

黄芩及其炮制品黄芩片的 HPLC 指纹图谱研究

杨云¹, 肖功胜¹, 闻永举², 田润涛³ (1.河南中医学院药学院, 郑州 450008; 2.江西宜春学院, 江西 宜春 336000; 3.珠海科曼中药研究有限公司, 广东 珠海 519085)

摘要: 目的 对黄芩药材及其炮制品黄芩片进行 HPLC 指纹图谱研究。方法 选择 HPLC-UV 指纹图谱。色谱条件: Hypersil C₁₈ 柱 (200 mm×5.0 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液-乙腈线性梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 28 ℃; 检测波长 277 nm。结果 10 批不同产地正品黄芩进行规范炮制加工后得到的黄芩片指纹图谱无明显差异, 14 个不同产地黄芩药材的指纹图谱也具有极高的相似度。结论 该方法重复性好, 可为黄芩药材及其饮片的质量控制提供科学依据。

关键词: 黄芩; HPLC 指纹图谱; 黄芩饮片

中图分类号: R931.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)09-0720-05

Study on the HPLC Fingerprint of *Radix Scutellariae* and Its Processed Pieces

YANG Yun¹, XIAO Gongsheng¹, WEN Yongju², TIAN Runtao³ (1. Pharmacy College, Henan College of TCM, Zhengzhou 450008, China; 2. Jiangxi Yichun College, Yichun 336000, China; 3. Chromap Institute of Herbal Medicine Research, Zhuhai 519085, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the HPLC fingerprints of *Radix Scutellariae* and its processed pieces. **METHODS** Selecting HPLC-UV fingerprints. Using a Hypersil C₁₈ column (200 mm×5.0 mm, 5 μm). The mobile phase was linear gradient elute with methanol-0.4% phosphoric acid-acetonitrile. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Column temperature was 28 ℃. Detection wavelength was set at 277 nm. **RESULTS** There was no evident difference among the fingerprints of 10 batches of *Radix Scutellariae* that were normatively manufactured and processed, and the similarity of 14 batches of *Radix Scutellariae* was very well. **CONCLUSION** This method recurs well, and can be used to provide scientific basis for *Radix Scutellariae* and its processed pieces quantity control mode.

KEY WORDS: *Radix Scutellariae*; HPLC-fingerprint; processed *Radix Scutellariae* pieces

黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根, 主产于河北、河南、内蒙古及陕西等地。黄芩性味苦寒, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎之功效, 黄芩除以其饮片作为中医临床配方之外, 还作为多种中成药的原料药材广泛应用于医药工业。关于黄芩的炮制品, 中国药典 2005 版收录的有黄芩片和酒黄芩。黄芩片系采用黄芩药材经过短时蒸制或沸水煮, 再切片、干燥而得。因此, 黄芩药材的质量和饮片加工过程极大地影响着黄芩片的临床疗效和质量稳定性。指纹图谱作为中药质量控制的有效手段已经被国内外广泛接受, 其中 HPLC 指纹图谱因其检测灵敏度高, 分离效率高, 分析速度快, 方法重现性好等优点发展尤为迅速。

关于黄芩片的指纹图谱至今尚未见诸于文献, 黄芩药材的相关研究有部分报道^[1-2], 但尚未见上述 2 种样品 HPLC 指纹图谱的比较研究。因此, 本试验采用反相高效液相法对黄芩药材和黄芩片的指纹图谱进行研究并建立了相应的标准指纹图谱, 采用相关系数法和夹角余弦法对 10 批黄芩片和 14 批黄芩药材进行相似度分析, 并对低相似度药材样本进行了镜像对比。本试验为黄芩药材的质量控制和黄芩饮片的规范化加工炮制提供了实验依据。

1 仪器与材料

Shimadzu LC2010A 高效液相色谱仪, SPD-10A 检测器, ClassVP2.3v 色谱工作站。黄芩苷(批号: 715-200010, 纯度>99%)、黄芩素(批号: 111595

基金项目: 河南省重大科技攻关(200422030700)

作者简介: 杨云, 女, 教授 Tel: (0371)65680605 E-mail: yyun@china.com.cn

-200301, 纯度>99%)、汉黄芩素(批号: 1514-200001, 纯度>99%)对照品(中国药品生物制品检定所), 汉黄芩苷对照品自制(面积归一化法测定, 含量 98.3%); 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸、乙醇均为分析纯。

黄芩药材分别采集或购于河南、内蒙古、陕西及甘肃等地, 经河南中医学院陈随清教授鉴定为唇形科黄芩属植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根。黄芩片制备方法是在本课题组建立的规范化炮制加工工艺基础上制定, 即取黄芩药材, 除去杂质, 蒸 1 h, 取出, 切薄片, 80 °C 干燥 2.5 h。药材来源见表 1。

表 1 样品来源及编号

Tab 1 Sample source and number

序号	黄芩药材 样品来源	搜集时间	序号	黄芩片 药材来源	搜集时间
1	甘肃(家种)	2003.9	1	灵宝(家种)	2004.9
2	安国(家种)	2003.9	2	灵宝(家种)	2004.9
3	安国(家种)	2003.9	3	灵宝(家种)	2004.9
4	安国(家种)	2003.9	4	洛宁(家种)	2004.10
5	安国(家种)	2003.9	5	洛宁(家种)	2004.10
6	灵宝(家种)	2003.9	6	陕西(野生)	2004.10
7	灵宝(家种)	2003.9	7	陕西(野生)	2004.10
8	灵宝(家种)	2003.10	8	安国(家种)	2004.10
9	洛宁(家种)	2003.10	9	安国(家种)	2004.10
10	洛宁(家种)	2003.10	10	甘肃(家种)	2004.10
11	内蒙(野生)	2003.10			
12	陕西(野生)	2003.10			
13	陕西(野生)	2004.10			
14	陕西(家种)	2004.10			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil C₁₈ 柱(200 mm×5.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4%磷酸水溶液-乙腈线性梯度洗脱, 见表 2; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 28 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长 277 nm。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient eluted program of mobile phase

时间/min	甲醇/%	0.4%磷酸/%	乙腈/%
0.01	47	53	0
9	47	53	0
25	27	53	20
40	22	53	25
41	47	53	0
45	47	53	0

2.2 对照品溶液的制备

精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷、汉黄

芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量, 用甲醇溶解, 制成浓度分别为 32, 30, 25, 23 μg·mL⁻¹ 的溶液, 临用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

分别取黄芩、黄芩片粗粉约 0.3 g, 精密称定, 置三角瓶中, 精密加 100 mL 70%乙醇, 称重, 超声提取 30 min, 放冷, 称重, 以 70%乙醇补足损失的重量。吸取此液 10 mL, 以 3 000 r·min⁻¹ 转速离心 10 min, 精密移取上清液 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度定容, 摇匀, 临用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液。

2.4 仪器精密度试验

精密吸取对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 记录色谱图。测得各共有峰的相对峰面积 RSD 小于 3%, 相对保留时间 RSD 小于 1%。表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一样品 5 份, 按“2.3”项下方法制备, 分别进样, 记录色谱图。测得各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 3%, 相对保留时间的 RSD 小于 1%。结果表明实验重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 8, 16, 24 h 测定, 记录色谱图, RSD 小于 1.5%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 线性关系的考察

分别取以上黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素对照品溶液 1, 4, 6, 8, 10, 14 μL, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表 3。

表 3 对照品溶液线性回归方程、线性范围及相关系数

Tab 3 Standard solution regression equation, linear range and interrelated coefficient

对照品溶液	线性回归方程	线性范围/μg	相关系数 r
黄 芩 苷	$Y=4\,404\,245.45X+1\,237.56$	0.032~0.448	0.999 9
汉黄芩苷	$Y=232\,730.9X-235.69$	0.030~0.720	0.998 9
黄 芩 素	$Y=5\,260\,729X-35\,273$	0.025~0.350	0.999 7
汉黄芩素	$Y=818\,626.8X+736.15$	0.023~0.322	0.999 6

2.8 指纹图谱的测定

精密吸取各供试品溶液, 在上述色谱条件下分离测定, 记录色谱图, 结果见图 1、图 2, 并计算相应样本中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素及汉黄芩苷

的含量, 结果见表 4。

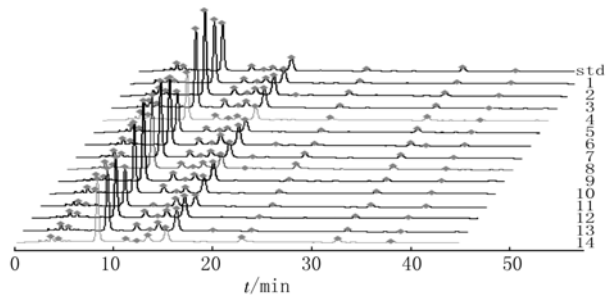


图 1 14 批黄芩药材的 HPLC 指纹图谱纵向叠加图
Fig 1 Vertical superposition chart of HPLC fingerprint of 14 batches of *Radix Scutellariae*

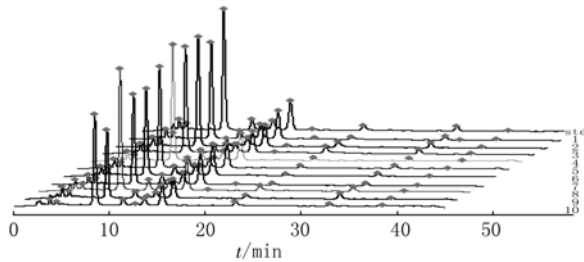


图 2 10 批次黄芩片 HPLC 指纹图谱纵向叠加图
Fig 2 Vertical superposition chart of HPLC fingerprint of 10 batches of processed *Radix Scutellariae* pieces

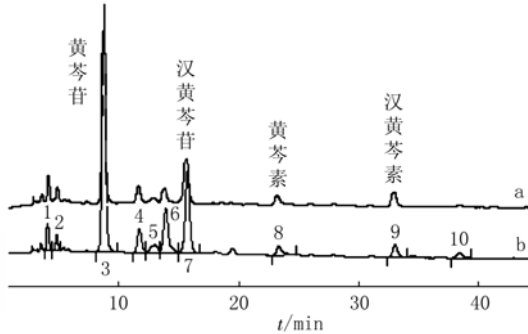


图 3 黄芩药材与黄芩片 HPLC 图谱
a-黄芩片; b-黄芩药材
Fig 3 HPLC chromatogram of *Radix Scutellariae* and processed *Radix Scutellariae* pieces
a-Processed *Radix Scutellariae* pieces; b-*Radix Scutellariae*

表 4 黄芩药材及黄芩片中四种主要有效成分的含量测定结果
Tab 4 Quantitative determination result of the four main active ingredients of *Radix Scutellariae* and its processed pieces

饮 片	黄芩苷 含量/%	汉黄芩苷 含量/%	黄芩素 含量/%	汉黄芩素 含量/%
黄芩药材	12.44±0.95	1.61±0.15	4.40±0.60	1.19±0.21
黄 芩 片	12.34±0.60	1.09±0.09	4.89±0.23	1.16±0.06

由图 3、表 4 可见, 炮制品黄芩片与黄芩药材中 4 种主要有效成分及其含量无显著差异($P>0.05$), 表明规范化的炮制加工方法对黄芩主要有效成分及其质量无明显的影响

2.9 标准 HPLC 指纹图谱的建立及色谱峰归属

考察 10 批黄芩片和 14 批黄芩药材的色谱图, 以中位数法筛选指纹特征峰及色谱峰面积值, 确认特征峰均为 10 个, 见表 5。通过比较在线紫外吸收光谱和加入对照品的方法进行色谱峰的归属, 其中 3 号峰为黄芩苷, 7 号峰为汉黄芩苷, 8 号峰为黄芩素, 9 号峰为汉黄芩素, 其中黄芩苷峰面积百分比占 45% 以上, 因此选作参照峰。建立的标准 HPLC 指纹图谱见图 4、图 5。

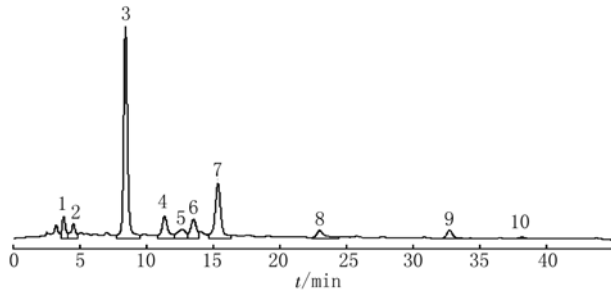


图 4 黄芩药材标准 HPLC 指纹图谱
Fig 4 HPLC standard fingerprint of *Radix Scutellariae*

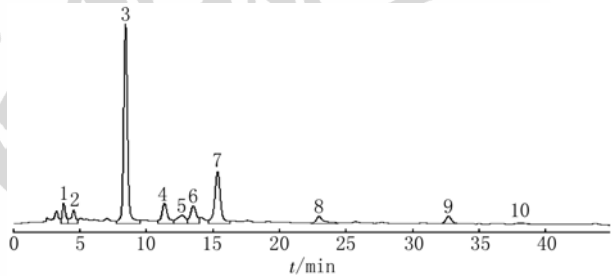


图 5 黄芩片标准 HPLC 指纹图谱
Fig 5 HPLC standard fingerprint of processed *Radix Scutellariae*

表 5 黄芩和黄芩片 HPLC 指纹图谱共有模式特征峰表
Tab 5 Peaks of HPLC fingerprint common pattern of *Radix Scutellariae* and its processed pieces

峰序号	近似保留时间 /min	相对峰面积		成分名称
		黄芩药材	黄芩片	
1	3.818	0.064	0.045	
2	4.571	0.037	0.032	
3(R)	8.458	1.000	1.000	黄芩苷
4	11.35	0.102	0.085	
5	12.58	0.057	0.047	
6	13.58	0.224	0.126	
7	15.49	0.377	0.263	汉黄芩苷
8	23.34	0.055	0.101	黄芩素
9	32.87	0.069	0.068	汉黄芩素
10	38.36	0.016	0.019	

2.10 指纹图谱相似度分析

利用珠海科曼中药研究有限公司开发的色谱指纹图谱系统解决方案软件(Chromafinger2005)进行相似度分析。将实验数据导入该软件系统, 经选峰, 设定匹配模式, 将谱峰自动匹配, 采用相关系数法、

夹角余弦法对 14 个黄芩药材和 10 批黄芩片的色谱图相对于标准指纹图谱进行相似度分析, 结果见表 6。

表 6 相似度结果分析表

Tab 6 Result of similarity analysis

色谱 图号	黄芩药材			黄芩片		
	相关 系数法	夹角 余弦法	匹配峰 数目	相关 系数法	夹角 余弦法	匹配峰 数目
标准	1.000 0	1.000 0	10+0	1.000 0	1.000 0	10+0
1	0.998 8	0.998 9	10+0	0.994 9	0.995 2	10+2
2	0.999 6	0.999 7	10+1	0.997 3	0.998 0	10+1
3	1.000 0	1.000 0	10+0	0.997 1	0.997 8	10+0
4	0.997 3	0.995 7	10+0	0.999 2	0.999 1	10+1
5	0.996 5	0.994 6	10+0	0.999 3	0.999 5	10+0
6	0.996 0	0.995 7	10+2	0.983 2	0.997 2	10+0
7	0.995 4	0.996 5	10+1	0.984 3	0.987 7	10+1
8	0.995 3	0.996 4	10+1	1.000 0	1.000 0	10+0
9	0.999 5	0.999 5	10+1	0.995 9	0.995 4	10+0
10	0.999 8	0.999 9	10+0	0.999 6	0.999 3	10+0
11	0.973 6	0.978 1	10+2			
12	0.986 0	0.989 3	10+0			
13	0.987 0	0.989 6	10+1			
14	0.991 6	0.993 4	10+0			

注: 药材来源同表 1

Note: The sample source is the same as tab 1

从表 6 可以看出, 不同产地并经过规范化炮制加工后的 10 批黄芩片间具有极高的相似度, 来自不同产地的 14 批黄芩药材也具有极高的相似度, 即使距离其他样品较远的 11 号药材和 6 号、7 号黄芩片与各自标准指纹图谱间的相似度也达到了 0.97 以上。相似度的大小反映的是指纹图谱“轮廓”的相似性, 说明不同产地黄芩药材以及不同批次黄芩片指纹图谱在成分的比例上基本一致。

2.11 药材 11 号的指纹图谱与标准指纹图谱的镜像对比

11 号药材样品是所有样本中和标准指纹图谱相似度最低的一个, 为探讨其相似度变化原因采用了镜像对比分析, 见图 6。

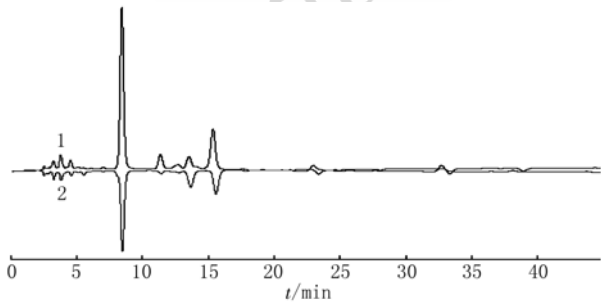


图 6 药材 11 号样品指纹图谱与标准指纹图谱的镜像图

1-标准指纹图谱; 2-11 号药材指纹图谱

Fig 6 Mirror grapy between the eleventh sample fingerprint and standard fingerprint

1-standard fingerprint; 2-the eleventh sample fingerprint

从镜像对比图可以看出样本 11 和标准指纹图谱存在一定差异, 主要是由于峰 3(黄芩苷)含量明显下降, 峰 4、峰 5 和峰 6 之间比例和标准图谱不一致造成, 但是这种差异并不明显, 因为它们的相似度大于 97%。

3 结论与讨论

本实验中考察了甲醇-水系统、乙腈-水系统、乙腈-0.45%磷酸水系统, 由于黄芩中 4 种主要有效成分: 黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷及汉黄芩素极性差别较大, 采用以上系统后两者出峰较慢, 而采用乙腈、甲醇、0.4%磷酸水系统梯度洗脱可以得到分离度好、出峰均匀、基线平稳及时间适宜的各成分色谱峰的色谱图谱。故选择乙腈、甲醇、0.4%磷酸水系统梯度洗脱。

中国药典 2005 年版收载了黄芩片炮制方法即黄芩除去杂质, 置沸水煮沸 10 min, 取出, 焖透; 或蒸 0.5 h, 取出, 切薄片, 干燥(注意避免曝晒)。但上述工艺过于笼统, 如未规定干燥方法、温度等。而直径过粗、质地较硬的黄芩蒸制 0.5h 也难以达到软化效果, 故本课题对黄芩炮制工艺进行系统研究, 并制定出黄芩片的规范化炮制方法。

采用 HPLC 建立了黄芩片和黄芩药材的指纹图谱分析方法, 结果表明, 来自不同产地、同一规格的炮制品其指纹图谱主要峰群的整体图貌具有较高的相似性, 用相关系数法、夹角余弦法进行的相似度计算, 均在 0.97 以上, 说明不同产地的黄芩药材在主要化学成分种类和相对比例上的相似性。

从黄芩片及黄芩药材的 HPLC 图谱可以看出, 二者在峰数上无显著性差异, 说明规范化炮制加工对二者的化学成分无明显的影响, 且由表 4 可知, 二者各主要黄酮类成分的含量除黄芩苷含量略有下降外(但均超过 9%, 符合药典标准), 其他主要有效成分均无显著性差异。说明本课题建立的规范化的黄芩片加工方法工艺稳定, 饮片质量一致。

通过面积归一化可知黄芩片和黄芩药材中黄芩苷约占总峰面积 45%以上, 汉黄芩苷约占总峰面积 15%, 二个主要大峰的面积之和约占总峰面积 60%, 指纹图谱数学相似度主要由占主导地位的化学成分所决定, 所以各供试品相似度较高。

对单一成分占主导的药材, 在进行指纹图谱分析时, 对其它成分的探讨可通过降低主成分权重、检测波长避开主成分的最大吸收波长或采用化学计量学方法(如主成分分析和聚类分析)等途径进

行,而探讨其相似度变化原因时,可进行镜像分析,由于药材 11 号样本的指纹图谱与标准指纹图谱在色谱峰比例上存在差异,造成相似度相对较低。

REFERENCES

[1] MA C Y, DAI B C, LIN R C. HPLC quantitative analysis and

fingerprint study of four flavonoids in *Scutellaria baicalensis* [J].Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2003, 23(2): 83-86.

[2] XIAO L H, WANG H Y, LI F M, et al. Comparative study on HPLC-FPS of *Radix Scutellariae* of various sources [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2004, 21(1): 28.

收稿日期: 2008-09-05