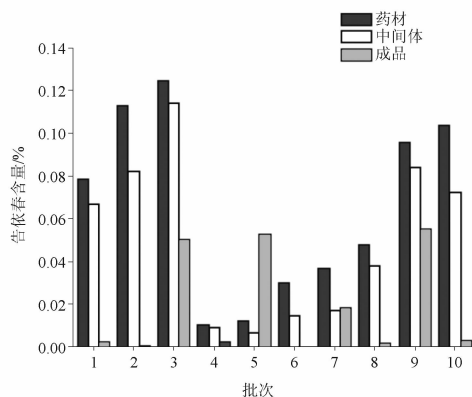
$$IR = \frac{(\text{酶活性对照荧光} - \text{底物空白荧光}) - (\text{样品作用后荧光} - \text{样品背景荧光})}{\text{酶活性对照荧光} - \text{底物空白荧光}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 含量测定

在上述检测条件下,(*R,S*)-告依春对照品线性范围为2.1~289.0 mg · L<sup>-1</sup>,10批次板蓝根药材、板蓝根中间体、板蓝根颗粒中(*R,S*)-告依春含量见图1。

经计算,不同批次(*R,S*)-告依春含量:板蓝根药材0.842~9.893 mg · L<sup>-1</sup>(RSD 3.3%),中间体0.462~11.635 mg · L<sup>-1</sup>(RSD 3.6%),成品0~25.850 mg · L<sup>-1</sup>(RSD 10.3%)。总体趋势是(*R,S*)-告依春含量随着工艺的推进而递减,但含量波动较大,未呈现明显的规律性;甚至部分批次中间体、成品中的(*R,S*)-告依春含量有增加的情况,这可能与(*R,S*)-告依春易发生构型变化而呈现不稳定性有关<sup>[18]</sup>。因此,以(*R,S*)-告依春作为表征板蓝根药材-中间体-成品质量内涵的评控指标值得商榷。



1. 河北(一等);2. 安徽(统货);3. 河北(统货);4. 甘肃(一等);5. 河北(统货);6. 北京(同仁堂药店);7. 河北(二等);8. 河南(统货);9. 河南(一等);10. 北京(养生堂药店)(图3,4同)。

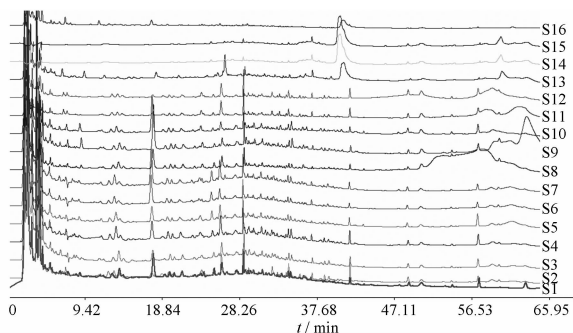
图1 板蓝根药材、中间体及颗粒中(*R,S*)-告依春含量传递比较

Fig. 1 The comparison of content transmigration of (*R,S*)-goitrin in Radix Isatidis, intermediates and Banlangen granules



## 2.2 化学指纹图谱相似度分析

采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004”软件,对不同批次板蓝根药材、中间体和成品的化学指纹图谱进行了相似度评价见图2。



S1 ~ S7. 板蓝根药材; S8 ~ S12. 板蓝根中间体; S13 ~ S16. 板蓝根颗粒。

图2 板蓝根药材、中间体及成品化学指纹图谱分析

Fig. 2 Chemical fingerprint analysis of Isatidis Radix, intermediates and Banlangen granules

从图2可知,板蓝根药材、中间体以及成品之间的相似度变化有一定的规律性。从药材到中间体再到成品不同阶段的峰总数递减,特别是保留时间在10~30 min的色谱峰衰减情况较为突出。进一步以相似度为指标,描绘不同生产阶段化学指纹图谱整体递变规律,见图3。

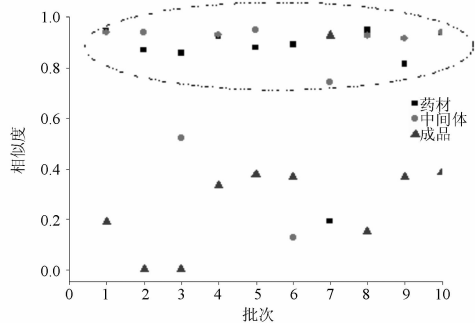


图3 不同批次板蓝根药材-中间体-成品化学指纹图谱相似度分布

Fig. 3 Similarity analysis of chemical fingerprint of different batches of Isatidis Radix, intermediates and Banlangen granules

相对成品来说,药材与中间体环节化学指纹图谱信息相似程度较大( $S > 0.7$ )且成品之间的相似度更为分散,说明本研究所建立的化学指纹图谱可

较好的表征不同生产阶段化学信息的传递性以及成品物质内涵的差异性;同时也提示板蓝根颗粒生产工艺中水提醇沉后的醇液回收、浓缩、干燥、加辅料成型环节对其质量内涵影响较大,应是生产过程中重点关注的环节。

## 2.3 抗流感病毒活性测定

以具有神经氨酸酶抑制作用的磷酸奥司他韦酸为对照,检测了板蓝根颗粒不同生产阶段的抗流感病毒活性<sup>[19-21]</sup>,见图4。

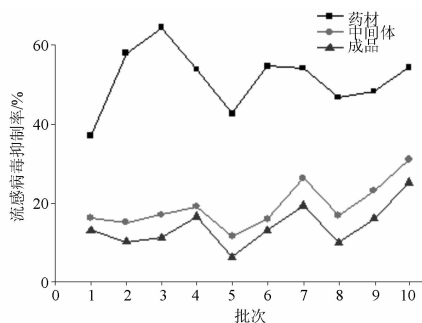


图4 不同批次板蓝根药材、中间体和颗粒抗流感病毒活性传递对比

Fig. 4 The comparison of anti-influenza virus activity transmigration of different batches of Isatidis Radix, intermediates and Banlangen granules

由图4可知,药材-中间体-成品的抗流感病毒活性逐次下降,特别是从药材到中间体这步进行了水提醇沉工艺对生物活性影响最大,而中间体与成品间较为接近且相对稳定。由此提示,可采用生物测定法对水提醇沉工序进行重点把关,并与化学指纹图谱分析互为补充,共同监控生产质量全过程。

## 2.4 药材-中间体-成品3阶段相关信息转移率分析

为全面了解板蓝根颗粒生产3阶段过程中化学表征信息、生物活性信息的传变规律,以药材环节的相关信息为参照(按100%计),横向比较药材-中间体-成品间( $R, S$ )-告依春含量、化学指纹图谱相似度、抗流感病毒活性转移率,见图5。

由图5可直观看出,中间体-成品阶段化学表征信息转移率变化较大,提示化学分析方法[( $R, S$ )-告依春含量测定、化学指纹图谱分析]对此阶段较为敏感,可较好地表征回收醇液、浓缩、干燥、加辅料

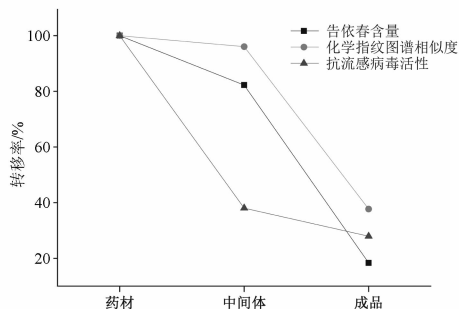


图5 板蓝根颗粒不同生产阶段化学表征信息、抗流感病毒活性转移率

Fig. 5 The transfer rate of chemical characterization information and anti-influenza virus activity in different process of Banlangen granules

成型工艺环节的过程质量评控;药材-中间体阶段抗流感病毒活性转移率变化较大,提示生物测定对此阶段敏感,可较好地表征水提醇沉工艺环节的过程质量评控。

结合常规性状鉴定、理化分析,对可用于中药生产过程质量控制的方法进行了综合分析,见表1。不同方法对中药生产过程质量控制各有侧重,性状鉴定方便快捷,但受主观经验性影响较大,缺乏客观量化评价;化学组分分析目前适用面较广,但仅能表达所提示“化学表征”信息的一致性与稳定性,与药效、临床疗效的相关性还需进一步明确;生物测定具有直接关切药效、符合中药多成分、多靶点等特点,但相对耗时,研制高通量、快捷的生物活性测定方法面临的首要问题。因此,发挥不同评控方法的优势,从“性、量、效”多角度把关中药生产过程质量控制是有效的解决之道。

表1 中药生产过程质量控制不同方法的适用能力比较

Table 1 The comparison of the different methods' capacity of production process quality of traditional Chinese medicine

方法	效力性	便捷性	经济性
性状鉴定/常规理化分析	+	+++	+++
化学组分分析	++	++	++
生物测定	+++	++	++

注:以+多少表示与评价指标的符合程度。

### 3 结论

本研究以疗效确切、临床广泛应用的板蓝根颗

粒为示例,对性状鉴定、指标成分含量测定、化学指纹图谱、生物测定等技术手段在中药生产过程质量控制的效力与适用范围进行了深度剖析,客观地评估了不同方法在药材-中间体-成品3个阶段质量评控中的作用与地位。对于板蓝根颗粒来说,性状鉴定更适合对药材的质量评控;化学组分分析更适合对药材-中间体工艺环节的质量评控;生物测定更适合于对中间体-成品工艺环节的质量评控。因此,建立基于化学组分分析-生物测定关联分析的板蓝根颗粒生产过程质量控制方法,将是解决目前板蓝根颗粒生产厂家繁多、质量参差不齐的现状,提升其疗效的可控性与稳定性的可行之道。

将生物测定引入到中药生产过程质量评控中,将有助于完善与提高目前中药质量评控能力,既能保证其质量“稳定可控”,又能直接关切“安全有效”。这将是构建中药质量评控多元化发展的重要举措,也是值得深入研究与发展的方向。

#### [参考文献]

- [1] 王智民, 钱忠直, 王永炎. 中药过程质量控制[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6):656.
- [2] 肖小河, 金城, 赵中振, 等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14):1377.
- [3] 肖小河, 鄢丹, 王伽伯, 等. 关于中药质量生物检定的几点商榷[J]. 世界科学技术——中医现代化, 2009, 11(4):35.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010:191.
- [5] 金城. 基于理化-生物关联检测的中药(板蓝根)生产过程质量控制方法初步研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
- [6] 鄢丹, 肖小河, 金城, 等. 论中药质量管理模式的挑战与发展[J]. 中草药, 2006, 37(6):806.
- [7] Zou P, Hong Y, Koh H L. Chemical fingerprinting of *Isatis indigotica* root by RP-HPLC and hierarchical clustering analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38:514.
- [8] Cheng Y, Schneider B, Oberthür C, et al. Flavone C-glycosides from *Isatis tinctoria* leaves [J]. Heterocycles, 2005, 65:1655.
- [9] 鄢丹, 任永申, 骆骄阳, 等. 中药质量生物测定的思考与实践——以板蓝根为例[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19):2637.
- [10] Deng X, Gao G, Zheng S, et al. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigotica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48:562.
- [11] 赵艳玲, 曹琳, 肖小河, 等. 板蓝根水提物的 HPLC 指纹图谱[J]. 中草药, 2005, 36(12):1819.
- [12] 任永申, 鄢丹, 张萍, 等. 基于微量热法检测板蓝根的血



- 红细胞凝集活性的评价研究[J]. 药学学报, 2010, 45(8): 1028.
- [13] 杨海霞, 李晓眠. 板蓝根提取液体内抗流感病毒作用的研究[J]. 天津医科大学学报, 2007, 1:19.
- [14] 胡兴昌, 郑伟强. 板蓝根粗提液抑制流感病毒的实验研究[J]. 上海师范大学学报:自然科学版, 2003, 32(1):62.
- [15] 李寒冰, 鄢丹, 王伽伯, 等. 基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质的生物评价[J]. 药学学报, 2009, 44(2):162.
- [16] 李寒冰, 鄢丹, 金城, 等. 基于化学荧光测定的板蓝根抗病毒效价检测方法的建立[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4):809.
- [17] 李寒冰, 肖小河, 鄢丹, 等. 中药质量生物控制模式和方法的研究——板蓝根抗病毒效价检测方法的建立[C]. 石家庄:2008年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周, 2008:25.
- [18] 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.
- [19] Potier M, Mameli L. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminat) substrate[J]. Anal Biochem, 1979, 94:287.
- [20] Deba Prasad Nayaka, Udo Reichl. Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus[J]. J Virol Meth, 2004, 122:9.
- [21] 周海钧. 药品生物检定[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 127.

## Investigation on production process quality control of traditional Chinese medicine——Banlangen granule as an example

TAN Manrong<sup>1,2</sup>, YAN Dan<sup>1\*</sup>, QIU Lingling<sup>1</sup>, CHEN Longhu<sup>1</sup>, YAN Yan<sup>1</sup>  
JIN Cheng<sup>1</sup>, LI Hanbing<sup>3</sup>, XIAO Xiaohe<sup>1\*</sup>

- (1. Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military hospital of PLA, Beijing 100039, China;  
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;  
3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] For the quality management system of herbal medicines, intermediate and finished products it exists the "short board" effect of methodologies. Based on the concept of process control, new strategies and new methods of the production process quality control had been established with the consideration of the actual production of traditional Chinese medicine an the characteristics of Chinese medicine. Taking Banlangen granule as a practice example, which was effective and widespread application, character identification, determination of index components, chemical fingerprint and biometrics technology were sequentially used respectively to assess the quality of Banlangen herbal medicines, intermediate (water extraction and alcohol precipitation) and finished product. With the transfer rate of chemical information and biological potency as indicators, the effectiveness and transmission of the above different assessments and control methods had been researched. And ultimately, the process quality control methods of Banlangen granule, which were based on chemical composition analysis-biometric analysis, had been set up. It can not only validly solute the current status that there were many manufacturers varying quality of Banlangen granule, but also ensure and enhance its clinical efficacy. Furthermore it provided a foundation for the construction of the quality control of traditional Chinese medicine production process.

[Key words] process control; component analysis; bioassay; Banlangen granule

doi:10.4268/cjmm20120815

[责任编辑 吕冬梅]