

数字化指纹图谱整合多指标测定策略的板蓝根品质评价

梁海伟^{1,3}, 王佳美^{1,3}, 董媛媛^{1,3}, 杨烨鑫^{1,3}, 任海琴², 许文鹃², 张 静², 李桐彤², 孔祥鹏^{2,3*}, 李慧峰^{2*}

1. 山西振东五和堂制药有限公司, 山西 长治 046100

2. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619

3. 山西省博士创新站(山西振东五和堂制药有限公司站), 山西 长治 046100

摘要: **目的** 基于数字化指纹图谱、多指标成分含量测定整合策略, 对不同产地板蓝根 *Isatidis Radix* 品质进行评价。**方法** 采用 UPLC 方法建立不同产地板蓝根数字化指纹图谱, 通过 *N* 强峰、共有峰等筛选及模糊化处理, 提取得到板蓝根特征指纹谱。测定各产地板蓝根中尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷等指标成分含量。在此基础上, 以板蓝根特征指纹参数与各指标成分含量占比进行整合分析, 探究板蓝根特征指纹总差异率影响因素。**结果** 以(R,S)-告依春为内参计算各样本色谱峰相对保留时间和相对峰面积, 建立了 21 个产地板蓝根 UPLC 数字化指纹图谱。通过各样本色谱峰峰面积占比和(>70%), 筛选得到各样本 13 个 *N* 强峰, 并在共有峰频次(>15)基础上, 得到含有 34 个特征峰的板蓝根特征指纹谱; 不同产地板蓝根特征指纹重叠率、检出率多在 80%~90%, 相比之下, 板蓝根特征指纹总差异率变化更为显著(33%~111%)。含量测定结果表明, 不同产地板蓝根中尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷等指标成分含量存在较大差异。将不同产地板蓝根特征指纹参数与其指标成分含量占比组成进行整合可视化分析, 结果表明, 尿苷、鸟苷、腺苷与各样本特征指纹总差异率呈现二级聚类相关性, 与(R,S)-告依春占比及指标成分总含量呈现三级聚类相关性, 上述指标成分占比过高或过低均会导致板蓝根样本总差异率升高。**结论** 建立的基于数字化指纹图谱整合多指标含量测定方法, 能够有效地发现不同产地板蓝根特征指纹差异率原因, 为不同产地板蓝根品质评价提供了方法参考。

关键词: 板蓝根; 数字化指纹图谱; 特征指纹; 总差异率; 尿苷; 鸟苷; (R,S)-告依春; 腺苷; 整合策略; 品质评价

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)14-5202-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.023

Digital fingerprint profile integration with multi-index determination strategy for quality evaluation of *Isatidis Radix*

LIANG Haiwei^{1,3}, WANG Jiamei^{1,3}, DONG Yuanyuan^{1,3}, YANG Yexin^{1,3}, REN Haiqin², XU Wenjuan², ZHANG Jing², LI Tongtong², KONG Xiangpeng^{2,3}, LI Huifeng²

1. Shanxi Zhendong Wuhetang Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi 046100, China

2. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. Shanxi Province Doctor Innovation Station (Shanxi Zhendong Wuhetang Pharmaceutical Co., Ltd. Station), Changzhi 046100, China

Abstract: Objective To assess the quality variation of Banlangen (*Isatidis Radix*) from different origins using an integrated strategy of digital fingerprinting and multi-index component content determination. **Methods** An ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method was employed to establish digital fingerprints of *Isatidis Radix* from 21 different origins. *N*-strong peaks and common peaks were screened and fuzzified to extract the characteristic fingerprint spectrum of *Isatidis Radix*. Contents of uridine, guanosine, (R,S)-goitrin, and adenosine were quantitatively analyzed using the same UPLC method. Based on this, the integration analysis of

收稿日期: 2025-02-02

基金项目: 山西省重点研发计划项目(202102130501006); 山西省科技厅基础研究计划(20210302124292); 山西省卫生健康委项目(2022081); 山西省高等学校科技创新项目(2021L361); 山西省高等学校教学改革项目(J20241079); 山西中医药大学科技创新能力培育计划项目(2022PY-TH-10, 2024PY-CXY-008); 长治市企业科技特派员项目(20220831)

作者简介: 梁海伟(1983—), 男, 高级工程师, 研究方向为药品生产工艺与质量管理。E-mail: haiwei503@126.com

***通信作者:** 孔祥鹏(1984—), 讲师, 研究方向为中药及其复方药效物质基础及作用机制。E-mail: kong_xiangpeng@sxtcm.edu.cn

characteristic fingerprint parameters and the proportion of index component contents was conducted to explore the influencing factors of the total difference rate of the characteristic fingerprint spectrum. **Results** Relative retention times and peak areas of all samples were calculated using (*R, S*)-goitrin as an internal reference to establish UPLC digital fingerprints. A characteristic fingerprint spectrum comprising 34 peaks was obtained by screening *N*-strong peaks with peak area ratios greater than 70% and common peaks present in over 15 samples. The overlapping and detection rates of characteristic fingerprints among different origins ranged mostly from 80% to 90%, whereas the total difference rate varied significantly, from 33% to 111%. Content determination indicated substantial differences in uridine, guanosine, (*R, S*)-goitrin, and adenosine among *Isatidis Radix* from different origins. Integrated visualization analysis of characteristic fingerprint parameters and the composition of index component contents showed a secondary clustering correlation between uridine, guanosine, adenosine, and the total difference rate, as well as a tertiary clustering correlation with the proportion of (*R, S*)-goitrin and total index component content. Excessively high or low proportions of these components led to increased total difference rates in the *Isatidis Radix* samples. **Conclusion** This integrated approach effectively explains the variations in characteristic fingerprints among different origins of *Isatidis Radix*, offering a robust method for quality evaluation and ensuring the stability and controllability of its preparations.

Key words: *Isatidis Radix*; digital fingerprint spectrum; characteristic fingerprint; total difference rate; uridine; guanosine; (*R, S*)-goitrin; adenosine; integrated strategy; quality evaluation

板蓝根是十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 其性味苦寒, 具有清热解毒、凉血利咽等功效^[1], 被广泛用于瘟疫时毒、发热咽痛、温毒发斑、痄腮及丹毒、痈肿等治疗, 疗效确切^[2-4]。板蓝根在我国分布广泛, 既是临床常用中药, 亦是我国的大宗中药产品之一^[5]。根据《中国药典》2020 年版, 板蓝根中药饮片的含量检测项为(*R, S*)-告依春, 而以板蓝根为主要原料的板蓝根颗粒中成药则以尿苷、鸟苷、腺苷为含量检测项^[1, 6]。因此, 两者在含量测定项上的不一致性, 容易导致在板蓝根中药材、饮片及板蓝根颗粒中成药的质量控制上出现偏差^[7]。此外, 由于板蓝根产地的广泛性, 更加剧了板蓝根中尿苷、鸟苷、(*R, S*)-告依春、腺苷等指标成分的差异性^[8]。且除上述《中国药典》2020 年版规定的指标成分外, 板蓝根中亦存在不同类型的其他效用成分^[9-11], 这些均是板蓝根药材品质的潜在不稳定性因素。这不仅给药品生产企业带来了产品检测不合格的风险, 而且由于质量控制上的顾此失彼, 也给板蓝根及其中成药制剂在临床疗效的发挥带来了极大的不确定性^[12]。

为确保板蓝根及其相关产品的质量与疗效, 建立稳定性好、可控性强的板蓝根品质评价方法至关重要。近年来, 有学者采用现代指纹图谱技术, 基于共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行了板蓝根样本的相似度评价^[13], 采用化学计量学手段进行了板蓝根样本的聚类分析^[14], 或采用现代模式识别技术进行板蓝根样本的分类评价^[15-16]。然而, 上述方法多是基于不同板蓝根样本共有峰基

础上的评价, 这就排除了因产地差异性导致的板蓝根化学类群差异, 而这些排除的差异有可能是多数板蓝根样本所共有的。因此, 上述方法忽略了多数板蓝根样本共有、少数缺失的化学类群, 且多是定性模式下的样本区分。亦有学者采用了多成分定量对板蓝根进行质控, 或与指纹图谱相结合进行了产地归属评价^[6, 17-18], 但它们多是相对分裂的研究, 或仅有结果上的简单关联分析。基于上述, 亟需采用一种能代表所有样本共性, 体现多数样本关键特征, 且能够从多个角度反映出不同样本差异性原因的方法, 以对不同板蓝根样本进行品质评价。

本研究在传统指纹图谱的基础上, 通过 *N* 强峰、共有峰等参数分析, 挖掘并建立不同产地板蓝根特征指纹谱。并以特征指纹差异率为中心, 在尿苷、鸟苷、(*R, S*)-告依春、腺苷等指标成分含量测定基础上, 与特征指纹 *N* 强峰, 特征指纹重叠率、检出率等参数进行系统聚类, 基于数字化指纹图谱整合多指标含量测定策略, 建立能够有效评价板蓝根品质的方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC 超高效液相(美国沃特世公司)、AB135-S 型十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、FA2104 型万分之一分析天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)、SB-800 DTD 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 材料

尿苷（批号 110887-202104）、鸟苷（批号 111977-202202）、腺苷（批号 110879-202204），均购自中国食品药品检定研究院，质量分数均大于 98%；(R,S)-告依春（批号 DST221201-122）购于成

都德斯特生物技术有限公司，质量分数大于 98%。21 批不同产地板蓝根药材，经鉴定，均为十字花科植物菥蓝 *I. tinctoria* L. 的干燥根（表 1）。甲醇（色谱纯，批号 00040203，Grace 有限公司），乙腈（色谱纯，批号 00030281，Grace 有限公司）。

表 1 21 批次不同产地板蓝根样品信息
Table 1 Information of 21 batches of *Isatidis Radix* samples from different origins

编号	品种	产地	编号	品种	产地
S1	大庆产地合作社 1 号	黑龙江	S12	东北 SX6 号	黑龙江
S2	扎旗沙土地 5 号	黑龙江	S13	板蓝根 20221009	黑龙江
S3	大庆华峰合作社 8 号	黑龙江	S14	内蒙 1 号	内蒙古
S4	大庆 0 号	黑龙江	S15	内蒙 2 号	内蒙古
S5	大庆 1 号	黑龙江	S16	内蒙 3 号	内蒙古
S6	大庆 2 号	黑龙江	S17	河北 2 号	河北
S7	大庆 3 号	黑龙江	S18	甘肃 7 号	甘肃
S8	大庆 4 号	黑龙江	S19	甘肃 8 号	甘肃
S9	大庆沙土地 4 号	黑龙江	S20	大庆 5 号	黑龙江
S10	大庆黑土地 3 号	黑龙江	S21	大庆 6 号	黑龙江
S11	板蓝根 8 号	河南			

2 方法与结果

2.1 UPLC 数字化指纹图谱的建立与分析

2.1.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC® HSS T3 C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），以甲醇（A）-0.02%磷酸水溶液（B）为二元流动相进行梯度洗脱（0~1 min，3%A；1~4 min，3%~10%A；4~8 min，10%~70%A；8~10 min，70%A；10~11 min，70%~3%A）；柱温 40 ℃，体积流量为 0.2 mL/min，进样量为 2 μL；检测波长为 245 nm。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别称定尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷等对照品各适量，加 5% 甲醇超声溶解并稀释至 0.50、0.50、1.00、0.50 mg/mL，得到尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷混合对照品母液。

2.1.3 供试品溶液的制备 板蓝根样品粉碎后过 3 号筛，精密称定板蓝根各药材粉末 0.5 g，分别加水至 25 mL 量瓶，摇匀，称定质量。超声提取（功率 250 W、频率 40 kHz）30 min，擦拭外壁干燥后，再次称定质量，用水补足减失的质量，摇匀，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后，取续滤液即得板蓝根各样品供试品溶液。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.3”项下同一板蓝根样品供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，以 (R,S)-告依春（26 号色谱峰）为参照峰，计算各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 值在 1.00%

以内，相对峰面积的 RSD 值在 2.00% 以内，表明仪器的精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.3”项下同一板蓝根样品供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定，同上方法，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1.50%，相对峰面积的 RSD 值均小于 2.50%。

2.1.6 重复性试验 取同一板蓝根样品，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份板蓝根供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件分别进样，同上方法，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1.50%，相对峰面积的 RSD 值均小于 2.00%。

2.1.7 数字化指纹图谱的建立 参考“2.1.3”项下方法制备 21 个产地的板蓝根样品供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件分别进样，记录色谱图。取“2.1.2”项下尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷的混合对照品溶液母液适量，10 倍量甲醇稀释至所需浓度，并按“2.1.1”项下色谱条件分别进样，记录色谱图。通过保留时间、色谱峰光谱图，确认 21 个板蓝根样品色谱图中的尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷 Marker 色谱峰。见图 1。以 (R,S)-告依春为参照峰，计算其余色谱峰的相对保留时间及相对峰面积。在此基础上，设置相对保留时间窗宽度为 0.005，对板蓝根各样品色谱峰校正和对齐，统一不同样品共有色谱峰的相对保留时间。通过不同样品共有色

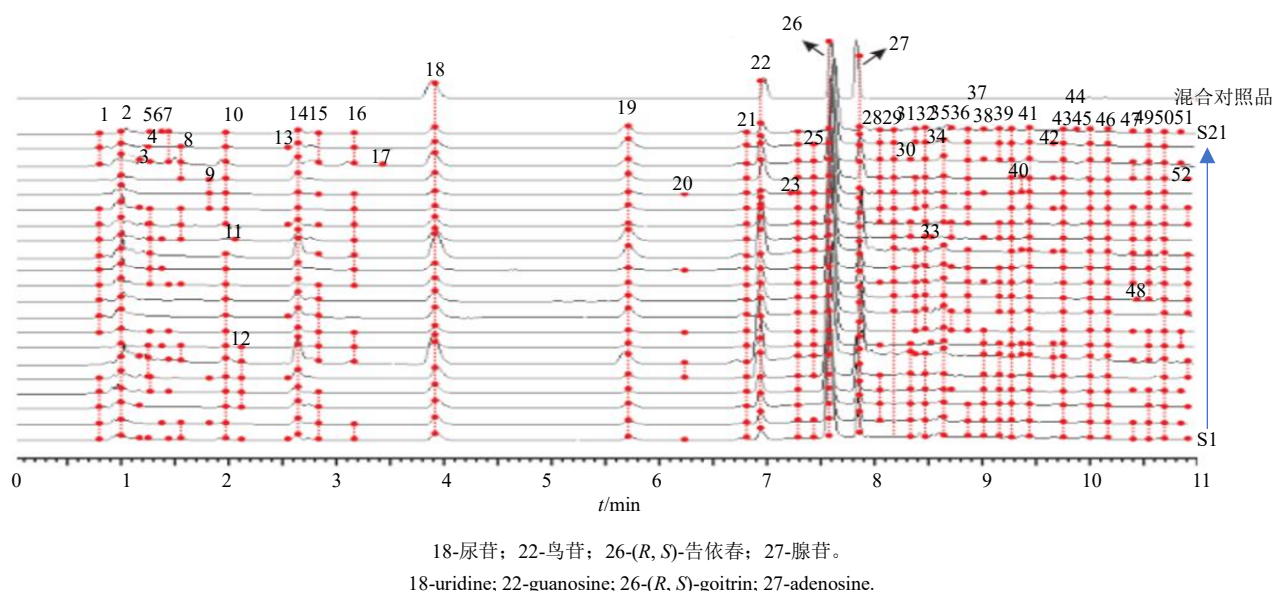


图 1 21 批次板蓝根样品的色谱叠加图及混标色谱图

Fig. 1 Chromatographic overlay of 21 batches of *Isatidis Radix* samples and mixed standards chromatogram

谱峰相对保留时间和相对峰面积值的统一量化描述,建立不同产地板蓝根各样品数字化色谱指纹谱。

2.1.8 数字化指纹图谱 N 强峰分析 根据每个产地板蓝根样品色谱峰峰面积占整个样品该样品所有色谱峰面积总和的比值,对该样品色谱峰面积占比由大到小进行排序,并由大到小进行排序和相加,并选择占峰面积总和 70% 以上的色谱峰为该样品 N 强色谱峰。

综合考虑各样品 N 强峰峰面积总和占比 ($>70\%$), N 强峰的峰总数占比 ($20\% \sim 30\%$),统一板蓝根 N 强峰数目为 13。 N 强峰结果分析表明,21 个板蓝根各样品 13 强峰峰面积总和占比在 $74\% \sim 91\%$ 。此外,不同产地板蓝根各样品共有峰数目区间在 15~21 的相对保留时间峰号有 2、14、18 (尿苷)、19、22 (鸟苷)、26 [(R,S)-告依春]、27 (腺苷)、34、41,峰面积总和占比在 $51\% \sim 84\%$;共有峰数目区间在 6~13 的相对保留时间峰号有 24、25、30、31、32、36、38、43,峰面积总和占比在 $3\% \sim 14\%$;共有峰数目区间在 1~3 的相对保留时间峰号有 4、6、8、15、28、29、35、37、39、45,峰面积总和占比在 $0 \sim 10\%$ 。见表 2。

2.1.9 数字化指纹图谱共有峰分析 不同产地样品共有峰频次分析结果表明,共有峰数目等于 21 的相对保留时间峰号有 2、14、18、19、21、22、24、26、27、29、39、41、43、45、46、50,共有峰数目在 16~20 区间的相对保留时间峰号有 1、10、

15、16、25、32、34、36、38、49,共有峰数目在 10~14 区间的相对保留时间峰号有 5、8、28、30、31、37、47、52,共有峰数目在 6~8 区间的相对保留时间峰号有 4、7、12、20、35、42、51,共有峰数目在 1~5 区间的相对保留时间峰号有 3、6、9、11、13、17、23、33、40、44、48。见图 2。

2.1.10 数字化指纹图谱特征指纹分析 在 N 强峰、共有峰分析基础上,设置特征峰的入选条件,基于模糊化手段,提取板蓝根特征指纹图谱。选择 75% 以上样品均含有的共有峰 (即共有峰数目 >15) 纳入板蓝根特征指纹。并基于模糊化手段,同时纳入 N 强峰 (13 强峰) 作为板蓝根特征指纹峰。统计并计算上述特征峰在 21 个样本中的相对峰面积平均值 (relative peak area average, RPAA)。由结果可知,所纳入的特征指纹峰包含了尿苷 (18)、鸟苷 (22)、(R,S)-告依春 (26)、腺苷 (27) 等对照品色谱峰,及共有峰数大于 15 的 N 强峰,并经模糊化纳入了共有峰数小于 15 的 N 强峰,见表 3。因此,与传统针对共有峰的中药特征指纹研究相比,该模糊化的特征指纹定性信息更全,且具有半定量的特点。

根据公式计算不同产地板蓝根样品特征指纹峰重叠率、检出率、总差异率,结果表明,除第 5、18 (重叠率均为 78%) 号样品外,多数板蓝根样品

重叠率 = (共有特征峰数 $\times 2$) / (模糊化特征指纹谱总峰数 + 特定药材总峰数) (1)

检出率=共有特征峰数/特定药材总峰数

(2)

定药材对应特征峰的相对峰面积/每个特征峰相对峰面积

总差异率=ΣABS(每个特征峰相对峰面积平均值-特

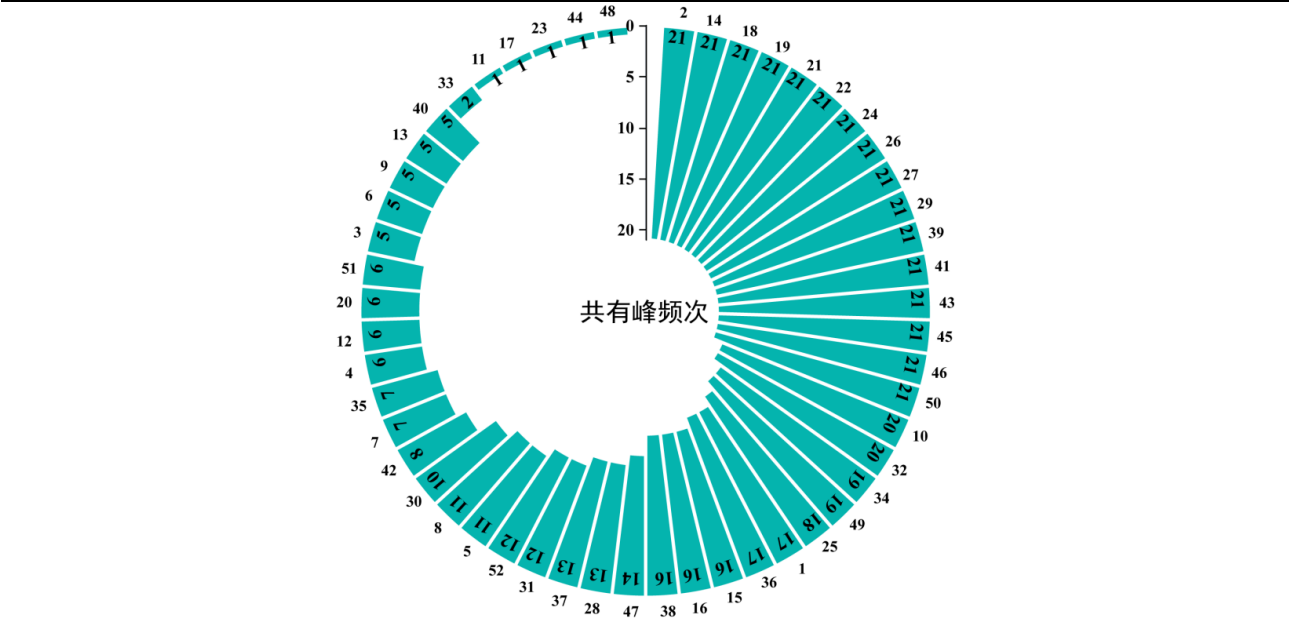
平均值/特定药材总峰数

(3)

表 2 21 批次板蓝根样品的色谱 N 强峰信息

Table 2 Information on N-strong peaks of chromatograms of 21 batches of *Isatidis Radix* samples

编号	N 强峰峰号 (峰面积占比/%)														总占比/%
S1	26S (32.57)	27S (9.41)	34 (5.97)	22S (5.70)	18S (4.72)	2 (4.39)	41 (3.46)	14 (3.19)	30 (2.80)	25 (2.36)	32 (2.22)	24 (2.15)	38 (2.04)	80.96	
S2	26S (35.75)	27S (8.49)	34 (5.29)	2 (5.07)	22S (3.67)	18S (3.67)	43 (2.88)	41 (2.84)	36 (2.69)	30 (2.65)	32 (2.63)	38 (2.45)	14 (2.32)	80.39	
S3	26S (38.20)	27S (8.56)	34 (5.59)	22S (4.51)	18S (4.47)	2 (4.40)	30 (3.17)	14 (3.03)	41 (2.63)	36 (2.58)	38 (2.47)	43 (2.40)	24 (2.35)	84.35	
S4	26S (33.39)	27S (9.14)	2 (5.21)	22S (5.05)	18S (4.58)	14 (3.54)	34 (3.35)	43 (3.13)	30 (3.03)	35 (2.95)	41 (2.82)	19 (2.77)	38 (2.71)	81.66	
S5	26S (36.17)	27S (9.60)	22S (6.72)	2 (5.75)	34 (5.54)	18S (5.51)	14 (3.12)	30 (2.86)	41 (2.74)	25 (2.40)	24 (2.13)	38 (1.61)	29 (1.57)	85.72	
S6	26S (27.42)	27S (11.43)	22S (8.04)	18S (5.43)	34 (4.75)	2 (4.41)	14 (4.17)	41 (2.70)	38 (2.51)	24 (2.02)	43 (1.93)	19 (1.90)	4 (1.810)	78.54	
S7	26S (17.05)	27S (10.50)	22S (9.31)	34 (6.97)	18S (6.41)	30 (5.54)	2 (4.88)	14 (4.78)	41 (3.10)	19 (2.93)	29 (2.54)	24 (2.50)	38 (2.31)	78.81	
S8	26S (36.98)	27S (8.18)	22S (4.08)	34 (4.01)	2 (3.98)	18S (3.58)	43 (3.39)	45 (2.97)	41 (2.94)	39 (2.87)	31 (2.82)	32 (2.34)	19 (2.28)	80.42	
S9	26S (42.27)	27S (8.79)	22S (6.13)	2 (5.79)	18S (4.50)	34 (3.73)	14 (3.53)	41 (2.77)	31 (2.25)	19 (1.96)	25 (1.88)	24 (1.75)	32 (1.75)	87.10	
S10	26S (33.02)	27S (7.66)	34 (5.60)	2 (5.03)	22S (4.75)	18S (3.94)	41 (3.43)	19 (3.43)	43 (3.37)	31 (3.01)	38 (2.88)	36 (2.85)	32 (2.59)	81.55	
S11	26S (35.59)	27S (6.10)	34 (5.06)	2 (5.02)	22S (5.00)	18S (4.22)	19 (3.01)	31 (3.01)	43 (2.64)	14 (2.62)	25 (2.4)	41 (2.37)	24 (2.04)	79.08	
S12	26S (38.53)	27S (9.47)	22S (5.67)	2 (5.63)	18S (4.53)	34 (3.47)	6 (2.54)	14 (2.49)	36 (2.43)	43 (2.38)	31 (2.35)	41 (2.27)	32 (2.00)	83.75	
S13	26S (44.37)	27S (8.87)	22S (5.98)	2 (5.84)	18S (4.37)	34 (4.00)	41 (2.98)	14 (2.58)	39 (2.33)	32 (2.21)	31 (2.00)	36 (1.63)	19 (1.44)	88.59	
S14	26S (21.3)	27S (10.89)	22S (9.63)	18S (6.39)	35 (6.12)	2 (5.64)	14 (4.93)	30 (3.14)	19 (3.12)	41 (2.99)	43 (2.93)	38 (2.56)	24 (2.28)	81.92	
S15	26S (35.72)	22S (7.42)	19 (7.09)	18S (5.77)	2 (4.92)	14 (3.09)	30 (2.77)	41 (2.73)	34 (2.41)	28 (2.22)	25 (2.13)	38 (1.95)	24 (1.94)	80.17	
S16	26S (43.96)	27S (9.48)	22S (8.08)	2 (6.64)	18S (5.5)	14 (3.54)	34 (1.93)	25 (1.84)	24 (1.68)	8 (1.63)	19 (1.58)	31 (1.55)	41 (1.32)	88.78	
S17	26S (52.85)	2 (11.21)	19 (4.28)	34 (3.44)	22S (3.3)	18S (3.29)	41 (2.43)	32 (1.83)	31 (1.58)	37 (1.54)	28 (1.53)	45 (1.24)	14 (1.15)	89.68	
S18	26S (53.08)	2 (9.77)	18S (3.57)	27S (3.56)	19 (3.34)	22S (3.32)	34 (2.84)	41 (2.36)	24 (2.19)	45 (1.79)	14 (1.75)	32 (1.57)	36 (1.53)	90.69	
S19	26S (34.43)	22S (7.54)	27S (7.02)	34 (5.32)	18S (5.15)	2 (3.76)	19 (3.75)	14 (3.05)	43 (2.76)	30 (2.63)	38 (2.51)	41 (2.39)	24 (1.83)	82.13	
S20	26S (24.62)	27S (8.28)	22S (6.02)	18S (5.88)	2 (5.30)	34 (4.27)	4 (3.83)	8 (3.79)	41 (3.35)	38 (3.16)	19 (3.00)	31/ (2.88)	15/ (2.78)	77.15	
S21	26S (28.43)	35 (5.69)	19 (4.92)	2 (4.30)	43 (3.87)	38 (3.84)	31 (3.67)	22S (3.61)	41 (3.48)	18S (3.39)	27S (3.21)	36 (3.11)	28 (2.95)	74.46	



外圈数字代表统一量化后的相对保留时间峰号，内圈数字及色柱高低代表与外圈相对应的共有峰频次。
Numbers on the outer circle represent the uniformly quantified relative retention time peak numbers, while the numbers and the height of the color columns on the inner circle represent the frequency of the corresponding common peaks.

图 2 21 批次板蓝根样品的共有峰频次分析
Fig. 2 Frequency analysis of common peaks in 21 batches of *Isatidis Radix* samples

表 3 板蓝根特征指纹

Table 3 Characteristic fingerprint of *Isatidis Radix*

α (峰号)	频次	RPAA	α (峰号)	频次	RPAA	α (峰号)	频次	RPAA
0.115 (1)	17	0.018 4	0.915 (22)	21 (N/S)	0.188 3	1.165 (36)	17 (N)	0.047 1
0.135 (2)	21	0.161 7	0.955 (24)	21 (N)	0.061 8	1.180 (37)	13 (N)	0.037 4
0.160 (4)	6 (N)	0.077 9	0.975 (25)	18 (N)	0.052 3	1.195 (38)	16 (N)	0.080 1
0.180 (6)	5 (N)	0.054 9	1.000 (26)	21 (N/S)	1.000 0	1.215 (39)	21 (N)	0.039 0
0.205 (8)	11 (N)	0.033 9	1.035 (27)	21 (N/S)	0.243 0	1.235 (41)	21 (N)	0.085 8
0.260 (10)	20	0.026 0	1.050 (28)	13 (N)	0.039 1	1.275 (43)	21 (N)	0.066 0
0.350 (14)	21 (N)	0.093 7	1.070 (29)	21 (N)	0.051 1	1.310 (45)	21 (N)	0.051 9
0.370 (15)	16 (N)	0.026 2	1.090 (30)	10 (N)	0.110 1	1.330 (46)	21	0.036 5
0.415 (16)	16	0.011 0	1.095 (31)	12 (N)	0.066 8	1.380 (49)	19	0.006 9
0.520 (18)	21 (N/S)	0.148 1	1.110 (32)	20 (N)	0.055 2	1.410 (50)	21	0.022 6
0.755 (19)	21 (N)	0.087 1	1.135 (34)	19 (N)	0.134 7			
0.890 (21)	21	0.023 6	1.140 (35)	7 (N)	0.101 1			

α 代表相对保留时间; N、S 分别代表 N 强峰和参照峰。
 α represents the relative retention time; N and S represent N-strong peak and reference peak, respectively.

特征峰重叠率在 80%~91%; 特征峰检出率结果表明, 除第 5、9、10、13 (检出率均为 76%)、18 (检出率为 74%) 号样品, 其余样品特征峰检出率在 79%~91%; 总差异率结果表明, 第 1、2、3、4、6、11、12、15、19 号样品总差异率在 30%~41%, 第 5、8、9、10、13、16 号样品总差异率在 42%~55%, 第 7、14、17、18、20、21 号样品总差异率在 56%~111%。见图 3。

利用 “CNSKnowall” 绘图平台, 将 21 批板蓝根样本的特征指纹峰重叠率、检出率、总差异

率为参量, 采用欧几里得距离 (Euclidean distance) 和完全链接法 (complete linkage) 进行系统聚类分析, 并基于分析结果绘制热图 (图 4), 进行可视化。

结果表明, 与特征指纹峰重叠率、检出率相比, 21 个不同产地板蓝根样品的总差异率差异更为显著。由结果可知, 21 个不同产地板蓝根样品聚为 2 个大类, 第 2、15、4、11、6、1、19、8、3、12、13、16、5、9、10 为第 1 类, 其余样品为第 2 类, 且后者的总差异率普遍偏高。见图 4。

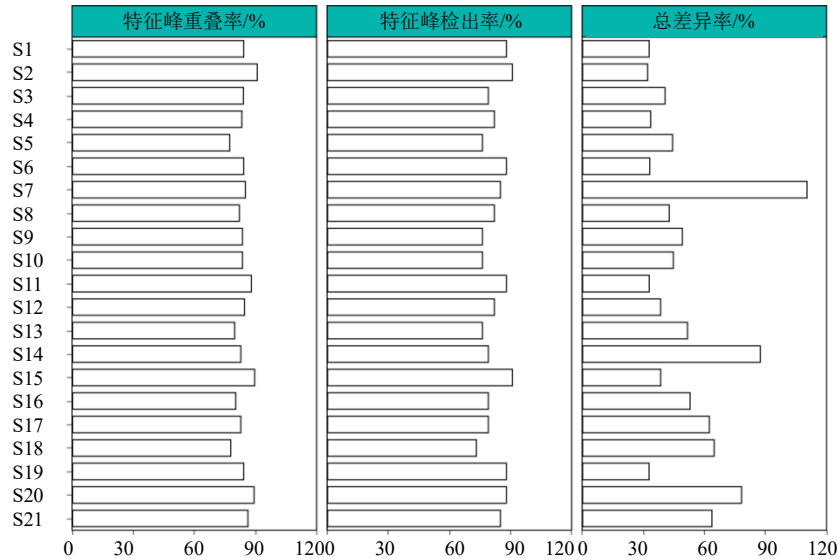


图 3 21 批次板蓝根样品的特征指纹参数分析
Fig. 3 Characteristic fingerprint parameter analysis of 21 batches of *Isatidis Radix* samples

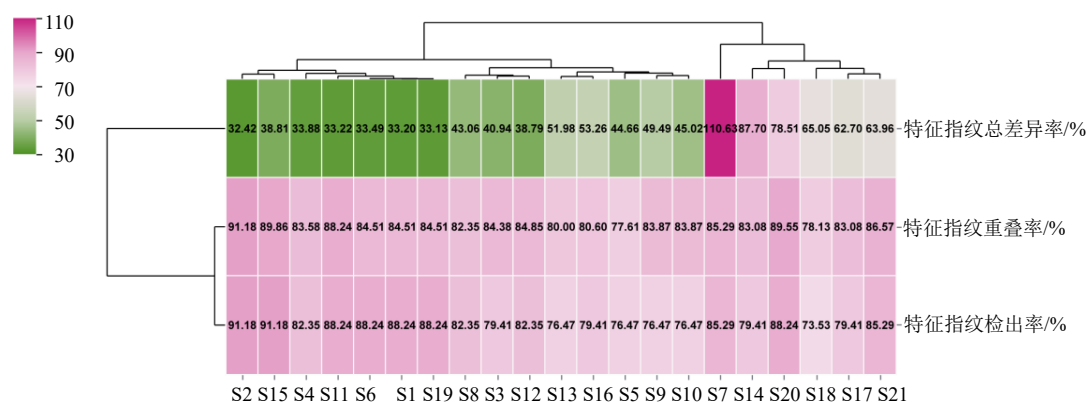


图 4 基于特征指纹参数的板蓝根样品聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of *Isatidis Radix* samples based on characteristic fingerprint parameters

2.2 多指标成分含量测定

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 同“2.1.2”项。

2.2.3 供试品溶液的制备 同“2.1.3”项。

2.2.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷的混合对照品溶液母液适量,加甲醇稀释至 6 个不同质量浓度,并参考“2.1.1”项下色谱及检测条件分别进样分析,记录峰面积。以混合对照品溶液中各对照品质量浓度为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y)进行回归分析,得到各对照品的线性回归方程、相关系数(R^2)及线性范围。结果表明,尿苷、鸟苷、腺苷在 1.56~200.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内的回归方程分别为 $Y=14\,404X+1\,836.6$ ($R^2=0.999\,9$), $Y=7\,429.4X-4\,488.1$ ($R^2=1.000\,0$), $Y=15\,723X-3\,962.1$ ($R^2=1.000\,0$); (R,S)-告依春在 3.13~400.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内的回归方程为 $Y=9\,909X+19\,096$ ($R^2=1.000\,0$)。

2.2.5 精密度试验 取同一板蓝根供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,分别记录尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷色谱峰峰面积,经计算各指标成分色谱峰峰面积的 RSD 值均小于 3.00%,说明仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一板蓝根供试品 6 份,按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,分别记录各指标成分色谱峰峰面积,并根据各指标成分回归方程换算其含量,经计算各指标成分含量的 RSD 值均小于 3.00%,说明板蓝根样品处理及测定方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一板蓝根供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、

24 h 进样测定,分别记录各指标成分色谱峰峰面积,经计算各指标成分色谱峰峰面积的 RSD 值均小于 3.00%,说明板蓝根样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取同一板蓝根供试品 6 份,每份 0.25 g,精密称定,每份分别加入已知浓度和体积的各指标成分混合对照品溶液,并参考“2.1.3”项平行制备板蓝根供试品溶液,并按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,记录各指标成分峰面积,经计算各指标成分加样回收率均在 95%~105%,说明该方法准确度良好。

2.2.9 多指标含量测定 根据“2.1.3”项下方法制备 21 批板蓝根供试品溶液,平行 2 份操作,并按照“2.1.1”项下色谱条件,分别测定 21 批板蓝根中 (R,S)-告依春、鸟苷、腺苷及尿苷的含量,见图 5。由结果可知,不同产地板蓝根中上述指标成分占比及总量分布差异明显,总量分布在 2.78~8.82 mg/g,其中大庆 2 号、板蓝根 8 号样品、甘肃 8 号产地板蓝根上述指标成分总量相对较高 (7.16~8.82 mg/g),大庆黑土地 3 号、内蒙 3 号、大庆 5 号等产地板蓝根样本上述指标成分总量相对较低 (2.78~3.99 mg/g),其余产地板蓝根样本上述指标成分总量相对居中 (4.33~6.94 mg/g)。此外, (R,S)-告依春、鸟苷、腺苷及尿苷的总量占比分别在 41%~87%、8%~31%、4%~11%、1%~16%。

2.3 基于数字化指纹图谱、多指标含量测定整合策略的板蓝根品质评价

2.3.1 基于 N 强峰、指标成分含量及特征指纹参数的整合分析 N 强峰为样品中相对峰面积占比靠前的色谱峰,且涵盖 (R,S)-告依春、鸟苷、腺苷及尿苷等代表性成分,因此具有定性准确及半定量的特点。

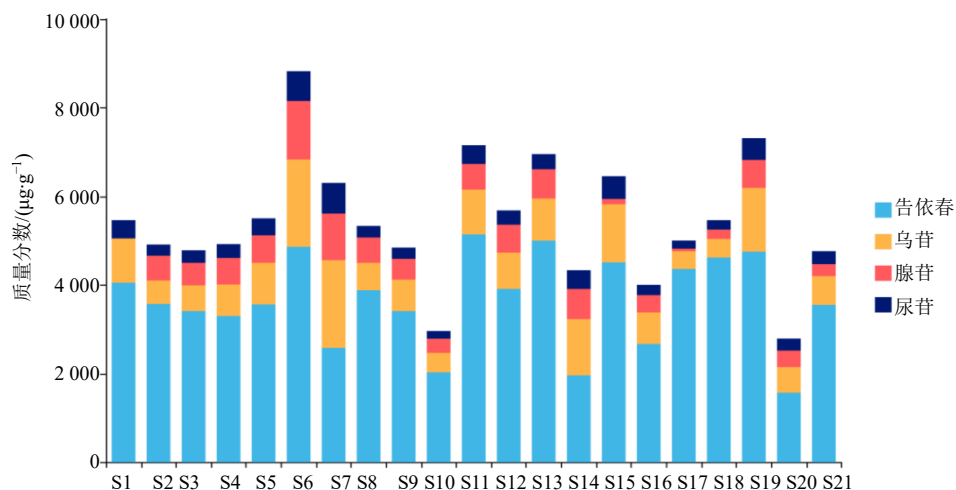
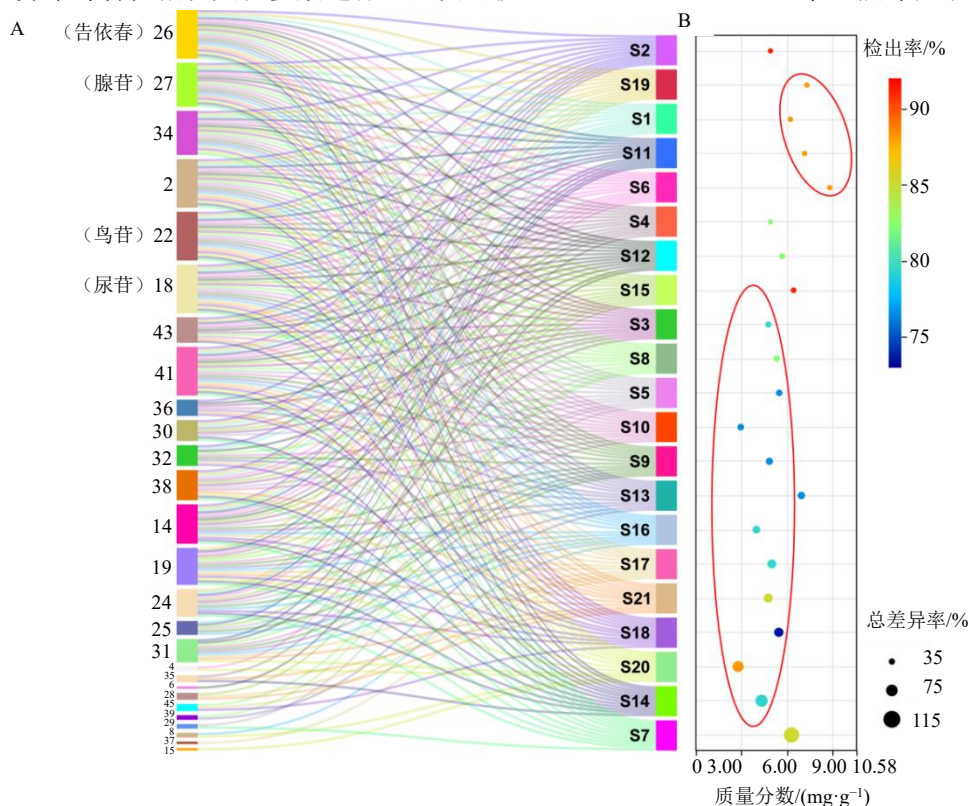


图 5 21 批次板蓝根样品代表性成分含量

Fig. 5 Content of representative components in 21 batches of *Isatidis Radix* samples

利用“CNSKnowall”绘图平台，将 21 批板蓝根样品的 N 强峰、指标成分含量及特征指纹峰检出率、总差异率等特征指纹关键参数进行整合及可视

化分析，见图 6。由图 6-A 桑基图结果可知，26[(R , S)-告依春]、27(腺苷)、34、2、22(乌苷)、18(尿苷)、14、19、41 等 N 强峰在不同产地板蓝根样品



A- N 强峰峰号与板蓝根样品关联桑基图， N 强峰色块大小与 N 强峰的共有峰数成正比；B-板蓝根样品-指标成分含量-特征指纹参数的关联气泡图。A-showing the association between peak numbers of N -strong peaks and *Isatidis Radix* samples, with the size of the color blocks proportional to the number of common peaks of N -strong peaks; B-showing the association between *Isatidis Radix* samples, the content of representative components, and characteristic fingerprint parameters.

图 6 21 批次板蓝根样品的 N 强峰、指标成分含量及特征指纹参数整合图

Fig. 6 Integrated diagram of N -strong peaks, content of representative components, and characteristic fingerprint parameters of 21 batches of *Isatidis Radix* samples

中的共有频次均在 16 以上。 N 强峰是特征指纹的重要组成部分,且涵盖具有定量属性的指标成分,因此,对样本、 N 强峰指标成分及特征指纹参数(检出率、总差异率)进行整合关联分析能够从定性、定量角度反映出指标成分对特征指纹差异性贡献。由气泡图(图 6-B)结果可知,多数样本指标成分总含量在 5 mg/g 以上,多数样本检出率在 75% 以上,然而总差异率存在较大变化区间(33%~110%)。此外,指标成分含量高的甘肃 8 号、黑龙江(大庆产地合作社 1 号)、板蓝根 8 号、大庆 5、6 号板蓝根样本(右上角圈注)总差异率普遍较低(<35%),且检出率高(>85%),这就表明板蓝根样本指标成分含量、特征指纹检出率等参数与板蓝根产地品质存在较大的相关性。

2.3.2 基于特征指纹总差异率-指标成分含量占比

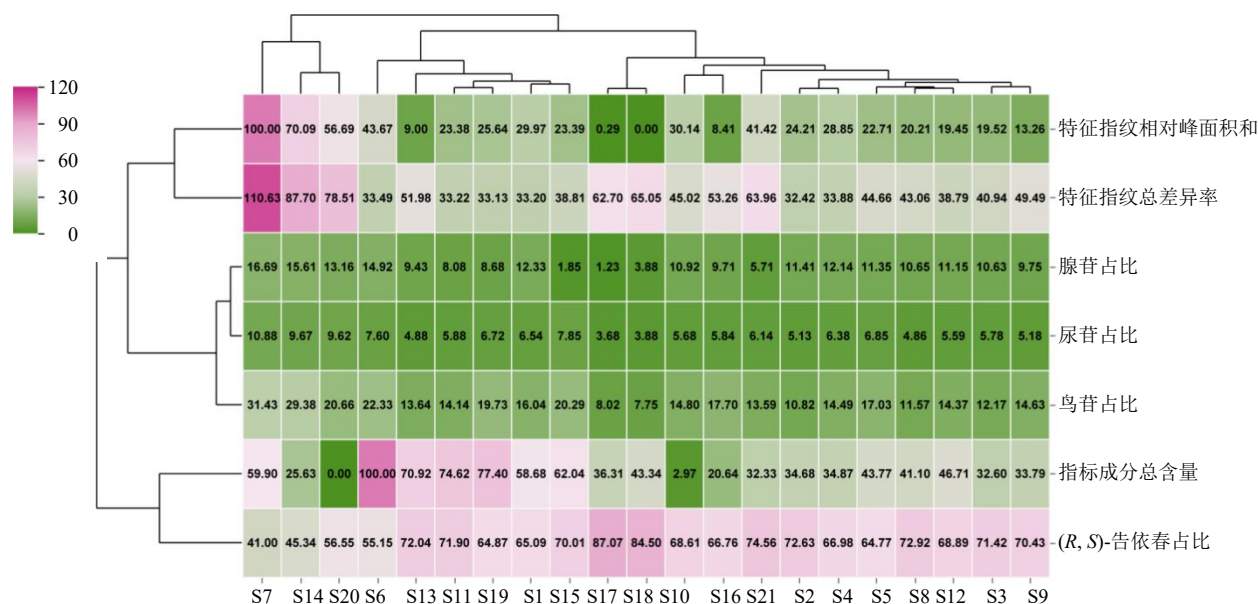


图 7 基于特征指纹参数-指标成分含量占比的板蓝根样品定性、定量整合聚类分析

Fig. 7 Qualitative and quantitative integrated cluster analysis of *Isatis Radix* samples based on characteristic fingerprint parameters and proportions of representative component contents

进一步的以特征指纹总差异率为中心的影响因素分析结果表明,特征指纹峰面积和过高(如大庆 3 号、内蒙 1 号、大庆 5 号、大庆 6 号)或过低(如板蓝根 20221009、河北 2 号、甘肃 7 号、内蒙 3 号、黑龙江大庆沙土地 4 号)均会导致特征指纹总差异率的升高,而特征指纹峰面积和在 20~30 区间时,特征指纹总差异率处于较低水平。腺苷、鸟苷、尿苷占比过高(如大庆 3 号、内蒙 1 号、大庆 5 号)或过低(如河北 2 号、甘肃 7 号、大庆 6 号)亦会导致特征指纹总差异率的升高,并与特征指纹

定性、定量整合聚类分析 为实现同一量纲下的聚类比较,采用 Min-Max 归一化方法,将 21 批板蓝根样本的特征指纹相对峰面积值、指标成分总含量归一化为 0~100 数值。在此基础上,利用“CNSKnowall”绘图平台,将各样本特征指纹总差异率、特征指纹相对峰面积,各指标成分占比及总含量为参量,采用欧几里得距离(euclidean distance)和完全链接法(complete linkage)进行热图可视化系统聚类分析,见图 7。由结果可知,板蓝根特征指纹总差异率与特征指纹相对峰面积和呈现较好的相似性而聚为一类;指标成分总含量与 (R, S) -告依春占比呈现相似性而聚为一类,腺苷、尿苷及鸟苷聚为另一类。此外,特征指纹相对峰面积和、总差异率与腺苷、鸟苷、鸟苷呈现较好的二级相似性聚类。

峰面积和大体呈现正相关趋势。此外, (R, S) -告依春占比及指标成分总含量亦与特征指纹总差异率呈现一定的相关性,如大庆 3 号、内蒙 1 号、大庆 5 号样本中 (R, S) -告依春占比较低或指标成分总含量较低,或河北 2 号、甘肃 7 号样本中 (R, S) -告依春占比较高,均与这些样本特征指纹总差异率高密切相关。有趣的是, (R, S) -告依春占比与腺苷、尿苷、鸟苷占比大体呈现负相关趋势。

3 讨论

《中国药典》2020 年版在板蓝根药材及饮片检

测中选择 245 nm 波长下进行了等度洗脱检测,而在板蓝根颗粒制剂中选择 254 nm 波长进行了梯度洗脱检测。本研究采用超高效液相色谱技术,通过优化梯度条件和检测波长,最终确定甲醇和 0.02% 磷酸水溶液二元梯度洗脱程序,相比现有的方法,本研究检测能够在较多的时间内实现尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷等指标成分的分离及同时测定。此外,综合《中国药典》2020 年版中提取溶剂、提取方法及指标成分溶解性,本研究选择水为溶剂,考察了回流、超声等不同提取方法,提取时间(15、30、60、120 min)、超声功率等对尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春、腺苷等指标成分的影响。结果发现,超声法能够在短时间内实现优于回流提取法的对上述指标成分的提取,并最终将方法优化为选择水为溶剂,超声(功率 250 W、频率 40 kHz)提取 30 min。

在此基础上,本研究建立了 21 个产地板蓝根样品的 UPLC 数字化指纹图谱,并基于共有峰、N 强峰等参数,通过模糊化处理,得到板蓝根特征指纹图谱。与传统的指纹图谱相比,除所有样本均含有的共有峰之外,板蓝根特征指纹亦包含了少数样本缺失而多数样本包含的板蓝根特征峰信息,以及每个样本中具有半定量属性的 N 强峰信息,这对于板蓝根药材的共性、差异性判别具有重要意义。由板蓝根特征指纹检出率、重叠率计算分析可知,21 个不同产地板蓝根样品中,多数特征指纹检出率、重叠率在 80%~90%,且二者呈现相似的正相关趋势,这就为板蓝根药材共性分类判定提供了依据。由 21 个产地板蓝根特征指纹总差异率分析可知,不同产地板蓝根特征指纹总差异率呈现明显的不一致性,这就表明,不同产地板蓝根在共有特征的基础上亦包含着或隐藏着特有性特征,特征指纹差异率正是该特有性特征的呈现。

由表 2 及图 6-A 结果可知,不同产地板蓝根中 N 强峰的类型及总峰面积占比等信息呈现一定的相似性而又不完全一致,如 26[(R,S)-告依春]、27(腺苷)、34、2、22(鸟苷)、18(尿苷)、14、19、41 等 N 强峰号在不同产地板蓝根样品中呈现多数存在而少数缺失等特征。进一步结合图 5 指标成分分析结果可知,上述 N 强峰号亦存在占比、组成等方面的差异,它们与不同产地板蓝根样品特征指纹总差异率的波动密切相关。由图 6-B 板蓝根样本、指标成分、特征指纹参数气泡关联分析结果可知,其指

标成分总含量与特征指纹总差异率大体上呈现出一定的负相关性,这与现有研究结果是相一致的,说明现有国家标准的合理性及可提升性^[19-21]。此外,板蓝根特征指纹总差异率和其所含成分类型差异及不同类型成分占比差异亦密切相关,这也从另一个方面解释了图 6-B 指标成分总含量与总差异率相关的不完全一致性。

图 7 结果分析表明,不同产地板蓝根特征指纹总差异率与特征指纹相对峰面积和呈现较好的一级聚类相关性,它们与腺苷、尿苷、鸟苷等指标成分占比呈现较好的二级聚类相关性,与指标成分总含量、(R,S)-告依春占比呈现三级聚类相关性。具体而言,以板蓝根特征指纹总差异率为中心,特征指纹相对峰面积和过高或过低均与板蓝根样本特征指纹总差异率异常升高相对应。相似的二级聚类分析表明,腺苷、尿苷、鸟苷等指标成分占比过高或过低亦与板蓝根样本的特征指纹总差异率异常升高相对应。有趣的是,在三级聚类中,相比指标成分总含量,(R,S)-告依春占比过高或过低,对板蓝根样本特征指纹总差异率的升高的影响更大。此外,(R,S)-告依春占比与腺苷、尿苷等指标成分占比呈现一定程度的负相关性,这与已有的研究结果是相一致的^[14]。

区别于传统的化学药物,中药成分类型多,每类型成分数量及成分含量、活性等亦有所区别,单一的精准医药模式下的质控与中药整体、综合的特点尚存在着较大差异,即单纯的中药成分解析和活性筛选并不能完全或很好地反映出中药宏观作用的特点,其根本原因是 2 种思维模式的差异^[22]。因此,如何结合传统和现代 2 种医药思维模式,在保持中药宏观思维模式下提升中药的质控水平,是当下中药质控的瓶颈^[23]。本研究立足企业当下生产、流通实际瓶颈,针对对当下板蓝根药材和中成药含测项不一致性及产地差异性等矛盾,在传统中药宏观思维理论指导下,整合数字化指纹图谱和多指标成分定量,并通过系统聚类、整合分析,挖掘不同产地板蓝根样品共性关键特征,并从不同维度揭示出导致不同板蓝根样本差异性的原因。该方法打破了传统的单纯依据指标成分含量或指纹图谱简单聚类的中药品质评价方法,这正是在宏观思维模式下的中药质控研究的拓展和创新,为中药品质评价提供了方法参考。在研究中亦存在较多不足,如板蓝根不同产地、不同批次样品收集有限,所纳入的

代表性成分有限等, 后续将进一步研究与完善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 麦麦提敏·麦提萨伍尔, 赖梦亭, 段金彪, 等. 基于文献计量学和专利分析的板蓝根研究现状剖析及产业化前景展望 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 563-574.
- [2] 王法琴, 屈雅琴, 丁元辰, 等. 基于复杂网络技术分析菰蓝不同入药部位的传统功效及现代应用差异性和关联性研究 [J]. 江苏科技信息, 2022, 39(25): 65-69.
- [3] 林子君, 刘晓秋, 韩娜, 等. 板蓝根的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 381-383.
- [4] Han X, Wu M Q, Yang Z R, et al. Comprehensive evaluation of powdered Chinese herbal medicines-An exemplification of *Isatidis Radix* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(3): 286-292.
- [5] 王雨田, 何玉成, 闫桂权, 等. 我国中药材产地市场整合研究: 以金银花、枸杞子、板蓝根和太子参为例 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1669-1676.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1110.
- [7] 李莉, 承晨, 王倬晔, 等. 板蓝根颗粒质量分析. 海峡药. 2017. 29(11): 79-82.
- [8] 秦露, 李健, 耿燕楠, 等. 基于 HPLC 指纹图谱不同产地板蓝根主要活性成分与其根际土壤理化性质的相关性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(6): 2077-2084.
- [9] 付照羽, 冯治朋, 韩颜超, 等. 板蓝根研究进展 [J]. 现代农业科技, 2023(14): 41-45.
- [10] 黄远, 董福越, 李楚源. 板蓝根中主要化学成分含量测定方法研究进展 [J]. 中国药业, 2020, 29(7): 150-156.
- [11] 黄远, 李菁, 徐科一, 等. 板蓝根抗流感病毒有效成分研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2618-2623.
- [12] 谭敏洁, 江勋, 彭婷婷, 等. 复方板蓝根颗粒质量标准提升研究 [J]. 中国药业, 2018, 27(15): 20-24.
- [13] 周景瑞, 冉江, 姜玲玲, 等. 板蓝根注射液特征图谱及其质量相关性研究 [J]. 中国兽药杂志, 2024, 58(7): 48-55.
- [14] 夏巧红, 刘柏龙, 刘生彩, 等. 基于指纹图谱和化学计量法的板蓝根质量评价研究 [J]. 广西中医药, 2024, 47(5): 60-69.
- [15] 毛莹莹, 栗焕焕, 郑富香, 等. 不同产地板蓝根 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3147-3151.
- [16] 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.
- [17] 钱秀玉, 聂黎行, 原文鹏, 等. 基于对照制剂的板蓝根颗粒指纹图谱和多成分含量测定研究及质量等级初评价 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(10): 1795-1806.
- [18] 黄远, 董福越, 李楚源, 等. 一测多评法测定板蓝根中 6 种化学成分的含量 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 845-851.
- [19] 马明, 张开雪, 熊超, 等. 板蓝根标准汤剂质量标准研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5139-5144.
- [20] 李柯, 戚建中, 符国成, 等. 复方板蓝根颗粒标准研究与产品评价 [J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 78-81.
- [21] 徐靖. 《中医药-板蓝根》ISO 国际标准发布 [J]. 中医药管理杂志, 2019, 27(4): 26.
- [22] 赵超, 李会军, 陈君, 等. 中药复杂成分解析与质量评价的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(3): 283-288.
- [23] 刘文龙, 赵靖, 李原华, 等. 中药宏观质量的评价与控制理论体系的建立与应用研究 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 613-620.

[责任编辑 时圣明]