

黔产南板蓝根不同样品中两种主要活性成分的含量对比

罗君¹, 杨丹², 张丽艳^{2*}, 李健², 杨玉琴², 刘桂华², 张培琴^{1*}

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:测定不同海拔、不同产地、不同采收期和不同初加工方法南板蓝根中靛蓝和靛玉红的含量,为评价及确定最佳产地、采收期和初加工方法提供依据。方法:采用 HPLC 法,Agilent ZORBAX EclipseXDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水梯度洗脱,检测波长 300 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:靛蓝在 0.031~0.314 μg 线性关系良好($r=0.9995$),靛玉红在 0.02~0.199 μg 线性关系良好($r=0.9998$),靛蓝平均回收率为 100.8% (RSD 2.2%),靛玉红平均回收率为 100.2% (RSD 2.3%)。结论:不同海拔、不同产地、不同采收期和不同初加工方法南板蓝根中靛蓝、靛玉红的含量存在较大差异。

[关键词] 南板蓝根; 活性成分; 靛蓝; 靛玉红

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0070-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080070

Contents of Two Main Active Components in Baphicacanthis Cusiae Rhizoma et Radix from Guizhou

LUO Jun¹, YANG Dan², ZHANG Li-yan^{2*}, LI Jian², YANG Yu-qin², LIU Gui-hua², ZHANG Pei-qin^{1*} (1. The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550001, China; 2. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate contents of indigo and indirubin in Baphicacanthus Cusiae Rhizoma et Radix from different altitude, habitats, harvest period, and processing method. It can provide the basis for the determination of the best habitat, harvest time and processing method. **Method:** The HPLC conditions as follows: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), mobile phase Methanol-Water, detect wavelength 300 nm, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature 30 ℃. **Result:** The linear range of indigo was 0.031-0.314 μg ($r=0.9995$), recovery rate were 100.8%, RSD was 2.2%. The linear range of indirubin was 0.02-0.199 μg ($r=0.9998$), recovery rate were 100.2%, RSD was 2.3%. **Conclusion:** The contents of indigo and indirubin in Baphicacanthis Cusiae Rhizoma et Radix of different altitude and different habitats, different harvest period, different preliminary working method in Guizhou exists a large difference.

[Key words] Baphicacanthis Cusiae Rhizoma et Radix; active ingredients; indigo; indirubin

南板蓝根具有清热解毒、凉血消斑的功效^[1-3],为贵州苗族习用药材。随着南板蓝根抗病毒有效成分腺苷等化合物的分离纯化,使其成为了抗病毒的焦点药物之一^[4-8]。靛蓝、靛玉红为南板蓝根的主要活性成分^[9],靛玉红对癌肿生长和扩散程度有明显的抑制作用^[10]。目前,《中国药典》仅采用性状和

理化鉴别对南板蓝根进行质量控制,且采收期及产地加工方法具体参数亦未作详尽规定。贵州作为南板蓝根大宗产地,不同海拔、不同采收期和初加工方法等对南板蓝根质量影响未见系统研究。鉴于此,本文采用梯度洗脱对贵州主产区不同海拔、不同产地、不同采收期和不同初加工方法南板蓝根中靛蓝与靛玉

[收稿日期] 20140711(013)

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合社字[2009]5024号);贵州省科技厅基金项目(黔科合J字[2011]2298号);《黔本草》—“黔药”本草学研究([2010]筑科农合同字第1-中-2号)

[第一作者] 罗君,硕士,主管中药师,从事中药、民族药质量控制与新药研究,E-mail:53011402@qq.com

[通讯作者] *张丽艳,教授,硕士生导师,从事中药、民族药质量控制与新药研究,E-mail:zly1964@163.com;

*张培琴,主任药师,硕士生导师,从事中药制剂研究与开发,E-mail:93343673@qq.com

红的含量进行了同时测定,以期为进一步阐明南板蓝根最佳产地、采收期及初加工方法和提升其质量标准提供一定依据。

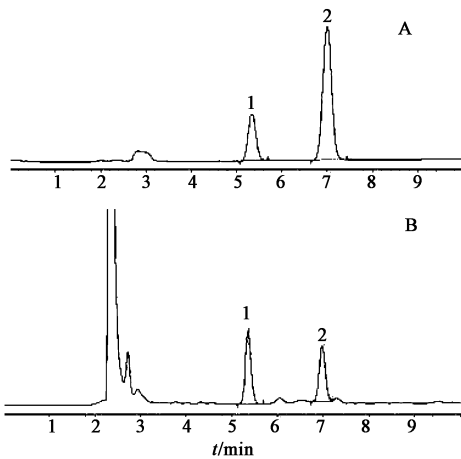
1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),XS205 型电子天平(梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药 靛蓝(批号 110716-200610)、靛玉红(批号 110717-200204)对照品,均购于中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。南板蓝根药材自采集,经贵阳中医学院魏升华副教授鉴定为爵床科植物马蓝 *Baphicacanth huscusia* 的干燥根茎及根。药材初加工方法:烘干(60 °C)、阴干、晒干均依据《中国药典》2010 年版项下加工。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX EclipseXDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min,20%~0 B),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 300 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 样品;1. 靛蓝;2. 靛玉红

图 1 南板蓝根 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Baphicacanthis Cusiae Rhizoma et Radix*

2.2 对照品溶液的制备 取靛蓝、靛玉红对照品适量,精密称定,加乙酸乙酯制成质量浓度分别为 0.015 7,0.009 94 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取南板蓝根粉末(过 80 目筛)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入乙酸乙酯 25 mL,称定质量,加热回流 3 h,取出,放冷,再称定质量,用乙酸乙酯补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 15 mL,置蒸发皿中,挥去

溶剂,精密加入乙酸乙酯溶液 2 mL,滤过,即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取靛蓝和靛玉红对照品溶液 1,2,4,6,8,10 mL,分别置 10 mL 的量瓶中,用乙酸乙酯稀释至刻度,分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。分别以靛蓝和靛玉红峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标绘制标准曲线,计算得回归方程 $Y = 1\ 002.3X + 424.64$ ($r = 0.999\ 5$); $Y = 2\ 328X + 3\ 329.8$ ($r = 0.999\ 8$)。结果表明,靛蓝在 0.031~0.314 μg,靛玉红在 0.02~0.199 μg 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取靛蓝、靛玉红同一供试品溶液,重复进样 6 次,测定峰面积,结果 RSD 分别为 1.7%,0.7%,说明方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,1,2,4,8,12 h 进样,记录靛蓝、靛玉红的峰面积,其 RSD 均为 2.4%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 分别精密称取南板蓝根 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,计算靛蓝、靛玉红含量, RSD 分别为 1.0% 和 0.6%,结果表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的南板蓝根 0.25 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入靛蓝和靛玉红对照品溶液 2.8,1.8 mL,按 2.3 项下方法制备,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算靛蓝、靛玉红的含量,结果见表 1。

表 1 靛蓝及靛玉红加样回收率测定

Table 1 Recover data of indigo and indirubin

成分	取样量 /g	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
靛蓝	0.250 4	44.26	43.96	87.67	98.75	100.8	2.2
	0.250 8	44.33	43.96	88.23	99.86		
	0.249 6	44.12	43.96	87.52	98.73		
	0.249 9	44.17	43.96	89.11	102.2		
	0.249 6	44.12	43.96	90.01	104.4		
	0.250 8	44.33	43.96	88.87	101.3		
靛玉红	0.250 4	18.49	17.89	36.53	100.8	100.2	2.3
	0.250 8	18.52	17.89	36.21	98.88		
	0.249 6	18.43	17.89	35.95	97.93		
	0.249 9	18.45	17.89	37.04	103.9		
	0.249 6	18.43	17.89	36.51	101.1		
	0.250 8	18.52	17.89	36.11	98.32		

2.9 样品测定 取贵州不同采收期、不同初加工方法及不同产地的南板蓝根药材粉末,按 2.3 项下制备供试品溶液,进行色谱分析,记录靛蓝、靛玉红的峰面积,计算含量,结果 6~9 月采收南板蓝根中靛

蓝含量分别为 93.68, 176.34, 183.90, 114.65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 靛玉红含量分别为 23.6, 73.84, 100.22, 34.04 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。阴干、烘干 3 种方法加工南板蓝根中靛蓝

含量分别为 176.76, 48.2, 114.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 靛玉红含量分别为 73.84, 30.63, 59.53 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。不同产地南板蓝根中 2 种成分含量见表 2。

表 2 不同来源南板蓝根中靛蓝、靛玉红的测定 ($n=3$)

Table 2 Contents of the indigo and indirubin in different habitats of *Baphicacanthis Cusiae Rhizoma et Raidx* ($n=3$)

产地	纬度	经度	海拔高度 /m	样地群落类型	土壤类型	靛蓝 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	靛玉红 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
台江县台拱镇	N26°40.544'	E108°18.935'	664.8	山丘,小路边	黄土	102.80	26.67
兴义市巴结镇	N24°49.583'	E104°58.080'	874	山丘,公路边	黄壤	142.58	125.90
独山县下司镇	N25°30.892'	E107°27.985'	987	山腰,地阴处	黄土	89.34	15.95
台江县方召乡	N26°39.862'	E108°23.164'	1160	山脚,山坡中	红壤	33.89	14.29
兴仁县	N26°34.103'	E106°28.424'	1221	上坡林下	黄土	143.83	26.37
关岭县坡贡镇	N26°04.449'	E105°33.016'	1270	山丘,田地中	红土	122.55	131.20
贞丰县纳山岗	N25°29.826'	E105°31.886'	1368	山脚,水库边	红壤	94.38	47.30
贞丰县赵家坪	N25°30.232'	E105°31.891'	1481	山腰,公路边	黄土	176.76	73.84

注:上述南板蓝根样品采集时间均为 2010 年 7 月,加工方法均为阴干。

3 讨论

贵州主产区不同海拔、不同采收期和不同初加工方法南板蓝根样品中靛蓝、靛玉红的含量存在较大差异。其中 8 月采收的南板蓝根中靛蓝、靛玉红的含量较高,并随时间增加呈下降趋势;不同初加工方法对南板蓝根药材中靛蓝、靛玉红的含量影响较大,以阴干法较好,其次为晒干,烘干法导致两者含量损耗严重,是否与烘干温度有关,有待进一步研究,贵州南板蓝根主产地不同来源中,以兴义市巴结镇质量较好;南板蓝根中靛蓝、靛玉红的含量与海拔高度不具显著相关性,其可能不是影响其含量的关键因素。

采用单因素多水平考察了回流、超声等不同提取方法的提取效果,结果回流提取较超声法提取好;并比较了乙酸乙酯、二氯甲烷以及三氯甲烷 3 种提取溶剂,结果其含量差异不大,考虑到三氯甲烷、二氯甲烷的毒性较大,选用乙酸乙酯做提取溶剂。

对不同流动相进行了考察,其中采用甲醇-水为流动相梯度洗脱,分析时间小于 10 min,基线不漂移,色谱峰分离度较好,且方法重复性较好,操作简单。

本研究可为南板蓝根规范化种植确定最佳采收期、初加工方法以及最佳产地,及其 SOP 的制定提供一定依据。

南板蓝根为贵州大宗药材,依据《贵州植物志》等资料,笔者尚对贵州南板蓝根主产区进行了南板蓝根种质资源、种源鉴定等研究工作,并对其自然概况和分布范围、群落组成与种群特征等进行了研究。

结果发现南板蓝根野生数量急剧减少,甚至在部分主产区未发现其分布,表明其野生资源保护迫在眉睫。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:229.

[2] Xu L H, Huang F, Cheng T, et al. Antivirus constituents of radix of *Isatis indigotica* [J]. Chin J Nat Med, 2005, 3:359-361.

[3] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科技出版社,2010:2212.

[4] 孙琴,马丽,李兰,等. 板蓝根中红细胞凝集效应组分的谱效关系研究[J]. 中草药, 2012, 43(1): 125-130.

[5] 徐桂花,张继环,乔建卫,等. HPLC 波长切换技术同时测定板蓝根中 4 种活性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):70-73.

[6] 程妍,李祥,陈建伟,等. 板蓝根有效部位的抗病毒药效研究[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(2):155.

[7] 刘依. 板蓝根有效成分的提取分离及含量测定[D]. 北京:中国农业大学,2002.

[8] 令红艳. 不同板蓝根制剂腺苷含量测定及其抗炎作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):143-145.

[9] 苗明三,李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:882.

[10] 许旋,罗一帆,陈子超. 抗癌药靛玉红及其异构体构效关系的量子化学研究[J]. 数理医药学杂志,1998,11(4):361-362.

[责任编辑 顾雪竹]