

# 板蓝根总生物碱 HPLC 指纹图谱

何洁英<sup>1</sup>, 何洁宝<sup>2</sup>, 王汝上<sup>3\*</sup>

(1. 佛山市第一人民医院, 广东 佛山 528000;

2. 顺德第一人民医院, 广东 顺德 528300;

3. 广州康臣药业有限公司 肾病药物研究中心, 广州 510530)

**[摘要]** 目的: 建立板蓝根总生物碱的 HPLC 色谱指纹图谱检测方法。方法: 采用 Phenomenex 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 柱温室温, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 220 nm, 进样量 10 μL。不同样品之间的相似度采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)计算。结果: 12 批不同来源的板蓝根药材所含生物碱类成分均得到很好的分离, 获得 19 个共有特征峰。结论: 经过系统的方法学考察, 该方法具有简便、专属性强、稳定、可重复的特点, 能较好地识别板蓝根药材, 为板蓝根生物碱的质量控制提供了方法学依据。

**[关键词]** 板蓝根; 生物碱; 高效液相色谱法; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0062-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120062

**Fingerprint of Total Alkaloids from Isatidis Radix by HPLC** HE Jie-ying<sup>1</sup>, HE Jie-bao<sup>1</sup>, WANG Ru-shang<sup>2\*</sup>  
(1. The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China; 2. The First People's Hospital of Shunde, Shunde 528300, China; 3. The Research and Development Center of Drug for Renal Diseases, Guangzhou Consun Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510530, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish fingerprint of total alkaloids from Isatidis Radix by HPLC. **Method:** An HPLC fingerprint has been established by gradient elution of acetonitrile and 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous solution, using a Phenomenex column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Detection wavelength was set at 220 nm, Column temperature was not controlled, flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, injection volume was 10 μL. The fingerprints were compared with similarity evaluation software published by the 'Similarity Evaluation of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine' (2004 A). **Result:** HPLC fingerprints of alkaloids were established through 12 batches of Isatidis Radix, and 19 common peaks were identified. **Conclusion:** This method has been proven to be feasible for the identification of Isatidis Radix. The method is simple, specific, stable, and repeatable, which will provide a methodological basis of quality control of alkaloids from Isatidis Radix.

**[Key words]** Isatidis Radix; alkaloids; HPLC; fingerprint

板蓝根具有清热解毒、凉血利咽之功效, 用于治疗瘟毒发斑、舌绛紫暗、痄腮、喉痹、大头瘟疫、烂喉丹痧、丹毒、痈肿等<sup>[1]</sup>。已报道的板蓝根化学成分有有机酸类、木脂素类、生物碱类、甾醇类、芥子苷类、含硫类化合物、多种氨基酸、核苷和多糖类<sup>[2-5]</sup>。其中生物碱成分为其主要的抗病毒成分<sup>[6]</sup>。国内外文献<sup>[7-10]</sup>已对板蓝根单一组分、水溶性总组分、脂溶性总组分等的含量测定和指纹图谱进行了研究。

对板蓝根中的生物碱类成分的指纹图谱的研究在国内尚未见报道。作者制定了板蓝根生物碱类成分的 HPLC 指纹图谱, 为板蓝根的鉴别和质量监控提供了新的依据, 并为生物碱类成分的进一步研究提供信息。

## 1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(DAD 检测器, 美国 Agilent), ACS-15N-JS 型电子计数秤(深圳市爱华衡

**[收稿日期]** 20140905(002)

**[第一作者]** 何洁英, 主管药师, 从事中药学研究, E-mail: hjiaying@fsyyy.com

**[通讯作者]** \* 王汝上, 研究工程师, 从事新药研究, Tel: 020-82016888-8746, E-mail: resun-com@163.com

器有限公司),乙腈(色谱纯,Merck),水为注射用水,其余试剂均为国产分析纯。

本文共收集板蓝根样品12个,购买于安徽亳州。该12批样品经广东康臣药业集团肾病药物研究中心朱荃教授鉴定,均为十花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* 的根,样品编号为  $S_1 \sim S_{12}$ 。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Phenomenex 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温室温,流动相乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(D),梯度洗脱(0~30 min, 2%~30% B; 30~40 min, 30%~55% B; 40~45 min, 55%~75% B; 45~50 min, 75%~80% B; 50~60 min, 80% B),检测时间60 min,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长220 nm,进样量10 μL。

**2.2 总生物碱供试品溶液的制备**<sup>[11]</sup> 取适量不同批次的板蓝根药材,适当粉碎,称取板蓝根粉末25 g,置250 mL锥形瓶中,加入80%乙醇(固液比为1:8)200 mL,橡胶塞封口,超声20 min,抽滤。续滤液旋干(旋干成浓浸膏),用0.1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸100 mL分多次溶解,溶液离心(3 500 r·min<sup>-1</sup>)10 min,抽滤,滤液用氢氧化钠溶液调pH 8~9,静置0.5 h,过滤,取溶液先后用三氯甲烷、正丁醇萃取,萃取液分别旋干,残渣分别用适量甲醇溶解转移并合并定容至25 mL量瓶(生药量约1 g·mL<sup>-1</sup>),0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试液。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 精密度试验** 精密吸取  $S_{12}$  样品溶液10 μL,连续重复进样6次,计算19个共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各特征峰的相对保留时间的RSD在0.3%~2.7% (RSD ≤ 3.0%),相对峰面积的RSD 0.9%~3.0% (RSD ≤ 3.0%),符合指纹图谱的要求。

**2.3.2 稳定性试验** 精密吸取  $S_{12}$  样品溶液10 μL,分别于0,12,24,36,48 h进行检测,经“中药指纹图谱相似度评价系统软件”计算,夹角余弦均 > 0.98,表明在48 h内供试品溶液具有良好的稳定性。

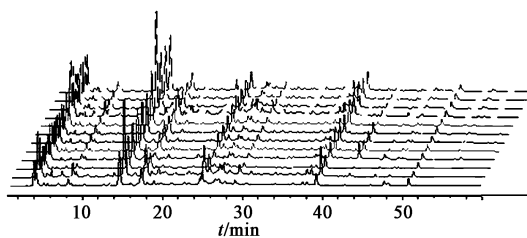
**2.3.3 重复性试验** 取  $S_{12}$  供试品粉末5份,按2.2项下方法制得供试品溶液,分别进样检测,计算19个共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积。各特征色峰的相对保留时间的RSD在0.4%~2.2% (RSD ≤ 3.0%),相对峰面积的RSD 0.7%~3.0% (RSD ≤ 3.0%),说明本实验方法具有较好的重复性。

**2.3.4 指纹图谱评价方法** 采用国家药典委员会

开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)。该软件具有生成对照图谱的功能,相似度计算为夹角余弦法,支持多点校正。

### 2.4 结果分析

**2.4.1 样品指纹图谱测定** 按照上述色谱条件,对12批不同来源板蓝根药材的生物碱成分进行测定,记录60 min色谱图,消除空白影响并且通过比较各色谱图,确定共有峰为19个,见图1。选定色谱图中峰形较好、峰面积较高的第8号峰为参照峰,其他各峰的保留时间和峰面积分别与参照峰的保留时间和峰面积相比,比值作为各峰的相对保留时间(RT)和相对峰面积(RS),见表1。



从外向里依次为  $S_1 \sim S_{12}$

图1 12批不同来源板蓝根药材生物碱HPLC指纹谱

Fig.1 12 batches of different sources Radix alkaloids HPLC fingerprint

**2.4.2 参照图谱生成及相似度计算** 采用“中药指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)软件生成参照图谱,见图2。将色谱工作站数据导入“中药指纹图谱相似度评价系统”软件,并消去空白影响,选定6个主要共有特征峰进行谱峰匹配,通过中位数矢量法计算得出板蓝根药材的生物碱成分样品指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为标准,采用夹角余弦法对各批样品进行整体相似度评价,12批样品与参照图谱的相似度分别为0.980, 0.973, 0.953, 0.971, 0.969, 0.967, 0.970, 0.970, 0.966, 0.958, 0.972, 0.970,与参照图谱的相似度均 > 0.950。

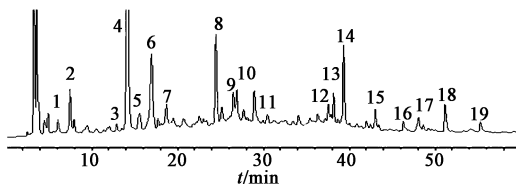


图2 板蓝根生物碱HPLC指纹图谱共有模式特征峰

Fig.2 Radix total alkaloids HPLC fingerprint patterns characteristic peaks

## 3 讨论

**3.1 提取方法选择** 从所在实验室研究员陈梓洵

表 1 板蓝根生物碱 HPLC 指纹图谱共有模式特征峰

Table 1 Radix total alkaloids HPLC fingerprint patterns characteristic peaks form

峰号	保留时间 /min	相对保留时间 (RT)	相对峰面积 (RS)	峰号	保留时间 /min	相对保留时间 (RT)	相对峰面积 (RS)
1	6.01	0.25	0.12	11	30.23	1.25	0.28
2	7.41	0.31	0.35	12	37.28	1.54	0.26
3	12.79	0.53	0.08	13	37.89	1.56	0.34
4	14.02	0.58	2.32	14	39.05	1.61	0.88
5	15.47	0.64	0.30	15	42.72	1.76	0.22
6	16.84	0.69	1.17	16	45.96	1.89	0.12
7	18.56	0.76	0.38	17	47.72	1.97	0.20
8(R)	24.28	1.00	1.00	18	50.76	2.09	0.27
9	26.29	1.08	0.47	19	54.88	2.26	0.12
10	28.72	1.18	0.72				

所做的课题《板蓝根中总生物碱的提取工艺优化研究》中得出最优的提取方法与条件。即采用本实验的提取条件,然后根据酸水-有机溶剂提取法提取出生物碱,并辅以碘化铋钾实验作定性分析。实验中,在溶液萃取过程中出现不明固体微粒,目前尚未明确具体成分,经富集后留待进一步研究分析。

**3.2 检测波长的选择** 采用 DAD 对检测波长进行选择,分别在 210,220,230,254 nm 处进行检测。结果表明,在 220 nm 检测波长下,信息量充分,且吸收强度大,各色谱峰之间的分离度好,共有特征峰多,基线相对平稳,因此确定检测波长为 220 nm。

**3.3 色谱柱的选择** 生物碱类成分因碱性较强,所以液相不易分离。作者在本次实验中曾试用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)和 Synergi 4u Hydro-Rp 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 micron),结果发现 Synergi 4u Hydro-Rp 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 micron)在 Agilent 1200 中能够较好地分离供试品,指纹图谱中各色谱峰都能达到较好的分离。

**3.4 流动相的考察** 考察了甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 磷酸水两种流动相,经过分析,乙腈-0.1% 磷酸水作流动相时分离度好、特征峰齐全。由于板蓝根中含有的生物碱成分的结构相近,有些生物碱极性相差不大,这就为流动相梯度的选择带来了相当的难度,经过大量的比对工作后,最终确定了 2.1 项下的梯度系统。

#### 4 结论

中药指纹图谱对鉴别药材的真伪优劣及其稳

定性均具有非常重要的参考价值。本实验所得到的色谱指纹图谱反映了板蓝根中生物碱的组成及含量分布状况,可作为鉴别板蓝根的新依据。

#### [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:化学工业出版社,2005:142.

[2] 刘海利,吴立军,李华,等. 板蓝根的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报,2002,19(2):93-100.

[3] 左丽,李建北,徐景,等. 板蓝根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,4(8):688-691.

[4] 黄家娣. 板蓝根化学成分和药理作用综述[J]. 中国现代药物应用,2009,8(15):197-198.

[5] 柏健,肖慧,何结炜,等. 板蓝根化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,2(3):271-272.

[6] 倪华. 板蓝根化学成分及其药理活性研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2008,9(13):609-1611.

[7] 徐德然,刘学华. HPLC 测定板蓝根中靛玉红含量的方法[J]. 中国野生植物资源,2004,23(2):53-55.

[8] 赵艳玲,曹琳,王伽伯,等. 板蓝根水提物的 HPLC 指纹图谱[J]. 中草药,2005,36(12):1819-1821.

[9] 林文艳,莫建霞,于荣敏,等. 板蓝根药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2005,22(5):378-380.

[10] 陈勇,杨文清,等. 板蓝根药材的 HPLC 特征指纹图研究[J]. 中医学报,2003,31(3):18-19.

[11] 黄晓玲,郑兆广,封亮,等. 正交试验优化板蓝根总生物碱的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):68-70.

[责任编辑 顾雪竹]