

板蓝根的质量标准研究

王 瑞^{1,2}, 杨海英³, 杨琪伟¹, 黄山君¹, 王峥涛^{1,2,*}

(1. 上海中医药大学中药学院 中药研究所 教育部中药标准化重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 3. 云南民族大学化学与生物技术学院 民族药资源化学重点实验室, 云南 昆明 650031)

摘 要:目的 对 22 批板蓝根药材和饮片进行定性定量试验研究, 提高板蓝根的质量标准。方法 采用薄层色谱法对板蓝根中表告依春进行定性分析, 采用高效液相色谱法测定表告依春的量, Ultimate AQ-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-0.02% 磷酸 (7:93); 检测波长 245 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃。结果 板蓝根中表告依春的薄层色谱鉴别特征明显, 专属性强, 可与南板蓝根区别; 表告依春的定量测定在 2.4~309.0 μg/mL 呈良好的线性关系, $r=1$; 平均回收率 100.9% (RSD=2.0%)。结论 本方法简单灵敏, 准确可靠, 重现性好, 可完善现行的质量标准, 为提高板蓝根的质量控制方法提供了实验数据, 对于保证其质量和临床疗效具有重要意义。

关键词:板蓝根; 质量标准; 表告依春; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0478-03

板蓝根为常用中药, 始载于《神农本草经》, 《中国药典》1985 年版开始收载, 2005 年版规定板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 从 2000 年版开始, 马蓝 [南板蓝根 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek.] 不再被列入板蓝根范围内。板蓝根具有清热解毒, 凉血利咽之功效。用于温毒发斑, 舌绛紫暗, 痄腮, 喉痹, 烂喉丹痧, 大头温疫, 丹毒, 痈肿等, 临床上常用于治疗病毒性疾病及细菌性感染疾病^[1,2]。

从《中国药典》1985 年版收载板蓝根药材至现行版, 均无专属性指标成分用于该药材的质量标准研究。板蓝根中的表告依春是抗病毒的主要活性成分之一^[3,4], 对其定量测定虽已有文献报道^[5,6], 但尚未见系统评价板蓝根药材与饮片质量的相关报道。

本研究选择表告依春为指标成分, 首先用 MTT 法测定了表告依春是否具有淋巴细胞毒性, 结果表明对淋巴细胞无毒性^[7]。在此基础上建立表告依春的定性定量分析方法, 完善现行的质量标准, 为提高板蓝根的质量控制方法提供了实验数据, 对保证其质量具有重要意义。

1 仪器与试剂

硅胶 GF₂₅₄ 预制板 (烟台化学工业研究所 SGF₂₅₄ 200 × 100, 批号 060414); 双槽展开缸; 薄层色谱仪 (Reprostar, 瑞士 CAMAG 公司); 1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司, 包括四元泵、自动

进样器、柱温箱、检测器、工作站); 甲醇 (色谱纯); 磷酸 (色谱纯); 水 (纯净水); 其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。表告依春对照品 (上海中药标准化研究中心提供, 质量分数 > 98%)。

板蓝根药材 10 批, 板蓝根饮片 (净片) 12 批, 南板蓝根药材 2 批, 由上海中药标准化研究中心吴立宏博士收集并鉴定, 标本保存在上海中药标准化研究中心。

2 定性鉴别

取定量测定项下制备的样品溶液 10 mL, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取表告依春对照品, 加甲醇溶解, 制成 0.5 mg/mL 对照品的溶液。照薄层色谱法 (附录 B) 试验, 吸取上述两种溶液各 5~10 μL, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以石油醚-醋酸乙酯 (1:1) 为展开剂, 预饱和 15 min, 展开, 取出晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的荧光淬灭斑点, 见图 1。表告依春的 R_f 值约为 0.45。

3 定量测定

3.1 色谱条件: Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.02% 磷酸 (7:93); 检测波长 245 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃; 进样量 10 μL, 见图 2。

3.2 对照品溶液的制备: 精密称取表告依春对照品

收稿日期: 2009-06-24

基金项目: 国家药典委员会项目 (yz-168, yz-169); 上海市科委科研计划项目 (08DZ1970103, 06DZ19737); 上海市教委科研项目 (08CZ07)

作者简介: 王 瑞 (1973—), 女, 辽宁省本溪市人, 副教授, 研究方向为中药活性成分与质量标准化。

Tel: (021) 51322181 E-mail: ellewangtcm@gmail.com

* 通讯作者 王峥涛 Tel: (021) 51322507 Fax: (021) 51322519 E-mail: wangzht@shutcm.edu.cn

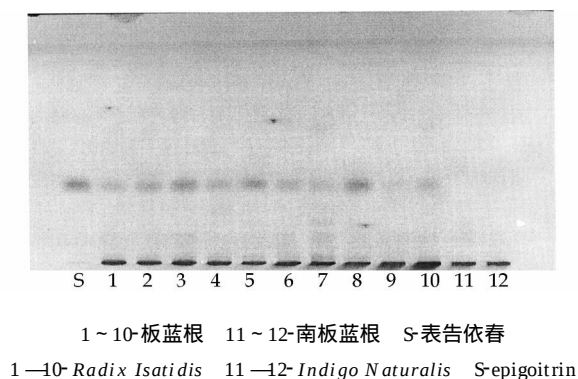


图 1 板蓝根的薄层色谱图 (UV 254 nm)

Fig 1 TLC Chromatogram of *Radix Isatidis* at UV 254 nm

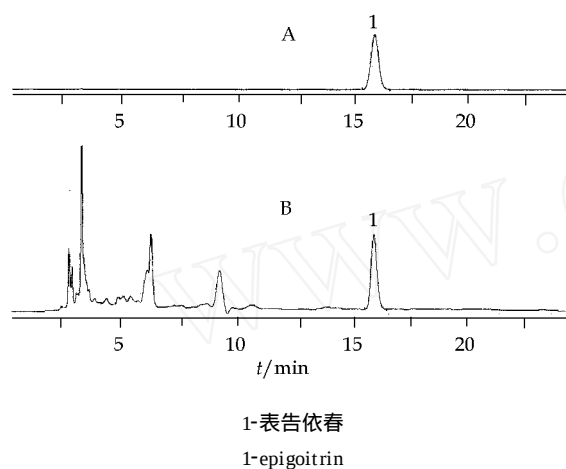


图 2 表告依春对照品 (A) 和板蓝根 (B) 的 HPLC 图

Fig 2 HPLC Chromatograms of epigoitrin reference substance (A) and *Radix Isatidis* (B)

适量,加甲醇制成 40 μg/mL 的溶液,即得。

3.3 供试品溶液的制备:取样品粗粉约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理 (功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

3.4 线性关系考察:取表告依春对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含表告依春 0.3 mg/mL 对照品贮备溶液。分别精密吸取不同体积的对照品储备溶液,制成系列浓度溶液,按上述色谱条件测定,进样 10 μL,分别以对照品的浓度 (X) 为横坐标,峰面积积分值 (Y) 为纵坐标,得回归方程为 $Y = 63.734 X + 0.3036$, $r = 1$,线性范围 2.4~309.0 μg/mL。

3.5 检测限和定量限:取对照品溶液,用甲醇依次稀释制成系列浓度由高到低的溶液,测得表告依春的检测限 ($S/N = 3$) 为 0.24 ng,定量限 ($S/N = 10$) 为 0.72 ng ($RSD = 2.0\%$)。

3.6 精密度试验:取同一供试品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,测得表告依春色谱峰面积的 RSD 为 0.2%,精密度良好。

3.7 重现性试验:取同一样品 6 份,精密称定,按“供试品溶液制备”项下操作,在上述色谱条件下进样测定,计算表告依春质量分数的 RSD 为 0.5%,重现性良好。

3.8 稳定性试验:取样品粉末约 2.0 g,精密称定,按“供试品溶液制备”项下操作,在上述色谱条件下,分别于 0、1、4、8、16、24、48 h 测定,测得表告依春色谱峰面积的 RSD 为 2.3%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

3.9 加样回收实验:取已测定的板蓝根样品粉末 9 份,约 1.0 g,精密称定,分别按已知量的 50%、100%、150% 3 个水平加入表告依春对照品,按“供试品溶液制备”项下操作,在上述色谱条件下进样测定,测得回收率为 100.9% ($RSD = 2.0\%$)。

3.10 样品测定:分别取板蓝根样品粉末约 2.0 g,精密称定,按“供试品溶液制备”项下操作,制成供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,结果见表 1。

表 1 板蓝根中表告依春的定量测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of epigoitrin in *Radix Isatidis* ($n = 3$)

编号	商品名	产地	收集地	表告依春/ %
1	板蓝根 (药材)	安徽	安徽	0.023 8
2	板蓝根 (药材)	安徽	亳州	0.034 6
3	板蓝根 (药材)	不详	辽宁	0.029 1
4	板蓝根 (药材)	不详	上海	0.066 3
5	板蓝根 (药材)	甘肃	上海华宇药业有限公司	0.055 1
6	板蓝根 (药材)	安徽	上海华宇药业有限公司	0.047 1
7	板蓝根 (药材)	安徽	四川成都	0.035 4
8	板蓝根 (药材)	甘肃武威	浙江中医药大学饮片厂	0.004 2
9	板蓝根 (药材)	河北祁州	浙江中医药大学饮片厂	0.006 7
10	板蓝根 (药材)	甘肃陇西	浙江中医药大学饮片厂	0.024 5
11	板蓝根 (饮片)	安徽	安徽	0.018 2
12	板蓝根 (饮片)	不详	河北安国	0.051 3
13	板蓝根 (饮片)	河北	河北安国	0.052 2
14	板蓝根 (饮片)	不详	上海花木华氏	0.061 2
15	板蓝根 (饮片)	安徽	亳州沪谿	0.064 5
16	板蓝根 (饮片)	河南	河南中原正信	0.078 1
17	板蓝根 (饮片)	安徽	西部药都	0.101 0
18	板蓝根 (饮片)	甘肃	河北安国	0.066 7
19	板蓝根 (饮片)	黑龙江	哈尔滨三棵树	0.079 6
20	板蓝根 (饮片)	甘肃武威	浙江中医药大学饮片厂	0.074 7
21	板蓝根 (饮片)	河北祁州	浙江中医药大学饮片厂	0.040 0
22	板蓝根 (饮片)	甘肃陇西	浙江中医药大学饮片厂	0.064 8
23	南板蓝根 (饮片)	不详	上海雷允上中药饮片厂	—
24	南板蓝根 (饮片)	不详	上海雷允上中药饮片厂	—

4 讨论

4.1 薄层色谱条件的选择:分别考察了不同的展开系统,如石油醚-醋酸乙酯、石油醚-醋酸乙酯-冰醋

酸、石油醚-丙酮、氯仿-甲醇等,在此基础上进行优化,结果表明以石油醚-醋酸乙酯(1:1)作为展开剂斑点相对位置和重现性好。比较了国家药典委员会规定使用的5种硅胶预制板:HPTLC-Fertigoplat-ten Nano-DURASIL-20 UV₂₅₄,德国MN,批号502059;Pre-coated TLC-plates SIL G25 UV₂₅₄,德国MN,批号501027;烟台化学工业研究所 HS-GF₂₅₄,批号080527;烟台化学工业研究所 SGF₂₅₄,批号060414;手铺板 GF₂₅₄薄层色谱用硅胶,青岛海洋化工厂,0.5%羧甲基纤维素钠水溶液,厚度0.4 mm,结果表明均可以对板蓝根中的表告依春进行定性鉴别,在保证重复性的前提下,以选择价格易于接受为原则,推荐使用国产普通预制硅胶板。分别观察在5种不同湿度下的展开情况:用不同浓度的硫酸溶液控制薄层板的相对湿度,结果显示湿度在32%~88%时均能获得较好的效果。分别在室温(20~25℃)及低温(10~4℃)展开,结果显示温度影响相对较小。

4.2 表告依春 HPLC 定量测定条件的选择

4.2.1 供试品溶液制备方法:对提取溶液(乙醇、甲醇、80%甲醇、50%甲醇)、提取方法(冷浸、超声振荡、直接回流)、提取时间(15、30、60 min)和提取溶剂量(10倍、20倍)进行考察,最终确定提取方法为80%甲醇20 mL 超声提取30 min。

4.2.2 耐受性试验:对不同品牌和型号色谱柱(Shiseido C₁₈ MG,Ultimate AQ-C₁₈,Agilent XDB-C₁₈,Agela venusil-MP C₁₈,VARIAN Polaris C₁₈-A;250 mm×4.6 mm,5 μm)、流动相比比例变化(5:95~9:91)、柱温(25~40℃)、检测波长(235~255 nm)、体积流量(0.8~1.2 mL/min)进行考察,按定量测定色谱条件以及改变色谱条件后进样分析,测得表告依春量以及相对标准偏差、分离度符合定量

测定要求。因此,板蓝根中的表告依春定量测定条件较宽,具有较好的耐受性。

4.3 本研究对10批板蓝根药材和12批板蓝根饮片进行定性定量分析。结果表明,各样品均可检出表告依春,南板蓝根中不含有表告依春,与HPLC试验结果一致,具有特征性和专属性。定量测定结果表明表告依春在各样品中量差异较大,有必要对其质量进行控制。

2005年版《中国药典》板蓝根(P.142)鉴别项下(3)以精氨酸对照品作为TLC鉴别依据,无定量测定方法。精氨酸虽然也可作为指标建立定性方法,但并非板蓝根的特征性成分,缺乏专属性。表告依春为板蓝根的特征性成分,专属性强,可与南板蓝根相区别,为活性成分,所具有的活性与板蓝根药材的功效接近。因此本研究选择表告依春为指标成分建立板蓝根药材与饮片的质量标准,方法简便,准确可靠,重现性好。广泛收集各地样品,结果具有一定的代表性,为板蓝根新质量标准的制定提供依据。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.1985,2000,2005.
- [2] 吴佩颖,王景敏.板蓝根本草考证[J].上海中医药大学上海市中医药研究院学报,1996,10(1):50-52.
- [3] 黄芳,陈渊成,刘晓东.板蓝根总生物碱中表告依春在发热大鼠体内的药动学-药效学结合模型研究[J].中草药,2007,38(10):1514-1519.
- [4] 黄芳,熊雅婷,徐丽华,等.板蓝根不同提取物中抗病毒成分表告依春在大鼠体内的药代动力学[J].中国药科大学学报,2006,37(6):519-522.
- [5] 安益强,贾晓斌,陈彦,等.HPLC法测定不同产地板蓝根中表告依春[J].中草药,2008,39(11):1739-1741.
- [6] 安益强,贾晓斌,袁海建,等.HPLC测定板蓝根药材及其制剂中表告依春的含量[J].中国中药杂志,2008,33(18):2074-2076.
- [7] 谢冰芬,吴萍,刘宗潮,等.阿诺宁各组分的抗肿瘤活性和急性毒性比较研究[J].中草药,2007,38(8):1199-1202.

《中草药》、《中国药学杂志》及陈新谦、陈常青荣获 “新中国60年有影响力的期刊及期刊人”

为纪念新中国诞辰60周年,表彰和鼓励对期刊事业做出重要贡献的期刊和期刊工作者,总结经验,促进期刊行业健康发展,中国期刊协会、中国出版科学研究所联合举办了“新中国60年有影响力的期刊及期刊人”推选活动。经过各地、各行业期刊协会和专家评审委员会的严格评审,中国药学会主办期刊《中草药》、《中国药学杂志》及《中国药学杂志》副主编陈新谦、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员分别荣获“新中国60年有影响力的期刊及期刊人”称号。

[本刊讯]