doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.02.016

# 超高效合相色谱法拆分及测定板蓝根中(*R*,*S*) - 告依春对映异构体含量*

蔡雪萍,朱乃军,钱　啸,陈　蓉,郝　刚△

(江苏省苏州市药品检验检测研究中心,江苏 苏州　215104)

**摘要:目的**　建立拆分板蓝根中(*R*,*S*) - 告依春对映异构体及测定其含量的超高效合相色谱(UPC²)法。**方法**　色谱柱为 Trefoil™ AMY1 柱(150 mm × 3.0 mm,2.5 μm),流动相为超临界 $CO_2$ - 甲醇(梯度洗脱),流速为 1.2 mL / min,检测波长为 245 nm,柱温为 45 ℃,动态背压为 1 800 psi,进样量为 2 μL。**结果**　*R* - 告依春、*S* - 告依春能达到较好分离,质量浓度分别在 2.01 ~ 64.32 μg / mL(*r* = 0.999 9,*n* = 6)和 1.01 ~ 32.38 μg / mL(*r* = 1.000 0,*n* = 6)范围内与峰面积线性关系良好;检测限均为 0.09 μg / mL,定量限分别为 0.46 μg / mL 和 0.44 μg / mL;精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 3.0%;平均加样回收率分别为 100.97% 和 101.26%,*RSD* 分别为 1.73% 和 2.08%(*n* = 6)。**结论**　该方法稳定性、重复性均较好,结果准确可靠,可用于拆分板蓝根中(*R*,*S*) - 告依春对映异构体及测定其含量。

**关键词:**板蓝根;(*R*,*S*) - 告依春;超高效合相色谱法;手性拆分;含量测定

**中图分类号:R932;R284.1;R286.0**　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006 - 4931(2022)02 - 0061 - 04**

# Separation and Quantification of (*R*,*S*) - Goitrin Enantiomers in Isatidis Radix by Ultra - Performance Convergence Chromatography

*CAI Xueping, ZHU Naijun, QIAN Xiao, CHEN Rong, HAO Gang*

*(Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou, Jiangsu, China　215104)*

**Abstract: Objective**　To establish an ultra - performance convergence chromatography (UPC²) method for the separation and quantification of (*R*,*S*) - goitrin enantiomers in Isatidis Radix. **Methods**　The chromatographic column was Trefoil™ AMY1 column (150 mm × 3.0 mm, 2.5 μm), the mobile phase was supercritical $CO_2$ - methanol (gradient elution), the flow rate was 1.2 mL / min, the detection wavelength was 245 nm, the column temperature was 45 ℃, the dynamic back pressure was 1 800 psi, and the injection volume was 2 μL. **Results**　*R* - goitrin and *S* - goitrin could be separated well, and the linear ranges of *R* - goitrin and *S* - goitrin were 2.01 - 64.32 μg / mL(*r* = 0.999 9, *n* = 6) and 1.01 - 32.38 μg / mL(*r* = 1.000 0, *n* = 6), respectively. The limits of detection(LOD) of *R* - goitrin and *S* - goitrin were 0.09 μg / mL, and the limits of quantitation(LOQ) of *R* - goitrin and *S* - goitrin were 0.46 μg / mL and 0.44 μg / mL, respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0%. The average recoveries of *R* - goitrin and *S* - goitrin were 100.97% and 101.26% with *RSD*s of 1.73% and 2.08%(*n* = 6), respectively. **Conclusion**　The method is stable, reproducible, accurate and reliable, which can be used for the separation and quantification of (*R*,*S*) - goitrin enantiomers in Isatidis Radix.

**Key words:** Isatidis Radix; (*R*,*S*) - goitrin; ultra - performance convergence chromatography; chiral separation; content determination

*基金项目:江苏省苏州市科技计划项目[sys2018103]。

第一作者:蔡雪萍,女,博士,主管药师,研究方向为药品质量评价,(电子信箱)caixueping880315@163.com。

△通信作者:郝刚,男,博士,副主任药师,研究方向为药品质量评价,(电话)0512 - 68222721。

pography to induce osteoblast differentiation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 184: 110513.

[14] RASHDAN NA, SIM AM, CUI L, et al. Osteocalcin regulates arterial calcification via altered Wnt signaling and glucose metabolism[J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(2): 357 - 367.

[15] MATSUSHITA Y, NAGATA M, KOZLOFF KM, et al. A Wnt - mediated transformation of the bone marrow stromal cell identity orchestrates skeletal regeneration[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 332.

[16] ZHU B, XUE F, ZHANG C, et al. Ginkgolide B promotes osteoblast differentiation via activation of canonical Wnt signalling and alleviates osteoporosis through a bone anabolic way[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 5782 - 5793.

[17] LI K, ZHANG X, HE B, et al. Geraniin promotes osteoblast proliferation and differentiation via the activation of Wnt / β - catenin pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 319 - 324.

[18] WU L, WEI Q, LYU Y, et al. Wnt / β - Catenin pathway is involved in cadmium - induced inhibition of osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1519.

[19] MOLAGODA IMN, KARUNARATHNE WAHM, CHOI YH, et al. Fermented oyster extract promotes osteoblast differentiation by activating the Wnt / β - catenin signaling pathway, leading to bone formation[J]. Biomolecules, 2019, 9(11): 711.

[20] HONG W, ZHANG W. Hesperidin promotes differentiation of alveolar osteoblasts via Wnt / β - Catenin signaling pathway[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2020, 40(5): 442 - 448.

(收稿日期:2021 - 07 - 10;修回日期:2021 - 09 - 11)

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fortune. 的干燥根，其性寒、味苦，有清热解毒、凉血利咽功效[1-2]。现代药理学研究表明，板蓝根具有抗病毒、抗炎、调节免疫等作用[3-5]，临床广泛用于治疗病毒性感冒发热、咽喉肿痛、流行性腮腺炎、扁桃体炎、病毒性肝炎、带状疱疹等疾病。虽然其药效显著，但化学成分复杂，活性指标成分不明，一直是国内外研究的热点[6-9]。板蓝根药材中的*R*-告依春可发挥抗流感病毒作用[10]，而其对映体*S*-告依春可导致甲状腺肿大[11]，故分离该对对映异构体具有临床价值。2020年版《中国药典（四部）》中采用反相高效液相色谱（RP-HPLC）法测定板蓝根中（*R*,*S*）-告依春含量[1]，但在该色谱条件下未能分离对映体。高效液相色谱（HPLC）法、气相色谱（GC）法和超临界流体色谱（SFC）法等均在手性化合物分离领域发挥着重要作用[12-14]。近年来，超高效合相色谱（UPC$^2$）法越来越多地应用于手性化合物的分离[15-17]。UPC$^2$基于超高效液相色谱（UPLC）法与SFC，以超临界流体$CO_2$为流动相主体，依靠其溶剂化能力进行分离[15]。采用HPLC法、SFC法分离（*R*,*S*）-告依春已有相关研究[18-20]，与HPLC法比较，UPC$^2$法分析时间短、效率高，且有机溶剂的用量极少，对环境友好；与SFC法比较，UPC$^2$法具有体系重现性、稳定性更高的优势。UPC$^2$法是一种经济高效、快捷环保的分离方法，可有效弥补HPLC法和SFC法在分离手性化合物时的不足。本研究中建立了拆分板蓝根药材中（*R*,*S*）-告依春对映体并测定其含量的UPC$^2$法，为手性化合物的拆分和含量测定提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Acquity UPC$^2$型超高效合相色谱仪，包括Empower 3工作站（美国Waters公司）；XSE205DU型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）；Biofuge Primo R型高速离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Direct-Q3型超纯水机（美国Millipore公司）；SK8210HP型超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）；XMTD-204型数显式电热恒温水浴锅（上海跃进医疗器械有限公司）。

### 1.2 试药

（*R*,*S*）-告依春对照品（中国食品药品检定研究院，批号为111753-201706，含量为100.0%）；*R*-告依春、*S*-告依春单一对照品（本实验室自制，含量分别为99.82%，99.83%）；板蓝根药材（来源见表1），经本中心中药室鉴定为正品；$CO_2$（苏州市金宏气体股份有限公司，体积分数≥99.995%）；甲醇为色谱纯，水为超纯水。

表1 板蓝根药材来源及批号

Tab. 1 Sources and batch numbers of Isatidis Radix samples

| 厂家 | 批号 | 厂家 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 太阳石（唐山）药业有限公司 | AG1180402001 | 山东孔府制药有限公司 | 1712006 |
| 太极集团四川南充制药有限公司 | 180201 | 山东昊福制药有限公司 | 1803001 |
| 山西华康药业股份有限公司 | 002001703031 | 广州诺金制药有限公司 | GZ1804036 |
| 太极集团重庆中药二厂有限公司 | 180303 | 海南制药厂有限公司制药二厂 | 20170926 |
| 哈尔滨市康隆药业有限责任公司 | 170717 | 商丘市金马药业有限公司 | YF18051315 |
| 河南福森药业有限公司 | 180201 | 陕西步长制药有限公司 | 180316 |
| 江西品信药业有限公司 | 180402 | 华润三九（枣庄）药业有限公司 | 1811004 |

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱：Trefoil™ AMY1柱（150 mm × 3.0 mm，2.5 μm）；流动相：$CO_2$（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0~4.5 min时95%A→80%A，4.5~5 min时80%A→60%A，5~7 min时60% A，7~8 min时60%A→95%A；8~10 min时95%A）；流速：1.2 mL/min；检测波长：245 nm；柱温：45 ℃；动态背压：1 800 psi；进样量：2 μL。

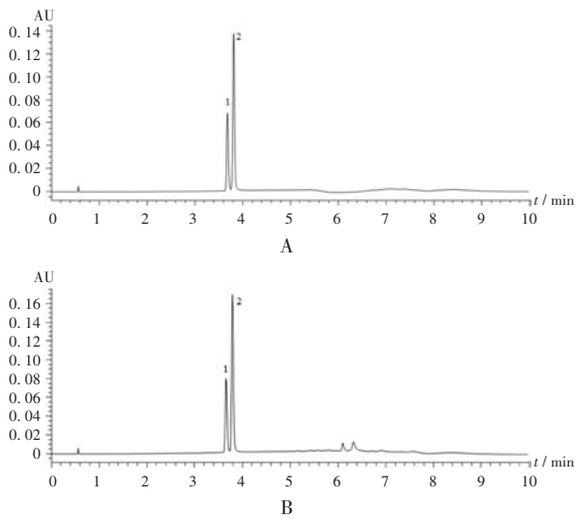
### 2.2 溶液制备

取*R*-告依春、*S*-告依春对照品各适量，精密称定，以甲醇溶解并制成质量浓度分别为0.321 6，0.161 9 mg/mL的混合对照品溶液；取*R*-告依春、*S*-告依春对照品各适量，精密称定，分别以甲醇溶解并制成质量浓度分别为0.046 0，0.044 1 mg/mL的单一对照品溶液。取药材样品粉末（过4号筛）0.4 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入20 mL水，称定质量，超声（功率250 W，频率40 kHz）提取60 min，放至室温，再次称定质量，用水补足减失的质量，摇匀并静置5 min，取上清液，12 000 r/min离心5 min，取上清液5 mL置坩埚中，蒸干，以甲醇复溶并定容至5 mL，摇匀，经0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验：精密量取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液各2 μL，按2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。供试品溶液色谱中，在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰，分离度均大于1.5。详见图1。

线性关系考察：分别取混合对照品溶液适量，以甲醇稀释制成*R*-告依春质量浓度为2.01，4.02，8.04，16.08，32.16，64.32 μg/mL，*S*-告依春质量浓度为1.01，2.02，4.05，8.10，16.19，32.38 μg/mL的系列混合对照品溶液，各量取2 μL，按2.1项下色谱条件进样测定。以*R*-告依春、*S*-告依春的质量浓度（*X*，μg/mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程*R*-告依春为$Y_1 = 10\,469X_2 + 1\,563.7$（$r = 0.999\,9$，$n = 6$），*S*-告依春为$Y_2 = 10\,229X_2 + 873.1$（$r = 1.000\,0$，




1. *S* - 告依春　2. *R* - 告依春
A. 混合对照品溶液　B. 供试品溶液

**图 1　超高效合相色谱图**

1. *S* - goitrin　2. *R* - goitrin
A. Mixed reference solution　B. Test solution

**Fig. 1　UPC² chromatograms**

$n = 6$)。结果表明，*R* - 告依春和 *S* - 告依春质量浓度分别在 2.01 ~ 64.32 μg / mL 和 1.01 ~ 32.38 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察：分别取 2.2 项下 *R* - 告依春和 *S* - 告依春单一对照品溶液各适量，倍比稀释，按 2.1 项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S* / *N*）3∶1 和 10∶1 时的质量浓度记作检测限和定量限。结果 *R* - 告依春和 *S* - 告依春的检测限均为 0.09 μg / mL，定量限分别为 0.46 μg / mL 和 0.44 μg / mL。

精密度试验：取 2.2 项下混合对照品溶液适量，按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果 *R* - 告依春和 *S* - 告依春峰面积的 *RSD* 分别为 0.25% 和 0.24%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取 2.2 项下供试品溶液，分别于 0，2，4，8，12，24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果 *R* - 告依春和 *S* - 告依春峰面积的 *RSD* 分别为 2.50% 和 2.39%（$n = 6$），表明供试品溶液室温下放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验：取药材样品（批号为 AG1180402001）粉末适量，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，共 6 份，按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果 *R* - 告依春和 *S* - 告依春含量的 *RSD* 分别为 1.80% 和 1.86%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量的药材样品（批号为 AG1180402001）粉末 0.2 g，共 6 份，分别精密加入 0.5 mL 混合对照品溶液，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果见表 2。

**表 2　加样回收试验结果（$n = 6$）**

**Tab. 2　Results of the recovery test（$n = 6$）**

| 样品含量(μg) | | 加入量(μg) | | 测得量(μg) | | 回收率(%) | | $\bar{X}$(%) | | *RSD*(%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| 21.36 | 10.09 | 22.66 | 10.42 | 44.25 | 20.63 | 101.02 | 101.15 | 100.97 | 101.26 | 1.73 | 2.08 |
| 21.36 | 10.09 | 22.66 | 10.42 | 43.68 | 20.33 | 98.50 | 98.27 | | | | |
| 21.48 | 10.14 | 22.66 | 10.42 | 44.38 | 20.68 | 101.06 | 101.15 | | | | |
| 21.81 | 10.30 | 22.66 | 10.42 | 44.82 | 20.95 | 101.54 | 102.21 | | | | |
| 21.54 | 10.17 | 22.66 | 10.42 | 44.19 | 20.61 | 99.96 | 100.19 | | | | |
| 21.67 | 10.23 | 22.66 | 10.42 | 45.18 | 21.13 | 103.75 | 104.61 | | | | |

注：A 为 *R* - 告依春，B 为 *S* - 告依春。表 3 同。

Note: A is *R* - goitrin and B is *S* - goitrin (for Tab. 2 and Tab. 3).

## 2.4　样品含量测定

取药材样品粉末适量，分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液，再按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法测定样品中 *R* - 告依春和 *S* - 告依春的含量。结果见表 3。

**表 3　样品含量测定结果（%，$n = 3$）**

**Tab. 3 Results of the content determination of *R* - goitrin and *S* - goitrin in the samples (%, $n = 3$)**

| 批号 | A | B | 批号 | A | B |
|---|---|---|---|---|---|
| AG1180402001 | 0.209 | 0.099 | 1712006 | 0.078 | 0.037 |
| 180201 | 0.195 | 0.086 | 1803001 | 0.075 | 0.033 |
| 002001703031 | 0.127 | 0.057 | GZ1804036 | 0.062 | 0.026 |
| 180303 | 0.120 | 0.059 | 20170926 | 0.057 | 0.028 |
| 170717 | 0.103 | 0.049 | YF18051315 | 0.052 | 0.021 |
| 180201 | 0.101 | 0.050 | 180316 | 0.048 | 0.024 |
| 180402 | 0.084 | 0.033 | 1811004 | 0.025 | 0.013 |

## 3　讨论

### 3.1　单一对照品的制备与纯化

基于 Waters Prep SFC 80 制备型超临界流体色谱系统结合 REGIS（*S*,*S*）- Whelk - O1 型（250 mm × 30 mm，10 μm）手性制备色谱柱制备 2 种对映异构体，其色谱条件参考文献[21]，并在此基础上进行优化，最终确定流动相为超临界 $CO_2$ 和乙醇（含 0.1% $NH_3 \cdot H_2O$，20∶80，*V* / *V*），流速为 8 mL / min，动态背压为 1 450 psi，紫外检测波长为 220 nm，进样量为 2 μL。分离得到的 2 个组分分别经 25 ℃旋转蒸发干燥和冷冻干燥，再经旋光鉴定及纯度检测，最终获得 *R* - 告依春对照品及 *S* - 告依春对照品。

本栏目由
国药控股云南有限公司
协办

### 3.2 色谱柱选择

预试验中分别考察了Trefoil™ AMY1柱（150 mm × 3.0 mm，2.5 μm），Trefoil™ CEL1柱（150 mm × 3.0 mm，2.5 μm），Trefoil™ CEL2柱（150 mm × 3.0 mm，2.5 μm），结果Trefoil™ CEL1柱和Trefoil™ CEL2柱不能完全分离该对对映异构体，分离度小于1.5；而Trefoil™ AMY1柱分离效果较好，分离度可达1.98。故选择Trefoil™ AMY1手性色谱柱用于*R*-告依春及*S*-告依春的分离。

### 3.3 样品处理方法确定

预试验中分别比较了水煎煮[1]和超声提取方法，水、50%甲醇、甲醇为提取溶剂，0.5，1，2 h提取时间对（*R*，*S*）-告依春提取效率的影响。结果超声提取法的提取效率明显高于水煎煮法。有文献报道，温度越高，（*R*，*S*）-告依春稳定性越低[22]，故长时间的高温水煎煮使得（*R*，*S*）-告依春的稳定性下降，导致其含量降低；以水为提取溶剂时，UPC²法测得的*R*-告依春和*S*-告依春含量最高，且明显高于以50%甲醇及甲醇作为提取溶剂时的含量，表明两者在水中的溶解度高。以水为提取溶剂对药材样品进行超声提取时，随着超声时间的延长，提取效率随之提高，但超声时间＞1 h时，两者的含量均不再明显增加，故最终选择超声时间为1 h。

### 3.4 样品含量测定结果

由本研究结果可知，不同厂家板蓝根药材中*R*-告依春的含量均明显高于*S*-告依春（约为后者的2倍）。推测*R*-告依春的含量可能是影响板蓝根制剂抗病毒效果的关键因素。

### 3.5 方法评价

本研究中采用UPC²法拆分板蓝根药材中抗病毒活性成分*R*-告依春及其对映异构体*S*-告依春，并建立了两者的含量测定方法。该方法稳定性、重复性均较好，结果准确可靠，且环保，为（*R*，*S*）-告依春手性化合物的分离开拓了新思路，对于板蓝根药材及其制剂的质量控制也有一定指导意义。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（四部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：214-215.
[2] 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.
[3] 吴 参，齐 敏，刘晶莹. 板蓝根药理作用和临床应用研究[J]. 医学综述，2009，15（13）：2032-2033.
[4] 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.
[5] 马毅敏，李 娜，刘承伟，等. 板蓝根不同提取部位抗炎镇痛活性比较研究[J]. 中草药，2014，45（17）：2517-2521.
[6] 陈 烨，范春林，王 英，等. 板蓝根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2018，43（10）：2091-2096.
[7] 黄 远，董福越，李楚源，等. 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.
[8] 何立巍，董 伟，杨婧妍，等. 板蓝根抗病毒有效部位的化学成分及其活性研究[J]. 中草药，2013，44（21）：2960-2964.
[9] 许会芹，何立巍，侯宪邦. 板蓝根乙酸乙酯部位抗病毒活性组分及相关化学成分研究[J]. 南京中医药大学学报，2019，35（4）：465-470.
[10] 徐丽华，黄 芳，陈 婷，等. 板蓝根中的抗病毒活性成分[J]. 中国天然药物，2005，3（6）：45-46.
[11] ASTWOOD EB，GREER MA，ETTLINGER MG. L-5-vinyl-2-thiooxa-zolidone，an antithyroid compound from yellow turnip and from Brassica seeds[J]. J Biol Chem，1949，181（1）：121-130.
[12] 周鑫鑫，周 宁，刘长春，等. 手性固定相HPLC法直接拆分奈他地尔对映体[J]. 分析试验室，2018，37（4）：471-474.
[13] 史雪岩，刘飞鹏，边庆花，等. 毛细管气相色谱法分离2-苯基羧酸酯对映体[J]. 色谱，2016，34（1）：85-88.
[14] 戴 涛，黄珺珺，季 红，等. 超临界流体色谱拆分齐留通对映体[J]. 华西药学杂志，2012，27（1）：67-69.
[15] 张文华，谢 文，侯建波，等. 超高效合相色谱法对6种三唑类农药对映体的拆分及其在黄瓜中的残留分析[J]. 色谱，2019，37（12）：1356-1362.
[16] 李士敏，陆永辉，高 莉，等. 超高效合相色谱法拆分卡多曲对映体研究[J]. 分析试验室，2018，37（4）：441-444.
[17] 庾莉菊，黄海伟，李秀梅，等. 超高效合相色谱法测定盐酸兰地洛尔中立体异构体的含量[J]. 分析化学，2016，44（9）：1348-1353.
[18] 聂黎行，王钢力，戴 忠，等. 手性高效液相色谱法测定板蓝根中表告依春和告依春含量[J]. 色谱，2010，28（10）：1001-1004.
[19] NIE LX，DAI Z，MA SC. Improved chiral separation of（*R*，*S*）-Goitrin by SFC：an application in traditional Chinese medicine[J]. J Anal Methods Chem，2016，2016：5782942.
[20] SHI YH，ZHENG C，LI JH，et al. Separation and quantification of four main chiral glucosinolates in Radix Isatidis and its granules using High-Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector coupled with circular dichroism detection[J]. Molecules，2018，23（6）：1305.
[21] 张 叶，张 蕾，王 玉. RP-HPLC法测定板蓝根药材中腺苷和表告依春的含量[J]. 药物分析杂志，2008，28（11）：1848-1850.
[22] 辛华夏，彭子悦，江大森，等. 反相液相制备色谱法结合超临界流体制备色谱法分离纯化海风藤中的化合物[J]. 色谱，2018，36（5）：474-479.

（收稿日期：2021-03-11；修回日期：2021-07-23）