

板蓝根药材 HPLC 指纹图谱研究

林文艳¹,莫建霞¹,于荣敏²,周长新¹,赵昱¹ (1.浙江大学药学院中药与天然药物研究室,浙江 杭州 310031;2.暨南大学药学院天然药物化学教研室,广东 广州 510632)

摘要:目的 研究板蓝根饮片 HPLC 指纹图谱。方法 应用 RP-HPLC 法,梯度洗脱分析市售的 11 批板蓝根饮片的醋酸乙酯提取物,建立板蓝根饮片的指纹图谱。结果 不同来源的板蓝根饮片的醋酸乙酯提取物的色谱图相近,特征共有峰 12 个,相对峰面积相差很大。结论 建立的方法用于板蓝根药材的鉴别和质量评价简便、准确,为深入研究板蓝根的质量标准提供了实验基础。
关键词:板蓝根;高效液相;指纹图谱
中图分类号:R282.71 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)05-0378-03

Studies on HPLC fingerprint chromatogram of Radix Isatidis

LIN Wen-yan¹, MO Jian-xia¹, YU Rong-min², ZHOU Chang-xin¹, ZHAO Yu¹ (1. Department of Traditional Chinese Medicine and Natural Drug Research, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Natural Products Chemistry, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for HPLC fingerprint chromatogram determination of Radix Isatidis. **METHOD** RP-HPLC, gradient elution was used to analyse the components of ethyl acetate abstract from the eleven batches of commodity Radix Isatidis and HPLC fingerprint chromatogram was established. **RESULT** The HPLC chromatogram of commodity Radix Isatidis from the eleven batches were found similar with twelve common characteristic peaks, but the relative areas of the peaks were showed notable different from each other. **CONCLUSION** This method can be simply and exactly used in identifying and evaluating Radix Isatidis, which provide experimental base for further quality control of it.
KEY WORDS: Radix Isatidis; HPLC; fingerprint chromatogram

板蓝根 (Radix Isatidis)系十字花科植物菘蓝 (Isatis indigotica Fort.)的干燥根,性寒味苦,具有清热解毒、凉血消炎的功效。作为一味传统中药,其应用相当广泛,临床上多用于治疗流感、肝炎、腮腺炎、流脑、扁桃体等病毒性、细菌性疾病。现代药理已经明确了其在抗细菌内毒素^[1,2]、抗炎抑菌^[3]、抗病毒^[4,5]等方面作用,而在质量控制方面,无论是药材还是制剂,到目前为止,仍用靛玉红、靛蓝作为含量测定的指标,而靛玉红和靛蓝本身并没有上述功能,因此,对于板蓝根药材质量标准,用单一靛玉红或靛蓝含量作为指标,不能全面反映药材的质量。本实验采用了 RP-HPLC 法,对于购于 2003 年 10~11 月份的 11 批板蓝根饮片的醋酸乙酯提取物进行了指纹图谱研究,为深入研究板蓝根的质量标准提供了实验基础。

1 实验材料
1.1 样品

11 批样品来源见表 1。上述药材饮片经浙江大学药学院中药与天然药物研究室陈柳蓉副教授鉴定为十字花科植

物菘蓝 (Isatis indigotica Fort.)的根。
表 1 板蓝根的来源及编号

Tab 1 The source of the crude drug

编号	购买地	饮片性状	直径 (cm)	批号
1	四川蒲江	色泽土褐,饮片	0.2~0.6	2003 年 11 月
2	安徽宿州	色泽土黄,饮片	0.2~0.6	2003 年 10 月
3	浙江杭州	色泽土黄,饮片	0.3~0.8	2003 年 11 月
4	云南昆明	色泽土黄,饮片	0.1~0.4	2003 年 11 月
5	辽宁沈阳	色泽土黄,饮片	0.2~0.3	2003 年 10 月
6	湖北武汉	色泽土褐,饮片	0.2~0.6	2003 年 10 月
7	河北石家庄	色泽土黄,饮片	0.1~0.3	2003 年 10 月
8	北京	色泽粉白,饮片	0.5~1.0	2003 年 10 月
9	吉林长春	色泽土黄,饮片	0.1~0.3	2003 年 10 月
10	江苏南京	色泽土黄,饮片	0.1~0.3	2003 年 10 月
11	新疆乌鲁木齐	色泽土褐,饮片	0.2~0.6	2003 年 11 月

1.2 仪器及试剂

Agilent 1100 液相色谱仪, DAD 和 VWD 检测器; Mettler Toledo AG135 双量程电子天平 (精度万分之一和十万分之

一); 中性氧化铝 (上海五四试剂厂); 甲醇 (美国 Merck 公司, 色谱纯), 双蒸水, 醋酸乙酯 (分析纯); 靛玉红对照品 (中国药品生物制品检定所), 批号 0717-200003。

2 实验方法

2.1 色谱条件和系统适应性实验

色谱柱 ZORBAX XDB C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) ODS 柱, 检测波长 290nm, 柱温 30℃, 流动相 甲醇-水 (梯度洗脱), 流速 0.8mL/min, 进样量 5μL, 所有组分均在 60min 内被检测完。靛玉红标准品的理论塔板数在 1 万以上。

2.2 供试液制备

精密称取 40℃ 真空干燥的 80 目板蓝根粉末 5g 置 250mL 圆底烧瓶中, 加入 50mL 醋酸乙酯, 回流提取 2h 抽滤, 再用 50mL 醋酸乙酯分 5 次洗涤滤渣和瓶壁, 合并滤液, 减压浓缩至 1mL, 加于已经处理好的中性氧化铝柱 (4g 氧化铝, 醋酸乙酯湿法装柱), 用 25mL 醋酸乙酯洗脱, 将洗脱液合并浓缩, 定容至 5mL, 过 0.45μm 滤膜, 备用。

2.3 对照品溶液的制备

取靛玉红对照品, 精密称定 2.10mg 用分析纯醋酸乙酯定容至 10mL, 过 0.45μm 滤膜, 备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取 1 号供试液, 连续进样 6 次, 记录图谱, 11 号峰 (靛玉红) 相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.13% 和 1.93%, 其他 11 个共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.03% ~ 0.21%, 相对峰面积的 RSD 为 1.82% ~ 3.23%, 表明精密度良好。

2.4.2 板蓝根 HPLC 指纹图谱的重现性 取 1 号板蓝根粉末 6 份, 精密称定, 按照 2.2 方法制备供试液, 分别进样, 记录图谱, 11 号峰 (靛玉红) 相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 0.18% 和 2.43%, 其他 11 个共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.05% ~ 0.61%, 相对峰面积的 RSD 为 2.38% ~ 4.68%。

2.4.3 板蓝根 HPLC 指纹图谱的稳定性试验 取 1 号供试液, 在 0.3、0.6、0.9、1.2h 进样, 记录图谱, 在 12h 内, 测定 11 号峰 (靛玉红) 相对峰面积的 RSD 为 3.15%, 其他 11 个共有峰的相对峰面积的 RSD 为 0.86% ~ 3.28%, 表明样品溶液在 12h 内稳定。18h 进样, 发现 10 号峰面积明显降低。

3 指纹图谱及各项技术参数

3.1 共有峰的指定

根据 11 批供试品溶液的 HPLC 谱提供的相关参数, 比较各批样品的色谱图, 其中共有峰 12 个, 见图 1; 第 11 号峰为靛玉红, 见图 2 11 批不同来源样品叠加的色谱图见图 3。

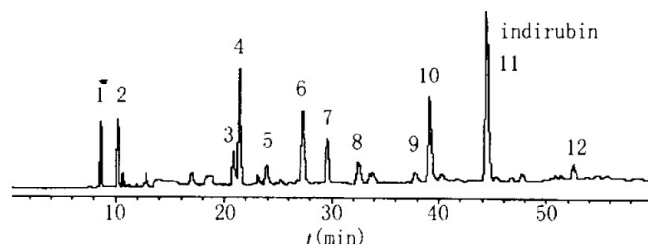


图 1 样品 1 (四川蒲江) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of sample 1

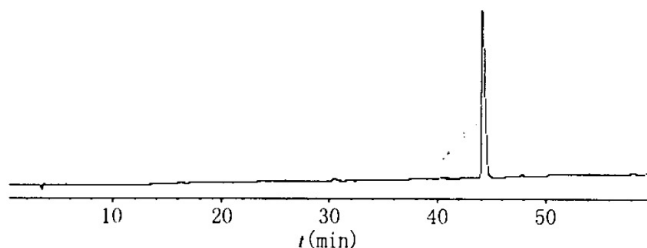


图 2 靛玉红标准品的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of indirubin standard

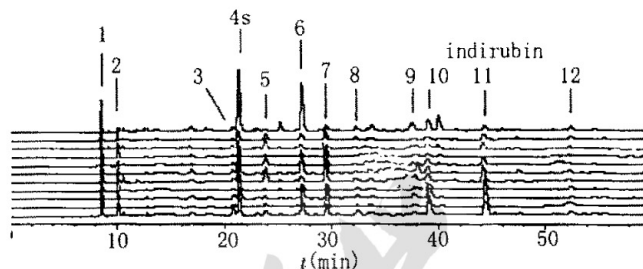


图 3 11 批样品的 HPLC 叠加图

Fig 3 The overlap chromatogram of 11 batches samples

3.2 共有峰的相对保留时间、相对峰面积

4 号峰在 11 批样品中都是主峰, 且稳定, 所以定 4 号峰为参照峰。共有峰的相对保留时间和相对峰面积分别见表 2 表 3。

3.3 不同来源的板蓝根的比较

从不同来源板蓝根饮片的保留时间来看, 其含有的成分相似, 但是从共有峰的相对面积和绝对面积 (表 1 和图 3) 来看, 这些共有成分在量上相差很大, 由此可以看出内在质量的差异。因此要控制板蓝根制剂的质量, 建议固定药材来源。

3.4 不同性状板蓝根谱图差异

3.4.1 在共有峰相同情况下, 不同大小板蓝根在谱图上的差异: 饮片直径较大的 (表 1 中直径 0.2~0.6、0.3~0.8、0.5~1.0cm), 其 1 号峰的相对面积较低, 在 0.55 以下; 若饮片直径较小的 (表 1 中直径 0.1~0.3、0.1~0.4、0.2~0.4cm), 其 1 号峰的相对面积都在 0.95 以上, 最高的达到 7.07。

3.4.2 在共有峰相同情况下不同色泽板蓝根在成分上的差异: 颜色深 (土褐色) 的板蓝根饮片, 其 6 号峰的相对面积大于 7 号峰的相对峰面积, 而颜色浅 (土黄和粉白) 的板蓝根饮片, 其 6 号峰的峰面积小于 7 号峰的相对峰面积。

4 讨论

4.1 本实验对不同的提取溶剂 (甲醇、丙酮、醋酸乙酯、氯仿)、不同提取方法 (超声、回流) 进行了考察, 确定了以上供试品的制备方法。用醋酸乙酯回流提取, 过中性氧化铝柱除杂, 得到的化学信息充分且基线稳定。

4.2 采用 DAD 对检测波长进行选择, 在 290nm 波长下, 信息量充分, 且吸收强度大。在用 DAD 选定波长后, 采用 VWD 检测。

4.3 按照本法, 用简单梯度洗脱, 能将板蓝根中小极性成分很好的分离, 这为板蓝根药材和制剂, 特别是注射剂制定指纹图谱提供了实验依据。

表 2 11批样品共有峰相对保留时间

Tab 2 The relative retention time of the common peaks

样品号	共有峰相对保留时间											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.402	0.475	0.976	1.000	1.120	1.275	1.383	1.523	1.769	1.833	2.080	2.461
2	0.403	0.475	0.976	1.000	1.113	1.275	1.383	1.516	1.768	1.832	2.080	2.459
3	0.402	0.474	0.977	1.000	1.114	1.276	1.384	1.517	1.768	1.830	2.081	2.461
4	0.403	0.475	0.976	1.000	1.113	1.275	1.383	1.516	1.767	1.829	2.079	2.459
5	0.403	0.475	0.977	1.000	1.122	1.275	1.383	1.515	1.787	1.835	2.078	2.457
6	0.403	0.475	0.976	1.000	1.114	1.275	1.383	1.515	1.786	1.829	2.077	2.457
7	0.403	0.475	0.976	1.000	1.121	1.275	1.383	1.515	1.768	1.831	2.078	2.457
8	0.403	0.476	0.976	1.000	1.114	1.275	1.383	1.515	1.773	1.830	2.081	2.455
9	0.402	0.474	0.976	1.000	1.122	1.275	1.384	1.515	1.770	1.840	2.083	2.470
10	0.402	0.475	0.976	1.000	1.122	1.276	1.385	1.518	1.772	1.835	2.084	2.471
11	0.402	0.475	0.976	1.000	1.114	1.276	1.383	1.516	1.763	1.832	2.081	2.462
平均	0.403	0.475	0.976	1.000	1.117	1.275	1.383	1.517	1.772	1.832	2.080	2.461
RSD	0.08%	0.05%	0.06%	0.00%	0.38%	0.03%	0.05%	0.22%	0.75%	0.32%	0.20%	0.48%

表 3 11批样品共有峰相对面积

Tab 3 The relative peak areas of the common peaks

样品号	共有峰相对峰面积											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.35	0.38	0.27	1	0.26	0.79	0.50	0.32	0.18	1.23	2.23	0.19
2	1.85	0.50	0.28	1	0.34	0.38	2.36	0.23	0.38	0.69	0.61	1.37
3	0.43	0.18	0.14	1	0.08	0.38	0.41	0.19	0.24	0.67	0.27	0.09
4	0.96	0.62	0.13	1	0.11	0.47	0.59	0.32	0.28	0.95	0.63	0.34
5	2.12	0.50	0.21	1	1.15	0.43	1.38	0.42	0.34	0.94	1.56	0.18
6	0.52	0.14	0.11	1	0.13	0.83	0.57	0.12	0.30	0.34	0.12	0.12
7	7.07	0.03	0.44	1	1.40	0.53	2.34	0.33	0.18	1.41	1.74	0.22
8	0.54	0.66	0.15	1	0.25	0.32	1.16	0.14	0.41	0.39	0.05	0.26
9	2.06	1.14	0.22	1	0.77	0.32	1.25	0.17	0.13	0.51	0.53	0.23
10	1.61	0.51	0.12	1	0.73	0.77	1.14	0.40	0.19	0.58	0.94	0.43
11	0.17	0.27	0.06	1	0.03	0.71	0.07	0.08	0.17	0.22	0.09	0.07
平均	1.607	0.448	0.194	1	0.477	0.539	1.070	0.247	0.255	0.721	0.797	0.318

4.4 实验过程中发现,样品在放置 18h后 10号峰面积降低,其前面的 9号峰明显增加。11号峰面积略有降低。放置 24h后进样,10号峰和 11号峰都明显下降,其最终降解成何物质,有待于在以后的研究中确定。

4.5 在本实验中,我们发现不同外观(色泽和大小)的药材饮片在 HPLC谱图上有些规律性差异(见“3.4”项下),若要得到确切的结果,需要收集更多来源确切的样品,进行深入研究验证。本实验得到的指纹图谱基本反映了板蓝根饮片醋酸乙酯提取部分的化学信息,而其谱图信息和药理作用的相关性,需要进一步深入研究。

参考文献

[1] 刘云海,林剑国,雷婷.板蓝根有效部位对脂多糖致小鼠血

清中 TNFα和 NO的影响[J].中草药,2003,34(2):152.
[2] 林爱华,方淑贤,方建国,等.板蓝根 F022部位抗内毒素活性研究[J].中国中药杂志,2002,27(6):439.
[3] 汤杰,施春阳,徐晗,等.板蓝根抑菌抗炎活性部位的评价[J].中国医院药学杂志,2003,23(6):327.
[4] 刘思贞,祝希娴,邵玉芹,等.板蓝根抗流感病毒有效部位的筛选[J].中草药,1999,30(9):650.
[5] 朱理安,关瑞锦,胡锡衷.板蓝根对实验性病毒性心肌炎心肌细胞的保护作用研究[J].中华心血管病杂志,1999,27(6):467.

收稿日期:2004-07-26