

基于抑菌药效的黄芩提取物精制工艺优选

于蓓蓓, 吕 凌, 于宗渊, 闫雪生

山东省中医药研究院, 山东 济南 250012

摘要: **目的** 优选黄芩提取物精制工艺。**方法** 采用抑菌率法测定黄芩提取物抑菌药效, HPLC 法测定其有效成分的量, 并采用正交试验设计, 以抑菌率及有效成分提取量为指标, 归一值法综合评分, 考察酸沉时药液浓度和 pH 值、2 次保温温度、保温时间和静置时间的影响。并比较精制前后的提取物的抑菌药效, 优选其制备工艺。**结果** 确定最佳精制工艺为药液浓缩到含生药 0.5 g/mL, 用 2 mol/L 盐酸调节 pH 值至 2~2.5, 80 °C 保温 1 h, 静置 24 h, 减压滤过, 沉淀物加 1 倍量的水混悬, 用 40% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 加等量 95% 乙醇, 搅拌使溶解, 滤过, 滤液再次如上法酸沉, 减压滤过, 沉淀水洗至 pH 值 5.0, 95% 乙醇洗涤, 挥尽乙醇, 减压干燥, 即得。**结论** 该优选工艺所得提取物有较高的抑菌药效, 工艺稳定、可行。

关键词: 黄芩; 抑菌率; 黄芩苷; 黄芩素; 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)03-0362-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.012

Optimization of purification technology for extract from *Scutellaria baicalensis* based on antimicrobial efficacy

YU Bei-bei, LYU Ling, YU Zong-yuan, YAN Xue-sheng

Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To optimize the purification technology for the extract from *Scutellaria baicalensis*. **Methods** The antimicrobial efficacy of *S. baicalensis* extract *in vitro* was evaluated with bacteriostatic rate test. And the contents of the active components in *S. baicalensis* extract were determined using HPLC method. Taking the bacteriostasis rate and the extraction weight of the active components as indexes, using the overall normalizing method for grading comprehensively, orthogonal test was employed to optimize the purification conditions of *S. baicalensis* extract, such as the concentration degree and pH value of the extract before acid precipitation, the holding temperature and time, and the standing time. The antimicrobial effects of *S. baicalensis* extract before and after purification were compared to determine the optimal process. **Results** The optimal purification process was as follows: concentrating the water extract to the degree of 1:2, regulating the pH value to 2-2.5 with 2 mol/L HCl solution, holding the temperature of 80 °C for 1 h, and standing for 24 h, then filtering under decompression, resuspending the precipitate with equivalence water, regulating the pH value to 7.0 with 40% NaOH solution, adding equivalence 95% alcohol, agitating to dissolve and filter, then adding HCl solution to precipitate and filter as before, washing the precipitate with water to regulate the pH value to 5.0, and at last washing the precipitate with 95% alcohol, drying under reduced pressure to obtain the product. **Conclusion** The product of this process has high antimicrobial efficacy and retention rate of active components, which proves that the preparation process is feasible, stable, and reasonable.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; antimicrobial rate; baicalin; baicalein; orthogonal test

黄芩是一种临床常用中药, 其味苦性寒, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效。目前黄芩市场上野生品、不同年限的栽培品及习用品混杂,

质量参差不齐, 严重影响其相关产品的临床疗效。黄芩提取物保留了黄芩的有效成分和功效^[1], 在质量控制方面具有相当的优势, 因此成为多种中成药

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 山东省中医药科技发展计划重点项目 (2011Z-003-1)

作者简介: 于蓓蓓 (1983—), 女, 山东禹城人, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药化学及制剂研究。

Tel: 13791049031 Fax: (0531)82968473 E-mail: ybb137@163.com

的原料药。《中国药典》2010年版中，成方制剂三黄片、珍黄胶囊（珍黄丸）以“黄芩浸膏（粉）”为原料药，牛黄降压丸（胶囊）、茵栀黄口服液、银黄口服液（颗粒）以“黄芩提取物”为原料药，而清开灵系列制剂则以“黄芩苷”入药。上述原料药虽都为黄芩的提取物，但制法却不尽相同，且没有统一的质量标准。《中国药典》2010年版规定了黄芩提取物的制法，提高了黄芩苷的质量分数，其质量标准也只以黄芩苷为指标^[2]。另外，有关黄芩提取工艺的研究较多，但也多以黄芩苷为指标，没有可行的药效指标^[3]。近年来研究表明，黄芩中汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素亦是黄芩中的主要特征性成分，与黄芩的功效具有相关性，是评价黄芩和提取物质量的适宜指标^[4-7]；而在黄芩提取物精制过程中同时采用药效指标，能更好地保留有效成分，去除杂质。本实验采用正交设计，以体外抑菌药效及黄芩苷、黄芩素提取量为指标，采用归一值法综合评分，对黄芩提取物精制工艺进行优化，制备具有确定药效的黄芩提取物，为黄芩提取物的标准化提供科学依据。

1 仪器与材料

安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪；BP211D 赛多利斯电子天平；Welchrom C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 高效液相色谱柱；RE52—99 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；LC—350A 型超声波中药处理机（济宁市中区鲁超仪器厂）；LDZX—40KBS 立式压力蒸气灭菌器（上海申安医疗器械厂）；7200 型分光光度计（上海合利仪器公司）；THZ—82B 气浴恒温振荡器（江苏金坛市医疗仪器厂）；ZPQ—280 型智能培养箱（哈尔滨东拓科技发展有限公司）；VS—1300—U 型洁净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；E200 型双目显微镜（日本尼康）。

金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）购自山东省疾病预防控制中心。

黄芩苷（批号 110797200307，质量分数≥99%）、黄芩素（批号 111595200905，质量分数≥99%），均购自中国食品药品检定研究院；汉黄芩素（批号 20021024，质量分数≥95%）、汉黄芩苷（批号 20021121，质量分数≥95%），均为山东省中医药研究院自制。

黄芩饮片（批号 20120203）购自亳州中药饮片厂，经山东省中医药研究院中药资源室林慧彬研究员鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。色谱甲醇（批号 20120927011，山东禹王实业有限公司化工分公司），酵母提取物（批号 20110204，北京奥博星生物技术责任有限公司），胰蛋白胨（批号 20101102，中国进出口商品检验技术研究所），氯化钠、磷酸等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 有效成分的测定

2.1.1 色谱条件^[8] 色谱柱为 Welchrom C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min, 45%甲醇，10~55 min, 45%~70%甲醇；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 274 nm；进样量 10 μL。理论板数按黄芩苷峰计算不低于 3 000。对照品及样品色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取黄芩苷、黄芩素对照品适量，加甲醇使其质量浓度分别为 64、123 μg/mL，另加入适量汉黄芩苷、汉黄芩素自制对照品用于定位，经 0.45 μm 滤膜滤过，即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的配制 取适量黄芩提取物，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声 20 min

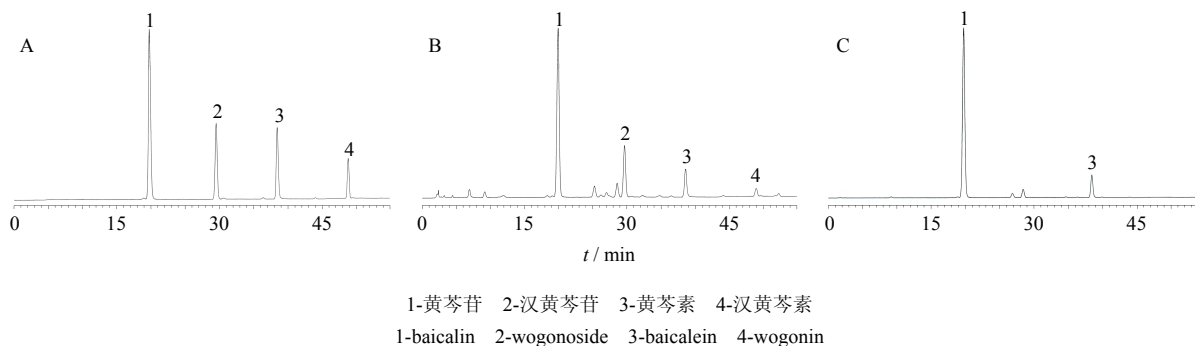


图 1 黄芩有效成分对照品 (A)、黄芩水提物 (B) 和精制品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of reference substances (A), water extract (B), and refined product (C) of active components in *S. baicalensis*

使溶解, 冷却至室温, 定容, 摇匀。经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2 抑菌率的测定^[9]

2.2.1 供试菌种及培菌方法 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538) 二代 LB 培养基 37 °C 培养箱培养。

2.2.2 最小抑菌浓度 (MIC) 实验 取黄芩提取物 18 批, 分别用一定量水溶解后灭菌, 采用 2 倍稀释法加入盛有培养基的试管中, 然后将含菌量为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cfu/mL 的菌悬液接种于各试管中, 分别于 37 °C 培养箱内恒温培养 24 h 后, 以完全无菌生长的最小浓度为 MIC。结果 16 批黄芩提取物的 MIC 为 3.125 mg/mL (相当于生药量), 即以此浓度进行抑菌率的测定。

2.2.3 抑菌率的测定 将不同方法所制备的黄芩提取物配制成每毫升相当于 3.125 mg 生药的水溶液, 灭菌。每批供试液取 4 支试管, 依次编号 1~4。先向 1、3、4 号试管中分别加入 2 mL LB 液体培养基, 然后在 1 号管中加入 2 mL 供试液, 混匀; 从 1 号管中吸取 2 mL 混合液移入 2 号管中作为阴性对照; 3 号管作为空白对照, 4 号管作为阳性对照。向 1 号管和 4 号管中分别加入 0.2 mL 含菌量为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 菌悬液, 摇匀, 分别测定其吸光度 (A) 值, 然后连同 2 号管和 3 号管于 37 °C 下培养 24 h, 如 2 号管和 3 号管均无污染, 则再次测定 1 号管和 4 号管的 A 值。计算该批供试液的抑菌率。

黄芩抑菌率 = $1 - (\text{样品培养后 } A \text{ 值} - \text{样品培养前 } A \text{ 值}) / (\text{菌液培养后 } A \text{ 值} - \text{菌液培养前 } A \text{ 值})$

2.3 黄芩提取物精制工艺优选

2.3.1 正交试验设计 以抑菌率和黄芩苷、黄芩素提取量为指标, 选取酸沉时药液质量浓度 (A) 和酸沉 pH 值 (B)、第 1 次保温温度 (C)、保温时间 (D)、第 2 次保温温度 (E) 和静置时间 (F) 这 6 个因素来观察其对黄芩提取物精制的影响。取一定量黄芩饮片加热回流提取 2 次, 每次提取 2 h, 加水量分别为 12、10 倍, 提取液合并滤过; 取 18 份提取浓缩液, 每份相当于 10 g 黄芩饮片的量, 按表 1 中所述精制条件, 分别浓缩至一定程度, 用 2 mol/L 盐酸调节 pH 值, 一定温度下保温, 静置, 减压滤过, 沉淀物加 1 倍量的水混悬, 用 40% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 加等量 95% 乙醇, 搅拌使溶解, 滤过, 滤液再次如上法酸沉, 减压滤过, 沉淀水洗至 pH 值至 5.0, 少量 95% 乙醇洗涤, 挥尽乙醇, 减压干燥, 即得黄芩精制提取物, 精密称定, 分别测

定抑菌率和黄芩苷、黄芩素提取量进行数据分析。试验设计及结果见表 1。

2.3.2 数据分析 将各指标值采用 Hassan 方法分别进行数学转换, 求归一值 (d), 再求算几何平均数, 得总评归一值 (OD)^[10]。

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

Y_i 为不同条件制备提取物的各指标值, Y_{\max} 为该指标最大值, Y_{\min} 为该指标的最小值

$$OD = [(d_{\text{黄芩苷}} \cdot d_{\text{黄芩素}})^{1/2} \times d_{\text{抑菌率}}]^{1/2}$$

以 OD 值作为各个实验设计的响应值进行数据分析, 优选最佳条件, 确定提取物精制工艺。直观分析见表 1, 方差分析见表 2。

由表 1 和表 2 可知, 在该正交试验设定的因素水平条件下, 各因素对综合评分结果影响大小依次为 $C > A > B > F > E > D$ 。其中因素 C、A、B 对试验结果有显著性影响 ($P < 0.05$), 因素 F、E 对试验结果影响较小, 而 D 因素对试验结果基本无影响。综合直观分析与方差分析的结果, 确定黄芩提取物最佳精制工艺为 $A_3B_3C_3D_2E_3F_3$, 即药液浓缩到每毫升含 0.50 g 生药, 用 2 mol/L 盐酸调节 pH 值至 2.0~2.5, 80 °C 保温 1 h, 静置 24 h, 减压滤过, 沉淀物加 1 倍量的水混悬, 用 40% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 加等量 95% 乙醇, 搅拌使溶解, 滤过, 滤液再次如上法酸沉, 减压滤过, 沉淀水洗至 pH 值至 5.0, 少量 95% 乙醇洗涤, 挥尽乙醇, 减压干燥, 即得。

2.3.3 验证试验 为进一步考察该精制工艺的可靠性及稳定性, 取 3 份提取液, 每份相当于 10 g 黄芩饮片的量, 按上述最佳工艺进行验证试验, 结果黄芩苷分别为 838.66、833.62、836.94 mg, 黄芩素分别为 55.63、54.04、58.79 mg, 抑菌率分别为 98.5%、99.3%、98.3%, 收率分别为 9.81%、9.68%、9.73%。结果表明, 该精制工艺所得黄芩提取物为淡黄色粉末, 收率平均为 9.74%, 抑菌药效和有效成分提取量都较高, 且稳定可行。

2.4 精制前后提取物抑菌药效比较

各取 3 批新制的精制前后的提取物比较其抑菌药效, 结果黄芩水提物 (精制前) 的抑菌率分别为 96.7%、98.0%、96.4%, 均值为 97.0%; 黄芩提取物 (精制品) 的抑菌率分别为 98.5%、99.3%、98.3%, 均值为 98.7%; 精制品略高于未精制品。但 (25 ± 2) °C、相对湿度 (60 ± 10) % 条件下放置 6 个月后, 黄芩水提物 (精制前) 的抑菌率分别

表1 黄芩提取物精制 L₁₈(3⁷) 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of L₁₈(3⁷) orthogonal test for purification of *S. baicalensis* extract

试验号	A/(g·mL ⁻¹)	B	C/°C	D/min	E/°C	F/h	G(误差)	黄芩苷/mg	黄芩素/mg	抑菌率/%	OD值
1	0.10(1)	1.0~1.5(1)	60(1)	30(1)	60(1)	6(1)	(1)	275.97	8.75	37.2	0.000
2	0.10(1)	1.5~2.0(2)	70(2)	60(2)	70(2)	12(2)	(2)	539.50	26.10	29.5	0.000
3	0.10(1)	2.0~2.5(3)	80(3)	90(3)	80(3)	24(3)	(3)	672.61	23.33	77.1	0.610
4	0.25(2)	1.0~1.5(1)	60(1)	60(2)	70(2)	24(3)	(3)	354.67	12.01	88.5	0.312
5	0.25(2)	1.5~2.0(2)	70(2)	90(3)	80(3)	6(1)	(1)	539.10	12.54	69.9	0.362
6	0.25(2)	2.0~2.5(3)	80(3)	30(1)	60(1)	12(2)	(2)	583.24	20.88	71.9	0.516
7	0.50(3)	1.0~1.5(1)	70(2)	30(1)	80(3)	12(2)	(3)	328.16	14.39	84.0	0.310
8	0.50(3)	1.5~2.0(2)	80(3)	60(2)	60(1)	24(3)	(1)	795.20	48.46	97.2	1.000
9	0.50(3)	2.0~2.5(3)	60(1)	90(3)	70(2)	6(1)	(2)	789.33	27.06	89.2	0.772
10	0.10(1)	1.0~1.5(1)	80(3)	90(3)	70(2)	12(2)	(1)	465.64	17.93	71.5	0.425
11	0.10(1)	1.5~2.0(2)	60(1)	30(1)	80(3)	24(3)	(2)	717.66	43.22	73.0	0.743
12	0.10(1)	2.0~2.5(3)	70(2)	60(2)	60(1)	6(1)	(3)	423.09	13.55	73.8	0.348
13	0.25(2)	1.0~1.5(1)	70(2)	90(3)	60(1)	24(3)	(2)	357.37	10.84	84.6	0.272
14	0.25(2)	1.5~2.0(2)	80(3)	30(1)	70(2)	6(1)	(3)	767.91	15.88	95.8	0.636
15	0.25(2)	2.0~2.5(3)	60(1)	60(2)	80(3)	12(2)	(1)	484.29	16.60	93.0	0.514
16	0.50(3)	1.0~1.5(1)	80(3)	60(2)	80(3)	6(1)	(2)	778.53	35.69	66.1	0.662
17	0.50(3)	1.5~2.0(2)	60(1)	90(3)	60(1)	12(2)	(3)	581.14	17.89	62.6	0.424
18	0.50(3)	2.0~2.5(3)	70(2)	30(1)	70(2)	24(3)	(1)	527.12	21.08	81.4	0.545
K ₁	0.354	0.330	0.461	0.458	0.427	0.463	0.474				
K ₂	0.435	0.527	0.306	0.473	0.448	0.365	0.494				
K ₃	0.619	0.551	0.641	0.477	0.533	0.580	0.440				
R	0.265	0.221	0.335	0.019	0.106	0.215	0.054				

表2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	0.220	2	24.444	P<0.05
B	0.176	2	19.556	P<0.05
C	0.338	2	37.556	P<0.05
D	0.001	2	0.111	—
E	0.038	2	4.222	—
F	0.140	2	15.556	—
G(误差)	0.009	2		

F_{0.05}(2, 2)=19.00 F_{0.01}(2, 2)=99.00

为64.8%、66.3%、62.6%，均值为64.6%；黄芩提取物（精制品）的抑菌率分别为95.1%、94.2%、94.8%，均值为94.7%；精制品抑菌药效未有明显降低（平均降低4.0%），未精制品则有显著降低（平均降低32.4%），可见精制品的抑菌药效高，且稳定性较好。

3 讨论

中药是一个有效成分群组合，并以多靶点、多途径作用于人体，其药效是这一有效成分群组合协同作用的结果^[11]，药效指标最能体现中药的质量。目前对中药提取工艺及质量标准的研究绝大多数仅以有效成分的量指标，缺乏简便可行的药效指标。本实验以抑菌率法来测定提取物抑菌药效，稳定可行，且与其他抑菌药效测定方法如滤纸片法^[12]相比，抑菌率法更易于定量表达，可用于具有抑菌药效的中药的提取工艺优选和质量标准研究。

文献报道的黄芩抑菌有效成分虽已明确为黄芩苷及其同系物，但何种配伍下的抑菌药效最佳尚不明确。在精制过程中，黄芩有效成分黄芩苷、黄芩素得到富集，汉黄芩素、汉黄芩苷则损失较大，而抑菌率提高了。可见，本实验所优化的精制工艺可实现黄芩苷及其同系物的最佳配伍以达到最高抑菌药效。

通过比较精制前后提取物的抑菌药效,发现新制未精制提取物和精制品的抑菌率没有显著性差异,但精制品的稳定性较高,而未精制品放置6个月后其抑菌率有大幅度的下降,可能因为所含杂质成分较多,如多糖等容易吸潮而使提取物腐坏从而品质下降。因此,该精制工艺不仅可以富集有效成分,还可以提高黄芩提取物稳定性,保证其药效和质量。

参考文献

- [1] 崔蓉,孟宪丽,王平,等.黄芩水提取物对急性肺损伤大鼠的保护作用及其与胆碱能抗炎通路的相关性研究[J].中草药,2012,43(2):321-326.
- [2] 中国药典.[S].一部.2010.
- [3] 宋承富,叶萍.黄芩提取物工艺研究[J].中华中医药学刊,2011,29(3):641-644.
- [4] 王军政,冯锋,徐明婧,等.黄芩素衍生物构效关系研究进展[J].药学进展,2008,32(6):241-246.
- [5] 王晓瑜,龙汉安.黄芩及黄酮类成分防治肿瘤作用的研究进展[J].华西医学,2011,26(2):297-300.
- [6] 李忠魁.汉黄芩苷对人肝癌细胞BEL-7402的抑制作用研究[D].长沙:中南大学,2007.
- [7] Shang Q, Liu W, Xu W R, et al. Virtual evaluation on activities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 136-140.
- [8] 丁芳林,张雯杰,陈波,等.HPLC法测定黄芩提取物中4种主要活性成分的含量[J].湖南农业科学,2008(3):128-130.
- [9] 赵瀚年,于宗渊,丁晓彦,等.黄芩质量评价谱-效相关模式的研究[J].中草药,2011,42(2):380-383.
- [10] 吴伟,崔光华,陆彬.实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J].中国药学杂志,2000,35(8):530-533.
- [11] 张铁军.中药质量认识与质量评价[J].中草药,2011,42(1):1-9.
- [12] 蔡文燕.金线莲提取物的抑菌作用研究[J].漳州师范学院学报:自然科学版,2008,21(3):76-78.