

实际情况,将修正后的最佳提取条件定为:提取时间 4 min,乙醇体积分数 80%,料液比 1:10。在此条件下紫草总萘醌的得率为 0.75%,质量分数 30.33%。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 黄志纾,张敏,马林,等. 紫草的化学成分及其药理活性研究概况[J]. 天然产物研究与开发,2005,12(1):73-83.
- [3] Singh B, Sharma M K, Meghwa P R, et al. Anti-inflammatory activity of shikonin derivatives from *Arnebia hispidissima* [J]. *Phytomedicine*, 2003, (10): 375-380.
- [4] Assimopoulou A N, Boskou D, Papageorgiou V P. Antioxidant activities of alkanin, shikonin and *Alkanna tinctoria* root extracts in oil substrates [J]. *Food Chem*, 2004, (87): 433-43.
- [5] Kim S H, Kang I C, Yoon T J, et al. Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyinn-DMNQ-S-33 [J]. *Cancer Lett*, 2001, (172): 171-175.
- [6] 罗学娅,李明辉,伦永志,等. 左旋紫草素抗副流感病毒作用[J]. 中草药,2005,36(4):568-571.
- [7] 谢秀琼,邱明丰. 对制剂中紫草成分和提取工艺的探讨[J]. 中国药房,1997,8(2):60-61.
- [8] 梁瑞红,谢明勇,刘薇. 超临界 CO₂ 萃取新疆紫草萘醌得率的响应曲面分析[J]. 食品科学,2004,25(50):76-78.

- [9] 史伟国,祖元刚,赵春建,等. 匀浆法提取喜树果和喜树叶中喜树碱的研究[J]. 林产化学与工业,2009,29(1):79-82.
- [10] 张琳,杨磊,贾佳,等. 匀浆法提取长春花中长春碱、文多灵和长春质碱[J]. 高校化学工程学报,2008,29(5):768-773.
- [11] 赵春建,祖元刚,付玉杰,等. 匀浆法提取沙棘果中总黄酮的工艺研究[J]. 林产化学与工业,2006,26(2):38-40.
- [12] 杨磊,李家磊,祖元刚,等. 印楝种子中印楝素 A 的匀浆提取工艺[J]. 东北林业大学学报,2008,36(9):65-67.
- [13] 杨磊,肖长文,赵春建,等. pH 控制匀浆法从迷迭香中提取鼠尾草酸[J]. 黑龙江大学自然科学学报,2008,25(4):514-518.
- [14] 田浩,刘玉,夏禄华,等. 匀浆法提取花生植株中白藜芦醇[J]. 东北林业大学学报,2008,36(3):81-83.
- [15] 祖元刚,赵春建,李春英,等. 鲜法匀浆萃取烟叶中茄尼醇的研究[J]. 高校化学工程学报,2005,19(6):757-761.
- [16] 祖元刚,祖柏实,史权,等. 打浆萃取装置[P]. ZL02275225.0,2002-09-11.
- [17] 杨磊,马春慧,黄金明,等. 兴安落叶松中二氢槲皮素提取方法的比较[J]. 森林工程,2009,25(5):6-11.
- [18] 杨秀芳. 正交实验法优选紫草的提取工艺[J]. 中成药,2005,27(3):351-353.
- [19] 李洪玲,乔秀文,曾宪佳,等. 新疆紫草中紫草素的微波提取工艺优选[J]. 时珍国医国药,2007,18(1):148.
- [20] 白研,白粉云,毋福海,等. 正交试验优选紫草提取工艺[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(4):289-291.

黄芩不同中医调剂品的 HPLC 指纹图谱比较研究

任子瑜,秦雪梅*,薛黎明,李震宇,郭小青,张丽增

(山西大学中医药现代研究中心,山西太原 030006)

摘要:目的 比较黄芩不同中医调剂品黄芩生饮片、3 种酒制黄芩、条芩与枯芩样品之间的 HPLC 图谱,探讨各组样品间的化学差异。方法 采用 HPLC 法。色谱条件: Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相: 甲醇-0.05%磷酸水溶液线性梯度洗脱;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 280 nm。运用相似度软件、SIMCA-P 与 SPSS 软件对指纹图谱进行分析。结果 不同黄芩指纹图谱组间分类明显,组内集中性好;生品与酒制品之间分类明显,差异很大;不同酒制品相比,酒炒和酒炒炭样品比较相近,酒烘与酒炒样品则差异明显;枯芩与条芩相比,差异明显。其中变化明显的成分是黄芩中黄酮类成分中极性较小的成分。结论 证明了古代中医区别用药的合理性,为黄芩质量控制及综合评价提供可靠的科学依据,并为黄芩合理用药提供参考。

关键词: 生黄芩;酒制黄芩;条芩;枯芩;HPLC 指纹图谱

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0573-04

黄芩为唇形科多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,始载于《神农本草经》。古文献记载黄芩用药有“病在头面及手指,皮肤者,须用酒炒之,借酒力以上腾。咽之下脐之上须酒洗之,在下生用大凡生升熟降”;“枯而飘者泻上焦之火,实而坚者,退下部之热”;“清上用枯,清下用

实,内行用醋,外行酒炒”。可见,自古以来,为提高临床疗效,满足不同病症需求,黄芩的应用有别。杨云等^[1~4]通过正交试验确定了黄芩最佳的酒炙与炭制工艺,并比较了黄芩炮制前后 4 种黄酮类成分量的变化。而在不同的酒黄芩炮制品中,酒烘样品色泽鲜亮均匀,工艺条件易于控制。对于黄芩酒炒样

①收稿日期:2009-11-22

基金项目:山西省科技攻关项目(042033)

作者简介:任子瑜(1984—),女,河南省新乡市人,硕士研究生,研究方向为中药质量控制。Tel:13835117085 E-mail:qinxm@sxu.edu.cn

*通讯作者 秦雪梅 Tel:(0351)7011202 E-mail:qinxm@sxu.edu.cn

品,《中国药典》对酒炒工艺参数的规定很笼统,但在炒制过程中,往往又会存在着炒制过度、外观色泽不均等问题^[5]。对于桔芩与条芩,文献则大多以黄芩苷的量比较评价^[6,7],具有一定的局限性。指纹图谱是多组分、多靶点的整体综合控制中药质量的方法,已成为国内外广泛接受的中药质量控制评价模式^[8~11]。本实验针对以上的问题,进行了酒烘黄芩、酒炒黄芩、酒黄芩炒炭3种酒制品与生品、条芩与桔芩等黄芩样品的 HPLC 指纹图谱研究,除了应用常用的相似度分析外,主要采用偏最小二乘法-显著性分析(PLS-DA)方法进行了模式识别分析并进一步寻找到了主要的差异峰,同时结合 SPSS 聚类分析,能更加全面、客观、科学评价黄芩的质量,为黄芩的合理用药及药效研究提供依据与参考。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱分析仪(1525 泵,2487 紫外检测器),Breeze 色谱工作站;KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BS210S 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司)。

甲醇为色谱纯,水为纯净水,磷酸、乙醇均为分析纯;黄芩苷、黄芩素对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 110715-200514、111595-200604。

黄芩药材经山西大学化学化工学院药理学系主任秦雪梅教授鉴定为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根。其中 5 份黄芩饮片分别购自山西太原长城药店、山西太原黄河大药房、山西华阳药业有限公司、山西太原荣华大药房与山西太原万民大药房,用一种饮片分别按《中国药典》方法炮制为酒烘、酒炒、酒炒炭样品。条芩与桔芩各 5 份分别收集于内蒙古各地。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液线性梯度洗脱,见表 1;体积流量 1.0 mL/min;柱温室温;进样量 10 μL;检测波长 280 nm。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution of mobile phase

t/min	甲醇/ %	0.05 %磷酸水溶液/ %
0	40	60
35	40	60
40	60	40
50	60	40
60	40	60

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、黄芩素对照品适量,用甲醇溶解,摇匀,分别制成 61、70 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备及测定:取各种黄芩样品粉末(过 20 目筛)0.15 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70 %乙醇 20 mL,称定质量,超声 60 min,放凉,补定质量,摇匀,滤过,用 70 %乙醇定容至 50 mL 量瓶(洗涤),精密移取 1 mL 置 10 mL 量瓶,用甲醇定容,摇匀,即得。按 2.1 项下的色谱条件测定,记录 HPLC 图谱。

2.4 数据分析方法

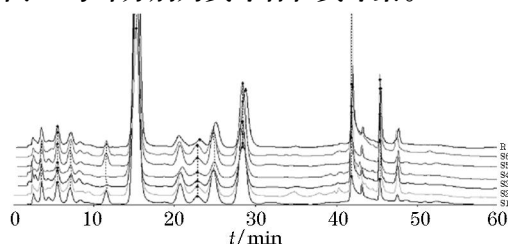
2.4.1 相似度计算:按中国药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》进行计算,得出相应的对照图谱及相似度值。

2.4.2 模式识别:用 Simca-P 11.5 软件(Umetrics, Umea, Sweden),以黄芩样品的 HPLC 图谱的各相对峰面积值为变量,进行了偏最小二乘法-显著性分析(PLS-DA),并进一步寻找各组贡献较大的成分。

2.4.3 聚类分析:以黄芩样品的 HPLC 图谱的各相对峰面积值为变量,数据通过 SPSS 11.6 软件进行聚类分析与 *t* 检验,置信区间设为 95 %,所得 *P* 值与 0.05 比较,当 *P* > 0.05 时没有显著性差异;*P* < 0.05 时有显著性差异。

2.5 结果与分析

2.5.1 HPLC 指纹图谱:由图 1 可见共有模式图谱有 13 个共有峰,峰位指认见图 2,根据对照品指认 5 号峰、10 号峰分别为黄芩苷和黄芩素。



S1-生品 S2-酒烘品 S3-酒炒品 S4-酒炒炭品 S5-条芩
S6-桔芩 R-对照

S1-*Radix Scutellaria* S2-wine-baked *Radix Scutellaria*
S3-wine-fried *Radix Scutellaria* S4-wine-fried carbon
Radix Scutellaria S5-dried *Radix Scutellaria*
S6-wine-fried *Radix Scutellaria* R-control

图 1 黄芩药材指纹图谱

Fig 1 Fingerprints of different *Radix Scutellaria*

2.5.2 黄芩生品与酒制黄芩比较:结果见图 3。从表 2 相似度分析结果看,黄芩生品和酒制品之间相似度均在 0.89 以上,说明黄芩经酒制以后药材成分的“整体性”变化不大;但从图 3 PLS-DA 分析,生品

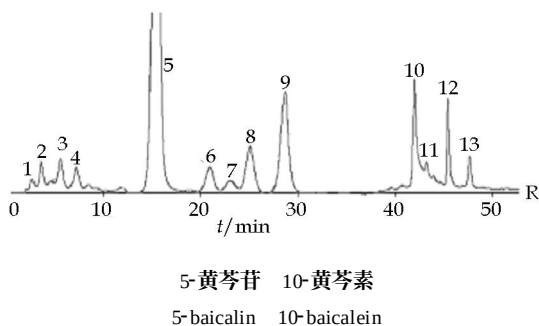
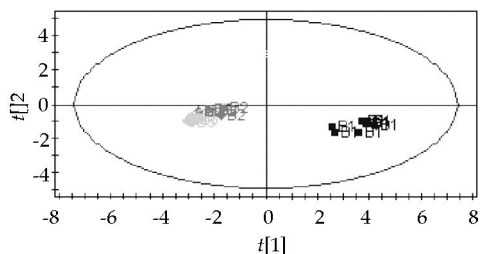


图 2 黄芩样品的共有模式图谱

Fig 2 Common pattern of Radix Scutellaria



B0-生品 B1-酒烘样 B2-酒炒样 B3-酒炒炭样

B0- Radix Scutellaria B1-wine-baked Radix Scutellaria

B2-wine-fried Radix Scutellaria B3-wine-fried carbon

Radix Scutellaria

图 3 生品与酒制黄芩的 PLS-DA 分析的 Score plot 图

Fig 3 PLS-DA Score plot of Radix Scutellaria and wine Radix Scutellaria

表 2 各样品之间的 HPLC 指纹图谱相似度

Table 2 Fingerprint similarity among samples investigated by HPLC

	生品	烘黄芩	炒黄芩	黄芩炭	条芩	枯芩	R
生品	1.000	0.883	0.988	0.872	0.954	0.915	0.972
烘黄芩	0.883	1.000	0.880	0.929	0.883	0.880	0.948
炒黄芩	0.988	0.880	1.000	0.870	0.988	0.940	0.971
黄芩炭	0.872	0.929	0.870	1.000	0.872	0.870	0.947
条芩	0.954	0.883	0.988	0.872	1.000	0.915	0.972
枯芩	0.915	0.880	0.940	0.870	0.915	1.000	0.954
R	0.972	0.948	0.971	0.947	0.972	0.954	1.000

与 3 种酒制品之间存在明显差异,且在酒制品中, B2 与 B3 的点混在一起,说明酒炒黄芩和黄芩炒炭比较接近,而酒炒与酒烘样品彼此分开。进一步分析相应的 Loading 图,主要差异峰见表 3。

由表 3 可知,与生品相比,酒烘黄芩 8 号峰量有所降低,10 号峰黄芩素、12、13 号峰的量升高。酒炒样品中的 8、9、11 号峰的量均明显降低,10、12 与 13 号峰的量均有升高趋势。酒炒炭样品 9、5、8 号峰的量明显降低,与文献报道 5 号峰黄芩苷的量下降一致,12、13 号峰的量有升高的趋势。由此可以看出黄芩在炮制过程中随着温度的升高或者加热时间的延长其中极性较小的化学成分易发生变化。

表 3 各组样品 PLS-DA 分析的主要差异峰

Table 3 Main different peaks by PLS-DA analysis on samples in every group

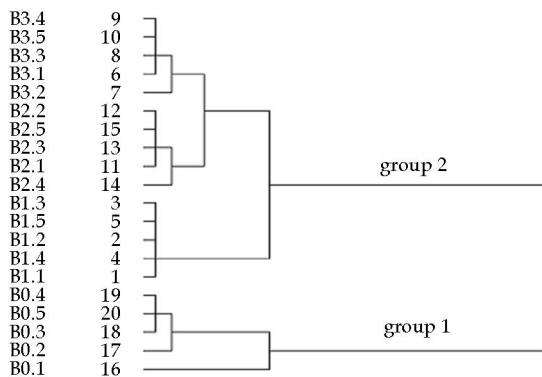
生品与酒制品	主要差异峰及其量变化趋势
B0-B1(生品—酒烘样)	8 ↓;10 ↑*,12 ↑*,13 ↑*
B0-B2(生品—酒炒样)	8 ↓,9 ↓,11 ↓;12 ↑*,13 ↑*,10 ↑
B0-B3(生品—酒炒炭样)	9 ↓*,5 ↓*,8 ↓,1 ↓;12 ↑,13 ↑*
B2-B1(酒炒样—酒烘样)	10 ↑*,12 ↑,13 ↑
B3-B1(酒炒炭样—酒烘样)	10 ↑*,12 ↑*,13 ↑
B2-B3(酒炒样—酒炒炭样)	无
A0-A1(条芩—枯芩)	8 ↓,9 ↓;10 ↑

表中各组比较均是以前者为比较对象,*表示量差异在 2 倍以上的峰

Results compared with formers, and * indicates difference beyond twice of peaks

3 种酒制品之间,酒烘样品与两种酒炒样品相比差异很大,主要差异均在 10、12 与 13 号峰上,酒炒与酒炒炭样品之间则无明显差异。

从聚类图 4 可以看出 3 种酒制黄芩(group 2)与黄芩生品(group 1)之间分类明显。而在酒制品中,两种酒炒样品之间关系比较接近,先聚为一类;酒烘样品与酒炒样品之间分类较明显。这与图 3 的分析结果相同。进一步对两种酒炒样品进行成对 t 检验, $P > 0.05$,同样可以看出两种酒炒黄芩样品无显著差异,与图 3 和图 4 所得的结果相一致。



B0-生品 B1-酒烘样 B2-酒炒样 B3-酒炒炭样

B0- Radix Scutellaria B1-wine-baked Radix Scutellaria

B2-wine-fried Radix Scutellaria B3-wine-fried carbon

Radix Scutellaria

图 4 生品和酒制黄芩之间的 SPSS 聚类分析图

Fig 4 SPSS Hierarchical clustering analysis between Radix Scutellaria and wine Radix Scutellaria

2.5.3 条芩与枯芩比较:条芩与枯芩的 HPLC 指纹图谱经相似度软件分析相似度为 0.915,说明二者之间的图谱整体来看差异不大。

由图 5 中 PLS-DA 分析可以看出条芩(A0)和枯芩(A1)组内聚合状态较好,样品间的分类明显。进一步分析其 Loading 图,显示条芩与枯芩之间的

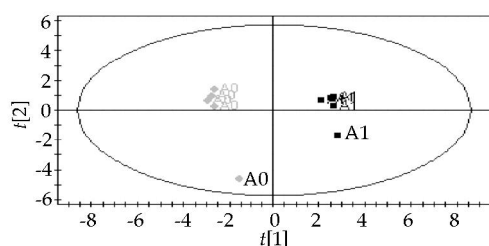


图5 条芩和枯芩 PLS-DA 分析的 Score plot 图
(A0—条芩; A1—枯芩)

Fig 5 PLS-DA Score plot of dried Radix Scutellaria
(A0) and wizened Radix Scutellaria (A1)

差异主要在于 8、9、10 号峰上面(表 3)。与条芩相比,枯芩中 8 号峰和 9 号峰的量降低,10 号峰即黄芩素的量升高。说明随着生长时间的延长黄芩中黄芩素的量升高。因此,本实验认为黄芩药材随着种植年限的增加,所含成分种类几乎没有变化,而是相关成分的量有明显变化。同时也证明了古代对条芩与枯芩在临床上区别应用的正确性。

3 讨论

PLS-DA 分析结果显示:生品在不同的酒制过程中有近一半的成分发生明显变化,进一步证实了自古以来黄芩分生品与炮制品临床应用的合理性;酒炒与酒炒炭样品在炒制过程中辅料相同,只是炒的程度不同。分析结果提示两种酒炒黄芩有相互代用的可能性,但还取决于进一步的临床实践;《中国药典》黄芩炮制项下面关于黄芩炮制规定没有具体的工艺参数,因此本实验也同时证明了黄芩炮制工艺条件较宽的笼统规定是比较合理的。酒烘与酒炒样品,炮制方法明显不同,且差异也较大。因此,在药用方面,酒烘样品不能取代酒炒样品。《中国药典》及各地炮制规范中也尚未收载酒烘黄芩,临床仍应使用传统的酒炒黄芩。对相关峰的进一步研究与指认,将能更好地探讨成分变化对药效的影响。

枯芩中 10 号峰黄芩素的量升高,5 号峰黄芩苷与 8、9 号峰的量下降,这与文献报道^[12] 枯芩由于中空而缺少木质部,使黄芩苷的量大大降低相一致。如能进一步指认 8、9 号峰,可为枯芩与条芩临床区别用药提供参考。

相似度评价软件是从宏观、整体的角度去评价药材的整体面貌,体现了指纹图谱“整体性”与“模糊

性”的特点。主要适用于存在较大差异的样品如不同产地,不同种的样品,从而建立具有代表性的模式指纹图谱,作为对未知药材鉴别与评价的依据。PLS-DA 则是以 HPLC 图谱峰的相对峰面积值为考察变量进行分析。模式识别与指纹图谱不同的是,在分析过程中,它把强的信号与较弱的信号放在同一水平上考虑^[13]。适合于分析有细微区别的样品,并可以寻找到引起差异的主要标志物。

本实验采用 PLS-DA 方法对有细微差异的不同黄芩样品进行了模式识别分析,并与 SPSS 聚类分析结果相互结合,能更好地进行聚类及寻找主要差异成分,从而避免了仅以单一指标或者有限的指标去评价药材质量的问题,为中药质量评价提供了新的思路与方法。

参考文献:

- [1] 杨云,冯卫生. 酒黄芩 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1289-1292.
- [2] 杨云,冯卫生. 黄芩酒炙工艺及酒黄芩 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2007, 29(5): 713-716.
- [3] 杨云,闻永久. 黄芩炭制工艺及其 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1518-1521.
- [4] 杨云,万焱. 黄芩及其炮制品的 HPLC 图谱对比研究[J]. 化学世界, 2007(1): 14-15.
- [5] 薛黎明. 酒黄芩炮制工艺及饮片标准研究[J]. 中成药, 2007, 29(4): 545-547.
- [6] 刘平,古今. RP-HPLC 法考察枯芩与子芩不同部位中黄芩苷含量和不同炮制方法的影响[J]. 中国药物应用与监测, 2007(2): 23-25.
- [7] 赵婷,闫永红,王文全. 热河黄芩中黄酮类成分的指纹图谱研究[J]. 中国药品标准, 2007, 8(2): 34-36.
- [8] 王文燕,赵强,张铁军,等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1638-1641.
- [9] 王文燕,赵强,张铁军,等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1810-1813.
- [10] 王文燕,赵强,张铁军,等. 牛黄降压丸的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 56-57.
- [11] 王文燕,赵强,张铁军,等. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980-1983.
- [12] 谢琴,华晓东,王菊美,等. 不同产地、不同部位黄芩的黄芩苷含量测定[J]. 上海中医药杂志, 2001, 3: 39-40.
- [13] Michel F, Young H, Luc A, et al. Metabolomic analysis of *Strychnos nux-vomica*, *Strychnos icaia* and *Strychnos ignatii* extracts by ¹H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1993-2001.