

RP-HPLC法测定不同产地黄芩中5种黄酮苷元成分的含量

颜梅*,徐菲拉,徐斌,何三民,梅新路*(金华市中心医院,浙江金华 321000)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1782-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.18

摘要 目的:建立测定不同产地黄芩中5种黄酮苷元成分含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Extend-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为276 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为35 ℃。结果:去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的进样量分别在0.018 0~0.108 0、0.378 0~2.268 0、0.094 5~0.567 0、0.022 5~0.135 0、0.035 4~0.212 4 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 9、0.999 5、0.999 6、0.999 5、0.999 5);精密性、重复性、稳定性试验的RSD<3%;加样回收率分别为98.72%(RSD=2.5%, $n=6$)、101.80%(RSD=2.0%, $n=6$)、99.25%(RSD=2.3%, $n=6$)、98.71%(RSD=1.5%, $n=6$)、99.05%(RSD=1.2%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、快速,结果准确,可用于黄芩中黄酮苷元成分的含量测定。

关键词 黄芩;黄酮苷元;含量测定;反相高效液相色谱法

Content Determination of 5 Kinds of Flavonoid Aglycone in *Scutellaria baicalensis* from Different Sources by RP-HPLC

YAN Mei, XU Fei-la, XU Bin, HE San-min, MEI Xin-lu (Jinhua Central Hospital, Zhejiang Jinhua 321000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 5 kinds of flavonoid aglycone in *Scutellaria baicalensis* from different sources. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Extend-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 276 nm, and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear ranges of norepinephrine wogonin, baicalein, wogonin, chrysin and oroxylin-A were 0.018 0-0.108 0 μg($r=0.999 9$), 0.378 0-2.268 0 μg($r=0.999 5$), 0.094 5-0.567 0 μg($r=0.999 6$), 0.022 5-0.135 0 μg($r=0.999 5$) and 0.035 4-0.212 4 μg($r=0.999 5$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3%. The recovery rates were 98.72% for norepinephrine wogonin (RSD=2.5%, $n=6$), 101.80% for baicalein (RSD=2.0%, $n=6$), 99.25% for wogonin (RSD=2.3%, $n=6$), 98.71% for chrysin (RSD=1.5%, $n=6$) and 99.05% for oroxylin-A (RSD=1.2%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and it is feasible for content determination of flavonoid aglycone in *S. baicalensis*.

KEYWORDS *Scutellaria baicalensis*; Flavonoid aglycone; Content determination; RP-HPLC

为短刺海马的合理利用和进一步产品开发奠定物质基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 275.
- [2] 姜素芬, 吉爱国, 梁浩, 等. 我国海马的研究进展[J]. 中药材, 2007, 30(7):884.
- [3] 肖定军, 邓松之, 曾陇梅. 南海海绵 *Clathria fasciculata* 化学成分的研究: I [J]. 中国海洋药物, 2002, 21(2):1.
- [4] 孙东东, 李祥, 陈建伟, 等. 板蓝根醇提部位化学成分研究[J]. 中国药房, 2007, 18(30):2 325.
- [5] Jiang X, Covey DF. Total synthesis of ent-cholesterol via a steroid C, D-ring side-chain synthon[J]. *J Org Chem*, 2002, 67(14):4 893.
- [6] Yaoita Y, Amemiya K, Ohnuma H, et al. Sterol constituents from five edible mushrooms[J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(6):944.
- [7] Piccialli V, Sica D. Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*[J]. *J Nat Prod*, 1987, 50(5):915.
- [8] Croll DH, Small DM, Hamilton JA. Temperature-dependent molecular motions of saturated acyl cholesteryl esters: A ¹³C NMR study[J]. *J Chem Phys*, 1986, 85(12): 4 381.
- [9] Notaro G, Piccialli V, Sica D. New steroidal hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge *Cliona copiosa*[J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(11):1 588.
- [10] 黄建设, 李庆欣, 吴军, 等. 粗吻海龙化学成分的研究[J]. 中草药, 2004, 35(5):485.

(收稿日期:2013-12-31 修回日期:2014-03-03)

*药师。研究方向:中药鉴定。E-mail:415656073@qq.com
#通信作者:药师。研究方向:中药分析。E-mail:mei222331@163.com

黄芩最早记载于《神农本草经》，为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根，具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效，是临床大宗使用的药材^[1]。有关黄芩的传统研究多集中在黄芩苷类成分上^[2-3]，而近年来有关黄芩中黄酮苷元类物质药理作用的研究有所增多：黄芩素有抗菌消炎、抗病毒、降低血清胆固醇等作用；汉黄芩素有抗氧化、抗肿瘤等生物活性；千层纸素 A 有抗肿瘤、神经保护等生物活性^[4-8]。目前，有关黄芩中黄酮苷元的质量控制报道较少，因此笔者基于黄芩中苷类成分的含量测定方法，建立了一种同时测定黄芩中 5 种黄酮苷元成分含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法，为提高黄芩药材的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200 系列 HPLC 仪(美国 Agilent 公司);SK5200LH 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);AB204-N 型精密分析天平(上海世义精密仪器有限公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市荣华仪器制造有限公司);鼓风干燥箱(上海市实验仪器厂有限公司)。

1.2 试剂

黄芩素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111595-200905);白杨素、汉黄芩素、千层纸素 A、去甲汉黄芩素对照品均为笔者自制(纯度均>98%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

黄芩药材于 2012 年 9 月分别采自河北承德、陕西商洛、内蒙古赤峰、山东胶南、安徽亳州、甘肃天水(栽培)、甘肃天水(野生),经我院何三民主任中药师鉴定,1~5 号为《中国药典》收载正品 *Scutellaria baicalensis* Georgi, 6、7 号为甘肃当地品种。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Extend-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);柱温:35 ℃;检测波长:276 nm;流速:1.0 ml/min。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	17	83
41	23	77
45	30	70
65	38	62

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 对照品适量,加入甲醇制备成每 1 ml 分别含 6、126、31.5、7.5、11.8 μg 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取黄芩粉末(过五号筛)5 g,置 150 ml 带塞锥形瓶中,加水酶解后取出,用水补足缺失的质量,再加入 95%乙醇

至含醇量为 50%,滤过,滤液置 250 ml 量瓶中,分别用提取溶剂少量多次洗涤容器和残渣,洗液并入量瓶中。精密量取 0.2 ml,置 25 ml 量瓶中,以甲醇定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 专属性试验

精密吸取对照品和供试品溶液各 10 μl,分别注入液相色谱仪,记录 65 min 内的色谱图。结果显示,供试品中 5 种黄酮苷元成分都实现了良好分离,表明该方法稳定、可行。色谱见图 1。

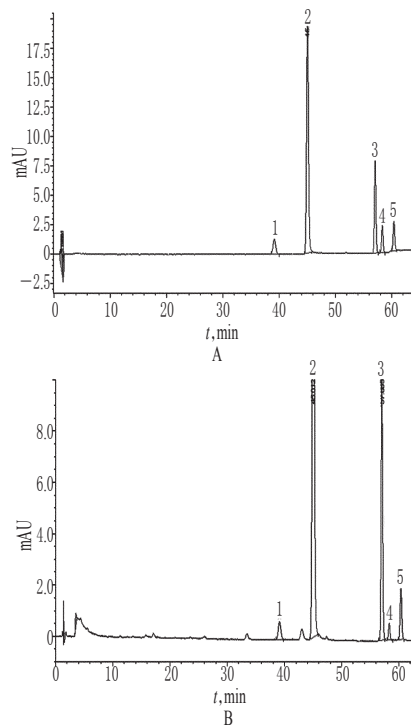


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 去甲汉黄芩素; 2. 黄芩素; 3. 汉黄芩素; 4. 白杨素; 5. 千层纸素-A

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test samples; 1. norepinephrine wogonin; 2. baicalein; 3. wogonin; 4. chrysin; 5. oroxylin-A

2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 3.0、6.0、9.0、12.0、15.0、18.0 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵座标,进样量(x, μg)为横座标,进行线性回归,得去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 的回归方程分别为 $y=64.063x+0.6733$ ($r=0.9999, n=6$)、 $y=37.731x-3.9733$ ($r=0.9995, n=6$)、 $y=48.178x+0.1333$ ($r=0.9996, n=6$)、 $y=59.949x+0.4733$ ($r=0.9995, n=6$)、 $y=42.736x$ ($r=0.9995, n=6$)。结果表明,上述 5 种成分的进样量依次在 0.018 0~0.108 0、0.378 0~2.268 0、0.094 5~0.567 0、0.022 5~0.135 0、0.035 4~0.212 4 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μl,注入液相色谱仪,按上述

色谱条件测定,记录峰面积,重复6次。结果显示,去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的RSD分别为1.2%、2.7%、1.2%、1.4%、1.3%、1.7%(n 均为6),表明仪器精密良好。

2.7 重复性试验

取黄芩粉末适量,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的平均百分含量分别为1.92%、8.47%、2.13%、0.1%、0.73%,RSD分别为1.3%、1.0%、0.5%、1.0%、1.2%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,按上述色谱条件分别于制备后0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果显示,去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的RSD分别为1.6%、1.1%、2.5%、2.5%、2.3%(n 均为6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 加样回收率试验

取黄芩粉末适量,精密称定,共6份,分别精密加入混合对照品溶液适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果显示,去甲汉黄芩素的平均加样回收率为98.72%,RSD=2.5%($n=6$);黄芩素的平均加样回收率为101.80%,RSD=2.0%($n=6$);汉黄芩素的平均加样回收率为99.25%,RSD=2.3%($n=6$);白杨素的平均加样回收率为98.71%,RSD=1.5%($n=6$);千层纸素A的平均加样回收率为99.05%,RSD=1.2%($n=6$),表明本方法准确度良好。

2.10 样品含量测定

取不同产地的黄芩药材粉末适量,精密称定,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中5种黄酮苷元成分的含量,结果见表2。

表2 不同产地黄芩中5种黄酮苷元成分的含量测定结果(% , $n=3$)

Tab 2 Results of content determination of flavonoid aglycone in *S. baicalensis* from different sources(% , $n=3$)

产地	栽培/野生	品种	去甲汉黄芩素	黄芩素	汉黄芩素	白杨素	千层纸素-A
河北承德	栽培	黄芩	0.19	9.61	2.46	0.13	0.56
陕西商洛	栽培	黄芩	0.20	8.51	2.15	0.18	0.71
内蒙古赤峰	栽培	黄芩	0.15	8.60	2.01	0.20	1.24
山东胶南	栽培	黄芩	0.15	8.59	2.44	0.17	0.91
安徽亳州	栽培	黄芩	0.09	8.39	2.25	0.12	0.49
甘肃天水	栽培	甘肃黄芩	0.12	7.30	2.00	0.14	0.70
甘肃天水	野生	甘肃黄芩		7.40	2.33	0.16	1.82

3 讨论

本试验首次采用RP-HPLC法同时测定黄芩中5种黄酮苷元成分——去甲汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的含量,并比较了7个产地黄芩药材的有效成分含量差异,与文献^[9]相比,目标成分多,方法准确、简便、快速,重复性和分离效果好,可用于黄芩药材和其黄酮苷元的质量控制。

黄芩作为我国临床常用药材,由于产地及生长期不同,各有效成分含量具有较大差异^[10-11]。研究发现,仅以含量最高的黄芩素作为指标,不同产地药材的质量差异显著,由高到低依次为河北承德、内蒙古赤峰、山东胶南、陕西商洛、安徽亳州、甘肃天水(野生)、甘肃天水(栽培);如将其他4种成分的含量同时作为评价指标,河北承德药材的质量最好。提示仅以单一成分作为质量控制的指标存在一定的局限性,需建立多种有效成分的含量测定方法才更容易全面控制药材质量。

本试验结果还表明,栽培黄芩和野生黄芩中的5种黄酮苷元成分含量总体上无明显差异,这可为黄芩药材的规范化种植提供依据;不同种属的黄芩中黄酮苷元成分含量差异较大,故临床应用应严格控制药材产地。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:138.
- [2] 徐楚江. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1983:46.
- [3] 宋扬文,陈忻. 中药黄芩药理作用的研究进展[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(4):375.
- [4] 宋旦哥,孟庆刚. 黄芩药理作用研究述评[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8):1 619.
- [5] 任晓东,符伟,张晓芸,等. 天然产物汉黄芩素的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9):777.
- [6] 郭英,瞿晶田,赵鑫,等. 天然产物千层纸素A的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(12):2 512.
- [7] 司磊. 人肠道群对黄芩苷的生物转化[D]. 西安:西安工程大学, 2012.
- [8] 许伯慧,严菲. 黄芩苷及其苷元黄芩素体内过程的研究进展[J]. 南通大学学报:医学版, 2010, 30(3):220.
- [9] 刘志刚,颜仁梁,徐昌瑞,等. 黄芩自生酶催化水解总黄酮苷的工艺研究[J]. 解放军药学学报, 2008, 24(2):130.
- [10] 田建红. 不同产地黄芩中的有效成分含量分析[J]. 海峡药学, 2009, 21(3):57.
- [11] 丁芳林,张雯杰,陈波. HPLC测定不同产地黄芩中黄酮化合物的含量[J]. 中国现代中药, 2008, 7(10):25.

(收稿日期:2013-12-18 修回日期:2014-04-05)