

基于 HPLC 指纹图谱与 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 的黄芩炒炭前后化学成分变化

李永康, 曹立华, 陈 智*

山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 探究黄芩 *Scutellariae Radix* 炒炭前后的化学成分变化。**方法** HPLC 法建立黄芩片及黄芩炭的指纹图谱, 标定共有峰并通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选出黄芩炒炭前后的差异性成分。进一步通过 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 技术对差异性成分进行定性分析。**结果** 建立的 HPLC 指纹图谱中, 黄芩片标定了 21 个共有峰, 15 批黄芩片的相似度为 0.998~1.000; 黄芩炭标定了 16 个共有峰, 15 批黄芩炭的相似度为 0.979~0.999; 指认出黄芩炒炭前后 28 个差异性成分; 通过 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 技术确定黄芩炭炮制前后的主要差异性成分为黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸素 A 苷、黄芩素及汉黄芩素。**结论** 通过对黄芩炒炭前后化学成分的系統研究, 明确了黄芩炒炭前后的主要差异性成分, 为完善黄芩片及黄芩炭质量标准提供了依据, 为黄芩炭凉血止血谱效关系的研究提供了一定的参考依据。

关键词: 黄芩片; 黄芩炭; HPLC; 指纹图谱; UPLC-Q Exactive Focus MS/MS; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 千层纸素 A 苷; 黄芩素; 汉黄芩素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8425-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.011

Comparison of chemical compositions before and after charcoal-frying of *Scutellariae Radix* based on HPLC fingerprint and UPLC-Q Exactive Focus MS/MS

LI Yongkang, CAO Lihua, CHEN Zhi

College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To explore the changes of chemical composition of Huangqin (*Scutellariae Radix*, SR) before and after charcoal-frying. **Methods** The fingerprints of SR slices and charred SR were established by HPLC, the common peaks were indexed, and the differential components of SR before and after charcoal-frying were screened by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). Qualitative analysis of differential components was performed using UPLC-Q Exactive Focus MS/MS technology. **Results** In the HPLC fingerprint, a total of 21 common peaks were demarcated in SR slices, and the similarity range of 15 batches of SR slices was 0.998—1.000, and a total of 16 common peaks were calibrated in charred SR, with a similarity range of 0.979—0.999, and 28 differential components were identified before and after charcoal-frying in SR. The primary differential components between SR and charred SR were determined to be baicalin, wogonoside, oroxyloside, baicalein, and wogonin, as identified through the use of UPLC-Q Exactive Focus MS/MS technology. **Conclusion** Through a systematic study of the chemical composition of SR before and after charcoal-frying, the major differential components between the two were identified. This research provided a basis for improving the quality standards of SR slices and charred SR, as well as offered certain reference for the study of the spectrum-effect relationship of charred SR for cooling blood and stopping bleeding.

Key words: *Scutellariae Radix* slice; charred *Scutellariae Radix*; HPLC; fingerprint; UPLC-Q Exactive Focus MS/MS; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; baicalin; wogonoside; oroxyloside; baicalein; wogonin

收稿日期: 2024-08-28

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2021MH009); 山东省中医药科技项目 (2021M143); 山东中医药大学科学研究基金项目 (KYZK2024M20)

作者简介: 李永康, 硕士研究生, 研究方向为中药新药与中药炮制原理研究。E-mail: avvv121382023@163.com

*通信作者: 陈 智, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药与中药炮制原理研究。E-mail: chenchi6088@163.com

黄芩始载于汉代《神农本草经》，列为中品^[1]。《中国药典》2020 年版规定黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根，具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效^[2]。黄芩炭为黄芩经武火炒制得到的炮制品，具有凉血止血的功效且止血作用增强，临床上常用于治疗血热出血引起的吐血、衄血、崩漏下血等症^[3-4]。现代研究发现黄芩的主要有效成分为黄酮类化合物，此外含有萜类化合物、挥发油和多糖等^[5-9]，具有抗过敏^[10]、抗炎^[11]、保肝^[12]、抗肿瘤^[13]、抗菌及抗病毒^[14]、抗氧化^[15]等作用。黄芩炒炭后凉血止血的临床疗效虽然得到了实践证明，但其物质基础尚未完全明确，对黄芩及黄芩炭饮片质量评价的指标不客观。《中国药典》以及各地方炮制规范中大多仅以黄芩苷或黄芩素的含量作为评判生黄芩及黄芩炭饮片质量的主要指标，对黄芩炭炮制工艺的优选也大多是以总黄酮含量及药理作用为评价指标^[16-17]，因此，对黄芩炒炭前后的化学成分变化进行系统研究并确定炮制前后特征性差异成分具有十分重要的意义。本实验选取了 15 批不同产地的生黄芩样品并制备成黄芩片和黄芩炭，建立黄芩片及黄芩炭的 HPLC 指纹图谱并标定共有峰，结合多元统计分析确定炒炭前后的差异性成分，并进一步采用 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 技术对差异性成分进行系统的定性分析，研究黄芩炒炭前后化学成分变化规律，以期为制定更加合理的黄芩炮制品质量标准和研究黄芩炭

凉血止血炮制原理提供实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，美国安捷伦公司；Q Exactive Focus 型质谱仪，中国赛默飞世尔科技；ME104E/02 型电子分析天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；KQ5200E 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试药

1.2.1 对照品 野黄芩苷（批号 J31GB156318）、黄芩苷（批号 Z28S11X125952）、木犀草素（批号 C24M8Q36543）、汉黄芩苷（批号 A09GB144759）、黄芩素（批号 C04D8Y49741）、汉黄芩素（批号 T11J11R108209）、白杨素（批号 X24O6C4947），均购于上海源叶生物科技有限公司，质量分数均大于 98%。

1.2.2 试剂 乙腈为色谱纯，美国 Sigma-Aldrich 公司；甲酸为色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；乙醇，分析纯，天津市富宇精细化工有限公司；纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2.3 药材 15 批生黄芩药材（S1~S15）均购于产区，经山东中医药大学徐凌川教授鉴定，该 15 批生黄芩均为唇形科黄芩属植物黄芩 *S. baicalensis* Georgi 的干燥根。遵循《中国药典》2020 年版项下规定，对各批生黄芩药材进行检验，均合格，黄芩苷质量分数均高于 9.0%。药材产地信息见表 1。

表 1 15 批生黄芩样品来源信息
Table 1 Source information of 15 batches of raw SR samples

编号	产地	黄芩苷/%	编号	产地	黄芩苷/%	编号	产地	黄芩苷/%
S1	甘肃省定西市	10.24	S6	山东省日照市	11.18	S11	陕西省渭南市澄城县	10.57
S2	河北省安国市	11.57	S7	山西省临汾市洪洞县	12.73	S12	陕西省渭南市合阳县	12.43
S3	吉林省敦化市	14.31	S8	山西省忻州市静乐县	10.91	S13	陕西省西安市蓝田县	9.35
S4	内蒙古自治区赤峰市	10.46	S9	山西省临汾市襄汾县	11.82	S14	陕西省铜川市	10.72
S5	山东省临沂市	13.44	S10	山西省临汾市永和县	9.76	S15	陕西省榆林市	13.19

2 方法与结果

2.1 黄芩片及黄芩炭的制备

2.1.1 黄芩片 参照《中国药典》2020 年版中的炮制方法制备。取各批次生黄芩（S1~S15）药材，除去杂质，蒸 0.5 h，取出，切薄片，80 ℃干燥，得到 15 批黄芩片（P1~P15）。各批黄芩片取适量粉碎，过 60 目筛，留置备用。各饮片均符合《中国药典》2020 年版的相关要求。

2.1.2 黄芩炭 照炒炭法（《中国药典》2020 年版四

部通则 0213）制备。取制得的各批黄芩片（P1~P15），大小分档，置热锅内，用武火炒至表面焦褐色至焦黑色，断面中心略带黄色时，喷淋清水少许，熄灭火星，取出，晾干，得到 15 批黄芩炭（T1~T15）。各批黄芩炭取适量粉碎，过 60 目筛，留置备用。

2.2 黄芩片及黄芩炭 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）柱；流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min，10%~15%乙

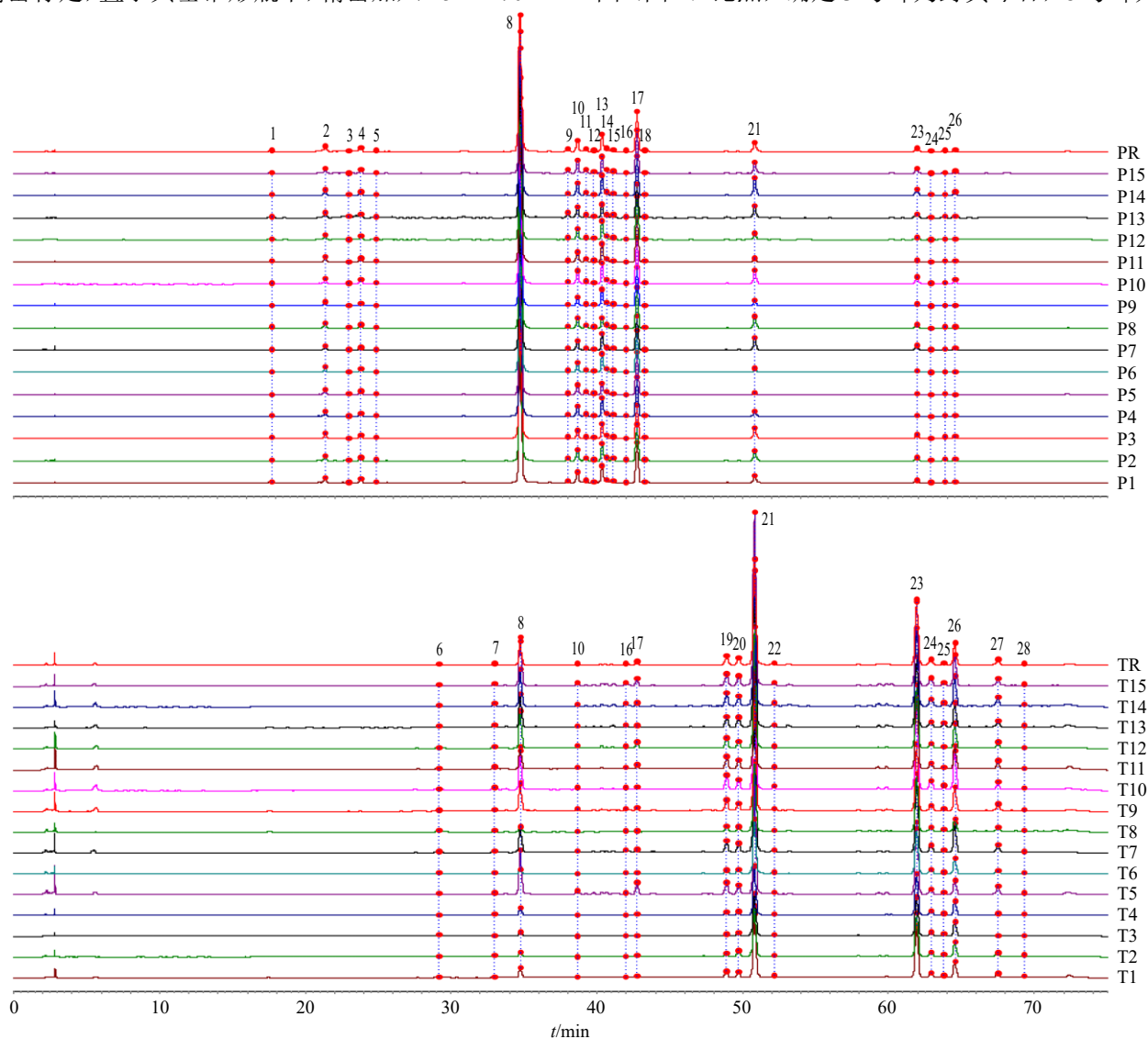
腈; 10~20 min, 15%~20%乙腈; 20~30 min, 20%~25%乙腈; 30~60 min, 25%~45%乙腈; 60~70 min, 45%~60%乙腈; 70~75 min, 60%~10%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 274 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μ L。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取野黄芩苷、黄芩苷、木犀草素、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素对照品适量, 加甲醇溶解, 制得质量浓度分别为 0.065、0.070、0.067、0.061、0.067、0.070、0.077 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下所得各批次的黄芩片及黄芩炭粉末(过 60 目筛)约 0.25 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 70%

乙醇, 密塞, 称定质量, 超声(500 W、40 kHz) 30 min, 冷却, 补足减失的质量, 取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.2.4 指纹图谱研究 取 P1~P15、T1~T15 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 得到的色谱数据以 cdf 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 分别设定 P3、T9 为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度设为 0.1 min, 进行多点校正和标记峰匹配, 得到黄芩片(P1~P15)和黄芩炭(T1~T15)的指纹图谱叠加图及对照指纹图谱(PR、TR, 图 1), 黄芩片标定了 21 个共有峰, 黄芩炭标定了 16 个共有峰, 经对照品色谱图(图 2)比照, 确定 3 号峰为野黄芩苷, 8 号峰为



3-野黄芩苷; 8-黄芩苷; 12-木犀草素; 17-汉黄芩苷; 21-黄芩素; 23-汉黄芩素; 24-白杨素; 图 2 同。

3-scutellarin; 8-baicalin; 12-luteolin; 17-wogonoside; 21-baicalin; 23-wogonin; 24-chrysin; same as figure 2.

图 1 15 批黄芩片 (P1~P15) 和黄芩炭 (T1~T15) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (PR, TR)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of SR slices (P1—P15) and charred SR (T1—T15) and their control fingerprints (PR, TR)

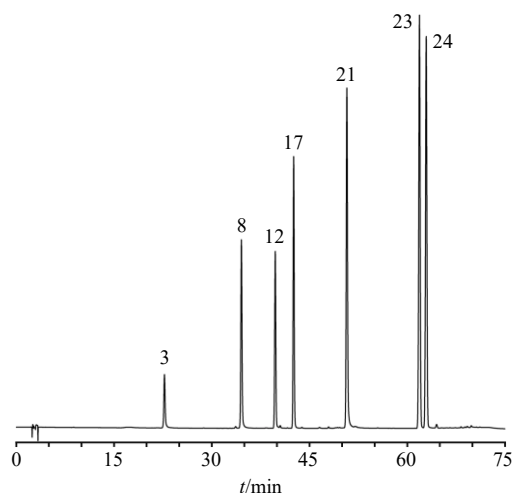


图 2 混合对照品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances

黄芩苷, 12 号峰为木犀草素, 17 号峰为汉黄芩苷, 21 号峰为黄芩素, 23 号峰为汉黄芩素, 24 号峰为白杨素。黄芩片样品 (P1~P15) 指纹图谱与 PR 的相似度分别为 1.000、1.000、0.999、1.000、0.998、0.999、0.999、0.999、1.000、0.999、0.999、1.000、0.999、0.998、1.000; 黄芩炭样品 (T1~T15) 指纹图谱与 TR 的相似度分别为 0.989、0.982、0.979、0.987、0.990、0.983、0.994、0.982、0.999、0.998、0.996、0.996、0.991、0.998、0.995。2 种样品的相似度均较高, 表明不仅各批次黄芩片之间的质量相似, 炮制后得到的各批次黄芩炭之间的质量也较为相似。

2.2.5 精密度试验 取 P3、T9 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 以 8 号峰为参照峰, 记录各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算其 RSD 值。测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均 $\leq 0.65\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $\leq 1.85\%$, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取 P3、T9 供试品溶液, 于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以 8 号峰为参照峰, 记录各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算其 RSD 值。测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均 $\leq 0.21\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $\leq 2.01\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内较稳定。

2.2.7 重复性试验 取 P3、T9 样品, 分别按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 以 8 号峰为参照峰, 记录各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算其 RSD 值。测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均 $\leq 0.78\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $\leq 1.63\%$,

表明该方法重复性良好。

2.3 化学模式识别分析

2.3.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 将 15 批黄芩片 (P1~P15) 及黄芩炭 (T1~T15) 指纹图谱的共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件, 以共有峰峰面积为变量, 进行 PCA, 结果 PCA 得分图见图 3。黄芩片与黄芩炭分区明显, 无重叠现象, 表明黄芩在炒炭前后化学成分存在明显差异。

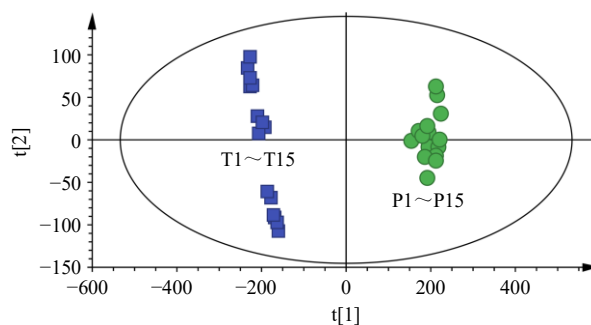


图 3 15 批黄芩片 (P1~P15) 与黄芩炭 (T1~T15) 的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA scores chart of SR slices (P1—P15) and charred SR (T1—T15)

2.3.2 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 使用 SIMCA 14.1 软件进行有监督模式的 OPLS-DA, 进一步确定区分黄芩片与黄芩炭的贡献成分。此模型的拟合参数 $R^2=0.981$, $R^2=0.993$, 表明模型在 X 轴及 Y 轴方向上的解释能力较好, 稳定可靠; 预测参数 $Q^2=0.993$, 表明建立的模型预测能力强。OPLS-DA 得分图见图 4, 可见炮制前后的样品较 PCA 分区更为明显。对建立的模型进行 200 次的排列检验, Q^2 -回归线的截距为 $-0.305 < 0$ (图 5), 表示模型未过拟合, 模型可靠。

在投影重要性参数图 (S-plot 图, 图 6) 中, 组

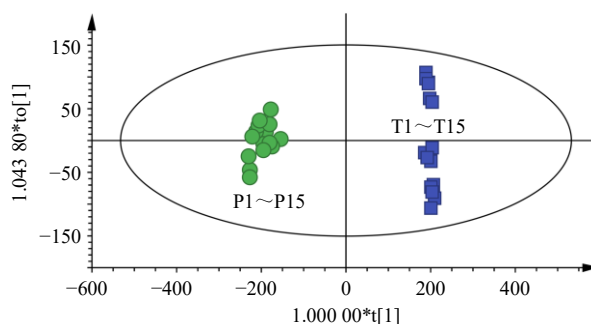


图 4 15 批黄芩片 (P1~P15) 与黄芩炭 (T1~T15) 的 OPLS-DA 得分图

Fig. 4 OPLS-DA scores chart of 15 batches of SR slices (P1—P15) and charred SR (T1—T15)

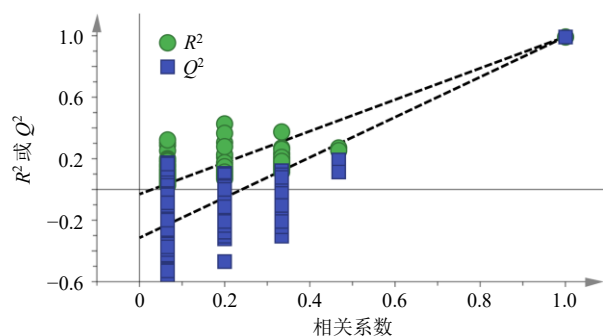


图 5 置换检验图

Fig. 5 Replacement test

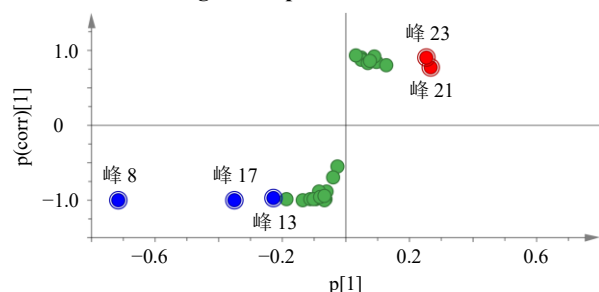


图 6 S-plot 图

Fig. 6 S-plot diagram

分距离原点的距离越远,对分组的贡献度越大。S 曲线上的成分区分明显,表明黄芩片与黄芩炭化学成分有明显的差异。在 S 曲线右上角的峰,代表了在黄芩炭中含量较高的成分;S 曲线左下角的峰,代表了在黄芩片中含量较高的成分。由此可直观地看出,峰 8、13、17、21、23 代表的成分对分组的贡献度大,其中峰 8、13、17 代表的成分在黄芩片中含量较高,峰 21、23 代表的成分在黄芩炭中含量较高。以变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 值 >1 为标准,筛选出对区分 2 种样品贡献度较大的成分,结果见图 7。由结果可知,有 5 种成分的 VIP >1 ,VIP 由大到小依次为峰 8(黄芩苷)、17(汉黄芩苷)、21(黄芩素)、23(汉黄芩素)、13(未知),与 S-plot 图中的结果相互印证。

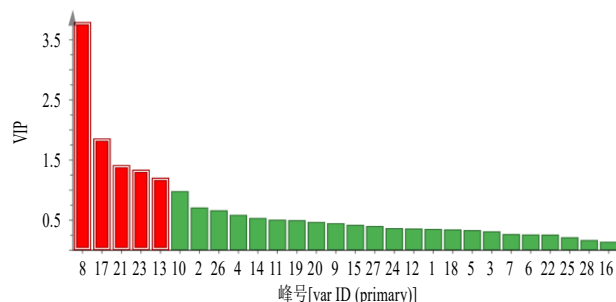


图 7 黄芩片与黄芩炭中差异性成分的 VIP 图

Fig. 7 VIP of differential components in SR slices and charred SR

2.4 质谱定性分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil Gold aQ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m) 柱;流动相为 0.1%甲酸乙腈混合溶液 (A) -0.1%甲酸水混合溶液 (B),梯度洗脱: 0~2.0 min, 5% A; 2.0~42.0 min, 5%~95% A; 42.0~47.0 min, 95% A; 47.0~47.1 min, 95%~5% A; 47.1~50.0 min, 5% A; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 5 μ L。

2.4.2 质谱条件 离子源: ESI; 检测模式: 正、负离子模式; 扫描模式: Full MS-ddMS², Full MS 分辨率 70 000, MS/MS 分辨率 17 500; 喷雾电压+3.5 kV/-3.2 kV; 鞘气压力 240 kPa; 辅助气体压力 70 kPa; 阶梯碰撞能量 20、40、60 eV; 毛细管温度 320 $^{\circ}$ C; 扫描范围 m/z 100~1 500。

2.4.3 对照品溶液的制备 精密称取“2.2.2”项下的混合对照品溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得对照品溶液。

2.4.4 供试品溶液的制备 精密称取 S5、T5 粉末各 0.25 g,各加入 25 mL 70%乙醇,超声 0.5 h,取 1 mL 上清液至 100 mL 量瓶中,加 70%乙醇定容至刻度,摇匀,取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.4.5 样品检测与数据处理 取供试品溶液及对照品溶液,按上述条件进样分析,得到总离子流图(图 8、9)。使用 Xcalibur 2.2 软件进行数据处理,根据得到的一级质谱的相对分子质量,二级质谱的碎片离子等信息,结合对照品的质谱数据及相关文献数据[18-21],鉴定黄芩片与黄芩炭中的化学成分。

2.4.6 数据分析与结构鉴定 在黄芩片中鉴定了 55 种成分,主要为黄酮类成分,黄芩炭在黄芩片的基础上丢失了 33 种成分,剩余 22 种成分,结果见表 2。在质谱数据中,在对照品比对下确认化合物 **39** ($t_R=14.10$ min) 为汉黄芩苷,化合物 **37** ($t_R=14.05$ min) 与汉黄芩苷有着相同的裂解方式:准分子离子峰为 m/z 459.093 4 ($C_{22}H_{19}O_{11}$, $[M-H]^-$),二级质谱中可见丢失 1 分子葡萄糖醛酸生成的苷元离子 m/z 283.061 4 ($C_{16}H_{11}O_5$, $[M-C_6H_8O_6-H]^-$),苷元失去 1 分子 CH_3 裂解成碎片离子 m/z 268.038 0 ($C_{15}H_8O_5$, $[M-C_6H_8O_6-CH_3-H]^-$),碎片 m/z 268.038 0 进一步丢失 1 分子 CO_2 及 1 分子 CO 后形成碎片 m/z 196.052 2 ($C_{13}H_8O_2$, $[M-C_6H_8O_6-CH_3-CO_2-CO-H]^-$),结合保留时间及文献数据确认化合物 **37** 为千层纸素 A 苷,结果见图 10。结合前期千层纸素

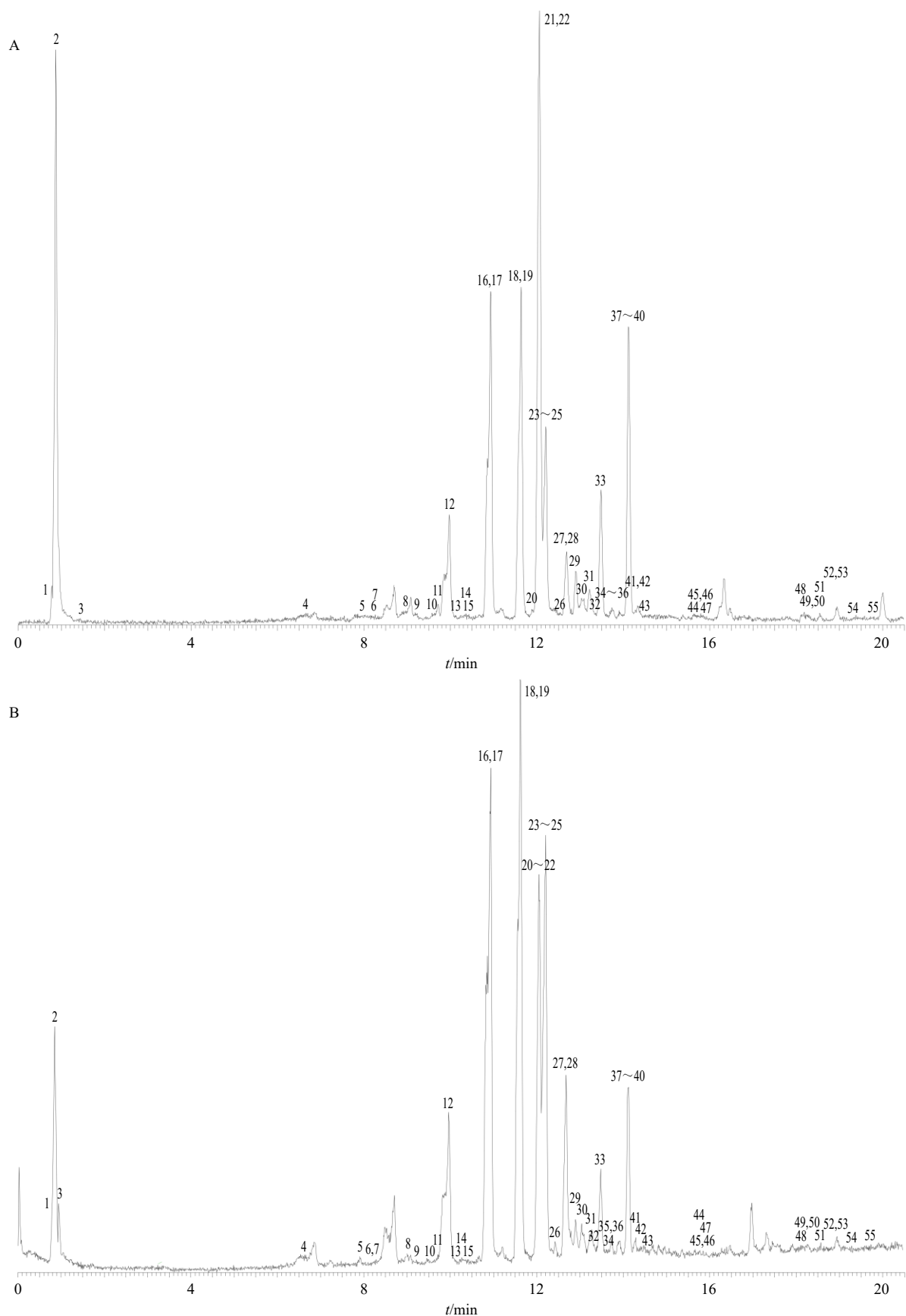


图 8 黄芩片负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 的总离子流图

Fig. 8 Total ionflow diagrams of negative ion pattern (A) and positive ion pattern (B) of SR slice

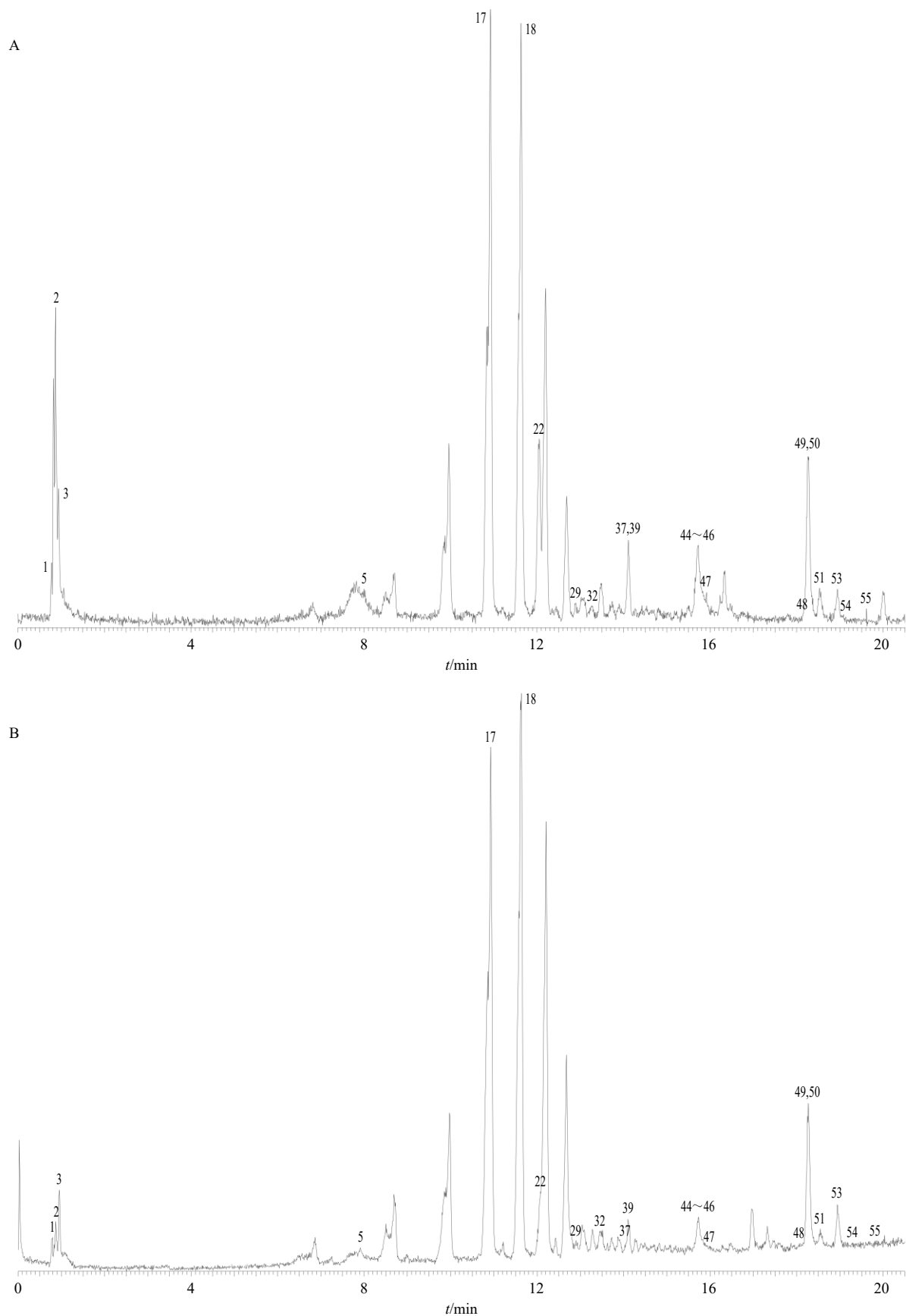


图 9 黄芩炭负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 的总离子流图

Fig. 9 Total ion flow diagrams of negative ion pattern (A) and positive ion pattern (B) of charred SR

表 2 黄芩片与黄芩炭中化学成分的鉴定

Table 2 Components identification of SR slice and charred SR

序号	<i>t</i> / min	分子式	离子 模式	实测值 (<i>m/z</i>)	理论值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)	主要碎片离子 (<i>m/z</i>)	化合物名称	黄芩片	黄芩炭
1	0.85	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	341.108 9	341.107 8	3.225	179.055 3, 143.033 9, 89.022 9	蔗糖	+	+
2	0.88	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116.070 8	116.070 6	1.732	70.065 9	脯氨酸	+	+
3	0.95	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.018 9	191.018 6	1.571	111.007 4, 173.008 1, 87.007 3	柠檬酸	+	+
4	6.64	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.051 1	303.049 9	3.960	285.042 5, 177.018 5	甘肃黄芩素	+	-
5	7.97	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	209.044 9	209.044 4	2.392	164.833 9, 121.028 2	hydroxyl-carboxyl phenylpropionic acid	+	+
6	8.19	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.035 5	301.034 3	3.986	151.002 7, 125.023 3	3,5,7,2',6'-五羟基黄酮	+	-
7	8.20	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.035 6	301.034 3	4.318	149.023 7, 125.023 3, 57.207 3	槲皮素	+	-
8	9.04	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	547.146 3	547.144 6	3.107	457.113 9, 529.134 3, 337.072 1	白杨素 6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷	+	-
9	9.20	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	462.076 4	462.079 3	-6.276	285.040 7, 267.028 8	野黄芩苷*	+	-
10	9.62	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.198 3	623.197 0	2.086	457.011 8, 161.023 4, 135.044 2	毛蕊花糖苷	+	-
11	9.73	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	547.146 0	547.144 6	2.559	427.104 2, 529.136 7, 281.082 2	白杨素 6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷	+	-
12	10.07	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	491.119 9	491.118 4	3.054	329.066 9, 299.019 3	三羟基二甲氧基黄酮葡萄糖苷	+	-
13	10.13	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄	[M-H] ⁻	581.187 9	581.186 5	2.409	461.146 7, 167.034 0	trihydroxydihydrochalcone-3'-C-glucoside-6'-O-glucoside or isomer	+	-
14	10.32	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 6	285.039 4	4.210	241.051 0, 217.050 1, 151.002 6	异野黄芩素	+	-
15	10.39	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	415.103 6	415.102 4	2.891	295.061 1, 267.066 6	白杨素-8-C-β-D-葡萄糖苷	+	-
16	10.82	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.088 7	463.087 1	3.455	287.057 3, 269.046 3	红花素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	+	-
17	10.90	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.023 0	137.023 3	-2.189	93.033 1, 108.936 0	水杨酸	+	+
18	11.52	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	[M-H] ⁻	345.061 3	345.060 5	2.318	330.038 4, 315.015 2	viscidulin III	+	+
19	11.76	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.056 2	287.055 0	4.180	161.023 2, 125.023 1	5,7,2',6'-四羟基黄酮	+	-
20	11.97	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	505.099 1	505.097 7	2.772	329.066 7, 314.042 8, 299.020 2	白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷	+	-
21	12.05	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.054 7	287.055 0	-1.045	269.044 8, 123.008 3	野黄芩素	+	-
22	12.07	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.077 7	445.076 5	2.696	269.045 9, 223.039 7, 169.065 0	黄芩苷*	+	+
23	12.16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.098 3	431.097 3	2.320	269.045 9	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	+	-
24	12.17	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	415.103 4	415.102 4	2.409	295.061 5, 267.066 3	白杨素 6-C 葡萄糖苷	+	-
25	12.17	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	415.103 4	415.102 4	2.409	325.070 3, 295.061 5, 267.066 3	葛根素	+	-
26	12.59	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.054 9	287.055 0	-0.348	153.018 1	四羟基黄酮	+	-
27	12.74	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 7	285.039 4	4.561	285.040 7, 133.028 2, 151.002 6, 175.038 6	木犀草素*	+	-
28	12.79	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	651.229 7	651.228 3	2.150	193.049 0, 175.039 1	异地黄苷	+	-
29	12.91	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.077 9	445.076 5	3.146	269.045 9, 225.055 2, 175.024 1	去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷	+	+
30	12.99	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	445.113 9	445.112 9	2.247	430.090 0, 283.061 5, 268.038 0	千层纸素 A-7-O-葡萄糖苷	+	-
31	13.24	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	475.088 3	475.087 1	2.526	299.056 3, 175.024 1	羟基千层纸素 A 苷	+	-
32	13.37	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.077 9	445.076 5	3.150	269.045 8, 251.035 4, 85.028 1	汉黄芩素 5-O-葡萄糖苷	+	+
33	13.54	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	431.097 1	431.097 2	-0.232	255.064 5, 219.737 5	白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷	+	-
34	13.69	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M-H] ⁻	329.066 7	329.065 6	3.343	299.019 0, 164.981 8, 133.028 6	5,8,2'-三羟基-6,7-二甲氧基黄酮	+	-
35	13.75	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 6	285.039 4	4.210	151.002 4, 83.048 7	5,7,2',6'-四羟基黄酮	+	-
36	13.76	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	475.088 4	475.087 1	2.740	299.056 2, 283.025 4, 255.031 3	4'-羟基汉黄芩苷	+	-
37	14.05	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	459.093 4	459.092 2	2.614	283.061 4, 268.038 0, 196.052 2	千层纸素 A 苷	+	+
38	14.08	C ₁₅ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	267.029 1	267.028 8	1.123	239.034 7, 163.002 5, 109.999 1	香豆素	+	-
39	14.10	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	459.093 5	459.092 2	2.832	283.061 4, 268.038 0, 196.052 2	汉黄芩苷*	+	+
40	14.15	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.075 2	285.075 8	-2.105	269.044 5, 241.049 5, 179.049 8	金合欢素	+	-
41	14.32	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	315.085 5	315.086 3	-2.539	285.039 4, 257.045 4, 197.365 3	黄芩黄酮 I	+	-

表 2 (续)

序号	<i>t</i> min	分子式	离子 模式	实测值 (<i>m/z</i>)	理论值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)	主要碎片离子 (<i>m/z</i>)	化合物名称	黄芩片	黄芩炭
42	14.34	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	489.104 0	489.102 8	2.453	313.072 1, 298.048 5, 283.025 1	5,7-二羟基-6,8-二甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷	+	-
43	14.56	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻	359.077 2	359.076 1	3.063	329.030 2, 194.992 7	5,2',5'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	+	-
44	15.72	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 7	269.044 4	4.832	225.055 5, 197.059 8, 169.064 9	去甲汉黄芩素	+	+
45	15.84	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 7	269.044 4	4.832	251.035 2, 197.060 0, 123.007 3	黄芩素*	+	+
46	15.85	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.059 8	271.060 1	-1.107	271.060 2, 151.002 8, 123.008 0	芹菜素	+	+
47	15.92	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.056 2	299.055 0	4.013	284.033 1	三羟基甲氧基黄酮	+	+
48	18.15	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M-H] ⁻	343.082 3	343.081 2	3.206	313.035 6, 164.982 0	黄芩黄酮	+	+
49	18.27	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 5	283.060 1	4.946	268.038 1, 239.034 7, 163.002 7	汉黄芩素*	+	+
50	18.30	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 4	283.060 1	4.593	268.038 1, 224.046 4, 196.052 9	千层纸素 A	+	+
51	18.54	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	253.050 6	253.049 5	4.347	209.060 3, 181.065 2, 107.012 4	白杨素*	+	+
52	18.93	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	373.093 0	373.091 8	3.216	358.069 8, 343.046 1, 325.034 8	黄芩新素	+	-
53	18.96	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	[M+H] ⁺	375.106 9	375.107 4	-1.333	345.060 3, 327.050 0, 197.008 1	黄芩黄酮 II	+	+
54	19.24	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	313.072 1	313.070 7	4.472	283.027 1, 211.040 0	5,7-二羟基-6,8-二甲氧基黄酮	+	+
55	19.72	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M-H] ⁻	343.082 4	343.081 2	3.498	328.059 9, 313.035 3, 193.442 2	tenaxin I	+	+

“*”表示与对照品比对;“+”代表检出;“-”代表未检出。
 “**” indicates control analysis with comparators; “+” indicates ingredient is detected; “-” indicates ingredient is not detected.

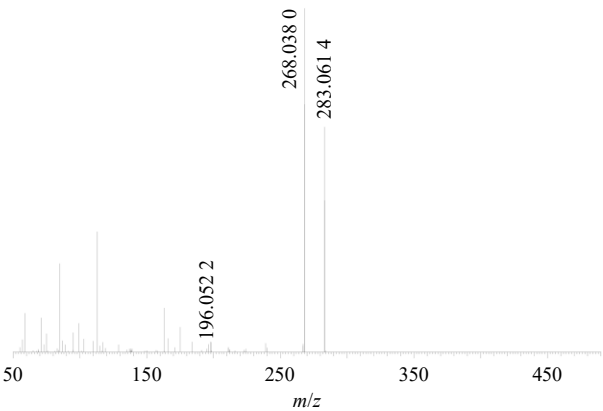


图 10 千层纸素 A 苷的二级质谱图

Fig. 10 ESI-MS/MS spectrum of oroxyloside

A 苷的 HPLC、质谱数据及相关文献数据^[18], 确认色谱峰 13 代表的化合物为千层纸素 A 苷。

3 讨论

本研究比较了不同流动相体系(乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.5%甲酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液)的分离效果, 最终选择了乙腈-0.1%甲酸水溶液作为 HPLC 流动相。质谱流动相在液相流动相的基础上, 向乙腈中加入 0.1%甲酸能够得到更好的峰形。同时对供试品的提取溶剂(65%、70%、75%、80%乙醇)、料液比(1:60、1:80、1:100)、提取方法(超声法、回流法)、提取时间(15、30、45 min)进行了筛选, 最终确定最佳制备方案为以 70%乙醇为提取溶剂, 料液比设置为 1:100, 超声提取 30 min。

本实验选择了多批次不同产地的生黄芩, 制备成黄芩片, 探索黄芩炒炭前后的成分变化。通过指纹图谱分析, 在黄芩片中标定了 21 个共有峰, 在黄芩炭中标定了 16 个共有峰, 经对照品比对, 确定了 7 种成分。结合多元统计分析, 筛选出峰 8(黄芩苷)、17(汉黄芩苷)、21(黄芩素)、23(汉黄芩素)、13(未知)为黄芩炒炭前后的主要差异性成分, 且炒炭后峰 8、13、17 代表的成分含量下降, 峰 21、23 代表的成分含量上升。

实验中发现虽然 15 批黄芩片产地覆盖广泛, 但其相似度较高, 且在化学模式识别分析中聚类效果较好, 在查阅多篇有关不同产地黄芩指纹图谱的文献后发现, 不同产地黄芩指纹图谱的相似度值均在 0.9 以上, 相似度均较高^[22-24], 与本研究的结果类似, 由此推测黄芩药材品质较为稳定, 外界因素对其影响较小。

为进一步探究黄芩炮制前后的成分变化, 本研究采用 UPLC-Q Exactive Focus MS/MS 技术对黄芩片及其炭品中的成分进行定性分析, 在黄芩片中鉴定了 55 种成分, 主要为黄酮类成分, 既明确了黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷等主要有效成分, 也验证了其含有白杨素 6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷、葛根素、tenaxin I 等潜在临床有效成分。黄芩炭丢失了 33 种成分, 在剩余的 22 种成分中, 不仅保留了黄芩片中含有的主要黄酮类有效成分, 还包含了如水杨酸、千

层纸素 A 等成分。黄酮类成分为黄芩炒炭前后的主要差异性成分,炒炭后黄酮苷类成分含量降低,黄酮苷元类成分含量升高,印证了黄芩炒炭后的主要变化为苷类成分苷键断裂转变为苷元^[25]。本研究揭示了黄芩炒炭后的化学成分变化规律,筛选出黄芩炮制前后的主要差异性成分,为黄芩炭饮片质量标准的提升提供了实验依据,为探究黄芩炭凉血止血炮制原理奠定物质基础。在今后的实验研究中,将进一步通过谱效关系筛选黄芩炭凉血止血的化学成分,为黄芩炒炭的炮制机制提供科学的阐释。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张可颐,王坤宁,尤旭颖,等.《神农本草经》与经方应用之黄芩篇 [J]. 山东中医药大学学报, 2024, 48(2): 177-182.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 314-315.
- [3] Zhang M L, Cheng J J, Luo J, et al. Protective effects of *Scutellariae Radix Carbonisata*-derived carbon dots on blood-heat and hemorrhage rats [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14, doi: 10.3389/FPHAR.2023.1118550.
- [4] 赵玉升,赵金莉,刘楚好,等.黄芩炭止血作用与吸附力的相关性研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(7): 72-76.
- [5] Zhao T T, Tang H L, Xie L, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(9): 1353-1369.
- [6] Hussein A A, de la Torre M C, Jimeno M L, et al. A neoclerodane diterpenoid from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(4): 835-837.
- [7] 黄琪,吴德玲,王云,等.黄芩炒炭前后挥发性成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 9-12.
- [8] Yun C, Ji X C, Chen Y W, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of *Scutellaria baicalensis* root polysaccharide and its hypoglycemic and immunomodulatory activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 227: 134-145.
- [9] Yan Y C, Amur S A, Liu H, et al. Endogenous crude *Scutellaria baicalensis* polysaccharide robustly enhances one-pot extraction and deglycosylation of baicalin [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 263(Pt 1): 130349.
- [10] Shin H S, Bae M J, Choi D W, et al. Skullcap (*Scutellaria baicalensis*) extract and its active compound, wogonin, inhibit ovalbumin-induced Th2-mediated response [J]. *Molecules*, 2014, 19(2): 2536-2545.
- [11] Lee Y J, Im D S. Inhibitory effect of oroxylin A in a mouse model of atopic dermatitis [J]. *Inflammation*, 2023, 46(2): 679-687.
- [12] Wu T H, Lin T Y, Yang P M, et al. *Scutellaria baicalensis* induces cell apoptosis and elicits mesenchymal-epithelial transition to alleviate metastatic hepatocellular carcinoma via modulating HSP90 β [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 3073.
- [13] Tao Y L, Zhan S B, Wang Y B, et al. Baicalin, the major component of traditional Chinese medicine *Scutellaria baicalensis* induces colon cancer cell apoptosis through inhibition of oncomiRNAs [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14477.
- [14] Dmitrieva A, Kozlova O, Atuchin V, et al. Study of the effect of baicalin from *Scutellaria baicalensis* on the gastrointestinal tract normoflora and *Helicobacter pylori* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 11906.
- [15] Lim J, Kim K, Kwon D Y, et al. Effects of different solvents on the extraction of phenolic and flavonoid compounds, and antioxidant activities, in *Scutellaria baicalensis* hairy roots [J]. *Horticulturae*, 2024, 10(2): 160.
- [16] 陈智,马玉坤,李佳旭.黄芩炭最佳炮制工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(1): 114-117.
- [17] 苏文龙,曹文正,李函阳,等.响应面法优选黄芩炭炮制工艺研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 214-217.
- [18] 张欣蕊,蒋孝峰,张逸婷,等.HPLC 指纹图谱、多成分定量、UFLC-Q-TOF MS/MS 表征技术相结合的黄芩药材质量评价研究 [J]. 中药材, 2024, 47(5): 1181-1189.
- [19] 李淑娇,王宇卿.基于 HPLC-Q-TOF/MS 法的黄芩血清药物化学分析 [J]. 中成药, 2019, 41(3): 595-600.
- [20] 陈馨,张欣然,牟立婷,等.基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 鉴定黄芩的化学成分及血中移行成分 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2722-2732.
- [21] 高文雅,李涛,周严严,等.黄芩水煎液中化学成分的定性及定量研究 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7339-7352.
- [22] 李璐含,王丹阳,杨冰月,等.基于化学模式识别分析的黄芩 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 130-133.
- [23] 余中敏,刘晓芹,刘思彤,等.基于指纹图谱的黄芩药材和饮片及其水煎液量值传递分析 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(8): 1020-1027.
- [24] 杨媛媛,贾寒冰,谢志民,等.基于指纹图谱及多组分含量测定的黄芩提取物质量控制研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(3): 52-58.
- [25] 孙静,朱博,李宇,等.炮制程度对黄芩炭中黄酮类成分转化及转移率的影响规律研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(6): 55-60.

[责任编辑 郑礼胜]