基于 UPLC 指纹图谱的青黛提取工艺评价研究

黄慧，倪峰，郭丹，张月芬，鄢雪梨，饶雪娥，叶桦珍*(福建卫生职业技术学院，福州 350101)

摘要：目的 建立青黛 UPLC 指纹图谱，用于评价其提取工艺。**方法** 采用单因素实验设计，以 UPLC 指纹图谱的共有峰数目、特征指纹峰总峰面积、有效成分含量为评价指标，分别对影响青黛加热回流提取法、超声提取法、微波萃取法的提取溶剂、提取温度、提取时间及物料比等因素进行优化，筛选并评价提取工艺。**结果** 3 种提取法的最佳提取溶剂均为 *N*,*N*-二甲基甲酰胺，最佳提取工艺分别为加热提取法(物料比 0.25 g∶30 mL，提取温度 20 ℃，提取时间 60 min)、超声提取法(物料比 0.25 g∶30 mL，提取温度 50 ℃，提取时间 60 min)、微波萃取法(物料比 0.25 g∶30 mL，提取温度 50 ℃，提取时间 8 min)。在最佳提取工艺下，微波萃取法、超声提取法和加热回流法的提取物的特征峰数依次为 34，30，11，总峰面积依次为 3 495.6，2 904.9，420.9。同时，微波萃取法得到的靛玉红含量分别为超声提取法和加热回流法的 1.63 倍和 22.57 倍。超声提取法得到的靛蓝含量分别为微波萃取法和加热回流法的 2.52 倍和 11.40 倍。**结论** 以 UPLC 指纹图谱的共有峰数目、特征指纹峰总峰面积和靛玉红含量为评价指标，微波萃取法优于超声提取法和加热回流法；以 UPLC 指纹图谱的共有峰数目、特征指纹峰总峰面积和靛蓝含量为评价指标，超声提取法优于微波萃取法和加热回流法。

关键词：青黛；UPLC 指纹图谱；提取工艺；评价
中图分类号：R284.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2017)04-0533-05
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.013

Application of UPLC Fingerprint in Evaluation of Extraction Process of Indigo Naturalis

HUANG Hui, NI Feng, GUO Dan, ZHANG Yuefen, YAN Xueli, RAO Xue'e, YE Huazhen*(*Fujian Health College, Fuzhou 350101, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the extraction process by establishing the UPLC fingerprint of Indigo Naturalis. **METHODS** The study was designed as a single factor experiment, the number of the common peak, total area of the characteristic fingerprint peak and active ingredient content of the UPLC fingerprint were taken as evaluation indexes to optimize factors including extraction solvent, extraction temperature, extraction time and reactant ratio that might affect heating-circumfluence extraction, ultrasonic extraction and microwave extraction, so as to screen and evaluate the extraction process. **RESULTS** The optimum extraction solvent of the 3 extraction methods was *N*,*N*-dimethylformamide, and the optimum extraction technique was heating-circumfluence extraction (reactant ratio was 0.25 g∶30 mL, extraction temperature was 20 ℃, and extraction time was 60 min), ultrasonic extraction (reactant ratio was 0.25 g∶30 mL, extraction temperature was 50 ℃, and extraction time was 60 min) and microwave extraction (reactant ratio was 0.25 g∶30 mL, extraction temperature was 50 ℃, and extraction time was 8 min), respectively. With the application of the optimum extraction technique, the characteristic peak number of microwave extraction, ultrasonic extraction and heating-circumfluence extraction was 34, 30 and 11, respectively; and corresponding total peak area was 3 495.6, 2 904.9 and 420.9, respectively. In addition, the content of indirubin extracted by microwave extraction was 1.63-fold and 22.57-fold of that by ultrasonic extraction and heating-circumfluence extraction; meanwhile, the content of indigo obtained by ultrasonic extraction was 2.52-fold and 11.40-fold of that by microwave extraction and heating-circumfluence extraction. **CONCLUSION** Microwave extraction may be superior than ultrasonic extraction and heating-circumfluence extraction with the number of the common peak and total area of the characteristic fingerprint peak in the UPLC fingerprint, and the content of indirubin as evaluation indexes; besides, ultrasonic extraction may be better than microwave extraction and heating-circumfluence extraction when using the number of the common peak and total area of the characteristic fingerprint peak in the UPLC fingerprint, and the content of indigo as the evaluating indicators.

KEY WORDS: Indigo Naturalis; UPLC fingerprint; extraction process; evaluation

青黛是爵床科植物马蓝*Baphicacanthus cusia* (Nees)Bremek.、蓼科植物蓼蓝*Polygonum tinctonum* Ait.或十字花科植物菘蓝*Isatis indigotica* Fort.的叶或茎叶经加工制得的干燥粉末或团块[1]，天然资源丰富，是福建省的道地药材[2]，具有清热解毒，凉血消斑，挥火定惊功效。青黛的主要成分有靛玉

基金项目：福建省中青年教师教育科研项目(JA15778，JA11318)；福建卫生职业技术学院立项科研项目(2016-2-7)
作者简介：黄慧，女，硕士，助理工程师 Tel: (0591)22869860 E-mail: fzhh528@163.com *__通信作者：__叶桦珍，女，博士，副教授 Tel: (0591)22869860 E-mail: 372288535@qq.com

红、青黛酮、色胺酮、靛红、靛蓝等[3]，其中靛玉红不仅对慢性粒细胞白血病与银屑病有明显疗效[4-6]，同时对多种肿瘤细胞均显示出较好的抑制作用[7]。目前，在青黛的提取工艺研究中[8-9]，大多数仅仅采用靛玉红或靛蓝的提取率作为提取或评价工艺优劣的指标。此类评价可能造成靛玉红或靛蓝含量很高，却未能较全面地表征出青黛的组成特征，而导致药品疗效降低，如：Chiang等[10]对青黛治疗银屑病的主要活性成分及疗效进行较为系统的研究，结果表明除了靛玉红之外，色胺酮和靛红对治疗银屑病也有重要作用。

中药色谱指纹图谱是一种综合的、整体的和可量化的色谱分析手段，国内外主要用于中药成分分析和质量控制研究[11-12]。这种方法建立在高效分离的基础上，能够较好体现中药中大类成分与疗效的相关性。目前，已有课题组进行了青黛HPLC指纹图谱建立的研究[13]，但未有报道将其用于提取工艺的评价。中药具有多靶点、多途径、多环节实现自身疗效的药效学特点[14]，而以往评价指标的单一性不能够体现青黛的整体性特点。因此，本研究遵循中药“整体”概念并借鉴指纹图谱法，建立青黛的UPLC指纹图谱，同时通过考察青黛提取物的指纹图谱差异，优选青黛的提取工艺，以此评价青黛提取工艺的优劣。

1 仪器、试剂与药材

ACQUITY H-Class UPLC™ 超高效液相色谱仪(包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、EmpowerⅢ色谱工作站，美国 Waters 公司)；SB-5200DT 超声清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)；MAS-Ⅱ微波萃取仪(上海新仪微波化学有限公司)；AEG-220 电子分析天平(日本岛津)；管形提取回流装置(四川蜀牛玻璃仪器有限公司)；Simiplity 型高纯水制备仪(法国 Milipore 公司)。

本实验收集 10 批次来自福建仙游县产地建青黛药材，药材来源见表 1；靛蓝对照品(批号：110716-201111，供含量测定用)、靛玉红对照品(批号：110717-200204，供含量测定用)均购自中国食品药品检定研究院；乙腈、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、甲醇、*N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF)等为 HPLC 级试剂(国药集团化学试剂有限公司)；冰醋酸为 AR 级试剂(广东光华化学厂有限公司)。

表 1 青黛药材来源

Tab. 1 Sample source of Indigo Naturalis

序号	批 号	产 地	时 间
1	131102012	仙游书峰	2013/11
2	140502009	仙游书峰	2014/05
3	140804012	仙游书峰	2014/08
4	141201006	仙游书峰	2014/12
5	131203011	仙游雪峰	2013/12
6	140505002	仙游雪峰	2014/05
7	141203011	仙游雪峰	2014/12
8	131106010	仙游巨星	2013/11
9	140405004	仙游巨星	2014/04
10	140901003	仙游巨星	2014/09

2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制

分别精密称取靛蓝、靛玉红对照品 11.96，13.40 mg，分别加入 DMF 适量，超声(300 W，40 kHz)60 min，冷却至室温，定容至 100 mL，精密移取 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中，稀释定容，用微孔滤膜(0.22 μm)过滤，即得。

2.2 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18}(100 mm×2.1 mm，1.7 μm)色谱柱，以甲醇(A)-1%冰醋酸(B)为流动相进行梯度洗脱，洗脱程序见表 2。检测波长为 255 nm，流速为 0.3 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃，进样量为 2 μL。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Time sequence of mobile gradient elution

时间/min	甲醇/%	1%冰醋酸/%
0	5	95
3	5	95
5	10	90
10	20	80
15	30	70
20	50	50
25	55	45
30	60	40
35	70	30
36	80	20
40	90	10

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器精密度试验　取同一青黛粉末(批号：131102012)以 DMF 为提取溶剂，按“2.4.1”项下供试品溶液制备方法，按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，以 9 号峰为参照峰，各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.01%~0.40%之间，相对峰面积的 RSD 在 0.3%~1.1%之间，结果表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验　取 6 批青黛粉末(表 1 中序号

1~6)以 DMF 为提取溶剂，按“2.4.1”项下供试品溶液制备方法，按“2.2”项下色谱条件进样，记录色谱图，样品中各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.30%~0.69%之间，相对峰面积的 RSD 在 1.1%~3.7%之间，结果表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一青黛供试品溶液，分别于 0，3，6，9，12，15，18，21，24 h 进样测定，各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.09%~0.50%之间，相对峰面积的 RSD 在 1.0%~3.2%之间，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4 提取溶媒的选择

2.4.1 不同溶剂提取样品溶液的制备 精密称取青黛粉末(批号：131102012)0.25 g，置于 50 mL 烧杯中，根据文献[3,9,14]及预实验结果，分别以乙腈、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、甲醇和二甲基甲酰胺 6 种溶剂为提取溶媒，超声(300 W，40 kHz)提取 60 min，提取温度为 50 ℃，冷却至室温，转移至 100 mL 量瓶中，稀释定容，精密移取 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中，稀释定容，用微孔滤膜(0.22 μm)过滤，备用。

2.4.2 提取溶剂选择 分别取样“2.4.1”项下方法制备供试品溶液，同时按“2.2”项下色谱条件进行测定，记录 UPLC 色谱图，见图 1。

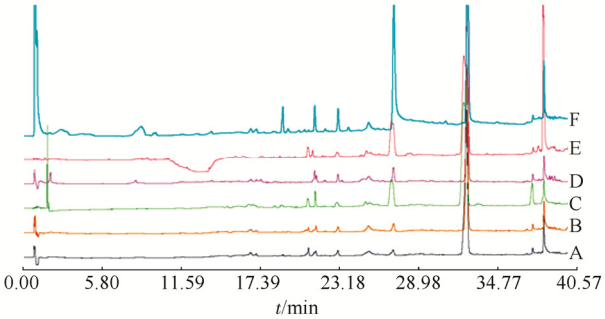

图 1 6 种不同提取溶剂 UPLC 指纹图谱

A–乙腈；B–乙醇；C–乙酸乙酯；D–甲醇；E–氯仿；F–DMF。

Fig. 1 UPLC fingerprint of Indigo Naturalis in 6 different extracting solutions

A–acetonitrile; B–ethanol; C–ethyl acetate; D–methanol; E–trichloromethane; F–DMF.

由图 1 可知，乙腈、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、甲醇和 DMF 6 种溶剂提取样品的特征图谱中 DMF 提取样品的特征图谱色谱峰最多、峰高较高，分离度好。因此，选择 DMF 作为提取溶剂。

2.5 3 种提取工艺的优化

2.5.1 提取工艺样品溶液制备 用单因素法分别对影响加热回流提取法、超声提取法(300 W，40 kHz)和微波萃取法的提取时间(回流法和超声法：30，60，90，120 min；微波法：4，6，8，10，12 min)、提取温度(回流法：10，20，30，40 ℃；超声法：30，40，50，60 ℃；微波法：20，30，40，50，60 ℃)、溶媒用量(均为 15，20，25，30，35 mL)进行优化，并制备样品溶液备用。

2.5.2 3 种提取工艺条件确定 分别取“2.5.1”项下方法制备的供试品溶液，同时按“2.2”项下色谱条件进行测定，记录 UPLC 色谱图。通过对比在 3 种提取工艺的不同条件下的共有峰数目、特征指纹峰总峰面积和有效成分含量，最终，确定各提取工艺的最优条件，分别为加热回流法(回流时间 60 min、回流温度 20 ℃、溶剂用量 30 mL)、超声提取法(超声时间 60 min、超声温度 50 ℃、溶剂用量 30 mL)、微波萃取法(萃取时间 8 min、萃取温度 50 ℃、溶剂用量 30 mL)。

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 参照峰选择 取“2.1”项下对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件测定，并对供试品中各峰进行指认，混合对照品色谱见图 2。

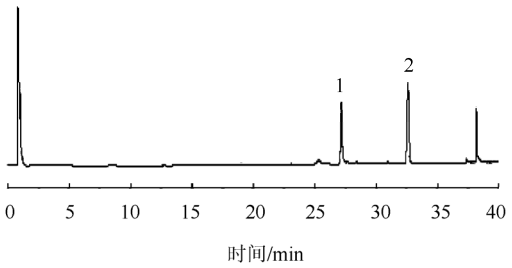

图 2 混合对照品色谱图

1–靛蓝；2–靛玉红。

Fig. 2 UPLC chromatogram of mixed reference substances

1–indigo; 2– indirubin.

靛蓝(1 峰)和靛玉红(2 峰)都是青黛的主要有效成分，在各批次样品中均能被检测到，分离度均较好，由于靛蓝色谱峰峰面积和保留时间适中且较稳定，故选择靛蓝色谱峰作为参照峰。

2.6.2 3 种方法提取液 UPLC 指纹图谱建立及相似度评价 分别取表 1 中 10 批青黛以 DMF 为提取溶剂，按“2.5.1”项下 3 种不同提取工艺条件制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录 UPLC 色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A)对其 UPLC 指纹图谱进行分析，以 S1 青黛药材(批号：

131102012)图谱作为参照谱，进行多点校正，自动匹配后的 10 批样品色谱，进行相似度分析，得出 10 批青黛药材 3 种提取工艺的相似度均>0.900，其中加热回流样品相似度范围为 0.923~0.986，超声提取样品相似度范围为 0.919~0.971，微波萃取样品相似度范围为 0.921~0.987，具体见表 3；同时，生成 3 种提取液的 UPLC 的对照指纹图谱，结果见图 3。

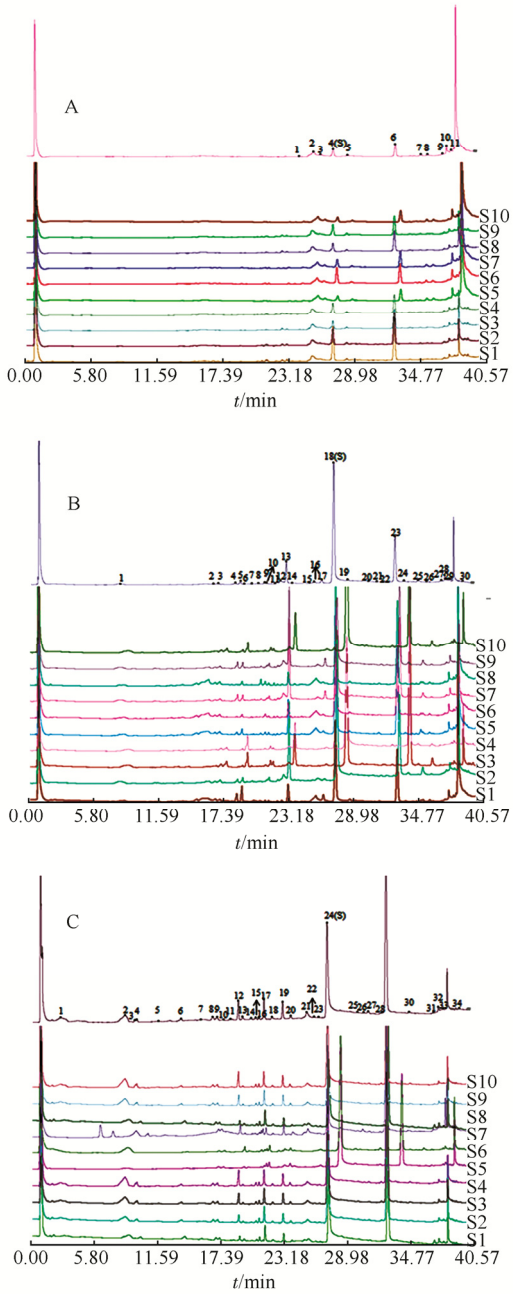

图 3 3 种方法提取液 UPLC 指纹图谱

A–加热回流提取法；B–超声提取法；C–微波萃取法。

Fig. 3 UPLC fingerprint of Indigo Naturalis in 3 kinds of extract

A–reflux extraction; B–ultrasonic extraction; C–microwave extraction.

表 3 3 种方法各批提取液指纹图谱的相似度计算结果

Tab. 3 Similarity calculation results of 3 kinds of extract

序号	相似度		
	微波萃取法	超声提取法	加热回流法
1	0.932	0.967	0.957
2	0.921	0.943	0.961
3	0.956	0.952	0.923
4	0.942	0.971	0.966
5	0.978	0.969	0.941
6	0.936	0.944	0.930
7	0.987	0.959	0.934
8	0.974	0.919	0.952
9	0.963	0.944	0.986
10	0.945	0.953	0.976

2.6.3 3 种方法提取液特征峰的标定 按“2.6.2”项下方法对 3 种提取液的 UPLC 指纹图谱进行分析，以靛蓝为参照峰找出 10 批青黛药材 3 种提取工艺的共有峰，其中加热回流样品中共有峰为 11 个，超声提取样品中共有峰 30 个，微波萃取样品中共有峰 34 个。在 3 种提取液的 UPLC 特征指纹图谱中，以参照峰(靛蓝)的保留时间和峰面积为基准，计算各峰的相对保留时间和相对峰面积，结果见表 4，3 种提取工艺色谱图见图 3。

通过测定 10 批青黛药材的 UPLC 指纹图谱，导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A)，建立 3 种提取液 UPLC 对照指纹图谱。10 批青黛药材的 3 种提取液的指纹图谱相似度均>0.900(表 3)，说明不同批次及不同提取工艺得到的指纹图谱的相似度良好，可用于进一步计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。通过对 3 种提取液 UPLC 对照指纹图谱分析，得出微波萃取法、超声提取法和加热回流法的提取物的特征峰数依次为 34，30，11，总峰面积依次为 3 495.6，2 904.9，420.9(表 4)，微波萃取液的特征峰数及总峰面积数值均远大于加热回流提取液和超声提取液；微波萃取法得到的靛玉红含量分别为超声提取法和加热回流法的 1.63 倍和 22.57 倍；超声提取法得到的靛蓝含量分别为微波萃取法和加热回流法的 2.52 倍和 11.40 倍。

综上所述，结合 3 种提取工艺的青黛 UPLC 指纹图谱，以特征峰数、总峰面积数值及主要成分提取效率为评价指标，微波萃取法的特征峰数、总峰面积数值及主要成分提取效率(靛玉红)均优于加热回流提取工艺和超声提取工艺。

表 4 3 种提取液特征峰相对保留时间及相对峰面积表

Tab. 4 The relative retention time and peak areas of 3 kinds of extract

峰号	相对保留时间			相对峰面积		
	回流	超声	微波	回流	超声	微波
1	0.889	0.299	0.101	0.057	0.012	0.044
2	0.936	0.606	0.319	1.252	0.005	0.179
3	0.960	0.621	0.351	0.153	0.005	0.004
4	1.000	0.678	0.358	1.000	0.010	0.008
5	1.047	0.693	0.431	0.133	0.021	0.008
6	1.202	0.707	0.508	1.750	0.004	0.022
7	1.281	0.733	0.574	0.195	0.003	0.017
8	1.306	0.751	0.614	0.172	0.005	0.024
9	1.355	0.775	0.630	0.069	0.005	0.025
10	1.367	0.781	0.651	0.701	0.004	0.004
11	1.382	0.806	0.675	0.108	0.003	0.015
12		0.826	0.703		0.025	0.102
13		0.842	0.716		0.123	0.019
14		0.865	0.743		0.003	0.010
15		0.921	0.761		0.003	0.008
16		0.936	0.770		0.014	0.009
17		0.960	0.786		0.025	0.095
18		1.000	0.817		1.000	0.013
19		1.047	0.853		0.008	0.096
20		1.120	0.877		0.003	0.017
21		1.144	0.933		0.004	0.090
22		1.167	0.957		0.003	0.005
23		1.202	0.973		0.350	0.006
24		1.233	1.000		0.008	1.000
25		1.281	1.103		0.018	0.004
26		1.306	1.124		0.003	0.006
27		1.355	1.136		0.005	0.016
28		1.367	1.182		0.024	0.006
29		1.382	1.199		0.006	1.437
30		1.427	1.278		0.006	0.013
31			1.360			0.005
32			1.374			0.025
33			1.392			0.005
34			1.447			0.005

3 讨论

现代研究认为，药物成分的分析是中药品质研究的眼睛，是决定中药临床疗效的关键。国内外研究者争相对青黛中有效成分进行药效研究[15]，同时也开展其有效成分的提取纯化研究[8-9]。在提取工艺优化及选择的过程中，大多只采用某单体成分含量为优化指标，但中药药效是多成分、多靶点整体作用的结果，因此，单一评价方法不能全面反应中药整体效应。而本实验采用的 UPLC 指纹图谱评价青黛提取工艺的方法，可能更好地体现中药的整体疗效与物质总量的关系。

尽管 UPLC 指纹图谱可以提供较为丰富的中药提取物信息，但本实验采用二极管阵列检测器，只能提供药液中具有紫外吸收的成分的信息；且指纹峰所对应成分的药效作用尚不完全清楚，在中药提取工艺的优化方面尚不能实现所有药效组分的提取与检测。为了获得更多提取物信息，本课题组将采用更先进的分离技术[16]及检测手段，尝试建立更全面的指纹图谱，进行全成分的高效分析、检测，以此更加全面、合理地评价提取工艺。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 199.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海人民出版社, 1977: 1230.

[3] 杨步青, 陈建斌, 李新雄. 建青黛及其原植物马蓝的研究进展[J]. 海峡药学, 2008, 20(12): 72-76.

[4] HAN R. High light on the studies of anticancer drugs derived from plants in China [J]. Stem Cells, 1994, 12(1): 53-63.

[5] XIAO Z, HAO Y, LIU B, et al. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China [J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43(9): 1763-1768.

[6] LIN Y K, LEU Y L, YANG S H, et al. Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component [J]. J Dermatol Sci, 2009, 54(3): 168-174.

[7] HU H G, WANG M J, ZHAO Q J. Synthesis of angirferin derivates and study their potent PTP1B inhibitory activity [J]. Chin Chem Lett, 2007, 18(11): 1323-1326.

[8] CHENG L H. Study on the extraction method of indirubinfrom Indigo Naturalis [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2007, 30(1): 50-52.

[9] DUANG X Y, GAO W F, et al. Optimal extraction technology of Indigo Naturalis by uniform design [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(4): 327-328.

[10] CHIANG Y R, LI A, LEU Y L, et al. An *in vitro* study of the antimicrobial effects of Indigo Naturalis prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore [J]. Molecules, 2013, 18(11): 14381-14396.

[11] JING J, REN W S, CHEN S B, et al. Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines [J]. Transition Met Chem, 2013, 44: 39-45.

[12] ZHU M, CHEN B L, SHI S M. Application of fingerprint technology on traditional Chinese medicine in Chinese pharmacopoeia (2015 edition) volume Ⅰ [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2016, 33(5): 611-614.

[13] CHAI X Y. Preliminary elaboration on emergent properties of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(13): 2480-2485.

[14] WANG L Q, LIN N, LI X X, et al. Study on the chromatographic fingerprint of Jian Qingdai by HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2010, 22(6): 98-101.

[15] HOESSEL R, LECLERC S, ENDICOTT J A, et al. Indirubin, theactive constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases [J]. Nat Cell Biol, 1999, 1(1): 60-67.

[16] HUANG H, LIN Z A, LIN Y, et al. Preparation and evaluation of poly(4-vinylphenylboronic acid-co-pentaerythritoltriacrylate) monolithic column for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins [J]. J Chromatogr A , 2012(1251): 82-90. Doi: 10.1016/j.chroma.2012.06.032. Epub 2012 Jun 18.

收稿日期：2016-04-05

(本文责编：曹粤锋)