

川银花-黄芩药对配伍前后指纹图谱的变化及其多指标成分的定量分析

石征蓉¹, 谷江华¹, 杨秀青¹, 袁强华², 宋英^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的:研究川银花-黄芩药对配伍前后指纹图谱及指标性成分含量的变化,对该药对的临床应用有一定参考意义。方法:采用 InertSustain C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 10 μL,检测波长分别为 327 nm(0~27, 43~62 min), 237 nm(27~33 min), 274 nm(33~43, 90~120 min) 和 280 nm(62~90 min);分别建立 10 批川银花、黄芩单煎液及合煎液的指纹图谱,标定共有峰,获得各自对照指纹图谱。对配伍后指纹图谱的共有峰进行归属分析并通过 11 种混合对照品测定指标性成分的含量。结果:川银花-黄芩药对的指纹图谱标定 26 个共有峰,9 个来源于川银花,17 个来源于黄芩;色谱峰 1,2,3,4,13,14,15,18,23,25,26 分别对应新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,异绿原酸 B,异绿原酸 A,异绿原酸 C,黄芩苷,汉黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素;配伍前后峰的数目未发生变化,但指标性成分的含量发生了改变。结论:川银花-黄芩药对配伍前后化学成分种类无差异,但主要有效成分的溶出会相互影响。

[关键词] 川银花-黄芩; 绿原酸类; 黄酮类; 药对; 配伍; 指纹图谱; 黄芩苷

[中图分类号] R289.9;R284;R283.6;R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0015-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180015

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1605.010.html>

[网络出版时间] 2017-06-28 16:05

Change of Fingerprints and Quantitative Analysis of Multi-index Constituents in Couplet Medicines of Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix Before and After Compatibility

SHI Zheng-rong¹, GU Jiang-hua¹, YANG Xiu-qing¹, YUAN Qiang-hua², SONG Ying^{2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To assess difference of fingerprints and index constituents in couplet medicines of Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix before and after compatibility. **Method:** The separation was performed on InertSustain C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase composed of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution for gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was set at 25 °C, the injection volume was 10 μL, the detection wavelengths were set at 327 nm (0-27, 43-62 min), 237 nm (27-33 min), 274 nm (33-43, 90-120 min), 280 nm (62-90 min). The fingerprints of single and mixed decoction of 10 batches of Lonicerae Similis Flos and Scutellariae Radix were established, common peaks were demarcated and their respective control fingerprints were gained. Attributing analysis of common peaks in the fingerprints after compatibility was adopted and the contents of index ingredients through the 11 kinds of mixed control were determined. **Result:** Twenty-six common peaks were marked in the HPLC fingerprints of couplet medicines; 9 derived from Lonicerae Similis Flos and 17 derived from Scutellariae Radix; the peaks of 1, 2, 3, 4, 13, 14,

[收稿日期] 20170417(004)

[基金项目] 四川省科技支撑项目(2014SZ0140)

[第一作者] 石征蓉,在读硕士,从事中药新制剂、新工艺和新技术研究,Tel:18683379514,E-mail:501560079@qq.com

[通讯作者] *宋英,主任中药师,从事中药新制剂、新工艺和新技术研究,Tel:028-87783251,E-mail:songying624@163.com

15, 18, 23, 25, 26 corresponded to neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, respectively. The number of peaks had no change before and after compatibility, but the contents of index ingredients made differences. **Conclusion:** There are no differences in chemical ingredients from couplet medicines of *Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix* before and after compatibility, but the dissolution of main effective components affects each other.

[**Key words**] *Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix*; chlorogenic acids; flavonoids; couplet medicines; compatibility; fingerprint; baicalin

川银花味甘,性寒,长于清热解毒、凉散风热,主要用于治疗风热感冒、温热发病、咽喉肿痛、痈肿疔疮、热毒血痢等^[1];黄芩味苦,性寒,长于清热燥湿、泻火解毒,主要用于治疗湿温、暑湿、胸闷呕恶、肺热咳嗽等^[2]。金银花、黄芩两药在多个制剂(如银黄制剂、双黄连制剂、茵栀黄制剂、糖肾清毒颗粒、化扁合剂等)均有配伍使用,是中医经典药对之一。现代研究表明该药对配伍后,抗菌、清热解毒、消炎、退热等作用更甚,可广泛用于治疗上呼吸道感染、急性慢性扁桃体炎、咽喉炎、肺炎等^[3]。目前,文献报道较多的是金银花、黄芩药材及银黄制剂的质量标准或指纹图谱研究,主要用于鉴别、含量测定、质量控制及评价等方面,而对其配伍研究报道较少^[4-6]。任旻琼等^[7]运用指纹图谱并结合 2 种对照品分析,比较了金银花、黄芩配伍前后绿原酸和黄芩苷的含量差异,但本课题组在前期研究中发现绿原酸类成分和黄酮类成分在煎煮过程中其异构体之间会相互影响,绿原酸的含量会有所下降,黄芩苷类也会降解为其苷元——黄芩素,说明仅测定黄芩苷和绿原酸 2 种成分并不能全面客观地反映其配伍前后药效变化的物质基础。本实验采用 HPLC-DAD 波长切换技术建立川银花-黄芩水提液的指纹图谱分析方法,拟对药材单煎液和合煎液的特征指纹图谱变化进行定性分析及指标成分含量变化研究,探讨配伍前后化学成分的变化,为中药复方配伍机制研究、临床合理用药以及现代中药制剂研制提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BP211D 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-201313, 110885-200102, 110715-201318, 112002-201501, 111595-201306, 111514-200403,纯度依次为 96.6%,100%,93.3%,98.8%,97.8%,98.4%);新绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸 B,

异绿原酸 A,异绿原酸 C 对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号依次为 140903, 140901, 141006, 141010, 141003,纯度分别为 99.1%, 98.7%,98.5%,98.8%,98.9%);水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。实验用 10 批川银花、黄芩药材均购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学附属医院药剂科盛蓉副主任中药师鉴定,10 批川银花均为忍冬科植物细毡毛忍冬 *Lonicera similis* 的干燥花蕾,符合 2010 年版《四川省中药材标准》相关规定,10 批黄芩均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根,符合 2015 年版《中国药典》一部的相关规定,见表 1。

表 1 药材样品的批号信息

Table 1 Sample batch information of medicines

No.	川银花	黄芩	No.	川银花	黄芩
1	20160110	20160209	6	20160305	20160319
2	20160112	20160211	7	20160406	20160515
3	20160115	20160213	8	20160408	20160517
4	20160302	20160315	9	20160410	20160519
5	20160304	20160317	10	20160420	20160521

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8-9] 采用 InertSustain C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 9% ~ 11% A; 20 ~ 22 min, 11% ~ 17% A; 22 ~ 52 min, 17% ~ 21.5% A; 52 ~ 62 min, 21.5% ~ 22.5% A; 62 ~ 90 min, 22.5% ~ 23% A; 90 ~ 120 min, 23% ~ 40% A)后运行 4.5 min,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长分别为 327 nm(0 ~ 27, 43 ~ 62 min),237 nm(27 ~ 33 min),274 nm(33 ~ 43,90 ~ 120 min)和 280 nm(62 ~ 90 min)。理论板数按绿原酸峰计 > 3 万。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取新绿原酸,绿原酸,

隐绿原酸,咖啡酸,异绿原酸 B,异绿原酸 A,异绿原酸 C,黄芩苷,汉黄芩苷,黄芩素和汉黄芩素对照品适量,加甲醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度分别为 23.50,38.70,27.75,10.25,31.10,25.50,28.95,99.68,20.00,9.80,6.30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 水提液 精密称取 10 批川银花与黄芩各 20 g,混合,置圆底烧瓶内,加 10 倍量水回流提取 1 h,滤过,滤渣重复上述操作,水提 3 次。分开贮存 3 次滤液,备用。分别精密称取 10 批川银花、黄芩各 20 g,加 20 倍量水,其余按上述方法处理,得单味药材样品溶液。

2.2.3 供试品溶液 将合提、川银花和黄芩第 1 次提取药液定容至 500 mL,各精密吸取 2 mL 置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容,得合提、川银花和黄芩一提供试品溶液,分别编号 S1-1 ~ S1-10, C1-1 ~ C1-10, H1-1 ~ H1-10; 将第 2,3 次提取药液分别浓缩至 100 mL,精密吸取合提、川银花和黄芩第 2 次提取药液各 2 mL 置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容,得合提、川银花和黄芩二提供试品溶液,分别编号 S2-1 ~ S2-10, C2-1 ~ C2-10, H2-1 ~ H2-10; 精密吸取合提、川银花和黄芩第 3 次提取药液各 5 mL 置 20 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容,得合提、川银花和黄芩三提供试品溶液,分别编号 S3-1 ~ S3-10, C3-1 ~ C3-10, H3-1 ~ H3-10。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(S1-1),按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.2%,表明仪器精密度良好。

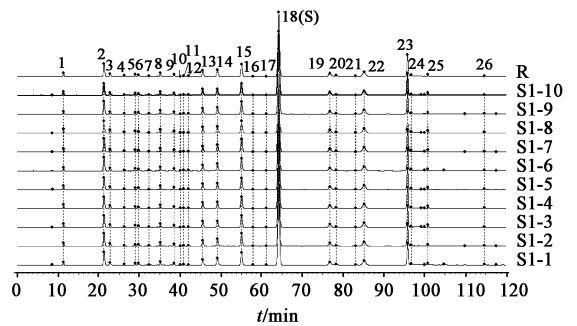
2.3.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(S1-1),按 2.1 项下色谱条件分别于 0,4,8,12,24,36 h 进样测定,记录色谱图,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.8%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.4%,表明供试品溶液在 36 h 内稳定性较好。

2.3.3 重复性试验 精密称定同一批川银花和黄芩药材,各 6 份,分别按 S1-1 供试品溶液方法制备,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.6%,相对峰面积的 RSD 均 < 4.4%,表明该方法的重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及评价^[10]

2.4.1 共有峰的标定 取混合对照品和供试品溶液按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。将 10 批

川银花-黄芩合煎液 3 次提取的指纹图谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2012 版),选择时间窗宽度 0.1,平均数法生成对照图谱,对色谱图进行多点校正,自动匹配,生成对照图谱,选择吸收信号较强、稳定性好的 26 个色谱峰标定为共有峰。其中 18 号峰为黄芩苷,选作参照峰(S),计算各样品指纹图谱共有峰的峰面积,分别生成 10 批川银花-黄芩合煎液 3 次提取的指纹图谱共有模式图,见图 1~3。同法采集 10 批川银花、黄芩单煎液 3 次提取的指纹图谱,经比较分析后,标定其中 9 个色谱峰为 10 批川银花单煎液 3 次提取的共有峰,17 个色谱峰为 10 批黄芩单煎液 3 次提取的共有峰。其中 2 号峰为绿原酸,选作 10 批川银花单煎液共有峰的参照峰(S),18 号峰为黄芩苷,选作 10 批黄芩单煎液共有峰的参照峰(S),计算各样品指纹图谱中共有峰的峰面积,并生成 10 批川银花单煎液和 10 批黄芩单煎液 3 次提取的指纹图谱共有模式图,见图 4~9。



R. 对照指纹谱(图 2~9 同)

图 1 10 批川银花-黄芩合煎液一提取指纹谱的共有模式

Fig. 1 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix at first extraction

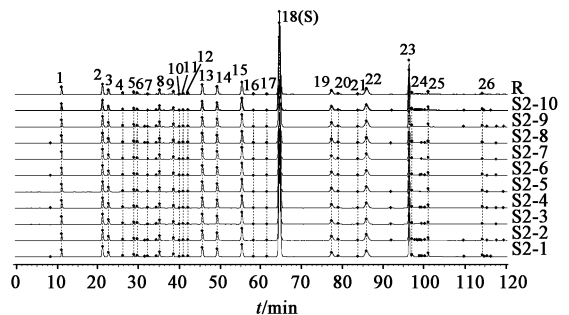


图 2 10 批川银花-黄芩合煎液二提取指纹谱的共有模式

Fig. 2 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix at second extraction

2.4.2 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2012 版),以各对照指纹图谱为参照,分别对 10 批川银花、黄芩单煎液和合煎液

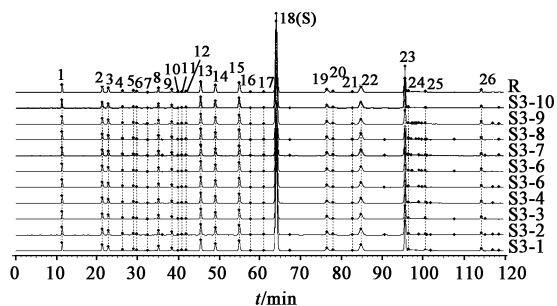


图 3 10 批川银花-黄芩合煎液三提指纹谱的共有模式
Fig. 3 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Loniceræ Similis Flos-Scutellariæ Radix at third extraction

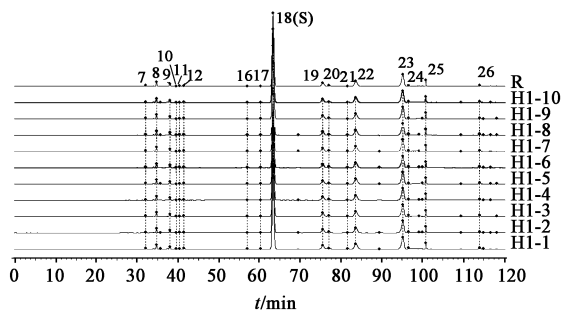


图 7 10 批黄芩单煎液一提取指纹谱的共有模式
Fig. 7 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Scutellariæ Radix at first extraction

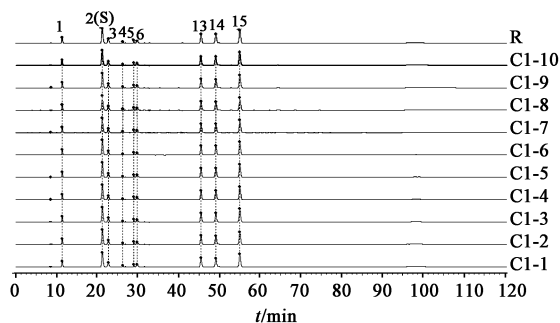


图 4 10 批川银花单煎液一提取指纹谱的共有模式
Fig. 4 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Loniceræ Similis Flos at first extraction

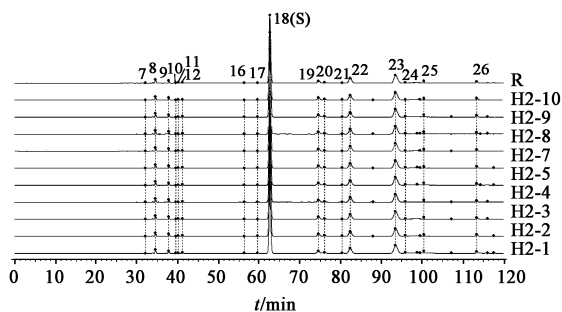


图 8 10 批黄芩单煎液二提取指纹谱的共有模式
Fig. 8 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Scutellariæ Radix at second extraction

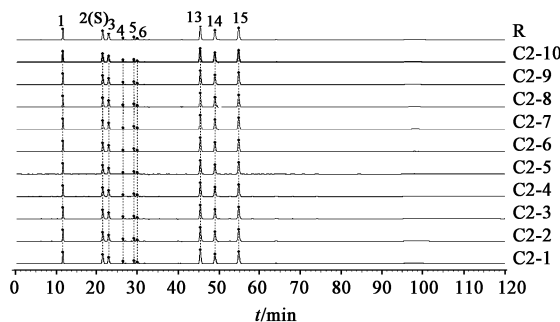


图 5 10 批川银花单煎液二提取指纹谱的共有模式
Fig. 5 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Loniceræ Similis Flos at second extraction

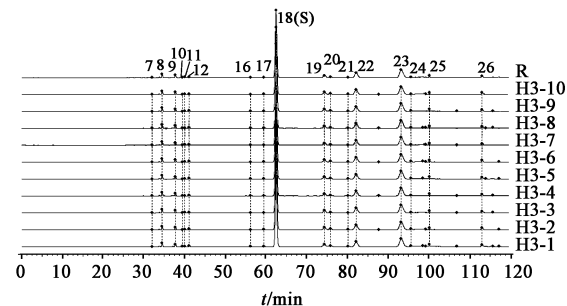


图 9 10 批黄芩单煎液三提取指纹谱的共有模式
Fig. 9 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Scutellariæ Radix at third extraction

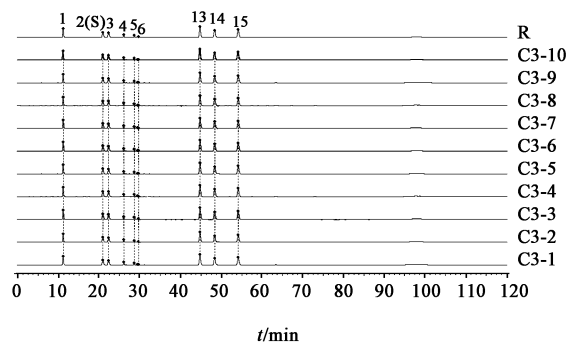


图 6 10 批川银花单煎液三提取指纹谱的共有模式
Fig. 6 Common pattern of fingerprints of 10 batches of Loniceræ Similis Flos at third extraction

的指纹图谱进行相似度评价,结果表明样品相似度均 > 0.93,不同批次的成分基本一致,说明药材各批次相似度良好,方法合理稳定。

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 色谱峰的归属 通过比较药对合煎液、单煎液及混合对照品的图谱,对合煎液中各共有峰进行初步归属,见图 10。结果发现共煎过程中并没有含量较大的组分产生或消失,基本确定 1 ~ 6, 13 ~ 15 号峰来源于川银花, 7 ~ 12, 16 ~ 26 号峰来源于黄芩。通过保留时间和 UV 光谱的对照,确定 1 号峰为新绿原酸, 2 号峰为绿原酸, 3 号峰为隐绿原酸, 4 号峰为咖啡酸, 13 号峰为异绿原酸 B, 14 号峰为异

绿原酸 A, 15 号峰为异绿原酸 C, 18 号峰为黄芩苷, 23 号峰为汉黄芩苷, 25 号峰为黄芩素, 26 号峰为汉黄芩素。

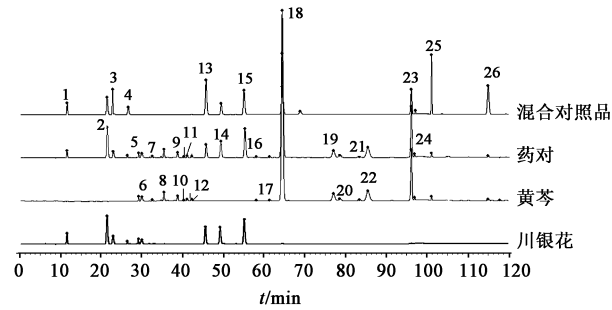


图 10 川银花 (C1-1), 黄芩 (H1-1), 药对 (S1-1) 及混合对照品的 HPLC
Fig. 10 HPLC of Lonicerae Similis Flos, Scutellariae Radix, couplet medicines and mixed reference substance

2.5.2 配伍前后指纹图谱的变化分析 比较药对合煎液与单煎液 3 次提取的指纹图谱共有峰的峰面

积均值, 见表 2。结果发现配伍后合煎液的共有峰峰面积随提取阶段变化具有以下趋势: 第 1 次提取时, 药对大部分共有峰的峰面积小于相应单味药共有峰峰面积; 在第 2, 3 次提取中, 药对大部分共有峰峰面积大于相应单味药共有峰峰面积。说明药对共煎与单煎效应不一致, 主要表现为单煎和配伍后 3 次提取中的活性成分溶出量发生改变 (峰面积与含量成相关性)。第 1 次提取时, 药对的共有峰峰面积减小, 活性成分的溶出量减少, 推测可能在第 1 次提取阶段, 川银花和黄芩活性成分溶出竞争大, 相互抑制效应比较明显。随着活性成分的不断溶出; 第 2, 3 次提取阶段抑制效应减弱或消失, 其活性成分溶出量逐渐增大。为进一步探究配伍后指标性成分的总溶出量较单味药有无差异, 选用 11 种指标性成分的混合对照品对川银花、黄芩单煎液及合煎液进行定量分析。

表 2 川银花-黄芩合煎液与单煎液 3 次提取时各共有峰平均峰面积的比较

Table 2 Comparison of average peak area of common peaks in single and mixed decoction of Lonicerae Similis Flos and Scutellariae Radix at three extraction

峰号	t_R /min	成分	峰归属	第 1 次提取		第 2 次提取		第 3 次提取	
				单味药	药对	单味药	药对	单味药	药对
1	11.31	新绿原酸	川银花	384.65	290.80	748.41	676.52	577.28	760.64
2	21.22	绿原酸	川银花	1 532.67	1 569.82	907.56	1 470.66	495.93	851.87
3	22.70	隐绿原酸	川银花	447.81	361.54	665.91	667.10	476.92	665.35
4	26.17	咖啡酸	川银花	69.92	66.90	106.41	101.27	135.17	127.38
5	28.90	-	川银花	143.25	139.24	144.48	183.63	89.79	156.84
6	29.71	-	川银花	300.49	300.90	202.38	323.00	59.70	207.23
7	32.23	-	黄芩	98.90	71.57	55.27	74.88	48.40	46.81
8	35.12	-	黄芩	405.03	343.56	326.20	482.41	176.88	458.60
9	38.47	-	黄芩	286.27	236.51	247.71	351.64	164.79	343.05
10	39.96	-	黄芩	44.44	46.24	57.10	62.62	60.89	68.54
11	40.87	-	黄芩	73.61	75.59	67.80	102.58	48.61	102.14
12	41.94	-	黄芩	130.79	100.88	110.96	151.54	28.80	145.59
13	45.50	异绿原酸 B	川银花	948.79	761.35	1 446.11	1 425.78	1 081.47	1 586.21
14	49.09	异绿原酸 A	川银花	1 010.73	938.98	1 101.45	1 252.50	806.63	1 151.95
15	55.02	异绿原酸 C	川银花	1 539.51	1 720.67	1 389.85	1 975.96	913.23	1 600.50
16	57.84	-	黄芩	67.35	40.12	46.56	47.33	36.25	37.47
17	61.09	-	黄芩	53.08	51.60	46.20	75.76	39.75	89.94
18	64.16	黄芩苷	黄芩	12 777.60	10 460.01	10 763.90	15 737.10	4 368.73	15 156.00
19	76.76	-	黄芩	1 006.73	729.83	493.40	1 103.00	81.87	788.93
20	78.33	-	黄芩	278.18	211.99	193.06	304.02	68.42	276.43
21	83.10	-	黄芩	94.04	77.69	84.68	120.92	64.74	112.24
22	85.20	-	黄芩	1 553.02	1 254.95	1 314.29	1 895.24	735.93	1 866.13
23	95.87	汉黄芩苷	黄芩	3 032.98	2 455.02	2 646.26	3 798.01	1 497.36	3 722.94
24	96.71	-	黄芩	95.58	73.19	72.47	137.66	53.02	106.12
25	100.84	黄芩素	黄芩	397.19	133.68	98.70	224.95	97.24	64.01
26	114.75	汉黄芩素	黄芩	202.41	93.00	243.03	232.73	319.86	431.77

2.6 指标成分的含量变化

2.6.1 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 1, 3, 5, 10, 20, 40 μL , 按 2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积积分值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得各成分的回归方程、线性范围, 见表 3。结果表明 11 个化合物的线性关系良好。

表 3 11 个活性成分的回归方程和线性范围

Table 3 Regression equations and linear ranges of eleven active components

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
新绿原酸	$Y = 38.619X - 12.823$	0.999 7	0.024 ~ 0.940
绿原酸	$Y = 12.515X - 5.638$	0.999 8	0.039 ~ 1.548
隐绿原酸	$Y = 34.295X + 7.607$	0.999 8	0.028 ~ 1.110
咖啡酸	$Y = 28.382X - 4.701$	0.999 6	0.010 ~ 0.410
异绿原酸 B	$Y = 34.199X - 1.271$	1.000 0	0.031 ~ 1.244
异绿原酸 A	$Y = 25.248X + 1.941$	0.999 9	0.026 ~ 1.020
异绿原酸 C	$Y = 34.314X + 3.340$	1.000 0	0.029 ~ 1.158
黄芩苷	$Y = 39.827X + 58.908$	0.999 9	0.010 ~ 3.987
汉黄芩苷	$Y = 58.468X + 6.854$	0.999 9	0.020 ~ 0.800
黄芩素	$Y = 61.082X - 15.534$	0.999 6	0.010 ~ 0.392
汉黄芩素	$Y = 67.397X + 6.801$	0.999 8	0.006 ~ 0.251

表 4 川银花-黄芩配伍前后多指标成分的定量测定

Table 4 Quantitative analysis of ingredients in couplet medicines of Lonicerae Similis Flos-Scutellariae Radix before and after compatibility $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

成分	第 1 次提取		第 2 次提取		第 3 次提取		总含量	
	药对	单味药	药对	单味药	药对	单味药	药对	单味药
新绿原酸	2.40	3.17	1.12	4.94	0.40	0.30	3.92	8.41
绿原酸	38.29	37.38	7.17	4.43	1.33	0.77	46.79	42.58
隐绿原酸	3.27	4.05	1.21	1.20	0.39	0.28	4.87	5.53
咖啡酸	0.74	0.78	0.23	0.24	0.09	0.10	1.06	1.11
异绿原酸 B	6.97	8.69	2.61	2.65	0.93	0.63	10.51	11.98
异绿原酸 A	11.52	12.40	3.07	2.70	0.90	0.63	15.49	15.73
异绿原酸 C	15.61	13.96	3.58	2.52	0.93	0.53	20.12	17.01
黄芩苷	76.04	92.89	22.88	15.65	7.05	2.03	105.97	110.57
汉黄芩苷	13.02	16.08	4.03	2.81	1.26	0.51	18.31	19.39
黄芩素	0.69	2.05	0.23	0.10	0.02	0.03	0.94	2.18
汉黄芩素	0.42	0.92	0.21	0.22	0.13	0.09	0.76	1.23

和咖啡酸缩合而成的多酚类化合物, 具有多种异构体, 其中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸互为同分异构体, 异绿原酸 B, A 和 C 互为同分异构体, 这些成分的结构母核相同, 存在酯键、不饱和双键和多元酚; 黄酮类成分以 2-苯基色原酮为基本母核, 含有多个酚羟基、酮基和氧苷键。由表 4 可知, 结果表明药对配伍后其活性成分的含量均有改变, 配伍后除绿原酸和异绿原酸 C 含量增加, 其他 9 种活性成分的含

2.6.2 方法学考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果表明 11 种成分峰面积的 RSD 均 $< 3.1\%$, 表明仪器精密度良好。稳定性试验同 2.3.2 项, 重复性试验同 2.3.3 项。精密吸取 2.2.3 项下已知指标成分含量的川银花-黄芩药对供试品溶液 (S1-1 ~ S1-6) 1 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 精密加入混合对照品储备液适量 (与样品中各待测成分的含量相当), 加 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定, 结果表明 11 个成分的平均加样回收率均在 $98.6\% \sim 103.1\%$, RSD 均 $< 3.0\%$ 。

2.6.3 样品测定 取 2.2 项下供试品溶液和对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以外标法计算样品中 11 个活性成分的平均含量, 见表 4。

有机酸类成分一直被视为金银花清热解毒的物质基础, 主要含新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸等绿原酸类成分^[11]。黄芩中主要含有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等黄酮类成分, 是黄芩发挥药理活性的物质基础^[12]。绿原酸类成分是一种由奎尼酸

量均有不同程度的减少, 其中新绿原酸、黄芩素和汉黄芩素明显减少, 相比于单煎液分别降低了 53.39% , 56.88% , 38.21% 。其原因可能是在共煎受热过程中, 受温度和 pH 等影响绿原酸类成分通过水解或分子内酯基迁移而发生异构化, 黄酮类成分的苷键被水解, 黄芩苷降解为其苷元——黄芩素。配伍后黄芩素降解严重, 可能因为其邻三酚羟基不稳定, 被氧化成醌类衍生物或与绿原酸类成分中的

羧基发生酯化所致。

3 讨论

由于绿原酸类与黄酮类成分的极性相差悬殊,紫外吸收波长各异,故选择乙腈-0.2%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱,以多波长切换技术手段全面分析该药对指纹图谱,所得的色谱图基线平稳,各色谱峰分离度良好,多个成分明确,指纹信息较为丰富,为川银花-黄芩的配伍研究提供了简便可行的方法。

中药复方煎煮过程中常伴随一系列复杂的物理、化学反应,药对是研究中药复方配伍规律的重要切入点,化学成分是药对产生疗效的物质基础,因此从药对配伍前后的化学成分变化着手探讨配伍科学内涵是一种合理可行的思路^[13-14]。在现阶段多数中药物质基础不明确的情况下,指纹图谱可更全面地反映复方所含化学成分的种类与数量,基于药效组分的多指标含量测定可以进一步明确药对配伍增效的物质变化基础。由于川银花和黄芩中含有的同分异构体较多,且多为药效组分,在煎煮过程中更易发生成分间的相互作用和转化,任旻琼等^[7]仅以绿原酸和黄芩苷为指标测定金银花-黄芩配伍前后的含量,但未对共有峰的大小变化进行分析,难以体现配伍过程中化学成分的整体变化情况。和其他药对配伍的研究方法相比,本文对川银花-黄芩的单煎液和合煎液3次提取的共有峰平均峰面积均作比较,并测定各提取阶段11个药效组分的含量和3次提取的总含量,不仅能更全面具体地反映该药对配伍的科学内涵,也为川银花-黄芩配伍的提取工艺研究奠定基础。

细毡毛忍冬在全国分布广泛,蕴藏量丰富,且绿原酸类成分含量较高,为西南地区银花药材的主要来源,在四川省、湖南省、贵州省中药材标准中均有收载。其用法用量、功效、主治和化学成分与金银花具有一定相似性,部分药理研究表明金银花、山银花及川银花均具有抗菌、抗病毒、抗炎、解热、降血脂、抗肿瘤等作用^[15]。由于其他银花类药材中绿原酸类的峰形基本与川银花一致,故本实验色谱方法同样适合金银花、山银花等其他银花类药材与黄芩的配伍研究。

由单味药及川银花-黄芩药对的指纹图谱分析可知,在现有色谱分析条件下,该药对配伍后暂未发现新的化学成分,且配伍后的活性成分含量不是各单味药的简单加和,这种差异对中药临床疗效是否存在影响有待进一步研究确认。在本研究基础上,

后续可通过LC-MS,NMR等手段对共煎液中未知色谱峰进行辨析,明确共煎液的物质基础,并对其药理作用进行研究,进一步阐明化学成分与其生物效应之间的关系,研究不同比例配伍对化学成分的影响,从而揭示其配伍的科学内涵。

[参考文献]

- [1] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[M]. 成都:四川科学技术出版社,2011:84-90.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:301-302.
- [3] 周淑芳,刘晓妹,于聪,等. 银黄制剂的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):222-225.
- [4] 徐玫,袁琦,赵辉,等. HPLC等度洗脱法同时测定银黄薄膜衣片中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中国中药杂志,2013,38(5):691-693.
- [5] 刘永利,李冬梅,冯丽,等. 银黄系列品种高效液相指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):102-104.
- [6] 张建伟,赵倩,何希荣,等. UPLC测定银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素6种成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):50-53.
- [7] 任旻琼,周日宝,王朝晖,等. RP-HPLC对金银花和黄芩单煎液与混煎液的分析[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(4):54-56.
- [8] 石征蓉,杨秀青,谷江华,等. HPLC-DAD波长转换法同时测定糖肾清毒颗粒中7种活性成分的含量[J]. 中国药房,2017,28(6):816-820.
- [9] 袁强华,呼梅,宋英,等. HPLC-DAD波长切换法同时测定化扁汤中10种有效成分的含量[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(1):30-35.
- [10] 高家荣,吴溪,韩燕全,等. 酸枣仁-五味子药对的单煎液、单煎混合液与合煎液UPLC特征指纹图谱相关性研究[J]. 中成药,2013,35(5):1001-1005.
- [11] 吴树国,翟德翠. 药用金银花的化学成分、药理作用研究及其进展[J]. 科技创新导报,2008,11(20):2.
- [12] 李琦,章军,崔文金,等. 黄芩饮片标准汤剂的制备和质量标准评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7):36-40.
- [13] 庞婷,麦蓝尹,陈勇,等. 中药药对配伍的化学成分变化研究进展[J]. 中药材,2015,38(11):2429-2434.
- [14] 高家荣,杨晓旭,魏良兵,等. 补骨脂、肉豆蔻配伍前后特征指纹图谱及指标成分含量变化研究[J]. 中药材,2014,37(10):1873-1876.
- [15] 刘华,张丽宏,王红平. 川产金银花主流品种细毡毛忍冬解热抗炎作用与急性毒性作用初探[J]. 海峡药学,2008,20(9):28-31.

[责任编辑 刘德文]