

黄芩制剂制备过程成分含量变化及其药效相关性研究

王雅琪^{1,2}, 焦姣姣¹, 熊 优², 胡彦君², 伍振峰², 杨 明^{1,2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 611130

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 探讨黄芩制剂制备过程中主要指标性成分含量变化与其药效活性间的相关性, 阐明黄芩制剂制备过程的关键影响环节, 质量源于设计角度整体评价制剂质量疗效短板。 **方法** 模拟黄芩制剂制备过程(提取-浓缩-干燥-制粒), HPLC 法测定各阶段化学成分的含量变化; 以脂多糖(LPS)诱导小鼠腹腔巨噬细胞为炎症模型, 测定各阶段中间体溶液的抗炎活性; 聚类分析法和线性回归法对指标性成分-药效活性数据进行相关分析。 **结果** 提取-浓缩-干燥-制粒等过程中黄芩化学成分含量与其抗炎活性整体呈下降趋势, 其中长时间热处理(浓缩、干燥)损失较大。 **结论** 黄芩制剂制备过程中的各阶段操作水平对其指标成分含量及药效活性影响显著, 其中浓缩、干燥环节为影响其制剂质量的关键环节。

关键词: 黄芩; 制备过程; 药效活性; 相关性; 黄芩苷

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)01-0115-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.016

Correlation between chemical composition and pharmacological activity of *Scutellaria baicalensis* during its preparation process

WANG Ya-qi^{1,2}, JIAO Jiao-jiao¹, XIONG You², HU Yan-jun², WU Zhen-feng², YANG Ming^{1,2}

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** Process design grants the quality connotation to products. To study the changes of main chemical ingredient of *Scutellaria baicalensis* preparation in the preparation process and the correlation with its pharmacological activity. To clarify the key step of *S. baicalensis* preparation process, and overall evaluate the short plate of the quality of preparation from the perspective of the design. **Methods** The preparation process (extracting-concentrating-drying-granulation) was simulated. HPLC analysis was employed to determine the contents of the chemical ingredients in each step of preparation process. Induction by LPS in mouse peritoneal macrophages of each intermediate was used as the model to determinate the anti-inflammatory activity. Cluster analysis and linear regression were used to analyze the correlation between its chromatogram and pharmacological activity. **Results** The content of chemical ingredients and anti-inflammatory activity of *S. baicalensis* were generally decreased on the whole, and the highest loss occurred in the concentrating-drying process. **Conclusion** Each step of the preparation process of *S. baicalensis* preparation has significant effect on the chemical ingredients and pharmacological activity. The concentrating and drying process may be the key process which could finally influence the quality of preparation.

Keywords: *Scutellaria baicalensis* Georgi; preparation process; pharmacological activity; correlation; baicalin

黄芩为唇形科黄芩属多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 是我国著名的传统中药,《神农本草经》将其列为中品, 主治“诸热, 黄疸, 肠泄痢, 逐水, 下血闭, 恶疮, 疽蚀, 火伤”。《中国药典》2015 年版记载黄芩具有“清热

燥湿, 泻火解毒, 止血, 安胎”功效, 临床上用于湿温、暑湿, 湿热痞满, 肺热咳嗽, 高热烦渴, 血热吐衄等^[1]。黄芩在临床应用已有超过 2 000 年的历史, 除中医配方药材外, 大量用作中成药原料, 根据《全国中成药产品目录》第一部的统计资料,

收稿日期: 2017-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560649); 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-TJ-43)

作者简介: 王雅琪, 博士, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118108 E-mail: wangyaqi_3@163.com

*通信作者 杨 明, 教授。Tel: (0791)87118108 E-mail: yangming16@126.com

70%的中成药均含有黄芩^[2]。目前黄芩药材及饮片的需求量逐年增大,已经成为我国大宗中药材之一。

中药制剂传统制备过程包括药材的预处理、提取、浓缩、精制、干燥、成型等各个工艺环节,不同阶段的中间体,经 1 次或多次物理、化学和生物等信息的传递或整合后,构成了最终产品的质量内涵,影响产品效能的发挥^[3-4]。传统中药制剂质量控制模式多集中于“事后控制”,各阶段过程控制水平与中间体/成品质量关联度不清,进而导致产品批间差异较大、不具有追溯性、控制困难等缺陷^[5]。

2016 年国家中医药管理局开展了中药标准化项目,强调中药饮片/中成药生产全过程质量控制技术规范与标准的制定,其中明确要求对生产过程中主要关键药效成分转移进行研究,基于药效关联的活性成分在提取-浓缩-干燥过程中的变化,进而建立以药材的药效物质成分及药效评价相关的提取、浓缩、干燥关键工序质量控制标准。因此,本研究着眼于黄芩制剂整体制备过程,以提取-浓缩-干燥-制粒等关键工艺环节为研究对象,考察主要指标性成分黄芩苷含量变化,构建 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型,运用计量学方法将化学成分-药效活性进行相关性分析,初探黄芩提取物制备过程的关键影响环节,为后续制备工艺优化提供理论基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

电热套, 郾城华鲁电热仪器有限公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 包括四元泵, DAD 检测器, 柱温箱, 工作站, 安捷伦科技有限公司; KQ5200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; BT25S 电子分析天平, 十万分之一, 德国 Sartorius 公司; Forma 3111 二氧化碳恒温培养箱, Thermo Electron; TDZ4A-WS 型台式低速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; XW-80A 漩涡混合器, 上海青浦沪西仪器厂; YXQ-SG46-280S 高压蒸汽灭菌锅, 上海博迅实业有限公司; Elx800 酶标仪, 美国基因有限公司; Eclipse TS100 倒置显微镜, Nikon 公司。

1.2 试药与细胞

黄芩苷对照品, 20 mg, 质量分数≥98%, 批号 N007-110416, 中国食品药品检定研究院; CCK8 试剂盒 (批号 609K011)、青链霉素混合液 (批号 20161201)、DMSO (批号 520C0317)、Hank's 缓冲液 (批号 20170120)、非必需氨基酸 (批号 20170317)、L-谷氨酰胺 (批号 20170412), 索莱宝

公司; DMEM 培养基 (批号 AB10201637), HyClone 公司; 胎牛血清 (批号 1856032), Gibco 公司; 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, 中国科学院上海细胞生物所; 乙腈, Tedia 公司; 水为双蒸馏水, 实验室自制; 其他试剂均为分析纯。

黄芩饮片于 2015 年购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 经江西中医药大学杨明教授鉴定为黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定各阶段指标成分

2.1.1 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2015 年版一部中“芩连片”制法, 精密称取黄芩饮片 50 g, 10 倍量的水 (500 mL), 回流提取 3 次, 每次 1 h, 提取液滤过, 合并, 定容至 1 500 mL, 得黄芩提取液 (S1)。提取液合并定容后 60 °C 水浴依次减压浓缩 (1 000、500、250、100 mL), 分别在近终点时取样 (取样前按浓缩要求依次定容), 分别标记为黄芩浓缩液 (S2~S5)。从浓缩液 (S5) 中分别取 10 mL 放入 60 °C 烘箱鼓风干燥, 在 1、2、3、4 h 时取样, 标记为黄芩干膏 (S6~S9)。再从浓缩液 (S5) 中取适量浓缩液继续减压浓缩至流浸膏状态加入适量的糊精, 制颗粒, 60 °C 烘箱干燥后称定质量, 得黄芩颗粒 (S10), 见表 1。

浓缩、干燥、颗粒各环节供试品溶液分析前均参照 S1 配制成标准浓度 (干膏、颗粒样品分别用甲醇水超声溶解, 涡旋仪混匀后定容)。每份样品取样 0.5 mL, 平行 3 份。所有供试品溶液均用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用双蒸水超声溶解并定

表 1 各环节供试品溶液的制备

Table 1 Preparation of sample in each step

编号	样品信息
S1	提取液合并且定容至 1 500 mL
S2	减压浓缩至 1 000 mL
S3	减压浓缩至 500 mL
S4	减压浓缩至 250 mL
S5	减压浓缩至 100 mL
S6	取浓缩液 10 mL 干燥 1 h
S7	取浓缩液 10 mL 干燥 2 h
S8	取浓缩液 10 mL 干燥 3 h
S9	取浓缩液 10 mL 干燥 4 h
S10	制备成颗粒后甲醇超声溶解

容摇匀,配成质量浓度为 0.52 mg/mL 的黄芩苷对照品贮备液,置 4 ℃ 冰箱保存备用。

2.1.3 色谱条件 色谱柱 Gemini 5 μ C₁₈ 110A (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1%乙酸水溶液,梯度洗脱: 0~10 min, 25%乙腈; 10~30 min, 25%~70%乙腈; 30~35 min, 70%~100%乙腈; 35~40 min, 100%乙腈; 体积流量 1 mL/min, 检测波长 278 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μ L。理论塔板数按黄芩苷计算不低于 5 000。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取“2.1.2”项下对照品储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,溶解稀释至刻度,得系列质量浓度的黄芩苷对照品溶液。按“2.1.3”项下方法,记录峰面积,以质量浓度为横坐标 (X),峰面积积分值为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,得黄芩苷回归方程 $Y=2037.9 X-49.78$, $R^2=1.000 0$,结果表明,黄芩苷在 0.52~10.40 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 参照“2.1.3”项下方法, HPLC 当日重复进样 6 次,记录峰面积,结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.43% $<$ 3%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取黄芩提取液 (S1) 10 μ L, 参照“2.1.3”项下色谱条件, HPLC 每 3 小时测定 1 次,记录峰面积,结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.98% $<$ 3% ($n=6$),表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.1.7 重现性试验 分别称取 6 份黄芩饮片,按“2.1.1”项下黄芩提取液 (S1) 制备方法处理后,按“2.1.3”项下色谱条件测定。黄芩苷峰面积的 RSD 为 2.11% $<$ 3%,表明方法重现性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取 6 份已知黄芩苷量的黄芩饮片,每份 50 g,按照样品中黄芩苷量的 100% 分别精密加入黄芩苷对照品,按“2.1.1”项下 S1 供试品溶液的制备方法处理后,按“2.1.3”项下色谱条件测定。结果黄芩苷的平均回收率 99.06%, RSD 为 1.65% $<$ 5%。

2.1.9 黄芩制剂制备过程指标性成分定量测定 精密吸取黄芩各环节供试品溶液 (S1~S10) 10 μ L, 参照“2.1.3”项下色谱条件测定黄芩苷量。各环节供试品溶液中黄芩苷的损失率结果见图 1。黄芩制剂制备过程中,指标性成分黄芩苷量整体呈下降趋势,每一步操作单元都会造成质量分数波动,其中浓缩过程损失 9.12%,浓缩到干燥过程损失 12.82%,制粒过程损失 5.18%,损失率大小为干燥 $>$ 浓缩 $>$ 制粒,总损失率为 27.12%。

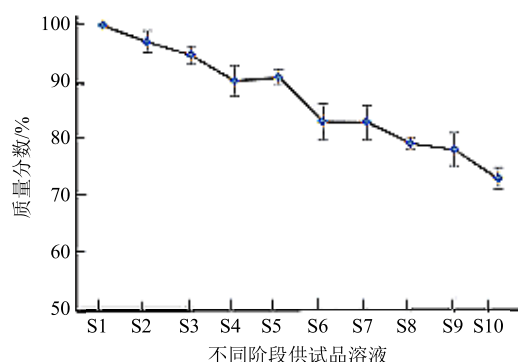


图 1 黄芩制剂制备过程黄芩苷质量分数变化

Fig 1 Content changes of baicalin in its preparation process of *S. baicalensis*

2.2 各环节色谱图的聚类分析

因黄芩苷为黄芩中主要化学成分,故以黄芩苷的量作为描述样品化学特征的变量,应用 SPSS 20.0 统计软件,采用系统聚类分析方法对黄芩制剂各制备环节进行聚类分析,结果见图 2。

由图 2 可知,当分类距离为 15 时,可将黄芩制剂各制备环节分为 2 类, S1~S5 聚为一类, S6~S10 聚为一类;当分类距离为 10 时,可将黄芩制剂各制备环节分为 4 类, S1、S2~S5、S6~S9、S10 分别聚为一类,聚类分析结果与供试品溶液制备方法一致。提示浓缩、干燥环节可能对制剂质量造成不同程度的影响;其中浓缩过程影响相对较大。

2.3 抗炎活性分析

2.3.1 细胞培养 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 用 DMEM 完全培养基 (含 10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%青链霉素混合液、1% L-谷氨酰胺) 于 37℃, 5% CO₂ 恒温培养箱中传代培养。

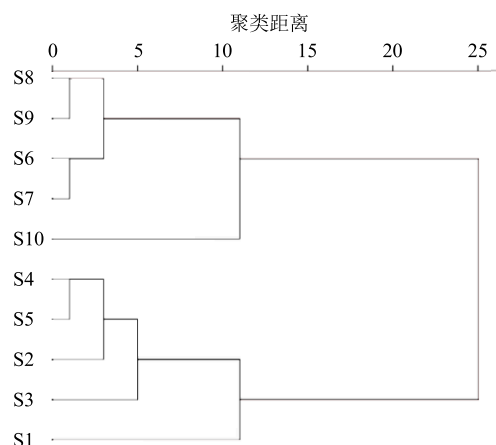


图 2 制备过程各环节黄芩苷含量聚类分析树状图

Fig 2 Hierarchical cluster dendrogram of content of baicalin from different preparation process

2.3.2 CCK8 试剂盒检测黄芩提取液对 RAW264.7 细胞的毒性 取对数生长期 RAW264.7 细胞制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 150 μL ; 空白孔加 150 μL 完全培养基, 以排除培养基的影响; 边缘孔用 200 μL Hank's 液填充, 以防止培养基的挥发对细胞的生长产生影响, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 吸弃旧培养液, 用 Hank's 液润洗 1 次, 实验组 (巨噬细胞+培养基+药物) 加入 100 μL 黄芩生药质量浓度分别为 25.00、31.25、50.00、62.50、100.00、125.00 mg/L 的黄芩提取液, 对照组 (巨噬细胞+培养基+溶剂) 和空白组 (培养基+溶剂) 均加入等量的 Hank's 液。每组设 6 个复孔; 继续培养 24 h, 吸弃孔内液体, 用 Hank's 液清洗 2 次, 每孔加入 100 μL Hank's 液和 10 μL CCK8 试剂, 再培养 50 min 后, 于酶标仪上选择波长 450 nm, 测定各孔吸光度 (A) 值。计算细胞抑制率, 经 SPSS 20.0 软件分析黄芩提取液 IC_{50} 为 0.075 mg/mL。

细胞抑制率 = $1 - (\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}) / (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值})$

2.3.3 NO 含量标准曲线的绘制 精密称取 6.9 mg NaNO_2 , 置于 100 mL 棕色瓶内, 加入适量双蒸水超声溶解, 待完全溶解后定容至刻度, 摇匀, 浓度为 1 mmol/L。分别稀释成 0、5、7.5、10、15、20、30、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 10 个浓度。取 100 μL 不同浓度的 NaNO_2 溶液于 96 孔板, 每个浓度 6 个复孔, 同时加入 Griess 试剂 100 μL , 避光振荡 10 min, 用酶标仪在 540 nm 处检测 A 值。本实验所得结果 NO 含量与其在 540 nm 波长的 A 值呈良好的线性关系, $Y = 0.0024X + 0.3127$, $R^2 = 0.9989$ ($n = 6$), X 、 Y 分别为 NO 含量及对应 A 值。

2.3.4 制备过程各环节供试品溶液对 LPS 诱导巨噬细胞 NO 生成的影响 根据“2.3.2”项下方法, 实验组每孔加入 150 μL 各环节供试品溶液 (药物的终质量浓度均为 0.075 mg/mL) 和 50 μL LPS 溶液 (质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$), 模型组加入 150 μL DMEM 高糖培养基和 50 μL LPS 溶液, 空白组加入 200 μL DMEM 高糖培养基。参照“2.3.3”项下方法测定各组 A 值, 并根据标准曲线计算 NO 含量与抑制率。结果如图 3, 黄芩制剂制备过程中, 各操作单元供试品溶液的抗炎活性不断降低。

抑制率 = $1 - (\text{实验组 NO 含量} - \text{空白组 NO 含量}) / (\text{模型组 NO 含量} - \text{空白组 NO 含量})$

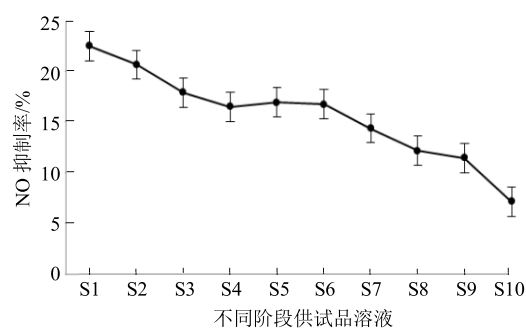


图 3 各环节供试品溶液对 LPS 诱导的巨噬细胞释放 NO 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 3 Inhibitory effect of samples on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells in each link of the preparation process ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

黄芩制剂制备过程各环节供试品溶液对 LPS 诱导的巨噬细胞释放 NO 的抑制率整体呈下降趋势, 即其抗炎活性在制备过程中缓慢减弱 (图 3)。其中浓缩、干燥环节抗炎活性下降明显, 浓缩过程抗炎活性降低了 5.55%, 干燥过程降低了 5.49%, 制粒过程降低了 4.31%。黄芩制剂制备过程中抗炎活性下降顺序为浓缩 > 干燥 > 制粒。

2.4 化学成分-药效活性数据相关性

运用 SPSS 20.0 软件对黄芩苷损失率-药效活性数据进行线性回归, 以黄芩苷的损失率为自变量 X , NO 抑制率为因变量 Y , 构建黄芩苷损失率-抗炎活性回归方程, 方差分析, $F = 108.478$, $P = 0.000 < 0.01$, $R^2 = 0.923$, 拟合的回归方程具有统计学意义。回归方程: $Y = 0.422X - 20.606$ 。回归系数 t 检验, $P = 0.000 < 0.05$ 。由图 4-A 残差图结果表明, 在正态分布中, 数据沿对角线和对角线方向分布, 回归模型满足正态性假设。由图 4-B 散点图结果表明, 数据均在 $(-2, 2)$ 区间内, 具有正态性和方差齐性。相关性分析结果表明黄芩苷量与黄芩制剂的抗炎药效活性正相关, 且黄芩苷量较高是黄芩药材中主要化学成分, 说明黄芩苷量可以基本表征黄芩药材/制剂的抗炎活性, 分析结果与文献结果一致^[6]。

3 讨论

中药制剂制备过程是一个复杂系统、有机整体, 各操作单元间不是机械组合或简单相加, 各要素间相互关联, 构成过程链的系统整体^[7-8]。由于中药制剂的特殊性, 长期以来, 中药制剂质量控制多趋向于传统事后控制模式, 造成制药过程各环节控制水平与中间体/成品质量标准关联性不清, 缺乏有效质量标准约束, 甚至导致关键环节不清, 顾此失

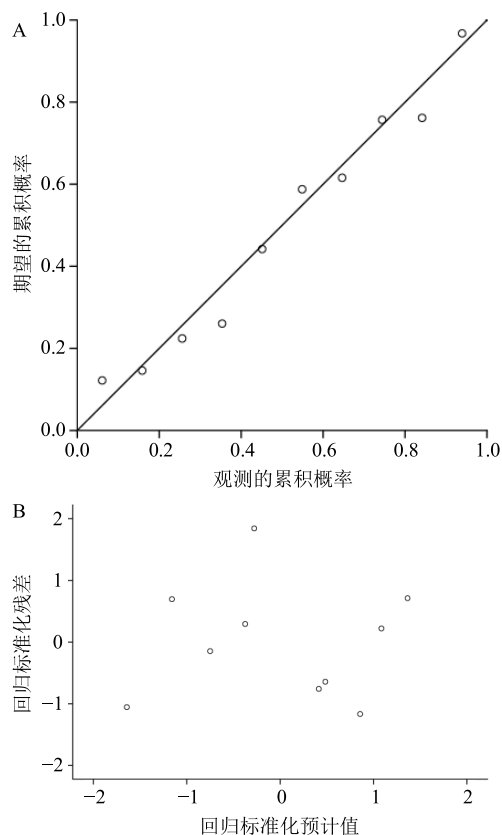


图 4 回归标准化残差 (A) 和散点图 (B)

Fig 4 Regression standardized residual plot (A) and scatter diagram (B)

彼，工艺单元存在短板效应。

本研究结果表明，黄芩制剂各制备环节中黄芩苷含量整体呈下降趋势，黄芩苷具有邻二酚羟基结构，溶液久置易氧化降解，且温度升高加速反应进程^[9-10]，与本实验结果一致；其抗炎活性同样呈逐步降低趋势，说明黄芩苷可能是黄芩发挥免疫抗炎活性的重要化学组分，与文献结果一致^[11]。长时间的浓缩干燥过程易造成黄芩制剂质量下降，此阶段与生产设备类型、热处理方式、釜体温度、真空度情况、处理时间等工艺参数密切相关，而目前药典标准只涉及提取单元的部分工艺参数，工艺过程规范化空间较大。黄芩制剂不同批次质量差异较大可能与浓缩、干燥环节操作规范化不足有关，其制剂生产过程中应尽量缩短高温处理的时间，或采用新型低温浓缩干燥方法以降低长时间热处理对黄芩制剂质量的影响。

中药制剂全过程质量追溯体系是目前制剂质量控制的发展方向，而要实现全过程质量控制的目标，首先要明确关键控制单元，其次结合工艺与质量关联分析，实现有针对性的、有目标的质量控制^[12]。但目前针对中药制剂全过程质量控制的研究报道较少，因此，本研究从整体观角度，药效活性指导，研究制剂制备过程、化学成分的变化趋势及其与药效的相关性，初探黄芩制剂可能的质量风险来源，为后续针对性地控制制剂工艺水平，为探究中药制剂生产过程质量控制提供新思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 杨晓明. 黄芩栽培技术 [J]. 四川农业科技, 2002(6): 25.
- [3] 胡彦君, 王雅琪, 李冰涛, 等. 板蓝根制剂制备过程中成分变化及其药效相关性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1515-1519.
- [4] 沙明, 王嘉亿, 曹爱民, 等. HPLC 指纹谱技术在中药新药质量控制中的应用 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 181-183.
- [5] Li C, Lin G, Zuo Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2011, 32(8): 427-445.
- [6] 张艳. 黄芩苷和黄芩素的抗炎和免疫调控作用研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [7] 兰继平, 胡彦君, 王雅琪, 等. 穿心莲制剂指纹图谱及其制备过程药效相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2802-2808.
- [8] 杨明, 杨园珍, 王雅琪, 等. 中药制剂生产过程中的质量风险分析与对策 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1025-1030.
- [9] 郑辛甜, 瞿海斌. 紫外光谱法结合多元曲线分辨研究黄芩苷的转化规律 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(7): 1450-1455.
- [10] 刘莹, 封亮, 贾晓斌. 中药制剂质量的影响因素分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1808-1813.
- [11] 陈涛. 中药黄芩及其主要成分抗炎活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [12] 伍振峰, 郑琴, 杨明, 等. 中药制剂质量控制的方法模式分析与研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1332-1336.