

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.12.03

# 板蓝根注射液的 HPLC 特征图谱研究

王亚芳<sup>1</sup>, 段文龙<sup>2</sup>, 周艳飞<sup>1\*</sup>, 李 滢<sup>1</sup>, 张连彦<sup>1</sup>, 钟昆芮<sup>1</sup>

(1. 北京市兽药监察所, 北京 102629, 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-09-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 12-0012-05 [中图分类号] S859.2

**[摘要]** 建立了板蓝根注射液 HPLC 特征图谱。采用 Waters Atlantis T3 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) 色谱柱, 以甲醇为流动相 A, 水为流动相 B, 进行梯度洗脱; 流速为 0.8 mL/min; 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长 250 nm。板蓝根注射液的色谱图基本相同, 检出特征共有峰有 9 个。该方法简便, 灵敏度高, 重复性好, 结果准确可靠, 可作为板蓝根注射液有效的鉴别和质量评价方法。

**[关键词]** 板蓝根; 板蓝根注射液; 高效液相色谱法; 特征图谱

## HPLC Characteristics Spectrum of Banlangen Injection Research

WANG Ya-fang<sup>1</sup>, DUAN Wen-long<sup>2</sup>, ZHOU Yan-fei<sup>1\*</sup>, LI Han<sup>1</sup>,ZHANG Lian-yan<sup>1</sup>, ZHONG Kun-rui<sup>1</sup>

(1. Beijing Veterinary Drug Monitoring Institute, Beijing 102629, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHOU Yan-fei, E-mail: 1956437829@qq.com

**Abstract:** To establish HPLC profile of Banlangen injection, the Waters Atlantis T3 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) column was used. With methanol as mobile phase A and water as mobile phase B, gradient elution was performed. The flow rate was 0.8 mL/min; the column temperature was 30  $^{\circ}\text{C}$ ; the detection wavelength was 250 nm. The chromatograms of Banlangen injection were basically the same. There are 9 common peaks for the detected features. This method is simple, sensitive and reproducible. The results are accurate and reliable, and can be used as an effective method for identification and quality evaluation of Banlangen injection.

**Key words:** *Isatis indigotica* fort; Banlangen injection; HPLC; characteristic spectrum

板蓝根系十字花科植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 的干燥根, 性寒、味苦, 具有清热解毒、凉血利咽的功效, 为我国常用中药材, 其药材和制剂质量控制方法经多年研究探索, 正往多指标系统性质量

控制方向发展。近 10 年间, 板蓝根及其制剂指纹图谱研究通过改变流动相系统、优化梯度洗脱程序以获得更多共有峰信息, 并采用 LC-ESI-MS<sup>n</sup> 鉴定结构和对照品指认的方法, 确定共有峰中氨基

基金项目: 科技部国家重点研发计划专项(2017YFD0501503)

作者简介: 王亚芳, 高级工程师, 从事兽药质量控制方面工作。

通讯作者: 周艳飞。E-mail: 1956437829@qq.com

酸类、核苷类、黄酮类、嘌呤和靛蓝、靛玉红等成分<sup>[1-4]</sup>。板蓝根指纹图谱研究为特征图谱研究提供了有力支撑,形成了(R,S)-告依春为参照峰,特征峰为尿苷、腺苷的板蓝根特征图谱以及表告依春为参照峰,特征峰为尿苷、鸟苷、腺苷的板蓝根特征图谱等。特征图谱色谱条件进一步简化流动相为甲醇-磷酸溶液系统<sup>[5-6]</sup>。板蓝根注射液是一种常见兽药品种,在治疗家禽流感、仔猪黄痢方面具有良好的治疗效果,兽医临床应用范围尝试逐渐拓宽,如治疗畜禽败血霉形体感染、水貂阿留申病等<sup>[7-9]</sup>,目前收录于《兽药质量标准》2017年版中。在现行的质量标准中只包括对其中的精氨酸、亮氨酸、L-脯氨酸进行薄层鉴别和对(R,S)-告依春组分进行含量测定<sup>[10]</sup>。为了从整体上控制板蓝根注射液的质量,同时进一步控制原料质量和生产工艺的稳定性,本实验采用高效液相色谱法,综合现有板蓝根及其制剂特征图谱标定的特征峰,参考现行的质量标准<sup>[10]</sup>板蓝根注射液(R,S)-告依春含量测定法使用甲醇-水系统,建立了板蓝根注射液的HPLC特征图谱分析方法,为进一步全面控制板蓝根注射液的质量提供了技术依据。

## 1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters e2695 液相色谱仪, Waters 2998 PDA 检测器(美国沃特世公司); METTLER XS205 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); DTL 500 型超声波清洗机(北京德泰隆科技发展有限责任公司); Milli-Q 型超纯水仪(Advantage A10)。

1.2 材料 甲醇为色谱纯;水为超纯水;(R,S)-告依春对照品(批号 111753-201706,含量 100.0%,中国食品药品检定研究院);尿苷对照品(批号 111887-201803,含量 99.5%,中国食品药品检定研究院);鸟苷对照品(批号 111977-201501,含量 93.6%,中国食品药品检定研究院);腺苷鸟苷对照品(批号 111879-201703,含量 99.7%,中国食品药品检定研究院);板蓝根注射液样品 14 批,来源见表 1。

表 1 板蓝根注射液样品信息

样品编号	来源
S1	山西省芮城县红宝兽药有限责任公司
S2	成都中牧生物药业有限公司
S3	山西省芮城科龙兽药有限公司
S4	芮城绿曼生物药业有限公司
S5	成都乾坤动物药业股份有限公司
S6	重庆方通动物药业有限公司
S7	成都科锐动物药业有限公司
S8	河南中盛动物药业有限公司
S9	四川恒通动物制药有限公司
S10	开封嘉骏生物科技有限公司
S11	自配样品,药材产地黑龙江省齐齐哈尔市泰来县
S12	自配样品,药材产地黑龙江省齐齐哈尔市泰来县
S13	自配样品,药材产地黑龙江省大庆市
S14	自配样品,药材产地黑龙江省大庆市

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Waters Atlantis T3 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) 色谱柱,以甲醇为流动相 A,以水为流动相 B,按表 2 中的规定进行梯度洗脱;流速为 0.8 mL/min;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长为 250 nm;进样体积 10  $\mu\text{L}$ 。

表 2 板蓝根注射液特征图谱梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~3	3	97
3~10	3→5	97→95
10~20	5→10	95→90
20~30	10	90
30~40	10→15	90→85
40~65	15	85
65~66	15→3	85→97
66~80	3	97

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 (R,S) - 告依春对照品、尿苷对照品、鸟苷对照品和腺苷对照品各 5 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加 5% 甲醇适量, 超声溶解后并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 2 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用 5% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品混标溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取板蓝根注射液样品, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 检测波长的选择 以 PDA 检测器进行全波长扫描, 比较板蓝根注射液样品在 200 ~ 400 nm 的吸收谱图, 发现板蓝根注射液在 250 nm 波长处得到的色谱峰响应值较理想, 且各峰分离良好。

## 2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一份样品, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 各色谱峰相对保留时间的  $RSD < 0.2\%$ , 各色谱峰峰面积的  $RSD < 2\%$ , 结果表明仪器系统精密度良好。

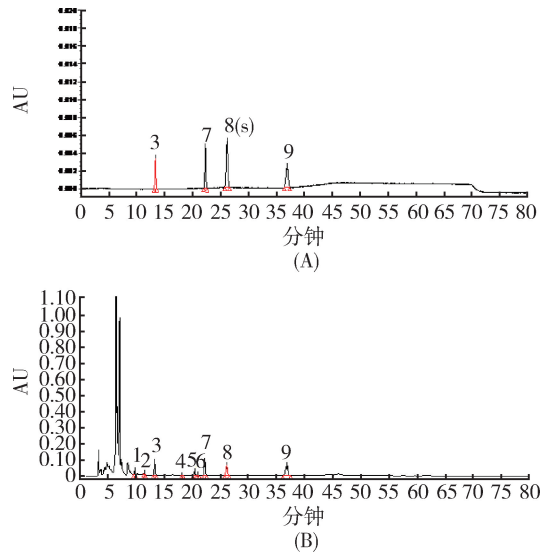
2.5.2 稳定性试验 取同一份样品, 按上述色谱条件测定, 分别在 0、2、4、8、16、24、30 h 检测, 各色谱峰相对保留时间的  $RSD < 0.5\%$ , 结果表明板蓝根注射液样品稳定。

## 2.6 板蓝根注射液特征图谱的建立及相似度评价

2.6.1 特征图谱的建立 在上述色谱条件下, 测定混合对照品溶液及板蓝根注射液样品, 将色谱图的数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 以 S2 样品色谱图为参照图谱, 采用平均数相关系数法进行多点校正, 时间窗宽度 0.1 s, 进行自动匹配, 建立共有模式, 共建立 9 个共有峰, 得到典型色谱图见图 1, 不同批次样品叠加图见图 2, 板蓝根注射液样品部分放大图见图 3。

2.6.2 共有峰的确认 将 9 个共有峰与对照品色谱图比对, 确认其中的 3 号峰为尿苷, 7 号峰为鸟苷, 8 号峰为 (R,S) - 告依春, 9 号峰为腺苷, 由于 (R,S) - 告依春是板蓝根药材中的质控指标组分, 并且在注射液中的含量相对较高, 因此, 设定为参考峰, 标记为峰 S。计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间, 结果表明各特征峰的相对保留时间  $RSD <$

1.8%, 具有较好的重现性。按照技术要求, 初步得到板蓝根注射液的特征图谱的技术参数 (表 3)。



(A. 对照品, B 板蓝根注射液样品. ; 3. 尿苷, 7. 鸟苷, 8. (R,S) - 告依春, 9. 腺苷)

图 1 板蓝根注射液样品和对照品的 HPLC 色谱图  
Fig 1 HPLC chromatogram of samples and reference materials of Banlangen injection

表 3 板蓝根注射液 HPLC 特征图谱中特征峰保留时间  
Tab 3 Characteristic peak retention time in HPLC characteristic spectrum of Banlangen injection

峰号	保留时间/min	相对保留时间	相对保留时间 $RSD/\%$
1	9.5	0.361	1.8
2	11.3	0.432	0.8
3	13.0	0.498	0.7
4	18.1	0.690	0.3
5	20.3	0.775	0.3
6	21.0	0.800	0.2
7	22.2	0.849	0.2
8(S)	26.2	1.000	—
9	37.2	1.420	0.3

2.6.3 相似度评价结果 将 14 批板蓝根注射液样品数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得出相似度评价结果表 (表 4)。

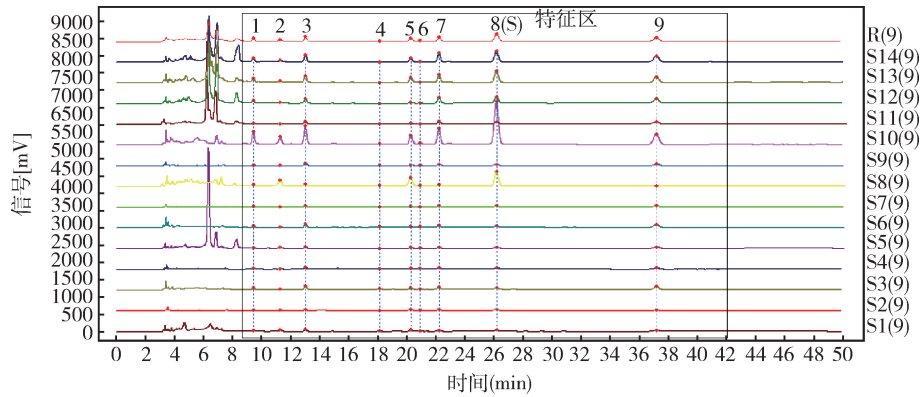


图 2 板蓝根注射液样品不同批次叠加图谱

Fig 2 Overlay spectrum of different batches of Banlangen injection samples

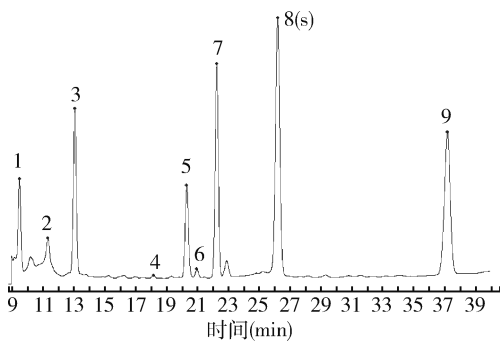


图 3 板蓝根注射液样品部分放大图

Fig 3 Partial enlargement of Banlangen injection sample

表 4 样品特征图谱与对照图谱的相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results of sample characteristic spectrum and reference characteristic spectrum

样品编号	相似度
S1	0.867
S2	0.966
S3	0.817
S4	0.925
S5	0.898
S6	0.815
S7	0.926
S8	0.827
S9	0.860
S10	0.974
S11	0.910
S12	0.954
S13	0.995
S14	0.986

### 3 讨论与结论

3.1 色谱柱的选择 本文共测试 4 支色谱柱,另外 3 支分别是 Agilent HC - C18(2)、Agilent Eclipse XDB - C18、Waters SunFire™ C18,虽然都能较好的分离板蓝根注射液中的组分,但是相对保留时间差异较大,RSD 约为 8%。因此,本实验需要固定色谱柱型号,使用 Atlantis T3 柱来检测特征图谱,9 个共有组分的相对保留时间 RSD 均小于 5%,满足实验要求。

3.2 检测波长的选择 本文采用 PDA 检测器,由各组分的光谱图可以得出最大吸收波长:若检测波长为 260 nm(尿苷和腺苷最大吸收波长)时,告依春响应值最低,由于告依春是主要成分,在色谱图中峰高较小,若含量低时可能检不出;若检测波长为 240 nm(告依春最大吸收波长)和 245 nm(常用波长)时,腺苷组分响应值最低,若含量低时可能检不出;比较检测波长 250、252、254 nm 时,3 种核苷类组分响应值相似,告依春组分是在 250 nm 响应最大,因此,最终选用 250 nm 作为检测波长。

3.3 不同生产企业、不同产地药材的差异 样品 S1 ~ S10 来自不同生产企业,板蓝根药材也来自不同产地,药材品质也存在不同。相似度评价结果表明 14 批样品中只有 8 批其相似度均在 0.90 以上,说明不同来源的样品间相似度有差异,但是并不影响特征峰的判断。

本文所建立特征图谱与现行标准<sup>[10]</sup>板蓝根注射液(R,S) - 告依春高效液相色谱法含量测定方

法相比,梯度洗脱条件不同、检测波长更优化。本方法在尽可能获得更多共有峰的同时可使包括(R,S)-告依春在内的所有特征峰出峰时间适宜、分离度良好、峰形更佳。板蓝根注射液特征图谱未见报道,本方法与已报道的板蓝根药材或其制剂特征图谱相比,特征峰选择更接近现行标准质量控制指标成分,流动相系统由甲醇-磷酸溶液系统简化为甲醇-水系统,与同流动相系统指纹图谱比较标定了更多特征峰、特征峰分离度更好。

迄今为止,尚无公认能反映板蓝根内在质量的指标成分用于控制其药材及制剂的质量,现行的标准<sup>[10-11]</sup>主要在高效液相色谱法测定(R,S)-告依春的含量、薄层色谱法鉴别氨基酸类成分等方面对板蓝根注射液进行质量控制。本实验采用 HPLC-PDA 法,建立板蓝根注射液 HPLC 特征图谱,灵敏度更高,准确性更好。板蓝根注射液特征图谱中 9 个特征峰包括(R,S)-告依春、核苷类成分和另外 5 个特征性成分,能更好、更全面地表达中药复杂体系,有效评价板蓝根注射液内在质量的稳定性和均一性。该方法简便灵敏,重复性好,进一步优化洗脱条件能提升分离效果,获得更多成分信息,可作为板蓝根注射液有效的鉴别和质量评价方法,是现行标准的有益补充,为中兽药标准化提供参考。

**参考文献:**

[1] 闫峻,刘舒,皮子凤,等.复方板蓝根颗粒抗病毒成分 HPLC-UV 指纹图谱及 LC-ESI-MS<sup>n</sup> 研究[J]. 化学学报,2011,69(2):204-208.  
Yan Jun, Liu Shu, Pi Zi-feng, et al. Studies on Fingerprint Chromatograms of Anti-virus Component of Compound Indigowoad Root Granule by HPLC-UV and LC-ESI-MS<sup>n</sup> [J]. Acta Chimica Sinica,2011,69(2):204-208.

[2] 孟岩,范丽芳,张兰桐,等.河北道地药材板蓝根 HPLC 指纹图谱研究[J]. 河北医药,2012,34(11):1720-1723.  
Meng Yan, Fan Li-fang, Zhang Lan-tong, et al. Study on HPLC Fingerprint of Radix Isatidis from Hebei Province [J]. Hebei Medical Journal,2012,34(11):1720-1723.

[3] 董敬翠. 板蓝根颗粒的指纹图谱质量控制研究[J]. 中国新技术新产品,2018,(15):3-4.  
Dong Jing-cui. Study on Quality Control of Fingerprint of

Banlangen Granules[J]. China's new technology and new products, 2018,(15):3-4.

[4] 张剑光,陈明,何敏,等.板蓝根 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中药材,2019,42(2):361-364.  
Zhang Jian-guang, Chen Ming, He Min, et al. Study on HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of Radix Isatidis [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2019,42(2):361-364.

[5] 康建,阚全程,张晓坚,等.板蓝根药材中水溶性成分高效液相特征图谱[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(14):1153-1155.  
Kang Jian, Que Quan-cheng, Zhang Xiao-jian, et al. Studies on HPLC fingerprint chromatogram of water-soluble chemical constituent in Radix Isatidis [J]. Chin Hosp Pharm J,2013,33(14):1153-1155.

[6] 殷世宁,张春辉,王海英.板蓝根特征图谱及 3 种成分含量测定研究[J]. 中国药业,2018,27(24):15-18.  
Yin Shi-Ning, Zhang Chun-hui, Wang Hai-ying. Study on Specific Chromatograms of Isatidis Radix and Content Determination of Three Components in Isatidis Radix [J]. China Pharmaceuticals, 2018,27(24):15-18.

[7] 吕华林.中药板蓝根在兽医临床上的应用[J]. 动物科学与动物医学,2001,(2):78.  
Lü-Linhua. Application of Chinese medicine Banlangen in veterinary clinic [J]. Animal Science& Veterinary Medicine,2001,(2):78.

[8] 舒宝丽.板蓝根液治疗水貂阿留申病[J]. 当代畜禽养殖业,2004,(10):38.  
Shu Bao-Li. Banlangen solution for treatment of leech Aleutian disease [J]. Modern Animal Husbandry,2004,(10):38.

[9] 李丹.板蓝根在兽医临床上的应用研究[J]. 今日畜牧兽医,2019,35(4):70-71.  
Li-Dan. Application of Banlangen in veterinary clinic [J]. Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2019,35(4):70-71.

[10] 中国兽药典委员会.《兽药质量标准(中药卷)》2017 年版 [M]. 北京:中国农业出版社,2017:10  
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Drug Quality Standard 2017 Edition Chinese Medicine Roll [M]. Beijing: China Agricultural Press,2017:10

[11] 中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典(二部)》2015 年版 [M]. 北京:中国农业出版社,2016:9  
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China veterinary pharmacopoeia (Part 2) 2015 edition [M]. Beijing: China Agricultural Press,2016:9