

· 中药工业 ·

# 响应面法优化黄芩茎叶对照提取物纯化工艺 及其特征图谱研究<sup>△</sup>

张雅蓉, 徐霖, 李纳, 刘吉爽, 徐文慧, 陈新\*

长春中医药大学 药学院, 吉林 长春 130117

**[摘要]** 目的: 采用响应面法(Box-Behnken)优化黄芩茎叶对照提取物的纯化工艺, 并建立其特征图谱。方法: 以黄芩茎叶总黄酮含量为评价指标, 单因素试验结合响应面法分析, 建立数学模型, 优选对照提取物纯化工艺参数, 并对制备的黄芩茎叶对照提取物采用高效液相色谱法进行特征图谱研究。结果: 采用 Design-Expert 10.0.3 软件得到黄芩茎叶总黄酮得率与各因素变量的二次多元回归方程为:  $Y = 65.58 + 1.68A + 0.84B + 1.55C + 0.44D - 0.16AB - 1.12AC - 0.58AD + 0.62BC - 0.067BD + 0.30CD + 0.52A^2 - 1.46B^2 - 1.25C^2 - 1.47D^2$  ( $P < 0.05$ ), 确定纯化工艺为乙醇浓度为80%, 上样流速为  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗脱体积为5 BV, 洗脱流速为  $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。确定11批黄芩茎叶对照提取物高效液相特征图谱有7个共有峰, 样品与对照特征图谱的相似度在0.957~0.989。结论: 本实验优选的对照提取物纯化工艺稳定、可控, 所建立的高效液相特征图谱可为黄芩茎叶对照提取物的研究及应用提供参考。

**[关键词]** 黄芩茎叶; 对照提取物; 响应面法; 特征图谱; 总黄酮

**[中图分类号]** R284.2; R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)05-0654-08

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190322001

## Response Surface Methodology for Optimizing Purification Technology and Characteristic Map of Control Extracts from Stems and Leaves of *Scutellaria baicalensis*

ZHANG Ya-rong, XU Ben, LI Na, LIU Ji-shuang, XU Wen-hui, CHEN Xin\*

Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the purification process of the control extract from the stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* by response surface methodology(Box-Behnken)and establish its characteristic map. **Methods:** The content of total flavonoids in the stems and leaves of *S. baicalensis* was taken as the evaluation index, the single factor experiment combined with response surface methodology was used to establish a mathematical model and optimize the purification process parameters of the crude extract, and the characteristic chromatogram of the extract was studied by HPLC. **Results:** The quadratic multiple regression equation of total flavonoids yield from stems and leaves of *S. baicalensis* with design-Expert 10.0.3 software was  $Y = 65.58 + 1.68A + 0.84B + 1.55C + 0.44D - 0.16AB - 1.12AC - 0.58AD + 0.62BC - 0.067BD + 0.30CD + 0.52A^2 - 1.46B^2 - 1.25C^2 - 1.47D^2$  ( $P < 0.05$ ). The purification condition was determined to be 80% ethanol concentration. Sample flow rate was  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The elution volume was 5 BV. The elution flow rate was  $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The characteristic chromatograms of 11 batches of control extracts from stems and leaves of *S. baicalensis* showed that there were 7 common peaks, ranging from 0.957-0.989. **Conclusion:** The purification process of the optimized control extract is stable and controllable. The established characteristic chromatogram of HPLC can provide theoretical reference for the research and application of the control extract from the stems and leaves of *S. baicalensis*.

**[Keywords]** *Scutellaria baicalensis* stem and leaf; controlled extract; response surface methodology; characteristic map; total flavonoids

<sup>△</sup> [基金项目] 吉林省科技攻关计划(20150201007YY)

\* [通信作者] 陈新, 教授, 研究方向: 中药有效成分应用与开发研究, E-mail: 1253068357@qq.com

黄芩茎叶为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥茎叶, 具有清热燥湿、泻火解毒的功效<sup>[1]</sup>。主要含野黄芩苷、芹菜素苷等黄酮类化合物<sup>[2]</sup>, 有效部位为黄芩茎叶总黄酮, 现已有“倒挂品种<sup>[3]</sup>”黄芩茎叶解毒胶囊上市销售, 用于治疗上呼吸道感染疾病。

以中药对照提取物为代表的质量控制方法已成为一种新的研究思路和模式, 近几年, 多种药材的对照提取物<sup>[4-7]</sup>研究均取得了初步成效, 不仅可用于药材的薄层定性鉴别, 也可以标示多个单体成分的含量<sup>[8]</sup>。本实验通过研究黄芩茎叶总黄酮纯化工艺以及特征图谱, 为制备黄芩茎叶对照提取物提供参考, 将有助于改善检验工作时使用化学对照品(中药标准物质)检验信息单一、价格高昂, 制备对照药材溶液过程繁琐的状况, 有利于质检工作高效进行。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); WondaSil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本岛津公司); AB265-S 十万分之一分析天平(瑞士梅特勒托利多公司); GXZ-9240MBE 数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司设备厂); UV-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

### 1.2 试剂

野黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院, 纯度: 91.7%, 批号: 110842-201709); 野黄芩素对照品(上海源叶生物科技有限公司, 纯度 > 98%, 批号: YY91209-20); 甲醇[上海西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 色谱纯]; 甲酸(天津市光复精细化工研究所, 色谱纯); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 大孔吸附树脂 D101(东鸿化工有限公司); AB-8(天津市光复精细化工研究所); DM130(北京索来宝化工有限公司); ADS-7(天津鸿博美化工科技有限公司); XDA-1(西安蓝晓科技新材料有限公司); 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 试药

本次共收集样品 11 批, 经长春中医药大学张景龙教授鉴定, 均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi。样品经自然风干后, 切段, 50 °C 干燥, 粉碎, 过二号筛, 备用。样品详情见表 1。

表 1 样品信息

药材编号	采集时间	类别	产地
HQJY1	2017-8-23	自采, 种植	吉林省白城市平台镇
HQJY2	2017-8-23	自采, 种植	吉林省吉林市蛟河县
HQJY3	2017-8-30	自采, 种植	吉林省长春市净月区
HQJY4	2017-8-20	自采, 种植	吉林省白城市平台镇
HQJY5	2017-7-26	自采, 野生	吉林省白城市平台镇
HQJY6	2017-7-16	自采, 野生	吉林省磐石市烟筒山镇
HQJY7	2017-8-20	自采, 野生	吉林省白城市平台镇
HQJY8	2017-8-20	自采, 野生	吉林省白城市平台镇
HQJY9	2017-8-23	自采, 野生	吉林省白城市平台镇
HQJY10	2017-8-23	自采, 野生	吉林省白城市平台镇
HQJY11	2016-6-15	购买, 种植	山西省侯马市

注: HQJY 为黄芩茎叶拼音首字母缩写。

## 2 方法与结果

### 2.1 粗提物制备

取干燥黄芩茎叶适量, 加入 8 倍量的 70% 乙醇溶液, 回流 2 次, 各 1 h, 过滤, 回收乙醇, 干燥(60 °C), 即得。

### 2.2 对照提取物纯化

精密称取粗提物适量, 加水配制成质量浓度为 30.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 加浓盐酸调节 pH 为 2~3, 放置 12 h<sup>[9]</sup>, 离心, 沉淀备用, 上清液作为上样液, 大孔吸附树脂吸附 2 h, 6 BV 水洗至中性, 再用不同浓度乙醇以相应流速洗脱, 收集洗脱液。上述沉淀用水洗至中性, 再用乙醇溶解, 与洗脱乙醇液混合, 回收乙醇, 干燥, 即为对照提取物。

### 2.3 总黄酮的含量测定方法

2.3.1 标准曲线绘制 取野黄芩苷对照品 10.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容, 摇匀, 即为对照品溶液。精密吸取上述溶液 0.4、0.8、1.2、1.8、2.4 mL 至 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 以甲醇作空白, 在波长为 285 nm 处测定野黄芩苷的吸光度(A)值。以野黄芩苷浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为  $Y = 15.082X + 0.0443$  ( $r = 0.9982$ ), 野黄芩苷在 0.0073~0.0440 mg·mL<sup>-1</sup> 线性良好。

2.3.2 供试品溶液制备 取黄芩茎叶对照提取物干燥粉末 20 mg, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 加

甲醇超声处理 20 min 后, 定容至刻度, 摇匀, 再取 1.0 mL 至 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过滤, 即得。

2.3.3 精密度试验 取 2.3.1 项下野黄芩苷对照品溶液, 连续测定 6 次吸光度(A)值, RSD 为 0.26%, 表明本方法所用仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 按照 2.3.2 项下方法得样品溶液, 测定 10、20、30、40、50、60 min 时吸光度(A)值, RSD 为 0.42%, 表明溶液稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批黄芩茎叶对照提取物干燥粉末 6 份, 各 20 mg, 按 2.3.2 项下方法得样品溶液, 测定各样品吸光度值(A), RSD 为 0.77%, 说明该方法重复性良好。

2.3.6 准确度试验 精密称定黄芩茎叶对照提取物(总黄酮质量分数 56.49%) 6 份, 各 10 mg, 分别置于 100 mL 量瓶中, 加入一定量野黄芩苷对照品, 再照 2.3.2 方法制备样品溶液, 测定吸光度(A)值, 计算回收率, 结果见表 2, 总黄酮平均回收率为 97.66%, RSD 为 0.82%, 准确度符合要求。

## 2.4 大孔吸附树脂型号筛选

取预处理好的 D101(非极性)、AB-8(弱极性)、DM130(中极性)、ADS-7(强极性)及 XDA-1(极性)大孔树脂各 25 mL, 分别装于 5 根树脂柱(20 cm × 1.5 cm)中, 加入上样液 8.0 mL, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 用 6 BV 水洗除去提取物中的水溶性多糖、无机盐离子等杂质, 再用 4 BV 的 95% 乙醇洗脱, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 合并洗脱液。按照 2.2 项下方法测定总黄酮含量, 计算吸附率和解吸率。计算结果见图 1。AB-8 型大孔吸附树脂的吸附效果和解吸效果明显优于其他型号, 且更为经济, 因此, 选择 AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩茎叶对照提取物进行纯化。公式如下。

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{(C_0V_0 - C_1V_1)}{C_0V_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{解吸率}(\%) = \frac{C_2V_2}{(C_0V_0 - C_1V_1)} \times 100 \quad (2)$$

$C_0$ : 上样液总黄酮的浓度,  $V_0$ : 上样液体积;

$C_1$ : 水洗液总黄酮的浓度,  $V_1$ : 水洗液体积;

$C_2$ : 洗脱液总黄酮的浓度,  $V_2$ : 洗脱液体积。

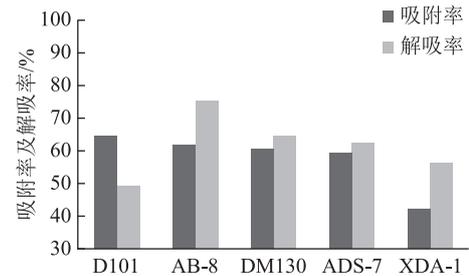


图 1 吸附率和解吸率实验结果( $n=2$ )

## 2.5 泄漏曲线

取黄芩茎叶上样液 150.0 mL, 上样至装有 AB-8 大孔吸附树脂 25 mL 的树脂柱(20 cm × 1.5 cm)中, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 流出液每 10 mL 收集一份, 收集 15 份停止, 测定黄芩茎叶总黄酮含量, 以收集次数为横坐标, 总黄酮含量为纵坐标, 绘制泄漏曲线, 见图 2。当收集到第 5 份, 即约为 2 倍柱体积时, 总黄酮开始大量泄漏, 故确定泄漏点为 50 mL, 即每 1 mL AB-8 型大孔树脂的上样量最多不能超过 2 mL。

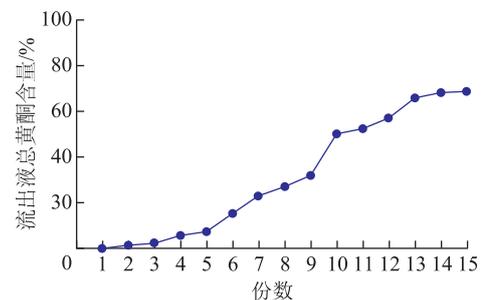


图 2 泄漏曲线(AB-8 型)

表 2 准确度试验结果( $n=6$ )

编号	取样量/mg	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	10.01	5.655	5.612	11.179	98.44	97.66	0.82
2	10.04	5.672	5.557	11.083	97.38		
3	10.02	5.660	5.594	11.116	97.53		
4	10.07	5.689	5.631	11.132	96.67		
5	9.98	5.638	5.566	11.137	98.80		
6	10.03	5.666	5.629	11.135	97.16		

## 2.6 单因素考察

2.6.1 上样流速 取黄芩茎叶上样液 50.0 mL 至装有 AB-8 大孔吸附树脂 25 mL 的树脂柱(20 cm × 1.5 cm)中,以流速 0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL·min<sup>-1</sup> 分别上样,上样完成后吸附 2 h,6 BV 水除杂,流速为 2 mL·min<sup>-1</sup>,95% 乙醇洗脱,流速为 4 mL·min<sup>-1</sup>,6 BV 体积洗脱。收集洗脱液,测定总黄酮含量,结果见图 3。总黄酮含量最高时,流速为 1.5 mL·min<sup>-1</sup>,因此,上样流速应当控制在 1.5 mL·min<sup>-1</sup>。

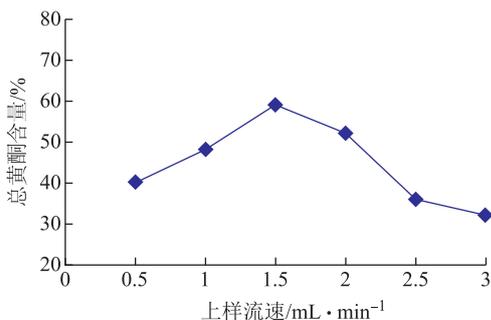


图3 上样流速选择

2.6.2 洗脱溶剂 取黄芩茎叶上样液 50.0 mL 至装有 AB-8 大孔吸附树脂 25 mL 的树脂柱(20 cm × 1.5 cm)中,以流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup> 上样,上样完成后吸附 2 h,6 BV 水除杂,流速为 2 mL·min<sup>-1</sup>,继续分别以 30%、50%、60%、70%、80%、95% 乙醇洗脱,流速为 4 mL·min<sup>-1</sup>,洗脱 6 BV 体积。收集洗脱液,测定总黄酮含量,结果见图 4。总黄酮含量较高的是 60% ~ 95% 乙醇洗脱液,综合考虑以 70% 乙醇进行洗脱纯化。

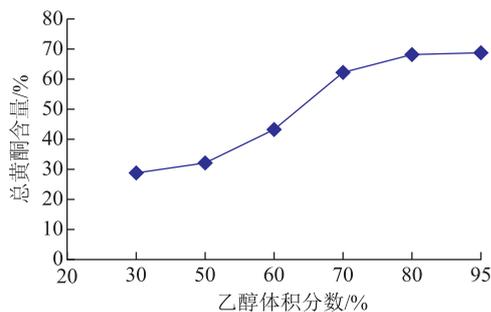


图4 洗脱溶剂选择

2.6.3 洗脱体积 取黄芩茎叶上样液 50.0 mL 至装有 AB-8 大孔吸附树脂 25 mL 的树脂柱(20 cm × 1.5 cm)中,以流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup> 上样,上样完成后吸附 2 h,6 BV 水除杂,流速为 2 mL·min<sup>-1</sup>,然后用 70% 乙醇洗脱,流速为 3 mL·min<sup>-1</sup>,洗脱体积分别为 2、3、4、5、6、7 BV。收集洗脱液,测定总黄酮含量,结果如

图 5,总黄酮含量随着洗脱体积的增大而不断变化,当洗脱流速超过 5 BV 后,再增大洗脱体积,总黄酮含量增幅不大,由此,洗脱体积控制在 5 BV 最佳。

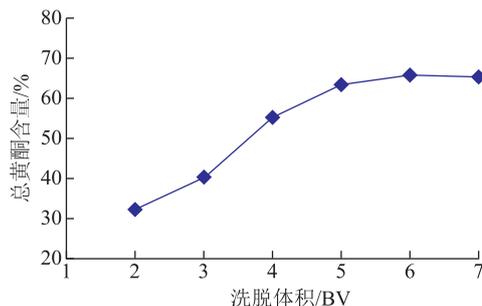


图5 洗脱体积选择

2.6.4 洗脱流速 取黄芩茎叶上样液 50.0 mL 至装有 AB-8 大孔吸附树脂 25 mL 的树脂柱(20 cm × 1.5 cm)中,以流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup> 上样,上样完成后吸附 2 h,用 6 BV 水除杂,流速为 2 mL·min<sup>-1</sup>,继续用 70% 乙醇洗脱,流速为 1、2、3、4、5、6 mL·min<sup>-1</sup>,5 BV 体积洗脱。收集洗脱液,测定总黄酮的含量,结果如图 6。总黄酮含量随着洗脱流速的增大在不断变化,当洗脱流速为 4 mL·min<sup>-1</sup> 时,总黄酮含量最高,由此,洗脱流速控制在 4 mL·min<sup>-1</sup> 最佳。

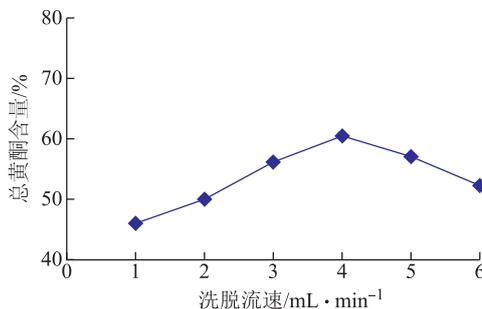


图6 洗脱流速选择

## 2.7 响应面法优化黄芩茎叶总黄酮纯化工艺

2.7.1 试验设计方法 在单因素试验基础上,依据 Box-Behnken(中心组合)试验设计原理,以 A(乙醇浓度)、B(上样流速)、C(洗脱体积)、D(洗脱流速)为自变量,Y(总黄酮含量)为评价指标进行设计,见表 3~4。

表3 响应面试验因素水平表

水平	因素			
	A 乙醇浓度/ %	B 上样流速/ mL·min <sup>-1</sup>	C 洗脱体积/ BV	D 洗脱流速/ mL·min <sup>-1</sup>
-1	60	1.0	4	3
0	70	1.5	5	4
+1	80	2.0	6	5

表4 响应面分析方案及结果

编号	A	B	C	D	Y
1	-1	-1	0	0	62.52
2	1	-1	0	0	65.15
3	-1	1	0	0	64.11
4	1	1	0	0	66.11
5	0	0	-1	-1	60.64
6	0	0	1	-1	63.44
7	0	0	-1	1	61.33
8	0	0	1	1	65.34
9	-1	0	0	-1	61.97
10	1	0	0	-1	67.17
11	-1	0	0	1	63.77
12	1	0	0	1	66.64
13	0	-1	-1	0	61.06
14	0	1	-1	0	62.12
15	0	-1	1	0	62.89
16	0	1	1	0	66.44
17	-1	0	-1	0	60.35
18	1	0	-1	0	66.35
19	-1	0	1	0	65.44
20	1	0	1	0	66.94
21	0	-1	0	-1	61.40
22	0	1	0	-1	63.02
23	0	-1	0	1	62.27
24	0	1	0	1	63.62
25	0	0	0	0	65.59
26	0	0	0	0	65.50
27	0	0	0	0	64.84
28	0	0	0	0	65.44
29	0	0	0	0	66.54

2.7.2 模型建立与显著性分析 采用 Design-Expert 10.0.3 软件对数据进行二次多元回归拟合, 建立二次多元回归方程  $Y = 65.58 + 1.68A + 0.84B + 1.55C + 0.44D - 0.16AB - 1.12AC - 0.58AD + 0.62BC - 0.067BD + 0.30CD + 0.52A^2 - 1.46B^2 - 1.25C^2 - 1.47D^2$ , 数据模型方差分析结果见表5。

该方法总模型方程差异有统计学意义 ( $0.01 < P < 0.05$ ), 相关系数  $r = 0.9594$ , 拟合程度良好, 方法可靠, 可对黄芩茎叶总黄酮的纯化进行预测和分析; 校正决定系数  $R_{Adj}^2 = 0.9188$ , 说明建立的数学模型能预测 91.88% 响应值的变化。失拟项  $P = 0.5766 > 0.05$ , 差异无统计学意义, 表明模型与实验的误差二者的差异程度较小。

由  $F$  值可知, 4 个因素对总黄酮含量显著性影

响的顺序为  $A > C > B > D$ 。由  $P$  值可知, 模型一次项 A、B、C, 交互项 AC, 二次项  $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  为极显著项 ( $P < 0.01$ ), 模型一次项 D, 二次项  $A^2$  为显著项 ( $0.01 < P < 0.05$ ), 其余为不显著项 ( $P > 0.05$ )。

根据上述回归方程, 绘制各因素交互作用的三维响应曲面图及等高线图, 见图 7~8。响应曲面较陡和椭圆形等高线说明两试验因素交互作用显著, 响应曲面较平和圆形等高线说明交互作用不显著<sup>[10]</sup>。因此, 黄芩茎叶总黄酮含量受 A (乙醇浓度)、B (上样流速)、C (洗脱体积)、D (洗脱流速) 四者的共同影响。首先, 本实验采用 AB-8 型 (弱极性) 大孔树脂, 黄芩茎叶所含黄酮成分为弱极性分子, 故高浓度乙醇有利于该类成分洗脱, 但当乙醇浓度超过 80% 时, 洗脱液中醇溶性杂质逐渐增多, 导致总黄酮含量下降。其次, 上样流速慢, 不仅延长操作时间, 还会使树脂与黄酮类化合物产生死吸附, 增加洗脱难度, 降低收率。再次, 洗脱体积过小, 导致洗脱成分未完全流出树脂柱, 降低收率; 洗脱体积过大, 总黄酮含量变化增幅不明显, 溶剂消耗增加。最后, 洗脱流速过大, 导致洗脱成分未与大孔树脂上的黄酮分子吸附就已随洗脱剂流出, 并且体积流量过小会延长洗脱工作时间, 降低洗脱效率。

表5 方差分析结果

系数来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	118.340	14	8.450	23.62	<0.0001
A	34.000	1	34.000	95.03	<0.0001
B	8.550	1	8.550	23.90	0.0002
C	28.950	1	28.950	80.92	<0.0001
D	2.370	1	2.370	6.62	0.0221
AB	0.099	1	0.099	0.28	0.6067
AC	5.060	1	5.060	14.15	0.0021
AD	1.360	1	1.360	3.79	0.0718
BC	1.550	1	1.550	4.33	0.0562
BD	0.018	1	0.018	0.051	0.8247
CD	0.370	1	0.370	1.02	0.3290
$A^2$	1.760	1	1.760	4.91	0.0438
$B^2$	13.750	1	13.750	38.43	<0.0001
$C^2$	10.170	1	10.170	28.43	0.0001
$D^2$	13.990	1	13.990	39.09	<0.0001
残差	5.010	14	0.360	—	—
失拟	3.510	10	0.350	0.94	0.5766
净误差	1.500	4	0.370	—	—
总离差	123.350	28	—	—	—

注:  $P < 0.01$  表明差异有统计意义; “—” 为差异无统计学意义。

2.7.3 验证性实验 根据 Box-Behnken 响应面实验优化结果, 得到最佳方案为乙醇浓度 76.527%, 上样流速 1.703 mL·min<sup>-1</sup>, 洗脱体积 5.441 BV, 洗脱流速 4.129 mL·min<sup>-1</sup>。结合实际情况, 确定纯化条件为乙醇浓度 80%, 上样流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 洗脱体积 5 BV, 洗脱流速 4 mL·min<sup>-1</sup>。采用优化后的方法

对黄芩茎叶进行纯化制得对照提取物, 测得 3 批对照提取物总黄酮质量分数分别为 66.93%、66.86%、66.71%, 平均值为 66.83%, 理论值为 67.19%, RSD 为 0.38%, 表明预测值与真实值接近, 说明该实验设计和数学模型合理可靠, 可用于纯化黄芩茎叶对照提取物。

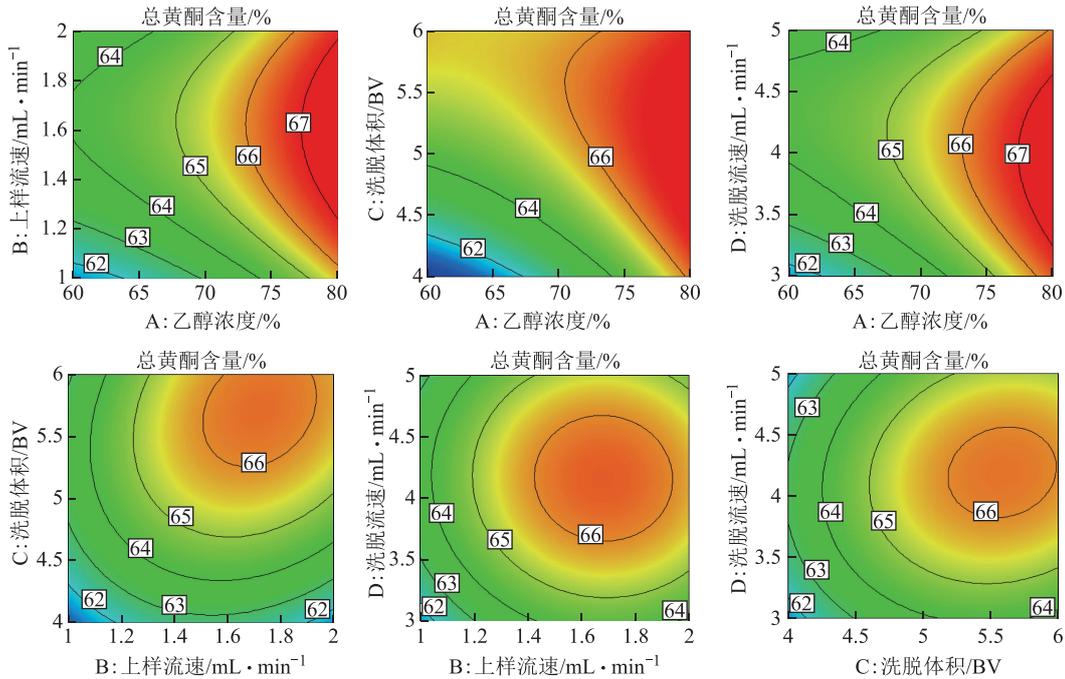


图7 各因素两两交互等高线图

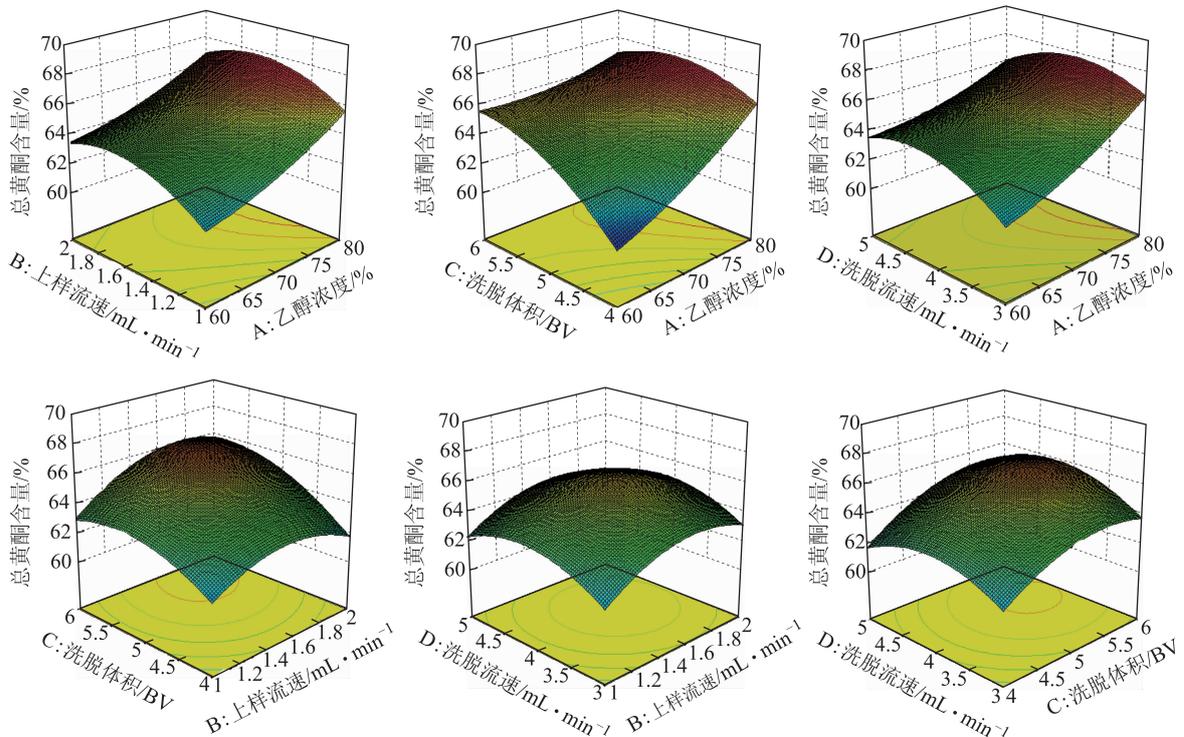


图8 各因素两两交互响应曲面图

## 2.8 对照提取物特征图谱的建立

2.8.1 色谱条件 色谱柱: 岛津 WondaSil C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇(A)-0.02% 甲酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 40 min, 34% ~ 64.67% A); 检测波长: 335 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 10 μL。

2.8.2 参照物溶液制备 取野黄芩苷、野黄芩素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含野黄芩苷 0.10 mg 的溶液, 每 1 mL 含野黄芩素 0.05 mg 的溶液, 即得。

2.8.3 供试品溶液制备 取黄芩茎叶对照提取物 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声处理 30 min, 用甲醇定容至刻线, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.8.4 共有峰模式和参照峰的确定 取 11 批黄芩茎叶药材, 按照响应面法优化的对照提取物纯化工艺制得样品(S1 ~ S11), 并照 2.8.1 项下方法, 依次进行高效液相分析, 参照物色谱图见图 9。在所有样品图谱中 2 号峰(野黄芩苷)分离度良好、峰面积较大且稳定, 所以确定 2 号峰为参照峰(S), 计算其他特征峰的相对保留时间和相对保留峰面积的 RSD 值, 各共有峰的相对保留时间 RSD 值为 0.12% ~ 0.40%; 相对峰面积 RSD 值为 8.03% ~ 36.05%, 具有显著差异。

2.8.5 重复性试验 取同一批样品(S1), 制备 6 份样品溶液, 按照 2.8.1 项下方法进样, 以野黄芩苷为参照峰, 计算相对保留时间和相对峰面积, RSD 值分别为 0.97%、1.54%, 说明该方法重复性良好。

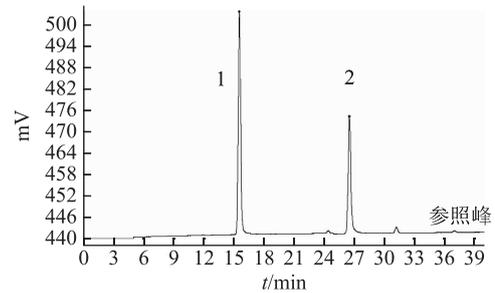
2.8.6 精密度试验 取同一份样品(S1)溶液, 按照 2.8.1 项下方法, 连续进样 6 次, 以野黄芩苷为参照峰, 计算相对保留时间及相对峰面积, RSD 值分别为 0.39%、0.74%, 表明该仪器精密度良好。

2.8.7 稳定性试验 取同一份样品(S1)溶液, 按照 2.8.1 项下方法, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以野黄芩苷为参照峰, 计算相对保留时间及相对峰面积, RSD 值分别为 0.86%、1.04%, 说明样品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.9 相似度软件数据处理与评价

使用 2012 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件对 11 批黄芩茎叶提取物样品色谱图的 AIA 文件格式进行处理, 设定“中位数”法, 时间窗宽度为 0.10, 多点校正, 并进行自动匹配, 结果显示, 黄芩茎叶对照提取物共有 7 个共有峰, 特征图谱叠加

见图 10, 对照特征图谱(R)见图 11。以对照特征图谱(R)为对照, 计算 11 批黄芩茎叶对照提取物样品相似度(0.957 ~ 0.989), 见表 6。



注: 1. 为野黄芩苷; 2. 为野黄芩素

图 9 参照物色谱图

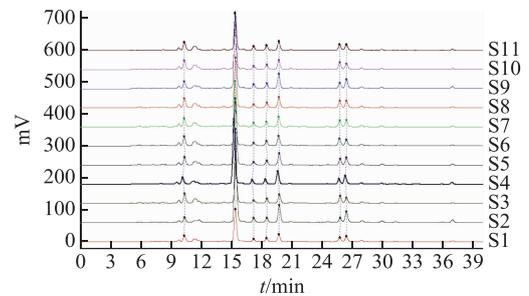
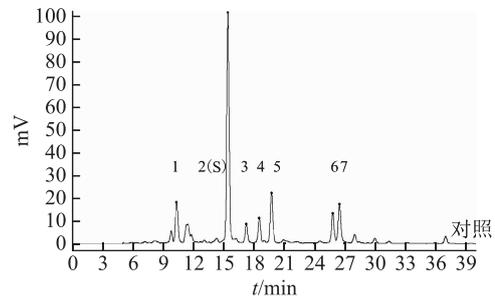


图 10 HQJY 对照提取物样品的特征图谱



注: 2. 野黄芩苷; 7. 野黄芩素。

图 11 黄芩茎叶对照提取物的对照特征图谱

表 6 相似度评价分析结果

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.988	S7	0.973
S2	0.982	S8	0.989
S3	0.966	S9	0.982
S4	0.974	S10	0.980
S5	0.979	S11	0.985
S6	0.957	R	1.000

## 3 讨论

黄芩茎叶的主要成分为野黄芩苷、芹菜素苷等黄酮类化合物, 具有酚羟基, 在经酸化处理后, 易

形成沉淀析出<sup>[11]</sup>,但因析出不完全,故采用大孔吸附树脂法富集上清液中的黄酮类化合物,提高收率。另外,大孔吸附树脂有吸附快、稳定性好、洗脱率高和再生简便的特点,已广泛用于总黄酮的纯化工工艺研究<sup>[12-15]</sup>,Box-Behnken 响应面法可考察各因素之间的交互作用,高效地减少实验次数。

本实验首次以黄芩茎叶总黄酮为指标,采用紫外分光光度法(UV),先对黄芩茎叶醇提物进行酸化处理,再选用5种不同极性的大孔吸附树脂,以单因素法考察树脂型号、树脂用量、上样液浓度、洗脱剂浓度、洗脱剂用量等因素,并采用Box-Behnken 响应面法对黄芩茎叶对照提取物的纯化工工艺进行优化。利用高效液相色谱建立了黄芩茎叶对照提取物特征图谱的测定方法,11批样品相似度均大于0.950,说明此次提取制得的黄芩茎叶提取物的质量稳定、可控。

本实验通过对黄芩茎叶对照提取物工艺优化及特征图谱的研究,为对照提取物的质量控制提供了实验依据,高度体现了中药质量控制的整体性、特征性和系统性<sup>[16]</sup>,为黄芩茎叶对照提取物的开发和利用提供了参考。

### 参考文献

- [1] 何春年,彭勇,肖伟,等.黄芩茶的应用历史与研究现状[J].中国现代中药,2011,13(6):3-7,19.
- [2] 张雅蓉,徐霖,李纳,等.HPLC法测定黄芩茎及叶中野黄芩苷的含量[J].药学研究,2018,37(8):449-452.
- [3] 屠鹏飞,黄璐琦,陈万生,等.《中华人民共和国药典》(2020年版)中药材和中药饮片质量标准增修订工作思路[J].中国现代中药,2018,20(12):1459-1464.
- [4] 刘绍勇,张文明,潘建超,等.对照提取物用于金银花药材的质量控制方法研究[J].中国中药杂志,2013,38(13):2147-2150.
- [5] 周德勇,张乐,姜艳艳,等.薄荷酚类对照提取物 HPLC 含量测定研究及其在薄荷药材质量控制中的应用[J].药物分析杂志,2018,38(4):582-589.
- [6] 薛翠娟,章军,荆文光,等.对照提取物法测定葛根饮片中5种成分含量[J].中国中药杂志,2012,37(16):2388-2391.
- [7] 周超,何轶,鲁静,等.黄芪异黄酮对照提取物的制备及其在黄芪药材含量测定中的应用[J].药物分析杂志,2014,34(3):523-528.
- [8] 罗莉娅,邓星,苟立平,等.五味子对照提取物的纯化工工艺研究[J].中药与临床,2018,9(4):16-19.
- [9] 朱磊,李君,董海荣,等.黄芩茎叶提取物纯化方法优选[J].中国医药导报,2014,11(32):90-93.
- [10] 王仁广,杨净尧,杨济齐,等.响应面法优化电磁裂解提取大黄蒽醌类成分[J].中南药学,2019,17(3):384-388.
- [11] 金泰利.天然药物提取分离工艺学[M].杭州:浙江大学出版社,2011:243.
- [12] 吕子明,李志宏,梁俊清,等.大孔吸附树脂纯化黄芩总黄酮工艺研究[J].中国医药导报,2012,9(10):143-145.
- [13] 杨丽,王宏伟,李洪波,等.大孔树脂法富集黄芩籽种壳总黄酮[J].医药导报,2017,36(4):420-424.
- [14] 马翠霞,赵武,肖凤琴,等.Box-Behnken 响应面法优化小飞蓬总黄酮纯化工工艺及其抗肿瘤活性研究[J].中华中医药杂志,2018,33(9):4104-4109.
- [15] 敖曼.大孔树脂纯化多舌飞蓬中灯盏花素的工艺研究[J].医学信息(中旬刊),2011,24(5):2091-2093.
- [16] 牛晓静,鲁静,孙广科,等.淫羊藿总黄酮提取物的 HPLC 指纹图谱建立及其中8种成分的含量测定[J].中国药房,2018,29(24):3376-3380.

(收稿日期:2019-03-22 编辑:王笑辉)

(上接第641页)

- [18] JARAUSCH B, JARAUSCH W. Establishment of a permanent rearing of *Cacopsylla picta* (Hemiptera: Psyllidae), the main vector of 'Candidatus Phytoplasma mali' in Germany [J]. J Pest Sci, 2014, 87(3):459-467.
- [19] GOTTWALD T R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing [J]. Annu Rev Phytopathol, 2010, 48: 119-139.
- [20] PENG L, TRUMBLE J T, MUNYANEZA J E, et al. Repellency of a kaolin particle film to potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), on tomato under laboratory and field conditions [J]. Pest Manage Sci, 2011, 67(7):815-824.
- [21] BULTER C D, BYRNE F J, KEREMANE M L, et al. Effects of insecticides on behavior of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae) and transmission of candidatus liberibacter psyllaerous [J]. J Econ Entomol, 2011, 104(2): 586-594.
- [22] YAN H, ZENG J, ZHONG G. The push-pull strategy for citrus psyllid control [J]. Pest Manage Sci, 2015, 71(7):893-896.

(收稿日期:2019-02-13 编辑:姚霞)