

一测多评法测定板蓝根中 6 种化学成分的含量

黄 远, 董福越, 李楚源, 王德勤*

广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

摘要: 目的 建立板蓝根 *Isatis indigotica* 中(R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷 6 种不同类成分的一测多评方法。方法 采用 HPLC 法, 以(R, S)-告依春为内参物, 建立了(R, S)-告依春与胞苷、鸟苷、尿苷、腺苷和直铁线莲宁 B 的相对校正因子, 并考察相对校正因子的耐用性和重现性。比较外标法和一测多评法对新疆软紫草中 6 种成分的测定结果。结果 各相对校正因子重复性良好, 一测多评法测定结果与外标法测定结果无显著差异。结论 建立同时测定 6 种成分的一测多评法控制板蓝根的质量准确、可靠。

关键词: 板蓝根; 一测多评法; (R, S)-告依春; 直铁线莲宁 B; 胞苷; 鸟苷; 尿苷; 腺苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0845-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.028

Simultaneous quantitative determination of 10 chemical constituents in *Radix isatidis* by QAMS method

HUANG Yuan, DONG Fu-yue, LI Chu-yuan, WANG De-qin

Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish a new method for the quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) and simultaneously determine six different components in *Isatis indigotica*. **Methods** The (R, S)-goitrin was used as internal marker to calculate the relative correlation factors (RCF) of clemastanin B, cytidine, uridine, guanosine and adenosine by HPLC, and examine the durability and reproducibility of the RCF. The external standard method and QAMS were compared to determine the six components in *I. indigotica*. **Results** The repeatability of RCF was good. The results calculated with QAMS were consistent with the results by the external standard method. **Conclusion** The QAMS method for simultaneously measuring the content of six components is accurate and reliable to evaluate the quality of *I. indigotica*.

Key words: *Isatis indigotica* Fortune; QAMS; (R, S)-goitrin; clemastanin B; cytidine; uridine; guanosine; adenosine

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fortune 的干燥根, 主要含有木脂素类、生物碱类、核苷类等活性成分, 具有清热解毒、凉血利咽的功效^[1]。现代药理学研究表明, 木脂素(lignan)具有抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤和保肝等多种药理活性和重要的应用价值^[2-9]。核苷(nucleoside)是中成药抗病毒的活性成分^[10-13], 在板蓝根药材中含量较高且易溶于水, 对板蓝根及其制剂的疗效和质量影响较大; 板蓝根的生物碱类(alkaloids)成分能够抗炎、抗病毒、解热^[14]。然而, 现行《中国药典》板蓝根的含量测定项下仅采用 HPLC 测定水提液中的(R, S)-告依春的含量作

为质量控制指标, 对板蓝根尚未建立完善的质量控制方法^[15-16]。因此, 多成分、多指标的控制方法对评价功效多样、成分复杂的板蓝根的质量研究有重要意义^[17-21]。本研究采用一测多评(QAMS)技术, 选取价廉易得的生物碱类化合物(R, S)-告依春作为参照物, 建立其与木脂素类化合物直铁线莲宁 B 以及核苷类化合物胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的相对校正因子, 实现通过只测定板蓝根的(R, S)-告依春的含量, 用校正因子计算出另外 5 种木脂素类和核苷类成分的含量, 从而简便快捷、全面准确地对板蓝根进行多指标的质量评价, 有助于保证该产品的质量可控和疗效稳定, 同时节约检测

收稿日期: 2020-06-09

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目(2017M622652); 广东省名优中成药二次开发项目(20174005)

作者简介: 黄 远(1986—), 男, 博士后, 研究方向为中药学。E-mail: huangyuan@pku.edu.cn

*通信作者: 王德勤(1971—), 教授级高级制药工程师, 研究方向为中药学。E-mail: chuanping99@126.com

成本和时间。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); UltiMate 3000 系列高效液相色谱仪 (美国 Thermo Scientific Technologies 公司); Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 色谱柱 Agilent ZORBAX-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 Waters Xbridge-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 Phenomenex Kinetex-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); BT 214D 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); CP225D 型电子分析天平 (Sartorius AG 公司)

1.2 试药

对照品 (R, S)-告依春 (批号 111753-201706, 质量分数为 99.9%)、尿苷 (批号 110887-201803, 质量分数为 99.5%)、鸟苷 (批号 111977-201501, 质量分数为 93.6%)、腺苷 (批号 110879-201703, 质量分数为 99.7%) 均由中国食品药品检定研究院提供, 胞苷 (批号 B20073, 质量分数为 98%) 由源叶生物有限公司提供, 直铁线莲宁 B (批号 hysC201811, 质量分数为 99%) 由广州呼研所制药有限公司提供。甲醇 (色谱纯, 美国 Tedia 公司), 甲醇 (分析纯, 广州化学试剂厂), 水为超纯水。

板蓝根 (批号 1807003、1805015、1808008、1805011、1805012、1805013、18wdct、18bjz、18nm、18dtly、18mLsb、18gjwzc、1805010、1806004、18nxgy、2017dq、1805014、18dtxh、18mLxt、18esyc、18dsc、18ftkfq、18gfc) 由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 3% B; 3~20 min, 3%~8% B; 20~25 min, 8%~22% B; 25~35 min, 22% B; 35~36 min, 22%~25% B; 36~48 min, 25% B; 48~50 min, 25%~90% B; 50~60 min, 90% B; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 254、230 nm; 进样体积 10 μL。色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取 (R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞

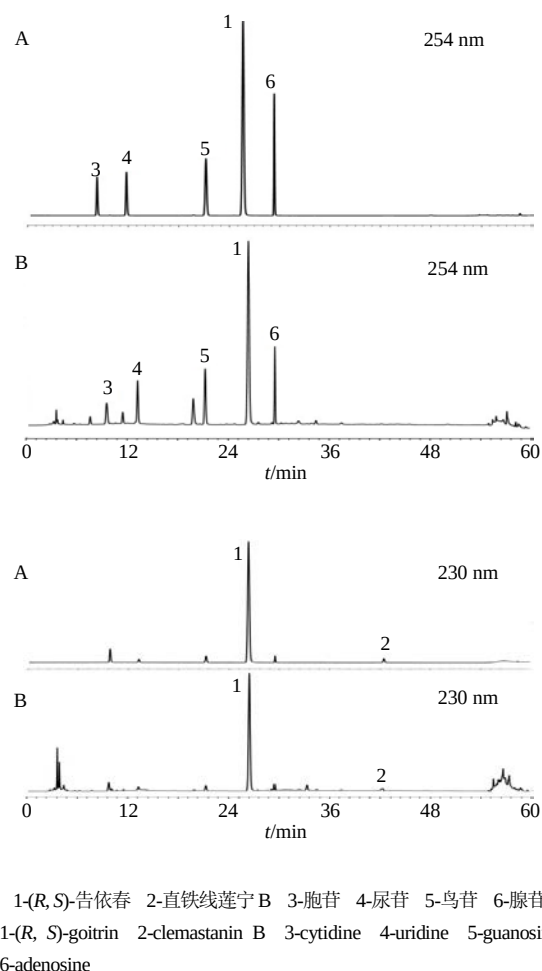


图 2 混合对照品 (A) 与板蓝根样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed references (A) and sample (B)

苷、尿苷、鸟苷和腺苷对照品适量, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含 (R, S)-告依春质量浓度为 28.96、57.92、115.8、289.60、579.20 μg/mL, 直铁线莲宁 B 质量浓度为 3.2、6.4、12.7、25.4、63.6 μg/mL、胞苷质量浓度为 2.2、4.3、8.6、17.3、43.2 μg/mL, 尿苷质量浓度为 3.8、7.7、15.4、30.7、76.8 μg/mL, 鸟苷质量浓度为 3.8、7.8、15.5、31.0、77.6 μg/mL 和腺苷质量浓度为 2.8、5.6、11.2、22.4、56.0 μg/mL 的混合对照品溶液, 并于 4 °C 冰箱中避光保存, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取板蓝根药材 1 g (过 60 目筛), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 5% 甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声提取 (40~50 °C, 250 W, 80 kHz) 1 h, 放冷, 称定质量, 用 5% 甲醇补足超声

过程减失的质量, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取 6 个系列浓度的混合对照品溶液, 各 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 测定各对

照品的峰面积, 取平均值。以各溶液质量浓度 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行回归处理, 得 (R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷的线性方程和相关系数 (R^2)。结果表明, 各对照品的进样量与峰面积均呈良好的线性关系 (表 1)。

表 1 6 种成分的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of six components

化合物	线性方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
(R, S)-告依春	$Y=4\ 114\ 716.7 X+55\ 633.1$	0.999 9	29.0~579.2
直铁线莲宁 B	$Y=1\ 946\ 856.0 X+29\ 259.8$	0.999 5	3.2~63.6
胞苷	$Y=6\ 767\ 976.7 X+30\ 894.2$	0.999 6	2.2~43.2
尿苷	$Y=4\ 548\ 213.8 X-39\ 436.4$	0.999 7	3.8~76.8
鸟苷	$Y=7\ 967\ 219.7 X-61\ 922.7$	0.999 8	3.9~77.6
腺苷	$Y=10\ 823\ 019.5 X-70\ 016.2$	0.999 6	2.8~56.0

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 10 μL , 按“2.1”项下条件, 连续进样 6 次。结果显示在 230 nm 下, (R, S)-告依春、直铁线莲宁 B 的 RSD 分别为 0.33%、0.58%; 在 254 nm 下(R, S)-告依春、胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.35%、0.58%、0.45%、0.41%、0.45%。

2.4.3 重复性试验 取批号为 1808008 的板蓝根药材, 按照“2.3”项平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下条件, 进行测定, 在 254 nm 下(R, S)-告依春、胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.81%、1.56%、1.96%、1.65%、3.15%; 在 230 nm 下(R, S)-告依春、直铁线莲宁 B 的 RSD 分别为 1.04%、1.79%。

2.4.4 稳定性试验 取批号为 1808008 的板蓝根药材, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 室温放置, 于 0、8、12、16、20、24 h, 按“2.1”项下条件进样测定, 在 254 nm 下(R, S)-告依春、胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的 RSD 分别为 0.85%、1.88%、1.36%、0.87%、6.84%; 在 230 nm 下, (R, S)-告依春、直铁线莲宁 B 的 RSD 分别为 0.5%、1.72%。腺苷的峰面积在不同时间段波动较大, 说明板蓝根供试品溶液中(R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷在室温放置 24 h 内稳定性良好, 但是腺苷不稳定。

2.4.5 加样回收试验 取已测定的样品 (批号 1808008) 9 份, 精密称定, 分别精密加入相当于供试品中待测成分含量的 50%、100%、150% 的混合对照品溶液, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶

液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得到 (R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷和鸟苷的平均加样回收率分别为 98.25%、99.57%、100.53%、102.29%、102.59%、99.30%, RSD 分别为 2.25%、2.45%、3.35%、1.62%、2.96%、2.79%。结果见 2。

2.5 相对校正因子 ($f_{k/m}$) 的建立

精密吸取混合对照品溶液 5、10、15、20、30 μL , 按“2.1”项下色谱条件测定, 每个浓度分别进样 3 次, 取平均值, 记录各对照品的色谱峰面积, 根据 $f_{k/m}$ 计算公式^[2-3]。计算待评价成分直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷的相对校正因子 (表 2)。

$$f_{k/m} = f_k / f_m = (W_k \times A_m) / (W_m \times A_k)$$

W_k 为 (R, S)-告依春内标物的含量, A_k 为 (R, S)-告依春内标物的峰面积, W_m 为被测指标组分 m 的含量, A_m 为被测成分 m 的峰面积

2.6 $f_{k/m}$ 的耐用性评价

2.6.1 不同色谱柱对 $f_{k/m}$ 的影响 取“2.2”项下的混合对照品溶液, 分别精密吸取 10 μL , 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱, 分别在 Agilent 1260、Agilent 1100、Waters2695-2996 高效液相色谱仪上进样检测, 求算以 (R, S)-告依春作为参照成分时, 5 种成分的 $f_{k/m}$, 结果说明 $f_{k/m}$ 在使用不同仪器时的耐用性良好, 结果见表 3。

考察了 Agilent ZORBAX C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Xbridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Kinetex C₁₈ (250 mm×

4.6 mm, 5 μ m) 共 3 种色谱柱对各成分 $f_{k/m}$ 的影响。使用以上色谱柱各成分均能达到较好的分离效果, 结果胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷、直铁

线莲宁 B 的 RSD 依次为 2.69%、3.41%、3.15%、3.09%、2.60%。表明色谱柱的更换对各成分 $f_{k/m}$ 无显著影响 (表 3)。

表 2 5 种成分的 $f_{k/m}$ Table 2 Relative correction factors ($f_{k/m}$) of five components

进样量/ μ L	$f_{k/m}$				
	胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	直铁线莲宁 B
5	0.765 6	1.000 6	1.437 2	1.384 3	0.227 4
10	0.780 6	1.037 8	1.455 3	1.424 4	0.230 7
15	0.804 0	1.046 1	1.512 5	1.448 1	0.235 1
20	0.822 4	1.073 9	1.539 7	1.481 1	0.237 2
30	0.856 1	1.117 2	1.604 8	1.538 6	0.250 3
平均值	0.805 8	1.055 1	1.510 0	1.455 3	0.236 1
RSD/%	4.41	4.12	4.46	4.01	3.73

表 3 不同色谱柱对 $f_{k/m}$ 的影响Table 3 $f_{k/m}$ of different columns

不同色谱柱	$f_{k/m}$				
	胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	直铁线莲宁 B
Agilent ZORBAX	0.770 2	1.008 2	1.452 2	1.394 2	0.240 6
Waters Xbridge	0.796 3	1.042 3	1.526 9	1.450 1	0.229 4
phenomenex Kinetex	0.812 5	1.079 3	1.540 2	1.482 2	0.230 9
均值	0.793 0	1.043 3	1.506 4	1.442 2	0.233 6
RSD/%	2.69	3.41	3.15	3.09	2.60

2.6.2 不同流动相体积流量对 $f_{k/m}$ 的影响 考察了不同体积流量 (1.0、1.1、1.2 mL/min) 对各成分 $f_{k/m}$ 的影响。结果表明 (表 4), 各成分的 RSD 依次为 1.30%、0.33%、0.79%、1.00%、2.16%。表明体流量的波动对各成分 $f_{k/m}$ 无明显影响。

2.6.3 不同仪器对 $f_{k/m}$ 的影响 考察了不同仪器 (安捷伦 1260、戴安 U-3000、沃特世 2695) 对各成分 $f_{k/m}$ 的影响, 结果 (表 5) 各成分的 RSD% 依次为 2.91%、3.11%、3.32%、4.16%、3.09%。表明仪器的更换对各成分 $f_{k/m}$ 无显著影响。

表 4 不同体积流量对 $f_{k/m}$ 的影响Table 4 $f_{k/m}$ factor of different flow rates

体积流量/(mL $\cdot$ min $^{-1}$)	$f_{k/m}$				
	胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	直铁线莲宁 B
1.0	0.808 3	1.075 9	1.509 0	1.465 8	0.235 2
1.1	0.802 3	1.070 4	1.503 3	1.456 4	0.245 1
1.2	0.822 8	1.076 9	1.526 3	1.458 2	0.237 6
均值	0.811 1	1.074 4	1.512 9	1.469 1	0.239 3
RSD/%	1.30	0.33	0.79	1.00	2.16

表 5 不同仪器对 $f_{k/m}$ 的影响Table 5 $f_{k/m}$ of different instruments

不同仪器	$f_{k/m}$				
	胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	直铁线莲宁 B
安捷伦 1260	0.770 2	1.008 2	1.452 2	1.392 7	0.240 6
戴安 U3000	0.729 0	0.948 6	1.360 9	1.281 6	0.253 7
沃特世 2695	0.737 8	0.969 0	1.425 2	1.347 1	0.254 2
均值	0.745 7	0.975 3	1.412 8	1.340 5	0.249 5
RSD/%	2.91	3.11	3.32	4.16	3.09

2.7 色谱峰定位参数考察

为了在仅采用 (R, S)-告依春为对照品时, 能够确认直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷色谱

峰的位置, 从而通过获得的相对校正因子同时计算另外 5 种成分的含量, 达到一测多评的目的, 考察了采用不同仪器、不同色谱柱和不同实验人员

时直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷和 (R, S)-告依春色谱峰之间的保留时间差和相对保留时间 2 个参数。考察结果发现, 另外 5 种成分和参照物 (R, S)-告依春之间的保留时间差波动较大, 而相对保留时间波动较小, RSD 均小于 5% (表 6、7)。因此, 可利用相对保留时间进行定位。

表 6 不同因素对保留时间差值的影响

Table 6 Influence of different factors on retention time difference

影响因素	型号	保留时间差值				
		胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	直铁线莲宁 B
不同色谱柱	Agilent ZORBAX	15.758	13.017	4.794	5.545	17.853
	Waters Xbridge	14.502	12.381	6.128	4.798	13.609
	phenomenex Kinetex	11.933	10.119	3.789	7.432	17.574
	均值	14.064	11.839	4.904	5.925	16.345
	RSD/%	12.75	11.51	17.44	22.91	14.52
不同仪器	安捷伦 1260	15.758	13.017	4.794	5.545	17.853
	戴安 U3000	17.215	13.825	4.600	3.948	22.665
	Waters2695	14.136	11.811	4.432	7.133	23.076
	平均值	15.703	12.884	4.609	5.542	21.198
	RSD/%	9.81	7.87	3.93	28.74	13.70
不同实验人员	A	15.342	12.504	4.579	5.535	18.782
	B	15.51	12.672	4.753	5.266	18.155
	C	15.394	12.539	4.954	5.093	19.014
	平均值	15.415	12.572	4.762	5.298	18.650
	RSD/%	0.56	0.71	3.94	4.20	2.38

表 7 不同因素对相对保留时间的影响

Table 7 Influence of different factors on relative retention time

影响因素	型号	相对保留时间				
		胞苷	尿苷	鸟苷	腺苷	直铁线莲宁 B
不同色谱柱	Agilent ZORBAX	0.316	0.435	0.792	1.241	1.775
	Waters Xbridge	0.336	0.441	0.748	1.285	1.718
	phenomenex Kinetex	0.313	0.410	0.746	1.341	1.880
	均值	0.322	0.429	0.762	1.289	1.791
	RSD/%	3.88	3.86	3.45	3.92	4.58
不同仪器	安捷伦 1260	0.316	0.435	0.792	1.241	1.775
	戴安 U3000	0.323	0.456	0.819	1.155	1.891
	Waters2695	0.306	0.420	0.782	1.252	1.937
	均值	0.315	0.437	0.798	1.216	1.868
	RSD/%	2.76	4.18	2.38	4.35	4.47
不同实验人员	A	0.389	0.502	0.468	1.220	1.432
	B	0.387	0.500	0.473	1.208	1.421
	C	0.377	0.493	0.452	1.206	1.467
	均值	0.385	0.498	0.464	1.211	1.440
	RSD/%	1.64	0.95	2.36	0.65	1.65

2.8 QAMS 法与外标法结果比较研究

采用了 HPLC 法, 以 (R, S)-告依春作为“一测多评”的参照成分, 测定其在板蓝根中的含量, 并通过测得的直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷的 $f_{k/m}$, 分别计算出这 5 种成分的含量。同时, 使用

外标法测定了板蓝根中 (R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷和腺苷的含量, 将外标法测定含量与 QAMS 法计算的含量采用相对偏差法进行比较, 从而验证 QAMS 法用于测定板蓝根中的多种类成分测定的准确性 (表 8)。

表 8 QAMS 法与外标法测定 26 批药材中 6 种成分的比较

Table 8 Comparison of determination of six components in 26 batches of medicinal materials by QAMS and ESM

批号	(R, S)-告依春/(mg·g ⁻¹)	直铁线莲宁 B/(mg·g ⁻¹)		胞苷/(mg·g ⁻¹)		胞苷/(mg·g ⁻¹)		尿苷/(mg·g ⁻¹)		鸟苷/(mg·g ⁻¹)	
	外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
1807003	3.882 8	0.297 6	0.294 0	0.294 3	0.299 3	0.339 1	0.345 8	0.309 2	0.311 6	0.385 5	0.390 6
1805015	3.415 1	0.145 4	0.143 7	0.536 1	0.545 1	0.591 2	0.602 8	0.568 9	0.573 3	0.624 1	0.632 3
1808008	4.371 7	0.226 4	0.223 7	0.308 3	0.313 4	0.309 0	0.315 0	0.349 6	0.352 3	0.463 6	0.469 7
1805011	3.930 9	0.061 8	0.061 1	0.390 3	0.396 8	0.508 2	0.518 2	0.425 5	0.428 7	0.430 8	0.436 5
1805012	4.318 7	0.197 2	0.194 8	0.419 0	0.426 0	0.559 1	0.570 1	0.449 0	0.452 4	0.281 4	0.285 1
1805013	3.308 4	0.113 1	0.111 8	0.412 0	0.418 9	0.388 8	0.396 4	0.356 7	0.359 4	0.403 7	0.409 0
18wdct	5.279 7	0.500 0	0.493 8	0.526 8	0.535 6	0.571 7	0.582 9	0.623 5	0.628 3	0.645 3	0.653 8
18bjz	2.762 5	0.191 4	0.189 1	0.434 9	0.442 2	0.547 9	0.558 6	0.539 0	0.543 1	0.448 7	0.454 6
18nm	3.572 5	0.283 1	0.279 6	0.538 9	0.547 9	0.680 7	0.694 0	0.741 1	0.746 8	0.700 1	0.709 3
18dtly	4.276 8	0.374 9	0.370 3	0.485 3	0.493 4	0.545 3	0.556 0	0.588 6	0.593 1	0.654 4	0.663 0
18mLsb	3.914 8	0.386 9	0.385 5	0.455 0	0.456 3	0.453 5	0.462 5	0.498 7	0.498 4	0.274 0	0.275 9
18gjwzv	2.993 1	0.291 7	0.302 9	0.268 8	0.267 6	0.465 6	0.472 3	0.398 8	0.397 0	0.522 9	0.523 3
1805010	3.372 9	0.654 5	0.679 6	0.497 2	0.495 1	0.623 8	0.632 8	0.636 3	0.633 5	0.738 1	0.738 7
1806004	4.272 8	0.475 4	0.493 6	0.436 6	0.434 7	0.541 2	0.549 0	0.406 1	0.404 3	0.294 9	0.295 1
18nxgy	3.024 2	0.324 8	0.337 2	0.345 6	0.344 1	0.472 0	0.478 9	0.422 6	0.420 7	0.506 2	0.506 6
1805013	3.319 1	0.176 2	0.183 0	0.257 2	0.256 0	0.341 3	0.346 3	0.288 1	0.286 9	0.367 7	0.368 0
1805014	2.897 0	0.106 0	0.110 1	0.412 3	0.410 5	0.548 8	0.556 8	0.434 8	0.432 8	0.472 5	0.472 9
18dtxh	4.882 0	0.605 6	0.628 8	0.374 4	0.372 7	0.513 3	0.520 7	0.497 2	0.495 0	0.574 0	0.574 5
18mLxt	3.631 7	0.380 4	0.394 9	0.331 6	0.330 1	0.391 0	0.396 7	0.377 9	0.376 3	0.464 4	0.464 8
18esyc	4.340 8	0.329 3	0.342 0	0.296 2	0.294 9	0.451 5	0.458 1	0.435 2	0.433 2	0.327 1	0.327 4
18dsc	5.328 6	0.903 2	0.937 8	0.446 8	0.444 9	0.514 0	0.521 5	0.541 7	0.539 3	0.642 6	0.643 1
18ftkfq	3.683 8	0.511 0	0.530 6	0.277 6	0.276 4	0.504 4	0.511 7	0.491 4	0.489 2	0.532 4	0.532 8
18gfc	3.807 2	0.322 7	0.335 0	0.279 2	0.277 9	0.456 7	0.463 3	0.409 4	0.407 6	0.465 4	0.465 8

3 讨论

3.1 测定波长的选择

本研究测定的化学成分种类较多, 包括核苷类、生物碱类和木脂素类, 共 6 种化合物。采用 DAD 全波长扫描对照品溶液, 分别对(R, S)-告依春、直铁线莲宁 B、胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷进行紫外波长扫描。结果显示, (R, S)-告依春和胞苷、尿苷、鸟苷、腺苷在 254 nm 处同时有较大吸收, (R, S)-告依春和直铁线莲宁 B 在 230 nm 处同时有较大的吸收, 且干扰少, 峰形良好, 基线平稳, 因此检测波长最终设定为 254 nm 和 230 nm。

3.2 内标物和质量控制指标的选择

现有 QAMS 法测定(R, S)-告依春和核苷类成分的研究^[1], 但是该方法选择腺苷作为内标物, 测定了(R, S)-告依春、鸟苷、尿苷、胞苷的含量。本研究发现腺苷并不稳定, 不适合作为内标物和质量控制指标成分; 而其他核苷类成分和(R, S)-告依春较稳定, 板蓝根中另一关键抗病毒性成分直铁线莲宁 B 亦有良好的稳定性, 均可作为质量控制指标成分; 且(R, S)-告依春与其他 5 种成分都可实现同波长下的较大吸收。因此, 本研究选择(R, S)-告依春为内标物, 结果显示各成分的相对校正因子稳

定, 重现性良好。

3.3 QAMS 法用于板蓝根质量控制的合理性

本研究的相对标准偏差表明, 外标法和 QAMS 法计算的含量相似性极高, 表明 2 种含量测定方法计算得到的含量值之间无显著性差异。此外, 在不同高效液相色谱仪、不同色谱柱等条件下均有良好的重复性。板蓝根中化学成分众多, 以外标法测定各成分含量需要对照品的数量多, 部分对照品价格昂贵且难以获取, 采用 QAMS 法测定各成分含量能极大的减少对照品使用数量, 节约成本, 增加检测便利性。因此, QAMS 法用于板蓝根质量控制具有极高的实用性、便利性和科学性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 205.
- [2] 郭铁英, 李名扬. 木脂素类化合物的研究进展 [J]. 现代农业科技, 2008(9): 199-201.
- [3] 孙彦君, 王雪, 陈辉, 等. 四氢呋喃型木脂素类化合物研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3067-3079.
- [4] Li J, Zhou B X, Li C F, et al. Lariciresinol-4-O-β-D-glucopyranoside from the root of *Isatis indigotica*

- inhibits influenza A virus-induced pro-inflammatory response [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174:379-386.
- [5] 王璐, 赵烽, 刘珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 467-470.
- [6] Li Z, Li L, Zhou H, et al. *Radix isatidis* polysaccharides inhibit influenza a virus and influenza A virus-induced inflammation via suppression of host TLR3 signaling in vitro [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 22-29.
- [7] Yang Z, Wang Y, Zheng Z, et al. Antiviral activity of *Isatis indigotica* root-derived clemastanin B against human and avian influenza A and B viruses in vitro [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4): 867-873.
- [8] 陈勇, 李祥, 陈建伟, 等. HPLC 法测定板蓝根颗粒中直铁线莲宁 B 和异落叶松脂素的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(6): 53-56.
- [9] 何立巍, 李祥, 陈建伟, 等. HPLC 法测定板蓝根中落叶松脂素-4,4'-二-O- β -D-二葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1895-1897.
- [10] 辛敏通, 傅欣彤, 陈有根, 等. 快速液相色谱法同时测定板蓝根颗粒中 4 种核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1571-1573.
- [11] 林丽君, 聂黎行, 戴忠, 等. 板蓝根的研究概况 [J]. 中国药业, 2015, 24(21): 1-4.
- [12] 杨建昕, 李峰, 李娜, 等. 板蓝根抗病毒活性成分研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(7): 141-143.
- [13] 赵亚丽. 板蓝根药材中 3 种核苷高效液相法测定含量分析 [J]. 实用中医药杂志, 2017, 33(12): 1458-1459.
- [14] 何立巍, 吴晓培, 杨婧妍, 等. 板蓝根总生物碱的提取纯化工艺及其抗病毒药理作用研究 [J]. 中成药, 2014, 36(12): 2611-2614.
- [15] 何洁英, 何洁宝, 王汝上. 板蓝根总生物碱 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 62-64.
- [16] 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.
- [17] 杨洋, 黄良永, 朱美玲, 等. 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用 [J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1738-1741.
- [18] 池絮影, 崔曰新, 张蜀, 等. 一测多评法测定板蓝根颗粒中 4 种成分的含量 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(10): 137-140.
- [19] 王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展 [J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.
- [20] 唐安福, 李思, 王银娟, 等. 一测多评法在中药化学成分分析中的应用及其研究进展 [J]. 中南药学, 2014, 12(2): 144-147.
- [21] 钱秀玉, 聂黎行, 戴忠, 等. UPLC-MS/ELSD 法快速检测板蓝根颗粒及组分中的糖类成分 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1267-1272.

[责任编辑 时圣明]