

不同道地产区黄芩的主要成分和抗氧化活性的比较研究

刘雨然^{1,2}, 郭梦佳²,
杨立新², 瞿燕¹, 潘晓丽^{1*}, 杨滨², 李化^{2*}

¹成都中医药大学药学院, 成都 611137; ² 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要:探究山东莱芜与河北承德两个道地产区黄芩的黄酮特征指纹图谱及其抗氧化能力的谱-效关系。在构建黄芩超高效液相色谱 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 指纹图谱的基础上, 采用体外抗氧化法测定 25 批不同道地产区黄芩对 DPPH、ABTS、O₂ 自由基的清除能力, 计算其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀); 运用正交偏最小二乘判别 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 法和双变量相关性分析构建化学成分和抗氧化活性的谱-效关系。25 批样品的指纹图谱相似度均大于 0.983, 确定了 16 个共有峰, 采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用法 (ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 确认了 12 个化合物。两个道地产区的黄芩均具有较强的清除 DPPH、ABTS 和 O₂ 自由基能力, 其中山东莱芜黄芩的抗氧化能力优于河北承德黄芩。OPLS-DA 所建的两个模型, 均可成功区分两个道地产区的黄芩, 且黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷是二者的差异性标志成分。谱效分析发现, 黄芩药材中黄酮类成分相互间可能对 DPPH、ABTS、O₂ 自由基的清除能力具有协同增效作用。本研究建立了基于化学成分和抗氧化活性的黄芩谱效评价模式, 可用于不同道地产区黄芩品质的评价, 可为中药材的道地性研究提供帮助。

关键词:黄芩; 超高效液相色谱; 抗氧化; 指纹图谱; 谱效关系; 道地

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)6-0919-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.6.001

Comparative study on main components and antioxidant activity of *Scutellaria Radix* from different genuine producing areas

LIU Yu-ran^{1,2}, GUO Meng-jia²,
YANG Li-xin², QU Yan¹, PAN Xiao-li^{1*}, YANG Bin², LI Hua^{2*}

¹School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

²Institute of Traditional Chinese Medicine, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract: This study aims to explore the flavonoid characteristic fingerprint and antioxidant capacity spectrum-effect relationship of *Scutellaria Radix* in Laiwu, Shandong Province and Chengde, Hebei Province. On the basis of constructing ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint profiles of *Scutellaria Radix*, this study employed an *in vitro* antioxidant assay to evaluate the scavenging ability of 25 batches of *Scutellaria Radix* from different authentic production areas on DPPH, ABTS and O₂ free radicals, and their half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined. Orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) method and bivariate correlation analysis were employed to establish the spectrum-efficacy relationship between the chemical composition and antioxidant activity. The fingerprint similarity of 25 batches samples exceeded 0.983, in which 16 common peaks were identified. Twelve compounds were identified by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technology. The *Scutellaria Radix* from the two areas had strong scavenging abilities of DPPH, ABTS and O₂ free radicals, and the antioxidant capacity of

收稿日期: 2023-11-20 接受日期: 2024-05-21

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2021CXGC010508); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04511); 四川省科技厅项目 (2023NSFSC0326)

* 通信作者 E-mail: lihua621@hotmail.com, panpan_1388@126.com

Scutellaria Radix from Laiwu, Shandong province was superior to that from Chengde, Hebei Province. The two OPLS-DA models can successfully distinguish Scutellaria Radix from two genuine producing areas. Baicalin, baicalein and oroxylin A-7-O- β -D-glucuronide were differential markers in them. The spectrum-efficacy analysis revealed that flavonoids in Scutellaria Radix may increase the scavenging abilities of DPPH, ABTS and O₂ free radicals based on their synergistic effects. This study established the spectrum-efficacy evaluation model combined chemical composition with antioxidant activity of Scutellaria Radix. It can be used to evaluate the quality of Scutellaria Radix from different genuine producing areas, and can provide help for the research of the geotropism of Chinese medicinal materials.

Key words: Scutellaria Radix; UPLC; antioxidant activity; fingerprints; spectrum-effect relationship; geotropism

黄芩来源于唇形科黄芩属多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 别名山茶根、土金茶根, 为常用中药, 始载于《神农本草经》^[1]。黄芩具有抗菌、抗疲劳、抗肿瘤、抗氧化、抗炎、保护肝脏等多种生理活性, 这与黄芩中黄酮类成分密切相关, 如黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等^[2]。

道地药材是指经过中医临床长期应用优选出来的, 在特定地域, 通过特定生产过程所产的, 较在其他地区所产的同种药材品质佳、疗效好, 具有较高知名度的药材^[3]。本草记载, 湖北宜州、陕西鄜州、甘肃泾县及山东兖州产的黄芩质量较好^[4]。生态的变化(如气候和土壤因子)是导致道地产区变迁和道地品质形成最主要的因素。河北承德“热河黄芩”^[5]一直被公认为质优效佳的道地黄芩, 但因承德道地产区的黄芩药材的过度采挖, 目前在全国各大中药材市场上很难能买到河北承德的道地黄芩。现阶段山东黄芩种植基地多, 产量大, 质量佳, 逐渐成为了黄芩的现代道地产区。目前, 尚未有人对不同道地产区的黄芩品质及其药效进行比较研究。因此, 本文立足于道地药材的“质优效佳”的特性, 从“化学成分-活性”多方位评价不同道地产区黄芩在品质和抗氧化活性是否存在差异, 以期为衡量不同道地产区黄芩的品质是否具有等同性提供实验支持。

单指标或多指标含量测定, 很难全面、客观地反映中药成分的整体性、复杂性。中药化学指纹图谱是对中药化学成分信息的整体表征, 是中药材质量控制的重要手段^[3]。中药指纹图谱虽然能反映中药化学成分的整体特性, 但其所反映的成分没有与药效相关联, 仍存在有局限性。抗氧化在治疗癌症、心血管疾病等多种慢性疾病及多种与衰老有关的疾病上发挥重要作用^[6]。中药谱效学是将中药指纹图谱信息及其药效进行模式识别, 明确二者的关系和贡献程度, 从而实现中药质量和功效的综合评价^[7]。目前有关黄芩谱效研究的文献报道较少。

Xu 等^[8] 和 Jia 等^[9] 建立了条芩与枯芩的指纹图谱与抗炎活性的关联研究; Pang 等^[10] 分别对黄芩根、茎、叶中化学成分的延缓衰老作用进行谱效分析; 还有学者结合黄芩指纹图谱与其抗炎、解热、抗流感病毒作用进行谱效关联, 明确其药效物质基础^[11,12]。迄今为止, 尚未见到有人采用谱效关联, 探究不同道地产区黄芩在品质上是否存在差异。为此, 本课题建立了黄芩的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱评价方法, 结合相似度评价、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)完善不同道地产区黄芩的质量评价体系; 考察了其对 DPPH、ABTS、O₂ 自由基的清除能力, 进一步采用双变量相关性分析开展谱效关联研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

Waters Acquity H-class UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ5200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Sartorius ISO9001 十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); Waters Xevo G2-XS Q-TOF/UPLC 系统(美国 Waters 公司); VARIOSKAN FLASH 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.1.2 试剂

DPPH(批号 128258, 纯度 > 98%, MedChemExpress 公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris)(批号 C15072111, 纯度 > 99.9%, 上海麦克林生化科技有限公司); ABTS(批号 C15306340, 纯度 > 98%, 上海麦克林生化科技有限公司); 甲酸和乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 其余试剂均为分析纯; 实验用水为娃哈哈纯水。

1.1.3 药材

本实验所用 25 批黄芩药材采自 2 个道地产区, 其中 12 批河北承德地区黄芩(CD1 ~ CD12)购自四川省荷花池药材市场, 实地采集 13 批山东莱芜地区

黄芩种植基地药材样品(SD1~SD13),经过中国中医科学院中药研究所李化研究员鉴定均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备

精密称取样品细粉 100 mg,置于锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 10 mL,超声提取 30 min,放置常温,用 70% 甲醇补足失重,滤过,将续滤液稀释 10 倍,摇匀,经 0.20 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液,用于 UPLC 与 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

精密称取各样品细粉 200 mg,置于锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,超声提取 30 min,放置常温,用 70% 甲醇补足失重,过滤,取续滤液稀释得 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.4、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/mL 的样品溶液,用于抗氧化分析。

1.2.2 UPLC 指纹图谱的建立

1.2.2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);流动相 A:0.1% 甲酸水,流动相 B:0.1% 甲酸乙腈;体积流量:0.3 mL/min;进样体积:1 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:280 nm;梯度洗脱:0~1.5 min, 10% \rightarrow 15% B; 1.5~3.0 min, 15% \rightarrow 20% B; 3.0~5.0 min, 20% \rightarrow 25% B; 5.0~8.0 min, 25% \rightarrow 28% B; 8.0~9.0 min, 28% \rightarrow 30% B; 9.0~10.0 min, 30% \rightarrow 32% B; 10.0~13.0 min, 32% \rightarrow 40% B; 13.0~14.5 min, 40% \rightarrow 43% B; 14.5~15.5 min, 43% \rightarrow 46% B; 15.5~20.0 min, 46% \rightarrow 60% B; 20.0~22.0 min, 60% \rightarrow 100% B; 22.0~23.5 min, 100% \rightarrow 10% B; 23.5~25.0 min, 10% B。

1.2.2.2 UPLC 指纹图谱测定

将 25 批黄芩药材粉末按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.2.1”项中的色谱条件进行色谱分析,测得每批供试品的 UPLC 色谱图。

1.2.3 UPLC-Q-TOF-MS 分析

1.2.3.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);流动相 A:0.1% 甲酸水,流动相 B:0.1% 甲酸乙腈;体积流量:0.3 mL/min;进样体积:1 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:280 nm;梯度洗脱:0~1.5 min, 10% \rightarrow 15% B; 1.5~3.0 min, 15% \rightarrow 20% B; 3.0~5.0 min, 20% \rightarrow 25% B; 5.0~8.0 min, 25% \rightarrow 28% B; 8.0~9.0 min, 28% \rightarrow 30% B; 9.0~10.0 min, 30% \rightarrow 32% B; 10.0~13.0 min, 32% \rightarrow 40% B;

13.0~14.5 min, 40% \rightarrow 43% B; 14.5~15.5 min, 43% \rightarrow 46% B; 15.5~20.0 min, 46% \rightarrow 60% B; 20.0~22.0 min, 60% \rightarrow 100% B; 22.0~23.5 min, 100% \rightarrow 10% B; 23.5~27.0 min, 10% B。

1.2.3.2 质谱条件

离子源为 ESI 源,正离子模式检测模式,质量扫描范围 m/z 50~800,离子源温度 110 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压 3 kV,脱溶剂温度 550 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气体流速 800 L/h,锥孔电压 30 kV,锥孔气流量 50 L/h。

1.2.4 体外抗氧化活性研究

1.2.4.1 DPPH 清除能力测定

参考 Tian 等^[13]和 Shi 等^[14]报道的方法,在 96 孔板中依次加入样品溶液,再加入 DPPH 测试液,在酶标仪中 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,在吸收波长 517 nm 处测定吸光度为 A_1 ;用 70% 甲醇代替样品溶液,测定其吸光度 A_0 ;用甲醇代替 DPPH 测试液,测定其吸光度 A_2 。每个待测样品测三个平行数据,取平均值。清除率按下式计算: DPPH 自由基清除率 = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。以样品浓度 (mg/mL) 为横坐标,清除率为纵坐标,进行对数曲线拟合,得到拟合公式,计算其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.2.4.2 ABTS 自由基清除能力测定

参考 Tian 等^[13]报道的方法,在 96 孔板中依次加入样品溶液,再加入 ABTS 工作液,在酶标仪中室温孵育 6 min,在波长 734 nm 处测定吸光度 A_1 ;用 70% 甲醇代替样品溶液,测定其吸光度 A_0 ;用水代替 ABTS 自由基工作液,测定其吸光度 A_2 。每个待测样品测三个平行数据,取平均值。清除率按下式计算: ABTS 自由基清除率 = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。 IC_{50} 值计算方法同“1.2.4.1”。

1.2.4.3 O_2^- 自由基清除能力测定

参考 Zhang 等^[15]和 Feng 等^[16]报道的方法,在 96 孔板中加入 Tris-HCl 缓冲液,然后依次加入样品溶液,在酶标仪中 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,再加入预热好的邻苯三酚溶液启动反应,5 min 后加入盐酸溶液终止反应。在波长 325 nm 下测定吸光值 A_1 ;以 70% 甲醇代替样品溶液测定 A_2 。每个待测样品测三个平行数据,取平均值。清除率按下式计算: O_2^- 自由基清除率 = $100\% \times (A_2 - A_1) / A_2$ 。 IC_{50} 值计算方法同“1.2.4.1”。

2 结果

2.1 UPLC 指纹图谱

2.1.1 方法学考察

稳定性实验:取 CD11 药材粉末按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按“1.2.2.1”项色谱条件进行色谱分析,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 值分别为 0.07% ~ 0.48% 和 1.3% ~ 4.1%,说明供试品溶液在 24 h 内化学性质稳定。

精密度实验:取 CD11 药材粉末按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.2.1”项色谱条件连续进样 6 次进行色谱分析,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 值分别为 0.07% ~ 0.15% 和 0.32% ~ 4.0%,表明仪器精密

度良好。

重复性实验:取 CD11 药材粉末按“1.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“1.2.2.1”项色谱条件进行色谱分析,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 值分别为 0.19% ~ 1.0% 和 0.04% ~ 4.8%,表明该方法的重复性良好。

2.1.2 指纹图谱的采集

将 25 批黄芩药材指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版),以编号为 SD1 的黄芩图谱作为参照,选取“时间窗宽度”为 0.5 min,采用平均数法计算,对样品进行多点校正和 Mark 峰匹配,得到指纹图谱匹配图(见图 1)。山东莱芜与河北承德黄芩的对照图谱见图 2。

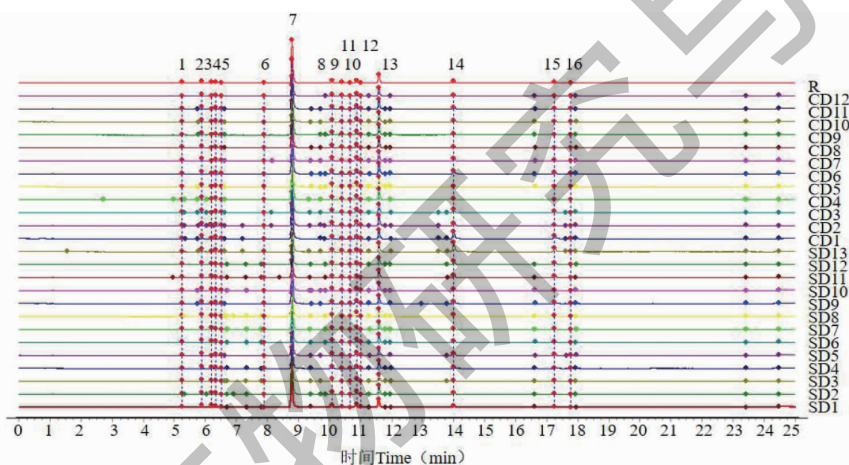


图 1 黄芩药材 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of *Scutellaria Radix*

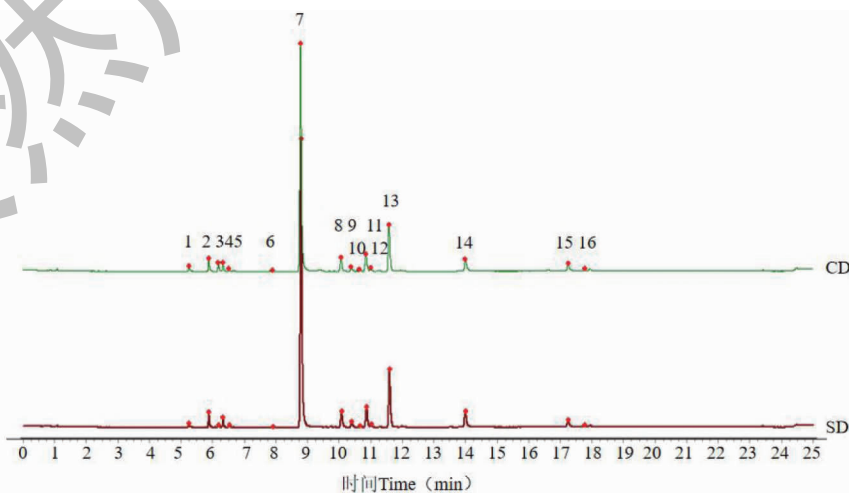


图 2 黄芩药材的对照图谱

Fig. 2 Reference spectrum of *Scutellaria Radix*

2.1.3 共有峰的标定与指认

根据相对保留时间及特征吸收波长,共标定 16 个共有峰。共有峰保留时间(峰号)分别约为 5.250 min(1)、5.883 min(2)、6.194 min(3)、6.336 min(4)、6.522 min(5)、7.907 min(6)、8.793 min(7)、10.072 min(8)、10.401 min(9)、10.666 min(10)、10.866 min(11)、11.019 min(12)、11.594 min(13)、14.003 min(14)、17.251 min(15)、17.774

min(16)。

根据质谱检测器一级和二级质谱所提供的化合物分子量信息,利用 Masslynx V4.1 软件的 Elemental Composition 分析工具计算各峰的分子式,通过比对文献报道并结合 PubChem 数据库中化学成分的精确相对分子质量,指认了其中 12 个成分,属于黄酮类和黄酮苷类成分。黄芩指纹图谱中 12 个共有峰的质谱指认结果见表 1。

表 1 黄芩指纹图谱中 12 个共有峰的质谱指认结果

Table 1 Identification of 12 common peaks in fingerprint of *Scutellaria Radix* by mass spectrometry

峰号 No.	保留时间 t_R (min)	分子式 Molecular formula	m/z [M+H] ⁺		误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子 Secondary fragment ions (m/z)	化合物 Compound	参考文献 Ref.
			实测值 Measured value	理论值 Theoretical value				
2	4.71	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	549.160 5	549.160 8	-0.4	411.107 5、363.086 5、 345.076 8、495.129 1	白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡 萄糖苷 Chrysin 6-C-arabino- side 8-C-glucoside	17
3	5.03	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.087 4	463.087 7	-0.6	287.055 5、269.044 5、 169.013 3、123.002 8	5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7- O-葡萄糖醛酸 5, 7-Dihydroxy-2'-methoxy-fla- vono-7-O-glucuronide	18
4	5.13	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	549.160 6	549.160 8	-0.4	441.107 2、381.097 3、 309.076 0、363.086 7	白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉 伯糖苷同分异构体 Chrysin 6-C-glucoside 8-C-ara- binoside isomeride	19
5	5.30	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	549.160 8	549.160 8	0.0	363.086 9、333.075 9、 381.096 7、309.078 5	白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉 伯糖苷 Chrysin 6-C-glucoside 8-C-ara- binoside	19
7	7.32	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.098 9	447.092 7	1.38	271.062 5、169.013 7、 123.008 5、253.050 2	黄芩苷 Baicalin	17
8	8.46	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.092 5	447.092 8	-0.4	271.060 7、269.044 7、 139.003 0、179.050 1	芹菜素-7-葡萄糖醛酸 Apige- nin-7-O-glucuronide	17
10	9.02	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.093 1	447.092 7	0.9	271.060 4、285.076 1、 169.013 5、123.007 6	去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛 酸苷 Glychionide A	17
11	9.22	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	461.109 1	461.108 4	0.9	285.076 7、270.052 8、 255.065 6、269.045 1	汉黄芩苷 Wogonoside	17
13	9.99	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	461.111 8	461.108 4	7.4	287.072 8、270.053 8、 183.043 3、168.057 3	千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄 糖醛酸苷 Oroxylin A-7-O-β-D- glucuronide	20
14	12.56	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.060 4	271.060 6	-0.7	123.008 2、253.049 8、 169.013 5、139.054 3	黄芩素 Baicalein	17
15	15.85	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.076 2	285.076 3	-0.4	270.052 7、168.057 6、 140.061 6、242.056 8	7-甲醚黄芩素 7-O-Methylba- icalein	21
16	16.39	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	375.107 3	375.108 0	-1.9	345.060 6、327.049 9、 197.008 6、227.055 4	黄芩黄酮 II Skullcapflavone II	22

2.1.4 相似度评价

将 25 批黄芩药材指纹图谱导入“中药色谱指

纹图谱相似度评价系统(2012 版)”进行相似度评价。结果显示,25 批黄芩样品的指纹图谱的相似度

分析结果为 0.983 ~ 1.000, 表明山东莱芜与河北承德黄芩样品间化学成分基本一致, 无显著性差异。

2.1.5 正交偏最小二乘方判别分析

正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 是一种有监督的判别分析统计方法, 该方法的特点是可以去除自变量与分类变量中无关的数据变化, 有效滤除与分类信息无关的噪音, 从而使得 OPLS-DA 可以更好地获取组间差异信息^[23]。将 16 个共有峰的峰面积数据进行标准化处理, 采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析(见图 3)。结果显示所建立 OPLS-DA 模型的解释率参数 $R^2X = 0.949$, $R^2Y = 0.865$ 和预测能力参数 $Q^2 = 0.745$ 均大于 0.5, 表明模型稳定可靠。变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) 是评价变量对分类贡献的常用指标, VIP 值 > 1 表示该变量对分类的贡献率较大, 为组间特征性成分^[24]。以 VIP 值 > 1 ($P < 0.05$) 为标准筛选影响山东与承德黄芩质量的差异

标志物(见图 4)。结果显示, 共有 3 个峰的 VIP 值 > 1, 依次为 7 号峰黄芩苷, 13 号峰千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷, 14 号峰黄芩素, 表明黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和黄芩素可能是影响山东莱芜与河北承德黄芩质量的差异标志物。将其峰面积导入 Origin 软件绘制箱线图(见图 5), 由箱线图可以看出黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷这 2 个成分的峰面积均是山东莱芜黄芩显著大于河北承德黄芩, 而黄芩素的箱线图显示平均值为山东莱芜黄芩略大于河北承德黄芩, 中位数为河北承德黄芩略大于山东莱芜黄芩。

2.2 体外抗氧化研究

2.2.1 体外抗氧化能力的测定结果

25 批山东莱芜与河北承德黄芩样品均有一定的抗氧化活性, 在实验浓度范围内, 两个产地黄芩样品的抗氧化活性随样品浓度的增大而增大。25 批黄芩样品中, DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 值变化范围为 0.84 ~ 1.73 mg/mL, ABTS 自由基清除率的 IC_{50}

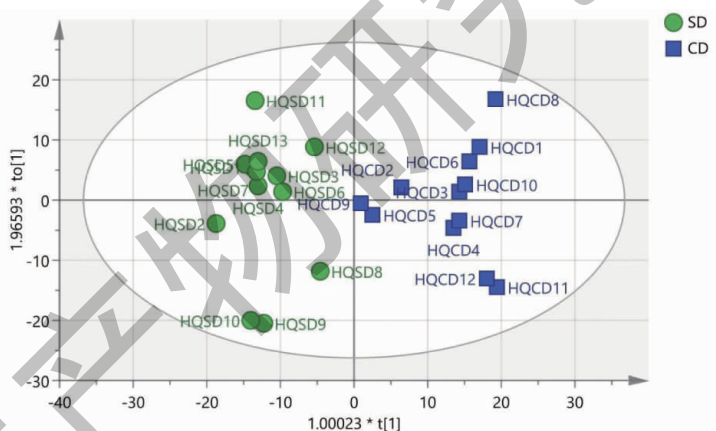


图 3 黄芩药材的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA scores of *Scutellaria Radix*

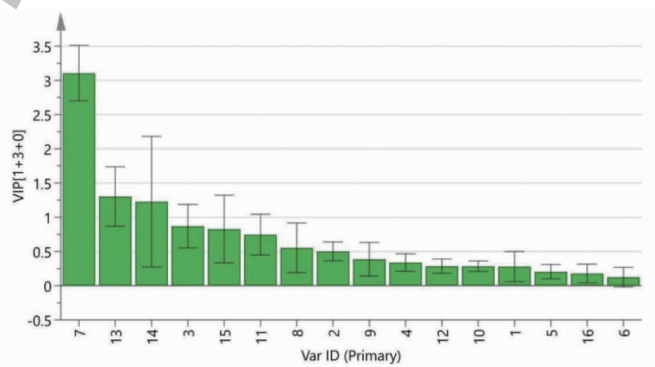


图 4 16 个共有峰的 VIP 值

Fig. 4 VIP values of 16 common peaks

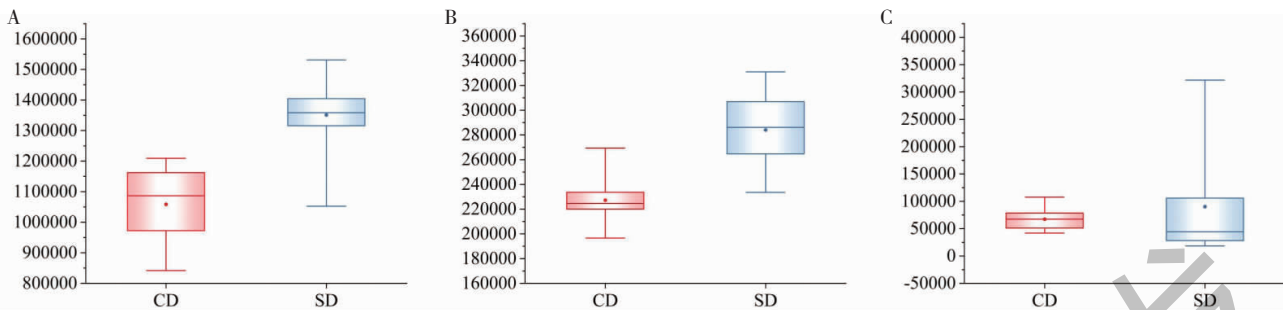


图5 黄芩指纹图谱峰面积箱线图

Fig. 5 Box plot of peak area of Scutellaria Radix fingerprint

注:A:黄芩苷;B:千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷;C:黄芩素。Note: A: Baicalin; B: Oroxylin A-7-O-β-D-glucuronide; C: Baicalein.

值变化范围为 0.44 ~ 0.62 mg/mL, O₂ 自由基清除率的 IC₅₀ 值变化范围为 0.07 ~ 0.24 mg/mL。本实验对 3 种抗氧化能力指标测定的结果与前人^[13,25]的研究结果所一致, 25 批黄芩样品对 DPPH、ABTS 和 O₂ 自由基均具有较强的清除能力, 但是各抗氧化指标的 IC₅₀ 值与文献中有所不同, 可能是由于黄芩提取时使用的溶剂和方式等不同, 使得提取出来的

活性成分的种类和含量不同, 导致抗氧化能力的 IC₅₀ 值不同。DPPH、ABTS 和 O₂ 自由基清除能力测定结果如图 6 所示。在 DPPH 与 O₂ 自由基清除实验中, 山东莱芜黄芩的 IC₅₀ 值均略低于河北承德黄芩, 表明山东莱芜黄芩对 DPPH 与 O₂ 自由基的抗氧化能力更强; 在 ABTS 自由基清除实验中, 两个产地的 IC₅₀ 值无明显差别。

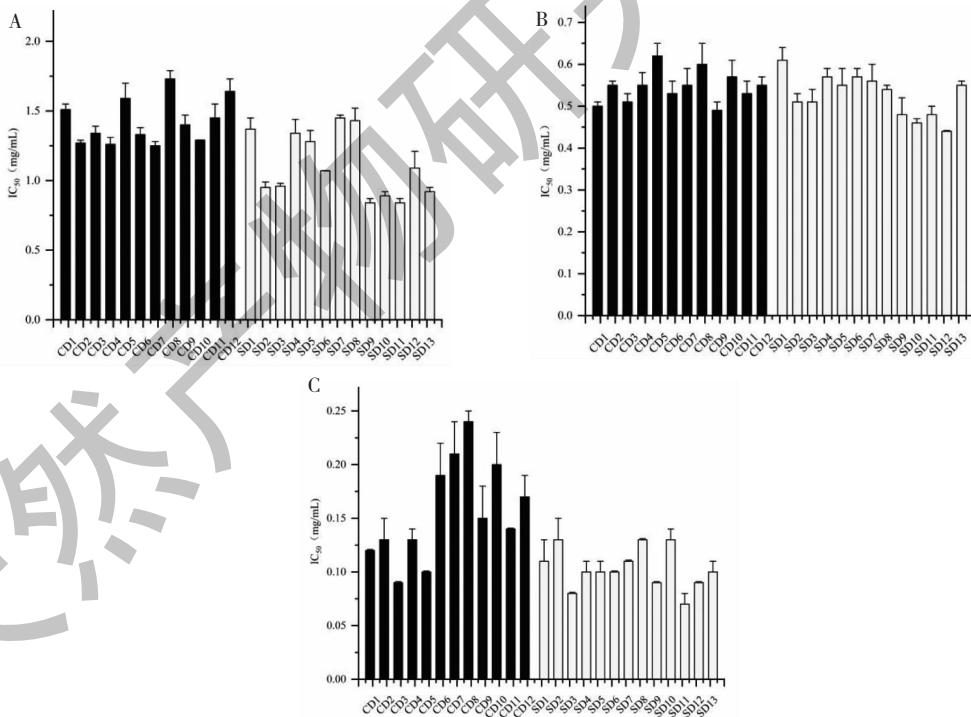


图6 黄芩药材对 DPPH (A)、ABTS (B) 和 O₂ (C) 自由基的清除活性

Fig. 6 Scavenging activity of Scutellaria Radix on DPPH (A), ABTS (B) and O₂ (C) free radicals

2.2.2 正交偏最小二乘方判别分析

为了更好地观察组间差异, 以 25 批山东莱芜与河北承德黄芩的三个抗氧化指标的 IC₅₀ 数据进行标准化处理后, 采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA

分析, 得 OPLS-DA 模型得分图见图 7。结果显示所建立 OPLS-DA 模型的解释率参数 $R^2X = 0.902$, $R^2Y = 0.88$ 和预测能力参数 $Q^2 = 0.846$ 均大于 0.5, 表明模型稳定可靠。图中显示, 山东莱芜与河

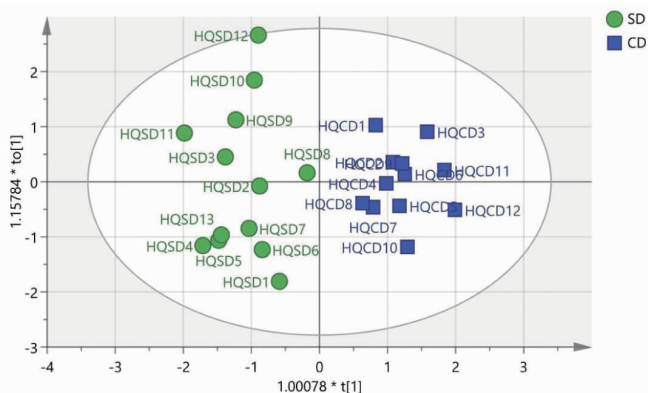


图7 黄芩药材的抗氧化能力 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA score of antioxidant capacity of Scutellaria Radix

北承德 25 批黄芩样品分为两类,两者区别显著。

2.3 谱效关系研究

将 16 个共有峰的原始峰面积与 DPPH、ABTS 和 O_2 抗氧化能力的 IC_{50} 值的相反数导入软件 SPSS 25.0 中,以峰面积值为自变量, IC_{50} 值的相反数为因变量,采用双变量相关性分析方法,分析山东与承德产地黄芩药材的 16 个共有成分的峰面积与 DPPH、ABTS 和 O_2 抗氧化能力 IC_{50} 值的 Pearson 相关性,分析结果见表 2。表 2 中数据显示,与不同的抗氧化指标呈显著相关的共有峰成分也不同,与 DPPH 自由基清除能力相关的峰有 10 个 ($P < 0.05$),按照相关系数大小排序为:白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡萄糖苷 > 黄芩苷 > 三羟基-单甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 > 千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 > 去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷 > 5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸 > 白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉伯糖苷同分异构体 > 芹菜素-7-葡萄糖醛酸 > 黄芩素 > 5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸;与 ABTS 自由基清除能力相关的峰有 5 个 ($P < 0.05$),按照相关系数大小排序为:黄芩素 > 7-甲醚黄芩素 > 白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡萄糖苷 > 白杨

素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉伯糖苷同分异构体 > 5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸; O_2 自由基清除能力相关的峰有 11 个 ($P < 0.05$),按照相关系数大小排序为:黄芩苷 > 去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷 > 芹菜素-7-葡萄糖醛酸 > 千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 > 白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡萄糖苷 > 白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉伯糖苷同分异构体 > 三羟基-单甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 > 5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸 > 汉黄芩苷 > 三羟基-单甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 > 5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸。

指纹图谱的 OPLS-DA 模型得到的山东莱芜与河北承德黄芩的 3 个差异性标志成分是黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和黄芩素。双变量相关性分析结果表明,黄芩苷和千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷在 DPPH 和 O_2 自由基清除能力中均呈显著正相关,黄芩素在 DPPH、ABTS 自由基清除能力中均呈显著正相关,即这 3 种成分含量越高,抗氧化活性越强。本文的抗氧化研究结果与前人研究结果^[13,15]相吻合。

表2 黄芩中共有峰与抗氧化活性的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between common peak and antioxidant activity of Scutellaria Radix

共有峰峰号 Peak number of common peak	化合物 Compound	双变量相关性分析 Bivariate correlation analysis	DPPH	ABTS	O_2
1	五羟基黄酮 Pentahydroxyflavone	Pearson 相关性 显著性(双侧)	-0.144 0.493	-0.088 0.677	-0.256 0.217
2	白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡萄糖苷 Chrysin 6-C-arabinoside 8-C-glucoside	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.771 ** 0.000	0.537 ** 0.006	0.611 ** 0.001

续表 2(Continued Tab. 2)

共有峰峰号 Peak number of common peak	化合物 Compound	双变量相关性分析 Bivariate correlation analysis	DPPH	ABTS	O ₂
3	5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸 5,7-Dihydroxy-2'-methoxy-flavono-7-O-glucuronide	Pearson 相关性 显著性(双侧)	-0.556 ** 0.004	-0.183 0.381	-0.798 ** 0.000
4	白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉伯糖苷同分异构体 Chrysin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside isomeride	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.685 ** 0.000	0.457 * 0.022	0.546 ** 0.005
5	白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉伯糖苷 Chrysin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.605 ** 0.001	0.467 * 0.019	0.606 ** 0.001
6	三羟基-单甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 Trihydroxy-monomethoxy-flavone-7-O-glucuronide	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.292 0.157	-0.117 0.577	0.417 * 0.038
7	黄芩苷 Baicalin	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.758 ** 0.000	0.229 0.272	0.835 ** 0.000
8	芹菜素-7-葡萄糖醛酸 Apigenin-7-O-glucuronide	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.556 ** 0.004	0.156 0.456	0.631 ** 0.001
9	三羟基-单甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 Trihydroxy-monomethoxy-flavone-7-O-glucuronide	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.745 ** 0.000	0.268 0.195	0.600 ** 0.002
10	去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷 Glychionide A	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.721 ** 0.000	0.310 0.132	0.718 ** 0.000
11	汉黄芩苷 Wogonoside	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.218 0.294	-0.105 0.619	0.493 * 0.012
12	三羟基-单甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 Trihydroxy-monomethoxy-flavone-7-O-glucuronide	Pearson 相关性 显著性(双侧)	-0.008 0.971	-0.222 0.285	0.351 0.085
13	千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 Oroxylin A-7-O-β-D-glucuronide	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.730 ** 0.000	-0.042 0.843	0.626 ** 0.001
14	黄芩素 Baicalein	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.413 * 0.040	0.585 ** 0.002	0.106 0.613
15	7-甲醚黄芩素 7-O-Methylbaicalein	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.311 0.130	0.573 ** 0.003	-0.029 0.892
16	黄芩黄酮 II Skulcaplavone II	Pearson 相关性 显著性(双侧)	0.370 0.069	0.368 0.070	0.345 0.091

注: * 在 $P < 0.05$ 水平下显著相关, ** 在 $P < 0.01$ 水平下极显著相关。

Note: * Significant correlation at $P < 0.05$ level; ** Extremely significant correlation at $P < 0.01$ level.

3 讨论与结论

本研究考察了 Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱和 Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱的分离情况, 发现 Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离效果佳、出峰多; 还考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈等不同流动相系统, 不同柱温 (30、35、40 ℃), 不同进样体积 (1、2 μL),

不同检测波长 (254、280 nm) 以及不同洗脱梯度。最终确定最优的色谱条件为流动相 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈、柱温 35℃、体积流量 1 μL、检测波长 280 nm。

本研究还考察了供试品溶液的提取方法 (超声法、回流法)、提取溶剂浓度 (30%、50%、70%、90% 乙醇)、提取时间 (10、30、60、90 min) 等。结果表明, 以 70% 甲醇作为提取溶剂, 超声提取 60 min, 黄芩样品溶液的各共有峰的峰面积较高, 峰形较好。

本研究采用 UPLC 技术建立的黄芩药材的指纹图谱的方法,精密度、稳定性和重复性均好,可用于黄芩的质量评价。25 批山东莱芜与河北承德黄芩与对照指纹图谱之间的相似度在 0.983 以上,说明山东莱芜地区与河北承德地区的黄芩中化学成分没有明显差异。通过 OPLS-DA 分析,发现黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、黄芩素这 3 个成分可能是影响山东莱芜与河北承德黄芩质量的差异标志物,且箱线图结果表明山东莱芜黄芩中这 3 个成分的峰面积均值高于河北承德黄芩。Li 等^[26]和 Yang 等^[27]研究发现河北承德产区黄芩中化学成分含量低于其他产区黄芩(例如山东),这与本研究结果相吻合。两个道地产区的黄芩均具有较强的 DPPH、ABTS 和 O₂ 自由基清除能力,其中山东莱芜黄芩的抗氧化能力优于河北承德黄芩。进一步采用 OPLS-DA 模型,根据 3 个抗氧化指标可区分两个道地产区。通过双变量相关性分析研究,我们发现黄芩对 DPPH、ABTS 和 O₂ 自由基的清除能力与黄芩中多种黄酮及黄酮苷类化学成分呈显著正相关,对抗氧化活性呈促进作用;仅有一种成分(5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸)呈显著负相关,对抗氧化活性呈抑制作用。

综上所述,山东莱芜产区的黄芩在化学成分含量和抗氧化能力方面优于河北承德地区的黄芩,且二者在成分和抗氧化方面都存在一定的差异。但鉴于本研究样本量较小,后续研究还需要增大样本数量,并且还将开展黄芩不同道地产区的土壤因子和气候因子的对品质形成的影响研究,从生态因子的角度阐释不同道地产区黄芩品质差异的根源;此外,还应加强抗炎、抗病毒、抑菌等其他多种药理作用的研究,为全面阐释不同道地产区黄芩的品质与功效是否存在差异提供研究策略,进一步丰富中药材道地性研究的科学内涵。同时还要加强研究黄芩药材的地域适应性特点,合理选择种植地点、优化种植技术,建立科学合理的道地药材的质量评价标准,生产出高品质的道地药材,更好地应用于中医药产业。

参考文献

- Jiang XH, Liu SM. Research on pharmacological effects and substance basis of *Scutellaria baicalensis* [J]. Chin Pharm (中国药师), 2020, 23:2004-2010.
- Jiang YT, He C, Ren TT, et al. Research progress in the chemical constituents and pharmacological mechanism of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Sci Technol Chem Ind (化工科技) 2022, 30:93-100.
- Liu J, Xiong L, Zhou QM, et al. Progress in the application of new technology in the study of TCM authenticity [J]. J Chin Med Pharmacol (中医药学报), 2021, 49:110-115.
- Li Z. Research on the materia medica of *Scutellaria baicalensis* and the distribution and change of authentic producing areas [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences (中国中医科学院), 2010.
- Wang D, Zhang QY, Yang XX, et al. Authentic medicinal materials of *Scutellaria baicalensis* based on HPLC fingerprint identification of non-authentic medicinal materials [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38:1951-1960.
- Zhang MM, Cheng SP, Zhao ZG, et al. UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS rapid screening of antioxidant components in *Salvia miltiorrhiza* by on-line combined technique [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51:2908-2913.
- Wei Q, Liu KM. Research progress on spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicine [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med (中药新药与临床药理), 2019, 30:634-638.
- Xu JY, Ke Chang, Wang Yan, et al. Establishment of UPLC fingerprints of *Scutellaria baicalensis* and their anti-inflammatory effects study on spectral effect relationship [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2023, 46:1454-1461.
- Jia CQ, Guo LP, Wang X, et al. Establishment of fingerprints, anti-inflammatory activities and spectrum-effect relationship study of pithnodecayed and pith-decayed *Scutellaria baicalensis* [J]. Chin Pharm (中国药房), 2022, 33:1430-1435.
- Pang YY. The anti-aging effect and spectrum-effect study of root, stem and leaf of *Scutellaria baicalensis* Georgi [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学) 2019.
- Wang W. Study on the relationship between the fingerprint and spectrum-effect of *Scutellaria baicalensis* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学) 2009.
- Wang YL, Liu W, Yang DB, et al. Research on spectrum-effect relationship of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2017, 35:3110-3113.
- Tian T. Study on quality evaluation and pharmacological action of *Scutellaria baicalensis* in different producing areas and growing years [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University (浙江理工大学), 2018.
- Shi TS, Wu XJ, Zhong MX, et al. Ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of antioxidant components from *Aronia*

- melanocarpa*[J]. J Cent South Univ Forest Technol(中南林业科技大学学报),2023,43:191-202.
- 15 Zhang Q, Li HX, Liu P, et al. Study on anti-inflammatory and antioxidant activities of baicalin *in vitro*[J]. J Yantai University (Nat Sci Eng)(烟台大学学报:自然科学与工程版), 2018, 31:232-238.
- 16 Feng J, Xiao HH. Study on the flavonoids content and antioxidant activity of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* cultivated from different areas[J]. Chin Food Additives(中国食品添加剂), 2021, 32:8-12.
- 17 Fu M, Han JX, Sun ZZ, et al. Study on quality evaluation of wild-type and cultivated *Scutellaria baicalensis* based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. Pharm and Clin Chin Mater Med(中药与临床), 2022, 13:7-12.
- 18 Pang YY, Xue LY, Zheng YH, et al. Comparative study on quality of *Scutellaria baicalensis* Georgi in different harvest periods using UHPLC-MS/MS metabolomics technology[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2017, 52:1903-1909.
- 19 Chen X, Zhang XR, Mou LT, et al. Characterization of chemical constituents and identification of absorbed prototypes components in rat serum of *Scutellaria baicalensis* by UHPLC-Q-Orbitrap-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2023, 54:2722-2732.
- 20 Qiao X, Li R, Song W, et al. A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering[J]. J Chromatogr A, 2016, 1441:83-95.
- 21 Wang YL, Liu W, Yang DB, et al. Fingerprint of coptis and *Scutellaria baicalensis* on UPLC-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23:80-85.
- 22 Guan YQ, Zheng XN, Yan MQ, et al. Analysis of effective components of *Scutellaria baicalensis*-*Sophora japonica* drug pair by UPLC-ESI-TOF/MS and network pharmacology analysis of its effect on chronic kidney disease[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2022, 53:6388-6400.
- 23 Du QQ, Zhang TJ, Xie DM, et al. Evaluation of quality markers of *Paeoniae Radix Alba* in different germplasm based on fingerprint and chemical pattern recognition[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2023, 54:3292-3301.
- 24 Deng YC, Zou ZY, Li Y, et al. Sensory characterisation of *Fu brick tea* and the construction of its origin discrimination model[J/OL]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1-16 [2024-04-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20230823.1138.002.html>.
- 25 Xing YJ, Li J. Study on ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* and antioxygenic property[J]. Shaanxi Agric Sci(陕西农业科学), 2021, 67:73-75.
- 26 Li WJ, Zhang JK, Wang B, et al. Content comparison of five kinds of flavonoids in *Scutellariae Radix* from different areas[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2016, 27:2985-2988.
- 27 Yang LX, Liu D, Feng XF, et al. Determination of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* from different origin by HPLC[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2002, 27:9-13.