

不同产地大青叶饮片反相高效液相色谱指纹图谱研究

李环环¹,王英姿^{2*},梁丽丽¹,孙秀梅¹
(1. 山东中医药大学,济南 250355; 2. 北京中医药大学,北京 100102)

〔摘要〕 目的:采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立大青叶的 HPLC 色谱指纹图谱分析方法,为其品质控制提供可靠依据。方法:Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱;流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃。结果:建立了大青叶饮片 RP-HPLC 标准特征指纹图谱,共确定 32 个特征指纹峰,其中 31 个特征峰为共有峰,另一指纹峰可部分检出。结论:建立的大青叶 RP-HPLC 特征指纹图谱方法专属性强,精密度和重复性良好,为大青叶饮片整体质量控制提供了有效手段。

〔关键词〕 大青叶饮片; 反相高效液相色谱指纹图谱; 质量控制

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0081-05

RP-HPLC Fingerprint Analysis of Folium Isatidis Pieces from Various Habitats

LI Huan-huan¹, WANG Ying-zi^{2*}, LIANG Li-li¹, SUN Xiu-mei¹
(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

〔Abstract〕 **Objective:** RP-HPLC was used to establish a method of fingerprint analysis on Folium Isatidis Pieces. This method can provide a reliable basis for the quality control. **Method:** Chromatographic column: Inertsil ODS-3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); mobile phase: ACN-0.1% formic acid, gradient elution; flow rate: 1.0 mL ·

〔收稿日期〕 20120805(002)
〔基金项目〕 国家中医药科研专项(201007012-2-11)
〔第一作者〕 李环环,硕士研究生,从事中药新药与中药炮制原理研究, Tel:0531-82628081,E-mail: kuaile521ql@126.com
〔通讯作者〕 *王英姿,副教授,硕士生导师,从事中药制剂新剂型与新技术研究, Tel:010-84738615,E-mail: wangyzi@sina.com

大黄酚和大黄素甲醚色谱峰(峰 25,26),可能跟大黄的药材来源不同有关。由此可说明,不能以大黄的 5 个蒽醌类成分的含量作为一清软胶囊的质量控制标准,一清软胶囊中的黄连和黄芩的化学成分比较稳定,都含有盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、黄芩苷和黄芩素(峰 7,8,9 和 19)。这 18 个共有峰是否代表一清软胶囊的药效物质,还有待于进一步的研究。

〔参考文献〕

[1] 王远见,李清,赵娟娟,等. HPLC 法同时测定一清颗粒中黄芩苷等 8 种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011(10): 807.

[2] 王群英,何选林. 一清软胶囊含量测定方法的改进[J]. 中国药业, 2011,20(19): 35.

[3] Zheng Guo-Dong, Li Kai, Li Yue-shan, et al. Fast profiling of chemical constituents in Yiqing Capsule by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2012,35(1): 174.

[4] Li Yan, Wu Tao, Zhu Jinghui, et al. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010,52(4): 597.

[5] 田国芳,李丽,张村,等. 大黄生、熟饮片质量评价方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8): 48.

〔责任编辑 顾雪竹〕

min⁻¹; detection wavelength: 254 nm; column temperature: 30 ℃. **Result:** The normal characteristic fingerprint of Folium Isatidis Pieces was established. The result showed that 32 peaks were characteristic including four common peaks and one partially detected peak. **Conclusion:** With high specificity, precision and good repeatability, the established method provides an effective means for overall quality control of Folium Isatidis Pieces.

[**Key words**] Folium Isatidis Pieces; RP-HPLC fingerprint; quality control

大青叶为十字花科植物菘蓝的干燥叶,具有清热解毒、凉血消斑等功效^[1]。目前市场上流通的大青叶饮片的质量参差不齐,其鉴别多采用传统鉴别形式(性状、显微、理化鉴别)和单体成分测定等,不能全面反映其内在质量。本实验在常规检查项目基础上,建立大青叶饮片 RP-HPLC 特征指纹图谱,为大青叶饮片质量控制提供有力依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,DAD 检测器,Chemstation 色谱工作站;电子分析天平(MA110 型,上海第二分析仪器厂);KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

不同产地大青叶饮片,均经山东中医药大学张兆旺教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶。

靛玉红(批号 110717-200204)、靛蓝(批号 110716-200610)、苯甲酸(批号 100419-200301)、水杨酸(批号 100106-201104)均购自中国食品药品检定所;硅胶 G 薄层板(200 mm × 200 mm,薄层色谱用,购自青岛海洋化工厂);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,均购自山东禹王实业有限公司,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 饮片的采集 根据目前大青叶药材的种植情况,在文献调研及市场调查的基础上^[2-8],并经产地考察,大青叶饮片采集情况见表 1。

2.2 饮片的质量鉴定 以《中国药典》2010 年版一部为依据,对饮片进行基源、靛蓝与靛玉红 TLC 鉴定,水分、醇浸出物及靛玉红含量测定^[1],结果饮片的外观性状及检查项目均符合药典标准,有效成分靛玉红含量均在标准范围之内,结果见表 1。

2.3 饮片指纹图谱测定

2.3.1 供试品溶液制备 精密称取大青叶饮片粉末(过 2 号筛)各 1.50 g,加甲醇 30 mL,50 ℃ 下超声 1 h,滤过,滤液浓缩,甲醇定容至 10 mL,过微孔滤膜(0.45 μm),作为供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取靛玉红、靛蓝、苯甲酸、水杨酸对照品,分别用甲醇溶解并稀释成每

表 1 15 批大青叶饮片样品来源及质量测定(n=3)

No.	产地	批号	采集形式	水分 /%	醇浸 出物 /%	靛玉红 含量 /%
S1	河北安国	110611	亲自采集	8.58	20.23	0.042
S2	河北安国	110716	亲自采集	8.67	19.77	0.036
S3	河北安国	110805	企业提供	7.03	20.89	0.024
S4	河北安国	110912	企业提供	7.15	21.12	0.022
S5	黑龙江大庆	110814	亲自采集	9.38	21.09	0.041
S6	黑龙江大庆	110917	亲自采集	7.01	20.67	0.030
S7	黑龙江大庆	111019	企业提供	8.61	18.32	0.024
S8	黑龙江大庆	111021	企业提供	9.10	21.07	0.021
S9	安徽阜阳	110719	亲自采集	9.33	20.31	0.026
S10	安徽阜阳	110623	亲自采集	8.99	18.52	0.043
S11	安徽阜阳	1207222492	企业提供	8.88	26.54	0.024
S12	安徽阜阳	1108040001	企业提供	7.45	16.09	0.024
S13	江苏泰兴	100613	市售	9.39	18.09	0.021
S14	甘肃陇南	110728	市售	9.61	21.49	0.024
S15	陕西安定	110803	市售	8.87	16.01	0.020

1 mL 含 12.8,3.2,6.4,5.1 μg 的对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相乙腈 A-0.1% 的甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 45 min,3% ~ 38% A;45 ~ 55 min,38% ~ 70% A;55 ~ 60 min,70% ~ 95% A;60 ~ 70 min,95% ~ 95% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃,供试液进样 20 μL。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 精密度试验 取同一份大青叶饮片供试液,在上述色谱条件下,连续进样 5 次,记录色谱图,结果各色谱峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.5%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.5%,证明测量精密度满足要求。

2.3.4.2 重复性试验 精密称取 15 批大青叶饮片混合粉末(过 2 号筛)1.50 g,按 2.3.1 法制备 5 份供试液,分别进样测定,记录色谱图,结果各色谱峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.5%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.5%,符合指纹图谱要求。

2.3.4.3 稳定性试验 取同一份大青叶饮片供试液,分别在制备样品后的0,4,8,12,18,24 h 进样测定,记录色谱图,结果各色谱峰的相对保留时间RSD 均 <1.5%,相对峰面积的RSD 均 <2.5%,表明供试品溶液在24 h 内稳定。

2.3.5 系统适用性实验及内参照峰的选择 取不同产地15 批大青叶饮片粉末(过2 号筛),按**2.3.1** 法制备供试品溶液,照**2.3.3** 项下色谱条件测定,记录色谱图,见图1。所有组分在72 min 内洗脱出柱,从图1 可以看出,23 号峰保留时间适中,峰面积较大且稳定,峰形较好,与相邻峰的分离效果好,且该峰为各待鉴样品中所共有的色谱峰,故选择23 号峰为内参照峰进行各供试品溶液相对保留时间和相对峰面积的计算。

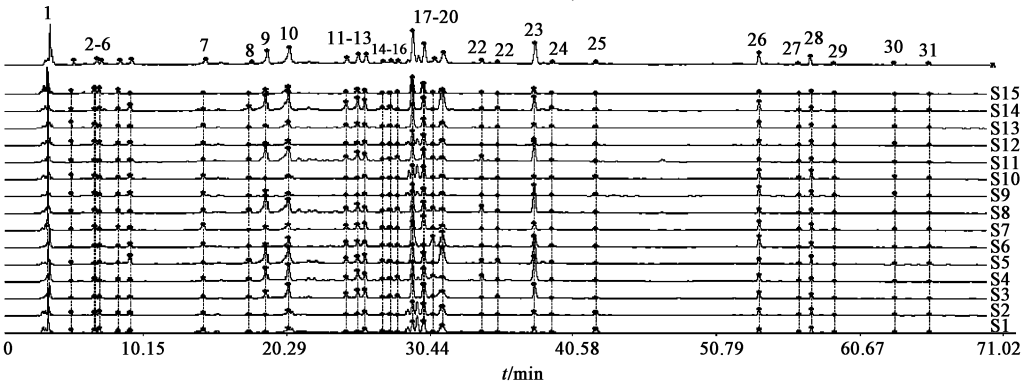
2.3.6 特征指纹鉴定

2.3.6.1 指纹图谱相似度的测定 参考文献[9],采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)评价15 批大青叶饮片指纹图谱,设定时间窗宽度为0.5 min,以中位数法生成对照指纹图谱,建立共有模式,见图1,测得样品与共有模式之间的相似度,结果见表2。通过对指纹图谱及数据比较归纳,S8 出峰数为47 个,最少的为S15,出峰39 个,共计出峰数71 个,其中共有峰数目为31 个。

2.3.6.2 共有峰定性 比较样品与对照品出峰保留时间、在线紫外光谱以及采用对照品加入法,确认28 号峰为靛玉红,结果见图2,同法确认21 号峰为苯甲酸,24 号峰为水杨酸,27 号峰为靛蓝。

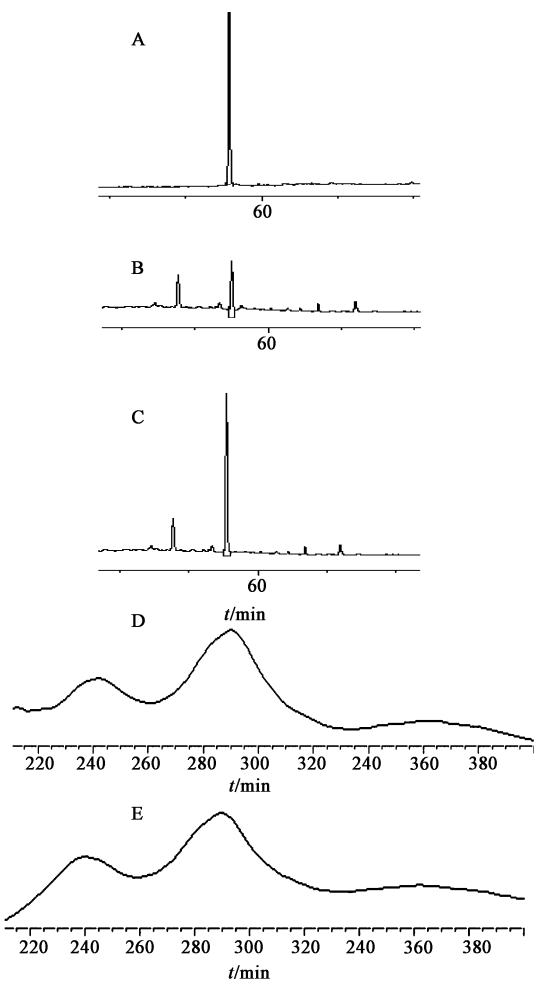
2.3.6.3 共有峰重叠率 用重叠率公式,以出峰数最多的S8 谱图为基准计算出所有样品共有峰的重叠率,结果见表2。

$$\text{重叠率} = \frac{\text{共有峰数} \times 2}{\text{基准样品峰数} + \text{待测样品峰数}} \times 100\%$$



R. 大青叶对照饮片;1~31. 共有峰;21. 苯甲酸;24. 水杨酸;27. 靛蓝;28. 靛玉红

图1 不同产地15 批大青叶饮片 HPLC 指纹图谱



A. 靛玉红对照品;B. S5 图谱;C. 加入靛玉红对照品后;
D. 靛玉红对照品;E. S5 靛玉红

图2 S5 图谱靛玉红定性鉴别

2.3.6.4 指纹图谱15 强峰 按照以下原则选择 n 强峰:以峰面积大小位于前 n 位,出峰数目为总数的 $1/5 \sim 1/3$ 为宜^[10]。因各样品出峰数目在39~47,认为 $n = 15$ 为宜。不同产地大青叶饮片15 强峰相对总面积在61.23%~74.55%,15 强峰(共有峰除外)统计结果见表3。

2.2.6.5 大青叶饮片 HPLC 标准特征指纹的确定

由表 2 获知,样品指纹图谱与共有模式间的相似度 > 0.80,结合较高的共有峰重叠率(≥79.6%),表明所有样品内在组分十分相似。所有色谱峰中有 31 个峰为所有样品所共有,将其全部列入标准特征指纹谱中。由表 3 获知,15 强峰中,除共有峰外,需将在 15 强峰中出现频次不甚高者,或名次靠后者,或共有样品数较低者剔除,如 t_R 为 0.083,0.093,0.156,0.761,0.860,0.558,0.590,0.614 等峰,故除共有峰外,只有 t_R = 0.781 的色谱峰可入选特征指纹谱。现以相对保留时间(t_R)和相对峰面积均值(Ar)标定其指纹特征,建立大青叶饮片标准特征指纹,结果见表 4。

所有样品中,特征指纹峰的峰面积之和在样品

峰面积总和中所占的百分比均超过 70%,说明这些峰可以代表样品的主要性质,通过对这组峰群的控制就可控制样品的内在品质。

2.3.6.6 检出率和总差异率 15 批样品在标准特征指纹中的检出率及总差异率结果见表 5。

由表 5 可知,大青叶饮片 HPLC 标准特征指纹谱中,因样品 S5,S7,S8,S11,S13,S14,S15 中缺少 t_R = 0.781 的色谱峰,导致检出率由 100% 降为 96.9%,因此,大青叶饮片 HPLC 标准特征指纹谱中除 t_R = 0.781 的色谱峰可部分检出,其余各峰必须 100% 检出。

总差异率反映了待鉴样品指纹谱与特征指纹谱之间的差异情况,其高低代表了样品组分量上的差异。所有样品的总差异率一般在 0.30 ~ 0.65,仅样

表 2 15 批大青叶饮片样品相似度及共有峰重叠率 %

样品	相似度	重叠率/%	样品	相似度	重叠率/%	样品	相似度	重叠率/%
S1	0.901	79.6	S6	0.847	84.1	S11	0.932	92.5
S2	0.876	80.4	S7	0.918	89.7	S12	0.803	79.6
S3	0.963	82.8	S8	0.931	100.0	S13	0.905	90.9
S4	0.945	82.8	S9	0.902	87.4	S14	0.933	83.1
S5	0.928	84.4	S10	0.875	84.8	S15	0.899	83.7

表 3 15 批大青叶饮片样品 15 强峰(共有峰除外)出峰统计情况

Rt	15 强峰出现频次/排列名次	共有样品数	Rt	15 强峰出现频次/排列名次	共有样品数
0.083	1/10	2	0.590	1/12	5
0.093	2/8,1/10	10	0.614	1/15	2
0.156	1/11	6	0.761	1/5,1/8,1/9,2/12	6
0.558	1/15	8	0.781	1/1,1/2,1/3,1/6,1/7	8
0.576	1/13,1/15	11	0.860	1/14	4

注: ¹⁾ 15 强峰出现频次/排列名次:“/”前指某峰在所有样品 15 强峰中出现的次数,“/”后指某峰在某样品 15 强峰中的排列次序。²⁾ 共有样品数:指含有某峰的所有样品数。

表 4 大青叶饮片 HPLC 标准特征指纹谱

Rt	Ar	Rt	Ar	Rt	Ar	Rt	Ar
0.090	1.37	0.497	0.68	0.771	2.04	1.033	0.40
0.135	0.19	0.539	1.31	0.781	1.31	1.113	0.40
0.179	0.52	0.647	0.60	0.792	1.40	1.419	0.87
0.187	0.35	0.668	0.70	0.812	0.47	1.494	0.19
0.222	0.46	0.683	0.72	0.828	1.25	1.516	0.59
0.244	0.53	0.716	0.40	0.900	0.28	1.559	0.16
0.382	0.58	0.729	0.41	0.929	0.35	1.673	0.20
0.468	0.26	0.743	0.32	1.000	1.00	1.738	0.20

表 5 大青叶饮片样品特征指纹检出率和总差异率

样品	检出率/% ¹⁾	总差异率 ¹⁾	样品	检出率/%	总差异率
S1	100.0	0.421	S9	100.0	0.345
S2	100.0	0.423	S10	100.0	0.521
S3	100.0	0.467	S11	96.9	0.521
S4	100.0	0.617	S12	100.0	1.371
S5	96.9	0.555	S13	96.9	0.326
S6	100.0	0.492	S14	96.9	0.487
S7	96.9	0.331	S15	96.9	0.398
S8	96.9	0.588			

注: ¹⁾ 检出率 = 某样品中的特征指纹峰数/特征指纹峰总数。²⁾ 总差异率 = $\frac{\sum |R_{Ai} - A_r| / A_r}{n}$, 其中 R_{Ai} 指某峰的相对峰面积, A_r 指相对峰面积均值, n 指特征指纹峰的总数。

品 S12 总差异率十分突出, 达到 1.371, 但其特征指纹检出率高达 100%, 与 S8 的重叠率达 79.6%, 应视为同一基源药用植物, 说明它与其他样品间存在较大的量上的差异。

3 小结与讨论

3.1 HPLC 色谱条件的选择 考察了流动相组成、检测波长、流速、柱温等因素, 结果以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃, 各峰分离度及峰形良好, 基线平整、稳定性较好, 特征性指纹峰表达明显, 更能全面反映大青叶饮片成分的信息特征。

3.2 HPLC 提取溶剂的选择 分别以水, 甲醇和乙酸乙酯为溶剂按 2.3.1 法制备大青叶饮片供试液, 进样分析, 发现水提取时测得的色谱图极性较小的成分出峰很少, 靛蓝与靛玉红几乎检测不到, 不能全面反映大青叶饮片成分的信息特征; 后两种溶剂提取时, 不同极性成分分布较平衡, 但以甲醇提取时出峰数目较多, 更为理想。

3.3 大青叶饮片的质量控制 选用符合药典规定的样本建立指纹图谱, 所得指纹图谱更具代表性, 更能体现大青叶饮片的质量特征。考虑到指纹图谱与醇浸出物都是建立在中药整体观念基础之上, 评价了指纹图谱与醇浸出物间相关性: 表 2 中相似度 > 0.90 的饮片, 除 S7 外, 醇浸出物含量均高于 20%,

而相似度 < 0.90 的饮片, 除 S6, S13 外, 醇浸出物含量均 < 20%, 可见本文建立的大青叶饮片指纹图谱方法用于判定药材质量具有较高的可信度, 作为药典标准的有益补充, 为药材的整体质量控制提供了有效的手段。

表 5 中大青叶饮片样品特征指纹检出率为 100% 的饮片有河北安国四批 (S1 ~ S4), 安徽阜阳 3 批 (S9, S10, S12), 黑龙江大庆 1 批 (S6), 其余产地检出率均 < 100%, 可见大青叶饮片特征指纹检出率高低具有一定地域性, 结合其他有关大青叶药材及饮片的文献研究, 为大青叶道地产区的确认提供依据。

[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: 中国医药科学出版社, 2010: 20.

[2] 李园园, 方建国, 王文清, 等. 大青叶历史考证及现代研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1750.

[3] 马琳, 夏光成. 大青叶原植物的古今应用研究[J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 309.

[4] 唐文文, 张欣旸, 何尤, 等. 陇中半干旱地区大青叶采收次数对药材产量品质的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 955.

[5] 刘盛, 陈万生, 乔传卓, 等. 不同种质板蓝根和大青叶的抗甲型流感病毒作用[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 204.

[6] 孙海霞, 周莲, 吴启勋. 不同产地大青叶质量的灰色模式识别研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5484.

[7] 王寅, 乔传卓, 尹茶. 高效毛细管电泳法用于不同居群大青叶药材的鉴别[J]. 中草药, 2000, 31(7): 547.

[8] 苏慕霞, 叶冰, 李霓冰, 等. 大青叶的化学成分研究分析[J]. 医药前沿, 2012, 2(2): 196.

[9] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282.

[10] 洪筱坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 86.

[责任编辑 顾雪竹]