

MEKC法和 HPLC法测定黄芩多倍体中黄芩苷含量的研究

高山林, 刘 蓁, 朱丹妮*

(中国药科大学中药学院, 江苏南京 210038)

摘要: 目的 采用 MEKC和 HPLC法对黄芩多倍体进行了黄芩苷含量的测定, 为大量样品的检测提供可靠的方法。方法 对 MEKC法和 HPLC进行方法学考察的基础上, 测定了黄芩中黄芩苷的含量, 并进行数据的比较和相关性分析。结果 两种方法的测定结果基本一致, 其中采用 HPLC法测定的结果偏高 1% ~ 3%, 但两种方法测定的数据之间差异并无显著性, 且相关系数较高。结论 两种方法均可以应用于黄芩苷含量测定, 但是 MEKC法分析样品速度快、时间短、试剂费用低廉, 如果仪器条件许可, MEKC法更适合于大量黄芩样品的测定。

关键词: 黄芩; 黄芩苷; 毛细管电泳; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2003)06-0511-03

Comparison of baicalin in skullcap polyploid determined by MEKC and HPLC methods

GAO Shan-lin, LIU Zhen, ZHU Dan-ni

(College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract **Object** To determine the baicalin content in skullcap polyploid by MEKC and HPLC, and to provide the reliable method used to determine a large number of samples. **Methods** On the basis of methodology of MEKC and HPLC, the baicalin in *Scutellaria baicalensis* Georgi. was determined, the data and relevant analysis were compared. **Results** The data of the content determined by HPLC was similar to that by MEKC, but the former showed slightly higher 1% - 3%. There was no significant variation between the two methods with higher correlation coefficient. **Conclusion** Both the above two methods could be accurately used to determine the baicalin in *S. baicalensis*. The MEKC has some advantages, such as quick, save time with lower solvent cost, and is suitable for the large number of samples in the determination of baicalin of *S. baicalensis*.

Key words *Scutellaria baicalensis* Georgi; baicalin; MEKC; HPLC

黄芩是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根^[1], 在《神农本草经》中被列为中品。具有清热燥湿、泻火解毒、安胎止血的功效, 常用于发热烦渴、肺热咳嗽、泻痢热淋、湿热黄疸、胎动不安、臃肿疮毒等症。黄芩也有腐肭、空肭、经芩、黄金茶、山茶根、烂心草等别名。主产于东北、河北和山西, 以山西产量最大, 河北承德为其道地产区^[2]。黄芩中种类最多、生物活性最显著的是黄酮类化合物^[3,4]。黄芩根中主要成分有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、千层纸素 A、葡萄糖苷等, 茎叶中含有卵黄芩苷及黄芩苷等, 其中黄芩苷药理活性最强, 因此《中华人民共和国药典》2000年版规定以 HPLC法测定黄芩中黄芩苷的含量, 且黄芩苷的含量不得低于 9.0%。

黄芩化学成分定性定量分析方法已经有较多的

报道, 定性分析主要有化学成分定性鉴别方法^[5], 定量分析主要有比色法^[6]、薄层色谱、紫外分光光度法^[7]、薄层扫描法^[8]和高效液相色谱法^[9,10]。高效毛细管电泳法 (MEKC)^[12]测定黄芩中的有效成分, 目前属于较新的测定方法, 国内报道较少。为此本实验将结合我们承担的国家中医药管理局重点课题——黄芩组织培养多倍体育种技术研究, 同时采用 MEKC和 HPLC两种方法对我们获得的 20 个多倍体株系进行黄芩苷含量测定和筛选, 同时进行方法技术学上的考察比较, 以寻求高效、准确和简便的测定方法, 并为黄芩多倍体优良株系的选育提供可靠的化学成分含量依据。

1 仪器和材料

Beckman Counter P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System; 未涂层石英毛细管 (河北

* 收稿日期: 2002-07-12

基金项目: 国家中医药管理局重点课题项目 (972095)

作者简介: 高山林 (1946-), 男, 江苏江阴人, 中国药科大学教授, 硕士学位, 长期从事药用植物遗传育种和组织培养技术的研究, 先后主持国家和省部级重点项目 10 项, 发表论文 60 篇, 著书 2 本。Tel (025) 5391288 E-mail shlingao@jlonline.com

永年光学纤维厂)。LC-10AT 高效液相色谱仪(岛津),LC-10AT 泵,SPD-10A (UV-VIS) 检测器,C-R6A 记录仪。

黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

实验样品为本教研室诱导培育得到的四倍体黄芩株系和二倍体黄芩,商品黄芩药材购于安徽亳州。

2 方法和结果

2.1 MEKC 法测定黄芩苷含量

2.1.1 色谱条件:以 25 mmol/L 硼砂缓冲液(pH8.3,其中含 60 mmol SDS)为电泳介质,未涂层石英毛细管(75 $\mu\text{m} \times 40.0 \text{ cm}$,有效柱长 33.0 cm)为分离通道,压力进样(0.5 psi, 3 s),于 25 $^{\circ}\text{C}$ 以下,以 17 kV 恒压分离,272 nm 检测。

2.1.2 样品制备:精密称取样品 0.200 g,加入 40 mL 70% 乙醇溶液,热回流提取 2 h,过滤,以少量溶剂洗涤残渣及器皿,定容为 50 mL。稀释 20 倍后以微孔滤膜过滤,取续滤液测定。

2.1.3 标准曲线的绘制:分别配制浓度为 5,10,15,20,25,30,35 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,各进样 0.2 μL ,在优化条件下进行电泳分析,以黄芩苷峰面积为纵坐标,黄芩苷的浓度为横坐标绘制标准曲线。线性方程为 $Y = -2\,315 + 1\,233\,800X$, $r = 0.998\,3$,线性范围:5~35 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.4 精密度试验:分别精密吸取黄芩苷对照品溶液在上述条件下连续进样 6 次,结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.94%,表明仪器符合要求。

2.1.5 稳定性试验:精密吸取黄芩苷对照品溶液,每隔 2 h 进样分析,连续测定 6 次,结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 2.2%,表明样品中黄芩苷至少在 12 h 内稳定,可以准确地进行定量分析。

2.1.6 回收率试验:精密吸取黄芩对照品溶液加入样品中,其余操作同 2.1.2,重复 6 次。结果平均回收率为 101.5%, RSD 为 0.83%。

2.2 HPLC 法测定黄芩苷含量

2.2.1 色谱条件:色谱柱:Lichrospher C_{18} (5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm);检测波长:275 nm;灵敏度:0.05;流动相:水-甲醇-磷酸(45:55:0.2);流速:0.8 mL/min;进样量:20 μL 。

2.2.2 样品制备:精密称取样品 0.400 0 g,加入 20 mL 70% 乙醇,热回流提取 2 h,过滤,以少量溶剂洗涤残渣和器皿,定容至 50 mL。用色谱纯甲醇稀释 10 倍,以微孔滤膜过滤,取续滤液进样。

2.2.3 标准曲线的绘制:分别配制浓度为 5.0,

7.5,10.0,12.5,15.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,各进样 20 μL 。以黄芩苷峰面积为纵坐标,黄芩苷浓度为横坐标作标准曲线。其线性方程为 $Y = -295 + 1\,649.6X$, $r = 0.997\,2$,线性范围:5.0~15.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 两种方法的测定结果比较

2.3.1 图谱比较:黄芩苷在 HPLC 和 MEKC 仪器分析的图谱见图 1,2。

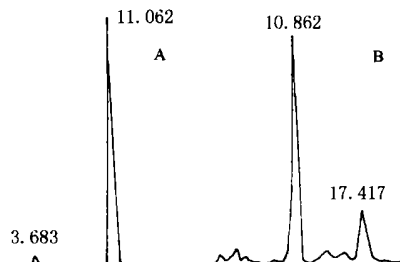


图 1 黄芩苷(A)和黄芩多倍体(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of baicalin (A) and polyloid of *S. baicalensis* (B)

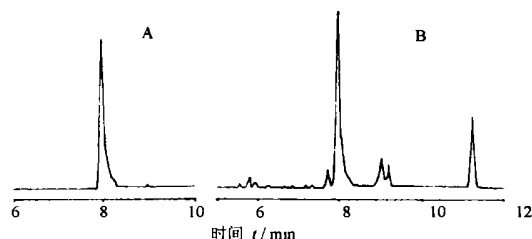


图 2 黄芩苷(A)和黄芩多倍体(B)的 MEKC 图谱

Fig. 2 MEKC chromatograms of baicalin (A) and polyloid of *S. baicalensis* (B)

2.3.2 含量比较:采用 MEKC 和 HPLC 法对研究获得的 20 个多倍体株系和对照二倍体黄芩及商品药材进行黄芩苷的含量测定,结果见表 1(所有样品均为两年生黄芩)。

测量结果表明:供试的 22 个样品中,采用 MEKC 法测定的黄芩苷含量为 10.62%~17.30% 平均值为 14.05%,而采用 HPLC 法测定的黄芩苷含量为 12.31%~17.63%,平均值为 15.35%。

进一步对采用 HPLC 法测定的黄芩苷含量和采用 MEKC 法测定的相应数据进行相关性分析,结果表明,两组数据相关性良好,相关系数 $r = 0.822\,1$ 。由 F 检验知,两种方法间的差异无显著性。

3 讨论

3.1 MEKC 法具有操作简单、柱效高、进样体积小、分析时间短、试剂成本低、易于清洗、分离模式多,容易建立新的分析方法等优点。由于 MEKC 法

表 1 两种方法测定黄芩苷含量的比较

Table 1 Comparison of baicalin content between two methods

株系编号	黄芩苷含量/%	
	MEKC 法	HPLC 法
CK	13.08	16.93
A1	12.39	13.48
B1	15.68	18.16
B3	10.62	12.31
B13	13.91	14.19
B16	14.17	15.68
C1	14.27	16.25
C2	12.37	14.02
C7	17.30	17.63
F4	14.78	15.09
商品药材	10.47	8.79
C8	13.04	14.01
D4	13.95	14.52
D5	13.23	14.52
D13	16.43	17.36
D20	13.61	14.18
E1	13.07	14.81
E6	14.00	15.73
E10	13.30	16.08
E12	16.40	16.85
F5	14.25	15.17
F8	15.08	17.34

与 HPLC 法的一致性较好,且 MEKC 法分析时间短、成本低,故 MEKC 法适宜应用于样品数目多的分析测定,在大量株系选育中使用具有较高的可信度,可以在大量筛选样品中应用。

3.2 HPLC 法是目前较多应用的一种测定方法,从本实验结果看,其分析准确性也比较好。本实验中 HPLC 法测定的黄芩苷含量普遍比 MEKC 法测定结果高 1%~3%,属于正常误差范围,因此 HPLC 法同样不失为方便、准确和可靠的分析测定方法。

3.3 黄芩以根入药,因此根部农艺性状和根部有效成分的含量成为选育多倍体优良品种的重要标准。

据我们的田间实验结果表明:两年生黄芩多倍体的主根长度、茎粗均明显高于二倍体。大部分多倍体株系的根鲜重、干重达到二倍体的 2 倍,因此采用同源多倍体育种可以明显提高根部的产量性状。而本实验对黄芩根部中黄芩苷含量进行了两种方法的同步测定。结果表明:大部分多倍体株系的根中黄芩苷含量高于对照株系,更明显高于商品药材。这一结果展示了选育高产优质的黄芩优良品种的良好前景。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol 1.
- [2] Song W Z. Study on the resources of *Radix Scutellariae* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1981, 16(2): 139-145.
- [3] Li Z P, Wei H Q. Survey of study on chemical compounds of *Scutellariae* [J]. *World Notes—Plant Med* (国外医药·植物药分册), 1994, 9(4): 147-156.
- [4] Pan F, Feng Y X. Study on *Radix Scutellariae* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1994, 6(2): 61-68.
- [5] Liu X H, Wang Y X, Fang K H. *TLC Identification of Traditional Chinese Medicine* (中药材薄层谱鉴别) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1990.
- [6] Sha S Y. *Analysis of Effective Compounds in Chinese Herbal Medicine* (中草药有效成分分析法) [M]. Part I. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.
- [7] Liu M L, Gao W. Determination of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1982, 2(3): 134-140.
- [8] Yu L R, Liu M L. Determination of baicalin and wogonoside in *Radix scutellariae* by TLCS [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1983, 3(1): 18-21.
- [9] Tsuyoshi T, Hsuanori J, Yukinori M, et al. Studies on the constituents of *Scutellaria* species: quantitative analysis of flavonoids in *Scutellaria* roots by HPLC. [J]. *J Pharm Soc Jpn*, 1985, 105(2): 148-155.
- [10] Sagara K, Tashiyukioshima T M, Murayama H. Simultaneous determination of baicalin, wogonin, oroxylin-A and their glucosides in *Radix Scutellariae* by ion-pair HPLC [J]. *J Chromatogr A*, 1985, 328: 289-291.
- [11] Liu Y M, Shen S J. Determination of the six major flavonoids in *Radix Scutellariae* by micellar electrokinetic capillary eletrophoresis [J]. *Anal Chim Acta*, 1994, 288: 221-226.

欢迎订阅《中草药》杂志 2002 年增刊

为了加快中药现代化的进程,交流中药指纹图谱研究的经验,讨论入世后我国中药产业面临的挑战和对策,本刊在 2002 年 10 月底出版以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容的增刊。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅。定价:60.00 元,另加 5.00 元邮费,款到寄刊。

本刊另有 1996—2001 年增刊,欢迎订阅。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编:300193 电话:(022)27474913 23006821 传真:(022)23006821 E-mail: zcyzbbj@tjpr.com