

黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性研究

陈玲,李 晓*,魏 悦,曹静亚,范 毅

河南省生物技术开发中心 河南省植物天然产物开发工程技术研究中心 河南科高中标检测技术有限公司,郑州 450002

摘要:建立黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱,并对其相关性进行评价。采用 HPLC 法,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 甲醇:0.05% 磷酸水作为流动相;流速 1.0 mL/min;检测波长 275 nm;柱温 35 °C;进样体积 10 μL。黄芩 10 批饮片、标准汤剂、中间体及配方颗粒指纹图谱均呈现 9 个共有特征峰,呈良好的相关性,在 9 个共有峰中指出黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 3 个成分。黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的主要化学成分组成基本相同,建立的 HPLC 指纹图谱方法可用于黄芩配方颗粒的生产全过程的质量控制。

关键词:黄芩;指纹图谱;相关性;配方颗粒;标准汤剂

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.1.010

Correlation Analysis of HPLC fingerprint of Pieces-standard Decoction-Intermediates and Dispensing Granules of *Scutellaria baicalensis*

CHEN Ling, LI Xiao*, WEI Yue, CAO Jing-ya, FAN Yi

Biotechnology Developing Center of Henan Academy of Sciences, Henan Plant Natural Products Development Engineering Research Center, Henan Cogo Testing and International Standardizing Technology Co. Ltd., Zhengzhou 450002, China

Abstract: In this study, the HPLC fingerprint method of the pieces, standard decoction, intermediates and dispensing granules of *Scutellaria baicalensis* was established, and the correlations among them were evaluated. The chromatographic separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was eluted with gradient by methanol-0.05% phosphoric acid; The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C and the detection wavelength was set at 275 nm. There were 9 common characteristic peaks in all fingerprint spectrum of 10 batches of pieces, standard decoction, intermediates and dispensing granules of *S. baicalensis*, presenting a good correlation, in the 9 common characteristic peaks, three of them were baicalin, baicalein, wogonin. The main chemical constituents of *S. baicalensis* pieces, standard decoction, intermediates and dispensing granules composition are basically identical. The established HPLC fingerprint method can be used for the quality control of *S. baicalensis* dispensing granules.

Key words: *Scutellaria baicalensis*; fingerprint; correlation; dispensing granules; standard decoction

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。具有清热燥湿、泻火解毒,止血,安胎等功效^[1]。现代药理研究表明黄芩具有解热、抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、保肝、调节免疫等作用^[2,3]。黄芩道地和大宗产地有河北、山西,河北、内蒙古等^[4],化学成分主要是黄酮及其苷类,还有少量萜类、挥发油等成分^[5]。

黄芩配方颗粒是以黄芩饮片投料,经提取、浓

缩、干燥、制粒而成,已经失去了饮片的外观形态。如果仅用黄芩苷的含量限度作为质量控制指标,较难全面的判断黄芩配方颗粒的真伪与优劣。2016 年国家药典委员会发布了《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》,该技术要求提出将标准汤剂作为中药配方颗粒是否与临床汤剂基本一致的标准参照物,并指出中药材、饮片、中间体、配方颗粒特征或指纹图谱应具相关性。目前关于黄芩的 HPLC 指纹图谱研究较多,但都是单一研究黄芩药材、提取物、配方颗粒的指纹图谱^[6-8],没有就黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 指

纹图谱相关性做进一步研究,因此本研究利用 HPLC 法建立了黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒指纹图谱,对其相关性进行评价,为黄芩配方颗粒制备全过程的质量控制提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津),ME204 万分之一分析天平(梅特勒),AUW220D 十万分之一天平(日本岛津),JJ5000A 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HGJR-01 红外加热仪(河南中良科学仪器有限公司),LGJ-12 低温冷冻干燥仪(北京松源华兴科技发展有限公司),SB-1100 旋转蒸发仪(东京理化),A-1000S 真空泵(东京理化)。

1.2 对照品

黄芩苷(批号:110715-201318,纯度 93.3%)购自中国食品药品检定研究院,黄芩素(批号:16101101)、汉黄芩素(批号:160215)均购自成都普菲德生物技术有限公司。试剂乙腈、甲醇为色谱纯;水为娃哈哈纯净水、蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

10 批黄芩饮片来源河南、山西、河北、内蒙古,经河南大学药学院张保国教授鉴定,均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。由本实验室根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技

术要求(征求意见稿)》制备黄芩的标准汤剂,并制定黄芩标准汤剂的质量标准,根据标准汤剂的标准优化黄芩的配方颗粒制备工艺,制成同批号的配方颗粒。

2 方法与结果

2.1 黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒中黄芩苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.2% 磷酸(47:53)为流动相,流速为 1.0 mL/min,柱温为 35 °C,检测波长 280 nm,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备

取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 41.24 μg 的溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液制备

黄芩饮片供试品溶液的制备同 2015《中国药典》黄芩饮片项下方法,黄芩标准汤剂、中间体、配方颗粒供试品制备方法:取各样品粉末 0.01 g 左右,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,加入 70% 乙醇 25 mL,称定重量,超声处理 30 min,放冷,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.4 样品含量测定

结果见表 1,黄芩饮片中黄芩苷含量均大于

表 1 黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒中黄芩苷含量

Table 1 The contents of baicalin in pieces, standard decoction, intermediates and dispensing granules of *S. baicalensis*

编号 No.	饮片来源 Resource of pieces	饮片黄芩苷含量 Baicalin content in pieces (%)	标准汤剂黄芩苷含量 Baicalin content in standard decoction (%)	中间体黄芩苷含量 Baicalin content in intermediates (%)	配方颗粒黄芩苷含量 Baicalin content in dispensing granules (%)
1	河南	13.0	25.8	26.3	22.0
2	河南	8.8	17.6	19.5	16.1
3	河南	11.1	19.0	20.3	17.5
4	山西	11.5	17.4	17.4	16.5
5	山西	12.0	20.8	22.4	21.9
6	河北	11.0	18.9	20.8	17.4
7	河北	12.2	22.4	23.8	21.1
8	河北	9.5	18.6	18.8	17.1
9	内蒙	11.0	20.8	21.2	19.2
10	内蒙	9.7	20.7	21.5	18.8

8.0%,符合2015《中国药典》要求。根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》的要求,我们前期研究了黄芩标准汤剂的质量标准,结合文献^[7]最后确定出黄芩标准汤剂中浸膏得率范围25.1%~46.6%,黄芩苷转移率范围46.6%~86.6%。该要求还指出中间体出膏率、含量和上下限范围以及指纹或特征图谱等各项指标的合理性评价应当以标准汤剂为标准参照物。

从表1数据可见黄芩标准汤剂、中间体中黄芩苷含量相差不超过±2,说明二者含量基本一致,黄芩中间体的浸膏得率、黄芩苷转移率均在标准汤剂标准范围之内,说明黄芩配方颗粒制备工艺合理,符合要求,黄芩配方颗粒在制备时由于加了辅料,故黄芩苷含量较中间体的稍偏低。

2.2 黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相甲醇(A)和0.05%磷酸水(B),梯度洗脱程序为:0~46 min,40%~70% A;46~60 min,70%~90% A;60~65 min,90% A。流速1 mL/min,柱温35℃,进样量10 μL,检测波长275 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量于25 mL容量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,摇匀,配制成每1 mL溶液含129.6 μg黄芩苷、71.6 μg黄芩素、81.6 μg汉黄芩素的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

分别精密称取黄芩饮片粉末0.02 g,黄芩标准汤剂、中间体、配方颗粒粉末0.01 g,置100 mL锥形瓶中,加入70%乙醇20 mL,称定重量,超声处理30 min,放冷,用70%乙醇补足减失的重量,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验

取同一批次黄芩标准汤剂样品,按2.2.3项下制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24、48 h进样,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积RSD均<3%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.3.2 精密度试验

取同一批次黄芩标准汤剂样品,按2.2.3项下制备供试品溶液,按照2.2.1项下条件连续进样6次,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积RSD

均<3%,表明精密度良好。

2.3.3 重复性试验

取同一批次黄芩标准汤剂样品6份,按2.2.3项下制备供试品溶液,按照2.2.1项下条件测定,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积RSD均<3%,表明重复性良好。

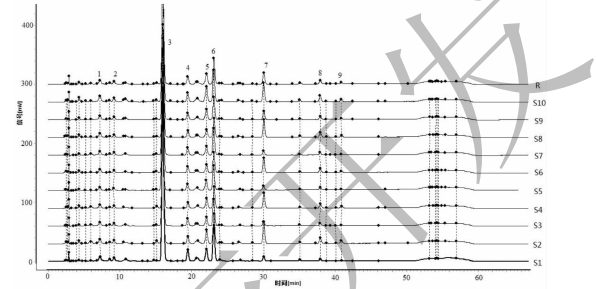


图1 10批黄芩标准汤剂 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprints of 10 batches of *S. baicalensis* standard decoction and its reference fingerprint

注:S1-S10为10批黄芩标准汤剂;R为对照指纹图谱

Note:S1-S10: *S. baicalensis* standard decoction; R: reference fingerprint

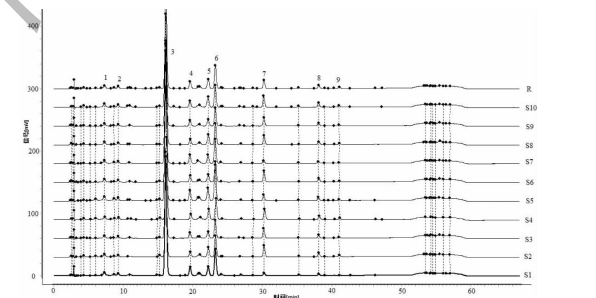


图2 10批黄芩配方颗粒 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱

Fig.2 HPLC fingerprints of 10 batches of *S. baicalensis* dispensing granules and its reference fingerprint

注:S1-S10为10批黄芩配方颗粒;R为对照指纹图谱

Note:S1-S10: *S. baicalensis* dispensing granules; R: reference fingerprint

2.4 样品的测定

取10批黄芩饮片、黄芩标准汤剂、黄芩中间体、黄芩配方颗粒供试品溶液10 μL,黄芩混标溶液按照2.2.1项下条件检测。黄芩标准汤剂、配方颗粒色谱图见图1-2。

2.5 共有峰的标定

将10批黄芩标准汤剂、黄芩配方颗粒 HPLC 指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系

统”(2012 版)选择时间宽度为 0.1,中位数法生成对照指纹图谱,经比较分析后确定黄芩标准汤剂、配方颗粒均有 9 个共有峰。同法采集黄芩饮片、中间体的指纹图谱,发现黄芩饮片、中间体的 HPLC 指纹图谱与黄芩标准汤剂、配方颗粒基本一致,均有 9 个共有峰,10 批黄芩饮片、中间体、标准汤剂、配方颗粒指纹图谱相似度范围在 0.95-1。各批次供试品指纹图谱与对照图谱进行比较,计算其相似度,结果见表 2,结果显示,10 批饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均在 0.98 以上,说明 10 批不同来源的黄芩饮片化学成分具有良好的相似性;黄芩配方颗粒生产工艺稳定。与黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品色谱图进行对比,确认配方颗粒 HPLC 指纹图谱中 3 号峰为黄芩苷,7

号峰为黄芩素,8 号峰为汉黄芩素,图谱见图 3。

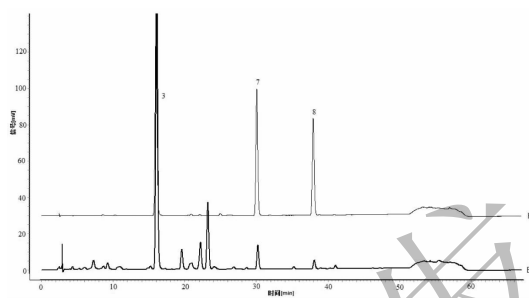


图 3 共有峰指认

Fig. 3 Identification of common peaks

注:3:黄芩苷;7:黄芩素;8:汉黄芩素;E:黄芩配方颗粒对照指纹图;F:混标

Note:3: baicalin; 7: baicalein; 8: wogonin; E: reference fingerprint of *S. baicalensis* dispensing granules; F: mixed standards

表 2 饮片、中间体、标准汤剂及配方颗粒的指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of fingerprints of pieces, intermediates, standard decoction and dispensing granules

样品 Sample	相似度 Similarity									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
饮片 Pieces	0.993	0.997	0.999	0.991	0.996	0.999	0.994	0.987	0.999	0.998
中间体 Intermediates	0.995	0.996	0.991	0.995	0.996	0.996	0.995	0.998	0.996	0.997
标准汤剂 Standard decoction	0.995	0.996	0.982	0.995	0.997	0.998	0.997	0.994	0.998	0.998
配方颗粒 Dispensing granules	0.998	0.995	0.999	0.997	0.998	0.999	0.997	0.997	0.998	0.998

2.6 相关性分析

黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱比较结果见图 4, 并采用相似度评价软件评价四者图谱的相似度, 结果见表 3, 结果表明黄芩配方颗粒的 9 个共有特征峰在黄芩标准汤剂、饮片、中间体中均有显示, 由表 3 可以看出黄芩配方颗粒对照指纹图谱与饮片、标准汤剂、中间体的对照指纹图谱相似度在 0.99 以上, 结合 10 批黄芩饮片、中间体、标准汤剂、配方颗粒指纹图谱相似度范围在 0.95-1, 说明黄芩配方颗粒和黄芩饮片、中间体、标准汤剂成分一致, 四者指纹图谱具有良好的相关性, 为采用 HPLC 指纹图谱对黄芩配方颗粒生产全过程进行控制提供试验依据。

2.7 不同厂家黄芩配方颗粒 HPLC 指纹图谱比较

从市场上购买了 5 批黄芩配方颗粒, 采用 2.2.1 方法建立其指纹图谱, 结果见图 5, 除了 F1 市售配方颗粒 HPLC 指纹图谱上多了一个较大的峰以外,

其他厂家的配方颗粒和本实验室自制的配方颗粒 HPLC 指纹图谱基本一致, 各批之间相似度 >0.92, 说明市场上和本实验室自制的黄芩配方颗粒的化学成分、含量基本一致, 均来源于黄芩饮片, 提取工艺均为水提, 黄芩配方颗粒和标准汤剂在化学成分上具有一致性。

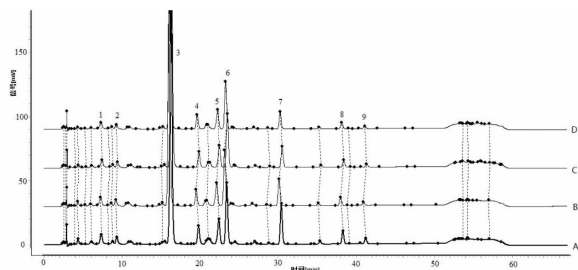


图 4 黄芩饮片(A)、标准汤剂(B)、中间体(C)及配方颗粒(D)的 HPLC 对照指纹图谱比较

Fig. 4 Comparison on HPLC fingerprints of pieces (A), standard decoction (B), intermediates (C) and dispensing granules (D) of *S. baicalensis*

表3 黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱相似度结果

Table 3 Similarity of reference fingerprints of pieces, standard decoction, intermediates and dispensing granules of *S. baicalensis*

样品 Sample	相似度 Similarity			
	饮片对照指纹图谱 Reference fingerprint of pieces	标准汤剂对照图谱 Reference fingerprint of standard decoction	中间体对照图谱 Reference fingerprint of intermediates	配方颗粒对照图谱 Reference fingerprint of dispensing granules
饮片对照指纹图谱 Reference fingerprint of pieces	1	0.996	0.996	0.994
标准汤剂对照图谱 Reference fingerprint of standard decoction	0.996	1	0.998	0.995
中间体对照图谱 Reference fingerprint of intermediates	0.996	0.998	1	0.993
配方颗粒对照图谱 Reference fingerprint of dispensing granules	0.994	0.995	0.993	1

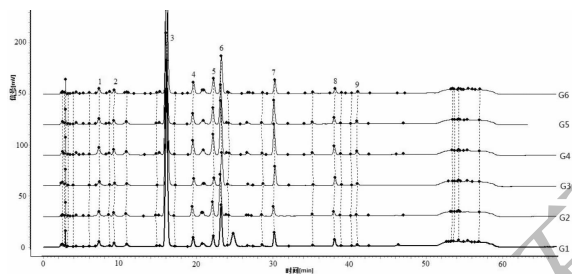


图5 黄芩市售配方颗粒和自制配方颗粒 HPLC 指纹图谱比较

Fig. 5 Comparison of HPLC fingerprints of commercial and self-produced dispensing granules

注: G1-G5 为市售配方颗粒; G6 自制配方颗粒对照指纹图谱

Note: G1- G5; commercial dispensing granules; G6; reference fingerprint of self-produced dispensing granules

3 讨论

本文购买的黄芩饮片有河南、山西、河北、内蒙四个产地,涵盖了黄芩的道地和大宗产区,在质量上经检测均符合 2015《中国药典》要求,在产地和质量上具有代表性。

本文综合考察了甲醇:水、乙腈:水、甲醇:0.05%磷酸水、甲醇:0.01%磷酸水、甲醇:0.1%磷酸水几种流动相系统,结果以甲醇:磷酸水系统分离效果比较好,考虑到对柱子的保护,选择甲醇:0.05%磷酸水系统,在该条件下,各色谱峰分离度良好,保留时间适中。样品检测时采用 DAD 检测器对黄芩配方颗粒供试品溶液进行了紫外 190~400 nm 扫描,发现在 275 nm 下色谱峰数较多且各峰之间的

分离度较好,能够反映组分的全貌,所以选择 275 nm 作为吸收波长。黄芩样品均为水提,超声就能保证有效成分的溶出完全,所以供试品制备方法选择超声提取,所用溶剂分别考察了 30%、50%、70%、100% 甲醇,30%、50%、70%、95% 乙醇,结果用 70% 乙醇作为提取溶剂时,各峰分离良好,峰形较好,且黄芩苷提取效率最高。本文通过对黄芩配方颗粒与饮片、中间体、标准汤剂的 HPLC 指纹图谱相关性的研究,阐明了黄芩配方颗粒与饮片、中间体、标准汤剂在化学成分上的相关性,为黄芩配方颗粒的质量控制提供了研究基础。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol I, 301.
- 2 Zheng YF(郑勇凤), Wag JJ(王佳婧), Fu CM(傅超美), et al. Research progress on chemical constituent and pharmacological effect of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2016, 38: 141-145.
- 3 Shi GX(施高翔), Shao J(邵菁), Wang TM(汪天明), et al. New advance in studies on antimicrobial activity of *Scutellaria baicalensis* and its effective ingredients [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 3713-3717.
- 4 Li Z(李子), Hao JD(郝近大). Textual research on *Scutellaria baicalensis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2008, 31: 1584-1585.