

文章编号: 1006 - 2858(2004) 01 - 0028 - 04

不同来源黄芩药材 HPLC 指纹图谱比较

肖丽和¹, 王红燕¹, 李发美², 徐绥绪¹, 王路宏³, 张 箭³

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016;
3. 三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518029)

摘要: 目的 对不同来源黄芩药材进行 HPLC 指纹图谱的比较研究。方法 选择 HPLC-UV 指纹图谱分析条件: 天津深航 Zirchrom Kromasil C₈ 色谱柱 (5 μm, 200 mm × 4.6 mm); 流动相为甲醇-水 (V/V = 52/48), 含 8 mmol L⁻¹ 四丁基溴化铵, 磷酸调 pH 2.8; 检测波长为 276 nm。以系统聚类分析进行分类, 用计算机辅助相似度计算软件进行指纹图谱相似度比较。结果 系统聚类分析将样品分为 5 类, 正品黄芩、滇黄芩、甘肃黄芩各分为 1 类; 2 份粘毛黄芩各分为 1 类。滇黄芩与正品黄芩的指纹图谱差异较明显, 而粘毛黄芩、甘肃黄芩与正品黄芩指纹图谱无明显差异, 不同产地正品黄芩间指纹图谱无明显差异。结论 该方法能较好地识别黄芩药材的种类, 为黄芩药材质量评估提供有益的信息。
关键词: 黄芩; HPLC 指纹图谱; 聚类分析; 相似度
中图分类号: R 944 文献标识码: A

黄芩为常用中药, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1], 药用历史悠久, 历代本草均有记载。国内外对其化学成分和药理作用进行了比较系统的研究, 其中含量较高的活性成分有黄芩苷 (baicalin)、汉黄芩苷 (wogonoside)、黄芩素 (baicalein)、汉黄芩素 (wogonin) 等^[2]。除了药典规定的黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 作为正品药用外, 其同属近缘植物如粘毛黄芩 (*S. viscidula* Bge.)、滇黄芩 (*S. amoëna* C. H. Wright)、甘肃黄芩 (*S. rehderiana* Diels) 等在临床上也作黄芩入药, 滇黄芩在我国西南地区是药用黄芩的主要来源^[3]。作者主要介绍中药黄芩 HPLC 指纹图谱的建立及利用指纹图谱信息从样品整体化学成分上对不同来源黄芩药材进行分析比较。

1 仪器与材料

Jasco PU—980 型高效液相色谱仪 (日本分光公司), Jasco UV—975 紫外检测器 (日本分光公司), WSC 色谱工作站 (大连化学物理研究所); DL—180 型超声波清洗机 (浙江象山县石浦海天电子仪器厂)。

快诺酮对照品由中国药品生物制品检定所提供; 甲醇为色谱纯, 水为二次重蒸水, 磷酸、四丁基溴化铵为分析纯 (中国医药集团上海化学试剂公司)。

所用药材样品黄芩 (*S. baicalensis* Georgi)、粘毛黄芩 (*S. viscidula* Bge.)、滇黄芩 (*S. amoëna* C. H. Wright)、甘肃黄芩 (*S. rehderiana* Diels) 均由沈阳药科大学郭允珍教授鉴定, 具体来源见表 1。

Table 1 The sources of samples		
Sample number	Species	Regions
1	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Beijing
2	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Shanxi
3	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Shanxi
4	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Anhui
5	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Shandong
6	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Gansu
7	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Linyi Shandong
8	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Chifeng Neimeng
9	<i>S. baicalensis</i> Georgi	Gansu
10	<i>S. viscidula</i> Bge.	Neimeng
11	<i>S. viscidula</i> Bge.	Neimeng
12	<i>S. amoëna</i> C. H. Wright	Yunnan
13	<i>S. amoëna</i> C. H. Wright	Yunnan
14	<i>S. rehderiana</i> Diels	Gansu
15	<i>S. rehderiana</i> Diels	Wudu Gansu

2 方法与结果

2.1 色谱条件

天津深航 Zirchrom Kromasil C₈ 色谱柱 (5 μm, 200 mm × 4.6 mm); 流动相: 甲醇-水 (V/V = 52

收稿日期: 2003 - 05 - 13
作者简介: 肖丽和 (1977 -), 女 (汉族), 福建莆田人, 在读硕士, 主要从事中药质量控制方面研究, E-mail: lihexiao@hotmail.com; 王红燕 (1962 -), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, Tel: (024) 23897443, E-mail: bchywang@hotmail.com.
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

48), 含 8 mmol L^{-1} 四丁基溴化铵, 磷酸调 $\text{pH} 2.8$; 流速: $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 室温; 检测波长: 276 nm ; 灵敏度: 0.02 AUFS 。

2.2 内标物溶液的配制

取快诺酮对照品适量, 用无水乙醇制成 1 g L^{-1} 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的配制

分别称取 60 干燥 4 h 的各种黄芩粉约 0.3 g , 精密称定, 加 $75\%(\varphi)$ 乙醇 40 mL , 加热回流 1 h , 滤过, 滤液置 100 mL 量瓶中, 用少量 $75\%(\varphi)$ 乙醇分次洗涤容器和残渣, 洗液滤入同一量瓶中, 加 $75\%(\varphi)$ 乙醇至刻度, 摇匀。精密量取溶液 1 mL 于 5 mL 量瓶中, 加入内标物溶液 1 mL , $30\%(\varphi)$ 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 测定方法

各供试品溶液进样 $20 \mu\text{L}$, 在上述色谱条件下进行分离测定, 记录色谱图。以各色谱峰保留时间为分子, 内标物保留时间为分母, 计算各色谱峰的相对保留时间; 以各色谱峰峰面积为分子, 以内标物峰面积为分母, 计算各色谱峰的相对峰面积值。

2.5 方法学考察

2.5.1 仪器精密度试验

取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 测得各色谱峰相对保留时间的 RSD 为 $0.30\% \sim 0.55\%$, 相对峰面积的 RSD 为 $0.24\% \sim 1.20\%$, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 方法重现性试验

取同一样品 5 份, 按“2.3”条方法制备供试品溶液, 分别进样, 测得各色谱峰相对保留时间 RSD 为 $0.18\% \sim 0.55\%$, 相对峰面积的 RSD 为 $0.94\% \sim 2.25\%$, 表明方法重现性良好。

2.5.3 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在 $0、2、4、8、16、24 \text{ h}$ 进样, 测得各色谱峰相对峰面积的 RE 为 $-1.62\% \sim +1.63\%$, 表明供试品溶液在 24 h 之内稳定。

2.6 不同来源黄芩药材 HPLC 指纹图谱分析

2.6.1 HPLC 指纹图谱的测定

取不同来源黄芩药材按“2.3”条方法制备供试品溶液, 按“2.4”条方法测定并记录色谱图, 正品黄芩有 9 个共有峰, 与对照品(自行提取分离制备)比较, 鉴定了其中的 6 个峰, 分别为黄芩素 $7-O$ 葡萄糖苷(2号峰), 黄芩苷(3号峰), 汉黄芩苷(6号峰), 黄芩素(7号峰), 汉黄芩素(8号峰), 千层纸素 A(9号峰)(图 1)。

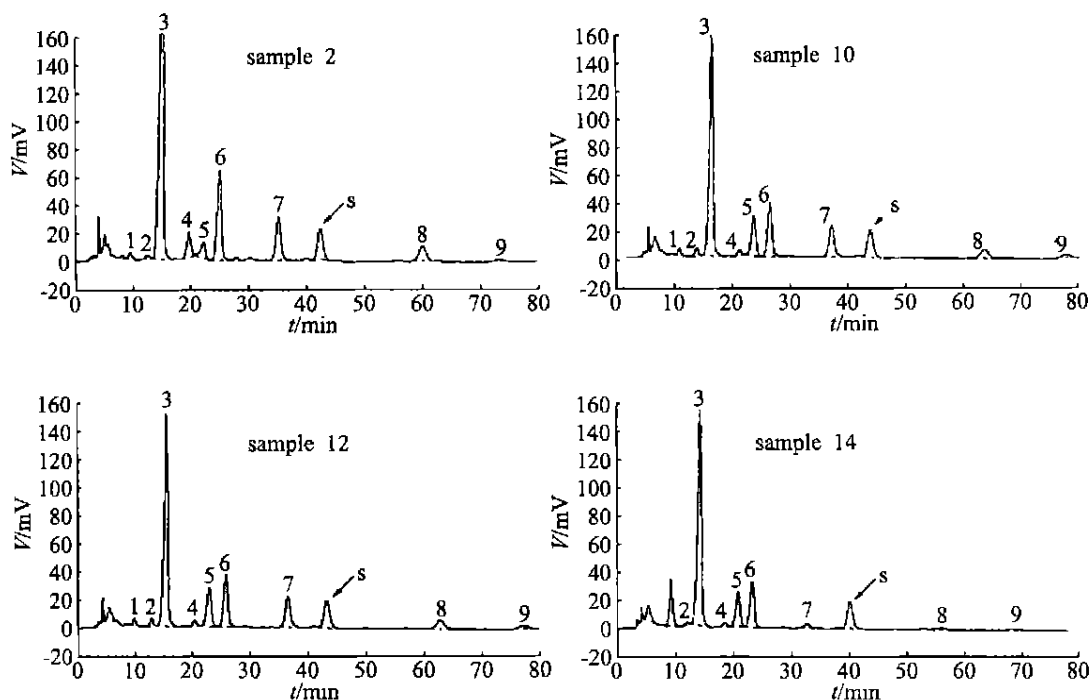


Fig. 1 The HPLC chromatograms of *S. baicalensis* Georgi (sample 2), *S. viscidula* Bge. (sample 10), *S. amoena* C. H Wright (sample 12) and *S. rehderiana* Diels (sample 14)

2—Baicalein 7-*O*-glucoside; 3—Baicalin; 6—Wogonoside; 7—Baicalein; 8—Wogonin; 9—Oroxylin A; S—Norethisterone

2.6.2 指纹图谱系统聚类分析

面积值为变量进行系统聚类分析,结果 15 个样品
各色谱峰的相对峰面积值见表 2,以相对峰
分为 5 类(表 3)。

Table 2 The HPLC fingerprints data of samples(Relative peak area)

Sample number	Peak number								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.226	0.091 9	10.31	0.684	0.832	2.719	0.399	0.212	0.044 8
2	0.149	0.109	8.515	0.463	0.899	1.805	2.326	0.587	0.234
3	0.153	0.100	7.159	0.374	0.472	1.830	3.290	1.058	0.203
4	0.118	0.063 3	6.839	0.388	0.573	1.777	2.001	0.750	0.119
5	0.163	0.089 5	9.975	0.645	0.477	2.383	0.692	0.644	0.079 4
6	0.154	0.028 4	7.695	0.499	0.524	2.052	0.134	0.139	0.016 5
7	0.159	0.039 6	9.212	0.556	0.542	2.260	0.395	0.211	0.033 4
8	0.175	0.179	6.683	0.424	0.783	1.702	0.566	0.249	0.084 1
9	0.299	0.099 4	8.991	0.660	0.728	1.974	0.735	0.242	0.061 6
10	0.174	0.157	5.279	0.156	1.204	1.585	1.084	0.435	0.228
11	0.274	0.272	5.817	0.216	1.114	1.800	0.178	0.105	0.039 5
12	0.381	2.013	7.231	0.350	4.146	0.435	0.365	0.0252	0.050 6
13	0.533	3.540	9.720	0.259	3.380	0.216	0.362	0.005 3	0.040 9
14	0.885	0.063 8	5.470	0.123	1.057	1.366	0.167	0.060 5	0.050 1
15	0.759	0.083 9	5.106	0.146	1.153	1.381	0.260	0.117	0.080 3

Table 3 The results of hierarchical clustering analyses

category	Sample number
	1, 7,6,9, 5,8,3,4,2
	10
	11
	14,15
	12,13

2.6.3 指纹图谱相似度分析

利用计算机辅助相似性评价系统软件(中南大学中药现代化研究中心),使用相关系数法计算,对所得的 HPLC 指纹图谱全谱进行相似度计算,以相关系数表征相似度,结果见表 4。

Table 4 The HPLC fingerprints analyses data of samples

Sample number	Correlation coefficient	Ratio of relative peak area (P3 P7)	Ratio of relative peak area (P4 P5)	Total relative peak area
1	0.988 9	25.84	0.822 1	15.51
2	0.973 0	3.661	0.515 0	15.09
3	0.940 5	2.176	0.792 4	14.64
4	0.972 5	3.418	0.677 1	12.63
5	0.991 9	14.41	1.352	15.15
6	0.977 9	57.43	0.952 3	11.24
7	0.983 7	23.32	1.026	13.41
8	0.966 7	11.81	0.541 5	10.85
9	0.994 1	12.23	0.906 6	13.79
10	0.995 4	4.870	0.129 6	10.30
11	0.976 0	32.68	0.193 9	9.816
12	0.901 7	19.81	0.084 4	15.00
13	0.915 2	26.85	0.076 6	18.06
14	0.972 3	32.75	0.116 4	9.242
15	0.973 8	19.64	0.126 6	9.086

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

首先比较了 C₁₈柱和 C₈柱的分离效果,C₈柱有利于极性较大成分的分离,故色谱柱选用 C₈柱;然后考察了甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-甲醇-磷酸水溶液、甲醇-四丁基溴化铵水溶液、乙腈-四丁基溴化铵水溶液等流动相系统,结果表明甲醇-四丁基溴化铵水溶液系统的分离效果最好,在此基础上对四丁基溴化铵水溶液的浓度、pH 值和甲醇比例进行进一步考察,最终选

择色谱峰的个数多、分离度大及分析时间合适的流动相,即上述流动相条件。

3.2 黄芩样品的分类

系统聚类分析将所有样品分为 5 类:正品黄芩、滇黄芩与甘肃黄芩各分为 1 类;2 份粘毛黄芩样品各分为 1 类,原因可能是其中的 10 号样品的黄芩苷(3 号峰)与黄芩素(7 号峰)的相对峰面积比值明显偏低(见表 4),是黄芩苷水解成黄芩素而导致这份粘毛黄芩样品的黄芩苷与黄芩素的相对峰面积比值明显偏低,还是药材的产地、生长条件、采集时间等其它因素而导致这种结果,需进一步研究。

3.3 指纹图谱比较

由表 4 可以看出,除了滇黄芩外其它样品的指纹谱的相关系数均大于 0.94,即滇黄芩与其它样品间的差异较明显,而粘毛黄芩与甘肃黄芩指纹图谱的相关系数均大于 0.97,这一结果与文献报道的粘毛黄芩、甘肃黄芩与正品黄芩差异较小

一致^[4,5];但直观比较粘毛黄芩、甘肃黄芩与正品黄芩的指纹谱可以明显看出它们之间的区别:与正品黄芩相比,粘毛黄芩、甘肃黄芩的 4 号峰与 5 号峰相对峰面积的比值有明显差别(见表 4),粘毛黄芩、甘肃黄芩均小于 0.2,而所有正品黄芩均大于 0.5,因此可以认为 4、5 号峰为区别粘毛黄芩、甘肃黄芩与正品黄芩的特征峰。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [Z]. 北京:化学工业出版社, 2000. 248 - 249.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999. 6206 - 6216.
- [3] 宋万志. 药用黄芩的资源研究 [J]. 药学报, 1981, 16(2): 139 - 144.
- [4] 齐美玲, 罗旭, 王玺. 黄芩品种及代用品的模糊聚类分析 [J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(2): 127 - 129.
- [5] 苏微微. 主成分分析法评价中药黄芩的质量 [J]. 现代应用药学, 1990, 7(4): 9 - 11.

Comparative study on HPLC-FPS of Radix Scutellariae of various sources

XIAO Li-he¹, WANG Hong-yan¹, LI Fa-mei², XU Sui-xu¹, WANG Lu-hong³, ZHANG Jian³

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Sanjiu Medical Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518029, China)

Abstract: Objective To compare HPLC-FPS of three species of Radix Scutellariae from different regions.

Methods The chromatograms of the fingerprints of Radix Scutellariae were developed by HPLC. Hierarchical clustering analysis was performed for classification of samples with relative peak areas as the chemical variable and the similarity of the whole HPLC chromatogram was analyzed with a computer-aided program.

Result Tested samples were divided into five categories by hierarchical clustering analyses, *S. baicalensis* Georgi, *S. amoena* C. H. Wright and *S. rehderiana* Diels were each in one category, and two samples of *S. viscidula* Bge. were in two categories. The similarities of *S. baicalensis* Georgi samples of different sources were bigger than 0.95 which indicated a great similarity, while the *S. amoena* C. H. Wright shows some differences in the chromatogram of the fingerprints. **Conclusion** The method can be used to differentiate Radix Scutellariae of different species, and provide some useful information for quality evaluation.

Key words: Radix Scutellariae; HPLC-FPS; hierarchical clustering analysis; similarity