

# 基于 HPLC 和 HSGC 结合的黄芩酒制前后饮片特征图谱表征

苏慧<sup>1,2</sup>, 霍雨佳<sup>1,2</sup>, 扶垭东<sup>1</sup>, 刘颖<sup>1</sup>, 麻印莲<sup>1</sup>, 李丽<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230038)

**[摘要]** 目的:建立黄芩片和酒黄芩的特征图谱,分析黄芩酒制前后饮片特征图谱的变化规律。方法:分别采用高效液相色谱法(HPLC)和顶空气相色谱法(HSGC)分析黄芩片和酒黄芩的特征图谱。色谱条件为流动相甲醇(A)-含10 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵的0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,20%~40% A;10~20 min,40%~46% A;20~30 min,46%~52% A;30~50 min,52%~70% A),检测波长260 nm。结果:黄芩片和酒黄芩的HPLC特征图谱中均可标示13个特征峰,并归属了其中黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 共6个色谱峰,黄芩片酒制前后 HPLC 特征图谱无显著差异。黄芩生品、炮制品的 HSGC 特征图谱差异显著,酒黄芩饮片中可以检测到炮制辅料乙醇的特征峰,可有效地区别生品和酒制品。结论:将 HPLC 和 HSGC 建立的特征图谱综合运用于黄芩片、酒黄芩的质量评价和鉴别,弥补了 HPLC 特征图谱在生品和酒制品属性识别方面的局限性,为酒制类中药饮片的质量评价和真伪鉴别提供了新思路。

**[关键词]** 黄芩; 酒黄芩; 顶空气相; 特征图谱; 饮片; 黄芩苷; 千层纸素 A

**[中图分类号]** R283;R943.1;R284;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0014-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020014

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1348.002.html>

**[网络出版时间]** 2017-10-11 13:48

## Characterization of Specific Chromatograms of Scutellariae Radix Before and After Being Processed by HPLC and HSGC

SU Hui<sup>1,2</sup>, HUO Yu-jia<sup>1,2</sup>, FU Ya-dong<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, MA Yin-lian<sup>1</sup>, LI Li<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the method of specific chromatograms of Scutellariae Radix decoction pieces and Scutellariae Radix fried with wine, and to study on the change law of specific chromatograms of Scutellariae Radix before and after being processed. **Method:** The characteristics of Scutellariae Radix decoction pieces and Scutellariae Radix fried with wine were analyzed by HPLC and headspace gas chromatography (HSGC). **Result:** Scutellariae Radix decoction pieces and Scutellariae Radix fried with wine were marked with 13 characteristic peaks, and baicalin, oroxyloside, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A were assigned, there was no significant differences of HPLC specific chromatograms of Scutellariae Radix before and after being processed. The characteristics of HSGC specific chromatograms of Scutellariae Radix decoction pieces and Scutellariae Radix fried with wine were significantly different, the characteristic peak of ethanol can be detected in Scutellariae Radix fried with wine, which can effectively distinguish the raw and wine-processed products. **Conclusion:** Combination of HPLC and HSGC is suitable for quality evaluation and identification of Scutellariae Radix decoction pieces and Scutellariae Radix fried with wine, it can make up for the limitations of HPLC specific

**[收稿日期]** 20170731(005)

**[基金项目]** 国家科技基础性科研专项重点项目(2014FY111100)

**[第一作者]** 苏慧,在读硕士,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:15256099012,E-mail:463228043@qq.com

**[通信作者]** \*李丽,博士,研究员,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:lili7755@163.com

chromatograms in the identification of raw and wine-processed products, this study provides a new way to evaluate the quality of traditional Chinese medicine decoction pieces and their authenticity.

[Key words] Scutellariae Radix; Scutellariae Radix fried with wine; headspace gas chromatography; specific chromatograms; decoction pieces; baicalin; oroxylin A

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根,最早收载于《神农本草经》,是我国常用中药之一。现代研究表明黄芩主要含有黄酮类、氨基酸、糖类及挥发油等成分,其中黄酮类化合物为其主要有效成分,具有抗菌、抗炎和抑制流感病毒、乙型肝炎病毒的作用<sup>[1-2]</sup>。在 2015 年版《中国药典》中,黄芩项下收载了 2 种饮片,即黄芩片和酒黄芩,二者定性和定量指标均相同。近年来,有关黄芩指纹图谱或特征图谱的研究多集中在药材方面<sup>[3-6]</sup>,而对其饮片专属性特征图谱的研究则鲜有报道。

除常用的 HPLC 或 UPLC 外,有研究者采用二维红外技术对黄芩不同炮制饮片进行分析,但对于黄芩片和酒黄芩的专属性识别均无明显的进展<sup>[7]</sup>。酒黄芩炮制过程中使用的辅料是具有挥发性的黄酒,HPLC 和红外光谱(IR)均无法体现辅料在炮制过程中的存在;而顶空气相色谱法(HSGC)是一种对处于密闭系统内的样品达平衡状态时所产生的含挥发性成分的蒸气进行气相色谱分析的技术,其可对粉碎后的样品粉末直接进行测定,减少了提取方法对样品信息的选择性。因此,本实验拟将 HPLC 和 HSGC 分别用于黄芩片及酒黄芩的特征图谱分析,并将 2 种特征图谱相结合,建立具有黄芩片和酒黄芩专属性的特征图谱,为完善黄芩饮片的质量评价标准体系提供科学依据,也为酒制类中药饮片的质量评价提供新思路。

### 1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),7890A 型气相色谱仪和 G1888 型顶空进样器(美国安捷伦公司),XS105 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),FA2204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 和千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-12112909, MUST-13052312, MUST-13092303, MUST-16063005, MUST-16090102, 纯度依次为 ≥ 98%, ≥ 98%, ≥ 98%, 98.75%, 99.52%),黄芩素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111595-200905,纯度 98.5%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

12 批黄芩片和 11 批酒黄芩购自北京盛世龙药业有限公司等企业,经中国中医科学院中药研究所肖永庆研究员鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根,具体信息见表 1。

表 1 不同企业黄芩饮片的样品信息  
Table 1 Information of Scutellariae Radix decoction pieces from different companies

饮片	编号	生产厂家	批号
黄芩片	S1	北京盛世龙药业有限公司	20150712
	S2	北京盛世龙药业有限公司	20150729
	S3	北京盛世龙药业有限公司	20150811
	S4	北京市双桥燕京中药饮片厂	1609006
	S5	亳州市沪谯药业有限公司	1611150252
	S6	四川新荷花中药饮片股份有限公司	1612013
	S7	安徽协和成药业饮片有限公司	16080103
	S8	上海德华国药制品有限公司	2016082002
	S9	四川省中药饮片有限责任公司	161221
	S10	广东和翔制药有限公司	HX16A01
	S11	湖北红土地现代中药有限公司	160606
	S12	洛阳康鑫中药饮片有限公司	160601
酒黄芩	S1	北京盛世龙药业有限公司	20150712
	S2	北京盛世龙药业有限公司	20150729
	S3	北京盛世龙药业有限公司	20150811
	S4	北京市双桥燕京中药饮片厂	1604080
	S5	亳州市沪谯药业有限公司	1612230132
	S6	四川新荷花中药饮片股份有限公司	1608086
	S7	安徽协和成药业饮片有限公司	15112208
	S8	四川省中药饮片有限责任公司	161221
	S9	广东和翔制药有限公司	HX16A01
	S10	湖北红土地现代中药有限公司	151019
	S11	洛阳康鑫中药饮片有限公司	151101

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-含 10 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵的 0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 20% ~ 40% A; 10 ~ 20 min, 40% ~ 46% A; 20 ~ 30 min, 46% ~ 52% A; 30 ~ 50 min,

52% ~ 70% A), 检测波长 260 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 5 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 对照品适量, 加甲醇定容至不同的 10 mL 量瓶中, 制成质量浓度分别为 1.383, 0.251, 0.258, 0.085, 0.026, 0.028 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。分别吸取上述对照品溶液适量, 于同一量瓶中混匀, 即得混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取饮片粉末(过三号筛, 下同) 0.2 g, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 45 min, 取出, 放冷, 加 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

#### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度考察** 精密称取黄芩片 S1 号样品 0.2 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 13 个特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积的 RSD

均 < 5.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性考察** 精密称取黄芩片 S1 号样品 6 份, 每份 0.2 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算 13 个特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明该方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性考察** 精密称取黄芩片 S1 号样品 0.2 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算 13 个特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5 样品测定** 取 12 批黄芩片和 11 批酒黄芩, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 见图 1, 2。结果发现不同企业的黄芩片和酒黄芩图谱中色谱峰数目基本一致, 且主要色谱峰保留时间相对稳定, 但保留时间 35 ~ 50 min 的色谱峰面积差异较为显著, 这可能归因于不同企业样品之间存在个体差异。

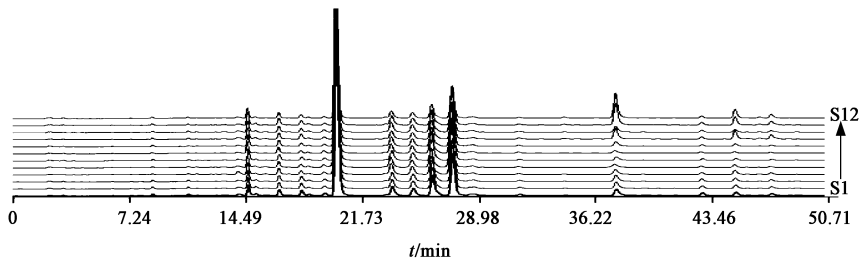


图1 不同企业黄芩片的 HPLC 特征谱

Fig. 1 HPLC specific chromatograms of Scutellariae Radix decoction pieces from different companies

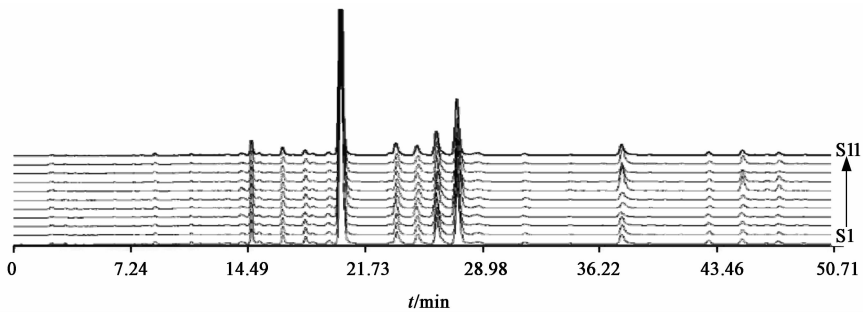


图2 不同企业酒黄芩的 HPLC 特征谱

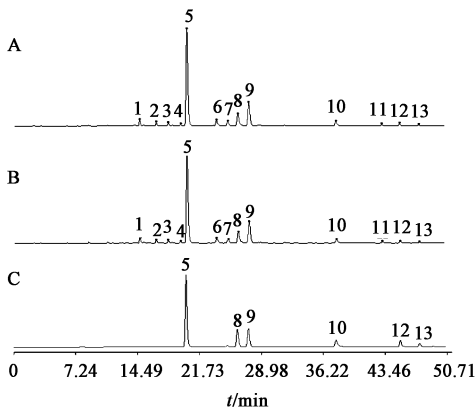
Fig. 2 HPLC specific chromatograms of Scutellariae Radix fried with wine from different companies

**2.6 HPLC 特征图谱的建立及色谱峰归属** 根据样品测定的结果, 黄芩片和酒黄芩均标示出了 13 个特征峰, 通过与对照品比对, 黄芩片和酒黄芩特征图谱中均归属了 6 个特征峰, 分别为黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A, 见图 3。建立的 HPLC 特征图谱

可作为黄芩类饮片的鉴别依据, 但由于黄芩酒制前后的 HPLC 特征图谱差异不显著, 无法用于黄芩片和酒黄芩的鉴别, 故继续采用 HSGC 对二者进行分析。

**2.7 黄芩片和酒黄芩 HSGC 特征图谱的建立**

**2.7.1 检测条件** Phenomenex ZB-WAX 毛细管



A. 黄芩片; B. 酒黄芩; C. 混合对照品; 5. 黄芩苷; 8. 千层纸素 A-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷; 9. 汉黄芩苷; 10. 黄芩素; 12. 汉黄芩素; 13. 千层纸素 A

图3 黄芩片及酒黄芩的 HPLC 特征谱归属

Fig. 3 HPLC specific chromatograms of *Scutellariae Radix* decoction pieces and *Scutellariae Radix* fried with wine

色谱柱(0.25 mm  $\times$  30 m, 0.25  $\mu$ m), 载气为高纯度氮气, 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 直接进样(不分流), 进样口温度 200  $^{\circ}$ C, 检测器温度 250  $^{\circ}$ C; 起始柱温 40  $^{\circ}$ C, 以 5  $^{\circ}$ C  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 的速率升至 160  $^{\circ}$ C, 保持 5 min, 再以 5  $^{\circ}$ C  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 的速率升至 180  $^{\circ}$ C, 保持 2 min。样品瓶加热温度 90  $^{\circ}$ C, 样品瓶保温平衡 20 min, 进样量 1 mL。

**2.7.2 样品测定** 分别精密称取 12 批黄芩片和 11 批酒黄芩粉末 1.0 g, 置于不同的 10 mL 顶空瓶中, 用橡胶塞密封后放入顶空进样器中, 按 2.7.1 项下色谱条件测定, 见图 4, 5。

**2.7.3 特征图谱的比较** 通过对不同企业黄芩片和酒黄芩的 HSGC 图谱分析, 黄芩片共检出 3 个特征峰, 酒黄芩共检出 5 个特征峰, 包括与黄芩片相同的 3 个共有峰及酒制后新生成的 2 个特征峰。其中 1 号色谱峰的相对峰面积较高, 通过与对照品比对,

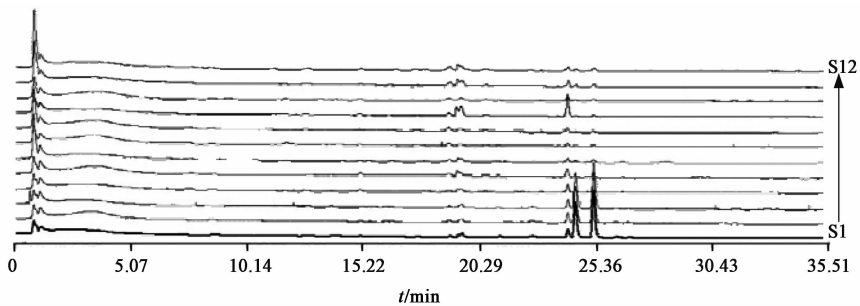


图4 不同企业黄芩片的 HSGC 特征谱

Fig. 4 HSGC specific chromatograms of *Scutellariae Radix* decoction pieces from different companies

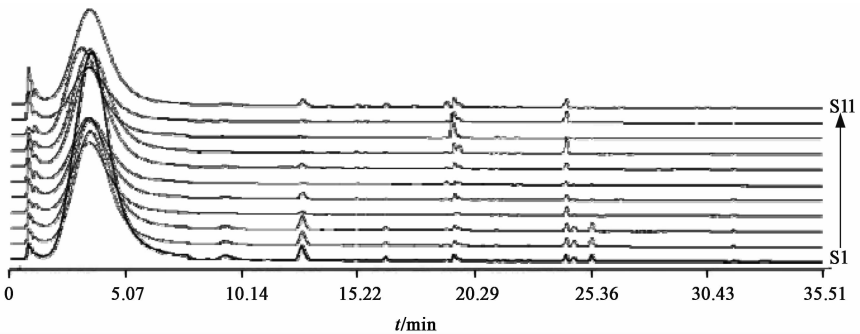


图5 不同企业酒黄芩的 HSGC 特征谱

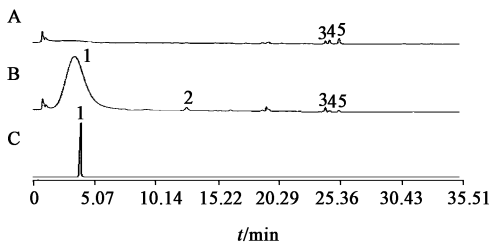
Fig. 5 HSGC specific chromatograms of *Scutellariae Radix* fried with wine from different companies

鉴定其为乙醇。黄芩片酒制后, 除峰 3 的变化幅度较小外, 4~5 号色谱峰的峰面积显著降低, 此外, 新生成的峰 1, 2 为酒黄芩的特有成分, 见图 6。

### 3 讨论

在查阅文献的基础上<sup>[8-12]</sup>, 本文考察了甲醇-0.4% 冰乙酸溶液、甲醇-0.1% 磷酸溶液、甲醇-水(含 0.1% 甲酸和 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 甲酸铵)等流动相系

统, 发现甲醇-水(含 0.1% 甲酸和 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 甲酸铵)为流动相时, 基线平稳、峰形较好, 但黄芩苷色谱峰与相邻色谱峰之间的分离效果不好, 所以继续考察了甲酸铵的浓度(10, 20, 30 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)对图谱的影响, 结果显示甲醇-0.1% 甲酸水溶液(含 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 甲酸铵)为流动相时, 各组分分离良好。



A. 黄芩片; B. 酒黄芩; C. 乙醇

图6 黄芩片和酒黄芩的HSGC特征谱比较

Fig. 6 Comparison of HSGC specific chromatograms of Scutellariae Radix decoction pieces and Scutellariae Radix fried with wine

本文采用 HPLC 同时对不同企业的黄芩片和酒黄芩进行分析,各样品均具有相同的色谱特征峰。该法分离效率高,所建立的饮片特征图谱稳定性好,能够全面反映黄芩片和酒黄芩的化学轮廓,可作为区别于其他类中药饮片的依据。但通过对比黄芩片和酒黄芩的 HPLC 特征图谱,发现 HPLC 无法体现酒制工艺对黄芩饮片中化学成分的影响,不能有效地鉴别出黄芩片和酒黄芩之间的个性特点,故同时结合 HSGC 对二者中的挥发性成分进行分析,结果发现黄芩酒制前后饮片 HSGC 中色谱峰数量虽少,但存在显著差异,其中酒黄芩饮片中的特有成分乙醇是由酒制工艺所产生,是二者专属性识别的关键指标,所以为确保实验结果的准确可靠,酒黄芩的炮制过程应严格按照 2015 年版《中国药典》的炮制方法进行,并根据酒黄芩的物理化学性质,选择气密性较好的塑料瓶或真空包装袋按量分装,于通风干燥处储存,防止包装和储存条件对实验产生影响。本研究揭示 HSGC 特征图谱的建立能够有效弥补 HPLC 对黄芩饮片酒制前后特征性表征的不足,但由于中药为多成分的复杂体系,单以挥发性成分为指标,不足以保证其质量,所以须采用 HPLC 与 HSGC 相结合的分析技术对黄芩片和酒黄芩进行特征属性识别。

黄芩片具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效,而酒黄芩用于去除上焦热邪,所以中医临床用药应合理区分黄芩片和酒黄芩。但黄芩酒制前后饮片的外表形态、颜色近似,不易区分,容易导致生品、炮制品混用或非规范炮制品的应用,故本研究提出

采用 HPLC 与 HSGC 相结合的分析技术,提高了黄芩片、酒黄芩的专属性鉴别效果,以确保中医临床用药的安全性和有效性。此外,2 种技术还可同时应用于整个酒制类中药饮片的真伪鉴别和品质评价,为全面提高中药饮片临床用药的安全性和可靠性提供参考。

[参考文献]

[1] 郑勇风,王佳婧,傅超美,等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药,2016,38(1):141-147.  
[2] 王雅芳,李婷,唐正海,等. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J]. 中华中医药学刊,2015,33(1):206-211.  
[3] 赵建军,高晓娟,王英华,等. 栽培黄芩与其对照药材的 HPLC 指纹图谱及近红外图谱比较研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(22):4204-4209.  
[4] 蔡艳芳,刘肖林. 中药黄芩中有效成分的含量测定及其相应指纹图谱的初步分析[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(28):90-91.  
[5] 王丹,张秋燕,杨兴鑫,等. 基于 HPLC 指纹图谱的黄芩道地药材与非道地药材的鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(12):1951-1960.  
[6] 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.  
[7] 陈影,刘慧,李普玲,等. 黄芩不同炮制饮片的红外光谱特征分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(22):77-81.  
[8] 赵恒强,王晓,周洁,等. 山东产区黄芩 HPLC 定量指纹图谱研究[J]. 中国现代中药,2014,16(7):528-533,541.  
[9] 宋双红,王喆之,张媛,等. 黄芩药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(6):413-417.  
[10] 唐德智. HPLC 法测定复方黄芩片中 6 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(10):1870-1874.  
[11] 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.  
[12] 刘金欣,孟繁蕴,张胜海,等. UPLC 同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A [J]. 中草药,2014,45(10):1477-1480.

[责任编辑 刘德文]