

HPLC 法测定不同规格并头黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷含量

温华珍^{1,2}, 肖盛元¹, 王义明¹, 罗国安^{1*}

(1. 清华大学 化学系, 北京 100084; 2. 江西中医学院 药理学系, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 考察4种不同规格并头黄芩的药用价值和黄芩苷提取条件。方法 采用HPLC法测定不同规格并头黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷含量。结果 4种不同规格并头黄芩中黄芩苷含量依次为12.89%、13.82%、11.75%和10.85%, 汉黄芩苷含量依次为0.28%、0.22%、0.24%和0.27%; 随提取溶剂中醇浓度的增加, 黄芩苷提取率先增高后降低, 碱性条件降低黄芩苷提取率。结论 4种不同规格并头黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷含量差异不大, 且黄芩苷含量均高于《中华人民共和国药典》要求; 提取条件为50%中性乙醇提取最佳。

关键词: HPLC; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 并头黄芩

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)04-0600-03

Baicalin and wogonoside in different species of *Scutellaria scordifolia* by HPLC

WEN Hua-zhen^{1,2}, XIAO Sheng-yuan¹, WANG Yi-ming¹, LUO Guo-an¹

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Department of Pharmacy, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Key words: HPLC; baicalin; wogonoside; *Scutellaria scordifolia* Fisch. ex Schrank

黄芩是常用中药, 始载于《本经》, 为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的根, 性苦寒, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功能^[1]。除黄芩外, 滇黄芩 *S. amoena* C. H. Wrigth、粘毛黄芩 *S. viscidula* Bunge、丽江黄芩 *S. likiangensis* Diels、甘肃黄芩 *S. rehderiana* Diels、连翘叶黄芩(川黄芩) *S. hypericifolia* Lévl. 的根也是黄芩的重要来源; 在部分地区尚有展毛韧黄芩(大黄芩) *S. tenax* W. W. Smith var. *Patentipilosa* (H. -M.) G. Y. Wu 代替黄芩作药用^[2]。并头黄芩 *S. scordifolia* Fisch. ex Schrank 在蒙药中有收载, 又名头巾草、吉布泽, 具清热解毒、利尿之功效, 主治肝炎、疮疡肿毒、肠痈、跌打损伤、虫蛇咬伤、小便不利等症^[3], 在东北民间作黄芩入药。黄芩苷是黄芩中含量最高的成分, 也是黄芩发挥药效的物质基础, 黄芩苷抗炎、抗变态和镇静作用较强, 且还有利胆解经作用^[4]。《中华人民共和国药典》(简称药典)规定黄芩中的黄芩苷含量按干燥品计算不得少于9.0%。同时黄芩中的汉黄芩苷在急性利尿实验中, 作用强度仅次于黄芩苷元。本文采用HPLC-二极管阵列检测器(DAD), 测定4种不同规格并头黄芩中黄芩苷和汉黄芩苷含量。

1 仪器、药品与试剂

Agilen 1100 型高效液相色谱仪, G1312A 二元泵, G13158DAD 检测器, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂), 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

甲醇(Fisher 公司, 色谱纯), 醋酸铵(分析纯, 北京益利精细化学品有限公司), 氨水(分析纯, 天津化学试剂三厂), 二次水(自制)。黄芩苷和汉黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所), 4种不同规格并头黄芩分别为: 规格(1)为二年生, 直径为0.5~0.7 cm, 有扭曲的纵皱和不规则网纹, 有稀疏的疣状细根痕, 断面黄色, 表面很粗糙; 规格(2)为二年生, 直径为0.7~1.0 cm, 有扭曲的纵皱和不规则网纹, 疣状细根痕较多, 断面黄色, 表面很粗糙; 规格(3)为二年生, 直径为0.1~0.4 cm, 较细小, 表面棕黄色, 断面黄色, 有纵皱和网纹; 规格(4)为二年生, 直径为1.5~2 cm, 并且有较多直径约0.4 cm的小细根, 整体粗细不均, 相差悬殊; 表面深黄色, 断面黄色, 纵皱和网纹较少, 少量顺纹, 表面相对光滑; 均经清华大学分析中心肖盛元博士鉴定。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件及系统适应性条件: 色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈分析柱(250 mm×4.6 mm, 5

收稿日期: 2004-06-21

基金项目: 国家973计划资助项目(G1999054404)

作者简介: 温华珍(1979-), 女, 江西石城人, 2002级硕士研究生, 研究方向为天然产物化学研究。 Tel: (010)62772265

* 通讯作者 E-mail: luoga@tsinghua.edu.cn

μm);流动相为A相:含0.05%醋酸铵、0.01%氨水的水相,B相:含0.05%醋酸铵、0.01%氨水的甲醇;检测波长:330 nm(汉黄芩苷)、280 nm(黄芩苷);体积流量:0.6 mL/min;进样量20 μL ;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱:0~10 min(0~20% B),10~30 min(20% B~40% B),30~45 min(40% B~60% B),45~50 min(60% B~100% B);理论塔板数按280 nm的黄芩苷峰计算,应不低于80 000,按330 nm的汉黄芩苷峰计算,应不低于15 000。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取黄芩苷和汉黄芩苷对照品各5 mg,加色谱甲醇溶解,分别转到50 mL的量瓶定容,配成0.1 mg/mL的对照品溶液。再用倍比稀释法依次稀释,黄芩苷和汉黄芩苷均为0.1、0.05、0.025、0.01、0.005、0.0025、0.002 mg/mL的7个对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:分别取(1)、(2)、(3)、(4)4种不同规格的并头黄芩粉碎,过40目筛;分别称取1 g,装入微量渗漉装置,加2.5 mL 50%中性乙醇浸泡1 h后,压实,再用27.5 mL 50%中性乙醇进行渗漉,控制渗漉速度,约1 h渗漉完,渗漉液稀释60倍;另取规格(2)并头黄芩粉末约0.10 g,精密称定,加无水甲醇50 mL浸泡12 h后,超声两次,每次15 min;3 000 r/min离心分离15 min,取上清液。稀释液和上清液用0.2 μm 微孔滤膜滤过。

2.4 波长的选择及色谱图:黄芩苷和汉黄芩苷在280、330 nm处均有吸收,但黄芩苷在280 nm处有最大吸收,汉黄芩苷在330 nm处有最大吸收,所以选280、330 nm双波长测定黄芩苷和汉黄芩苷含量。在上述液相色谱条件下,得到对照品和药材提取液的液相色谱图(图1),经过与相应对照品色谱图保留时间及紫外光谱对照,确认黄芩苷和汉黄芩苷的归属。

2.5 色谱柱及液相条件的选择:在实验过程中,试用了Angilent C_{18} 反相柱、Chromsil柱、Phenomenex prodigy柱、Phenomenex Luna C_{18} 柱。Angilent C_{18} 反相柱、Chromsil柱不能实现黄芩苷和汉黄芩苷有效分离,而Phenomenex prodigy柱柱效低,选Phenomenex Luna C_{18} 柱进行分离,分离效果较好。选用流动相时,尝试了含0.05%醋酸铵、0.1%醋酸的水相和含0.05%醋酸铵、0.1%醋酸的甲醇梯度、等度洗脱以及含0.5%醋酸的水相、0.5%醋酸的甲醇梯度、等度洗脱,均能将黄芩苷和汉黄芩苷对照品分开,但对于药材提取液,不能将黄芩苷和药材中其它组分分开。最终以含0.05%醋酸铵、0.01%氨水的水相和含0.05%醋酸铵、0.01%氨水的甲醇梯度洗脱。

2.6 提取条件的选择

规格(2)并头黄芩粉末用50%中性乙醇渗漉提取和常规甲醇超声提取,所得黄芩苷提取率分别为13.82%和13.50%,渗漉法提取率略高,而且渗漉法与实际生产更接近,所以本实验选择渗漉法提取黄芩。

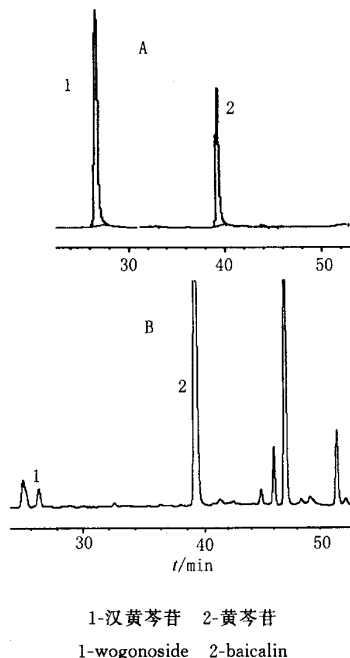


图1 对照品(A)和样品(B)HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

在黄芩药材提取时,对规格(3)并头黄芩分别用中性条件的25%、50%、75%乙醇和碱性条件(含0.08%的氨水)25%、50%、75%乙醇和水浸泡1 h及水浸泡12 h后渗漉,控制渗漉时间1 h。根据不同溶剂对黄芩苷和汉黄芩苷提取率的影响,提取溶剂选择50%的中性乙醇。

2.6.1 醇浓度的影响:黄芩苷提取率在中性条件为50%乙醇提取率>25%乙醇提取率>75%乙醇提取率;碱怀条件下为50%乙醇提取率>25%乙醇提取率≈75%乙醇提取率>水提取率>水浸泡12 h提取率,即醇浓度为50%乙醇提取黄芩苷时提取率较高。但醇浓度对汉黄芩苷提取率影响不明显。

2.6.2 碱性条件影响:黄芩苷提取率总体趋势为同浓度的中性乙醇提取率高于同浓度的碱性乙醇提取率。提取时用水浸泡12 h的黄芩苷含量最低。加碱液并未能提高黄芩苷的提取率。同时加碱对汉黄芩苷提取率影响不明显。所以选择50%中性乙醇提取黄芩中的黄芩苷和汉黄芩苷。

2.7 标准曲线制备:在上述条件下,黄芩苷和汉黄

芩苷分别在7个浓度点,每个浓度平行测定3次(均进样20 μL),用峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归,结果黄芩苷和汉黄芩苷的回归方程分别为: $Y=76\,083\,X-150.51$, $r=0.998\,5$; $Y=47\,437\,X-42.835$, $r=0.999\,5$;黄芩苷和汉黄芩苷线性范围均在0.04~2 μg 。

2.8 精密性试验:取配好的0.01 mg/mL黄芩苷和汉黄芩苷对照品溶液,连续进样5次和每隔24 h进样5次,测定黄芩苷日内精密性RSD为4.71%、日间精密性RSD为5.10%;汉黄芩苷日内精密性RSD为3.65%、日间精密性RSD为4.41%。

2.9 重现性试验:精密称取同一规格的并头黄芩药材粉末1 g(5份),按供试品溶液的制备方法制备,进样20 μL ,测得黄芩苷含量的RSD为3.01%,汉黄芩苷含量的RSD为4.95%。

2.10 稳定性试验:同一供试品溶液,按上述含量测定方法,间隔一定时间(0、2、4、6、8、12 h)重复进样,以峰面积计算,黄芩苷RSD为2.42%,汉黄芩苷RSD为1.06%,表明供试品溶液在12 h内比较稳定。

2.11 回收率试验:精密称取已知含量的同一药材粉末($n=3$),精密添加黄芩苷和汉黄芩苷对照品,按样品制备操作,测定计算黄芩苷的平均回收率为(99.02 $\pm$ 1.94)%,RSD为1.96%,汉黄芩苷的平均回收率为(97.48 $\pm$ 2.49)%,RSD为2.55%。

2.12 4种规格药材的黄芩苷和汉黄芩苷含量的测定:分别取(1)、(2)、(3)、(4)4个不同规格并头黄芩的粉末的渗漉稀释液,过0.2 μm 滤膜,进样20 μL ,并分别由标准线性方程求出黄芩苷和汉黄芩苷含量($n=3$),结果见表1。

表1 不同并头黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷含量

Table 1 Content of baicalin and wogonoside in different *S. scordifolia*

规格	黄芩苷/%	汉黄芩苷/%
(1)	12.89	0.277
(2)	13.82	0.22
(3)	11.75	0.235
(4)	10.85	0.27

3 讨论

3.1 药典规定黄芩药材的黄芩苷含量必须大于9%,本实验在考察4种不同规格并头黄芩时发现黄芩苷含量均高于药典规定,但药典并没有收载并头黄芩。4种规格并头黄芩的黄芩苷含量差异不大,且汉黄芩苷的含量差异也很小。并头黄芩在东北地区分布广泛,不同规格的并头黄芩中黄芩苷含量均超出药典要求,分析结果对扩大黄芩药源有参考意义。

3.2 不同醇浓度导致提取溶液颜色变化与黄芩苷提取率的对比:乙醇含量增高,抑制了黄芩苷的酶解,但同时可能加快了黄芩苷的氧化,乙醇含量越高,氧化程度越大,所以50%乙醇提取率高于75%乙醇提取率。但乙醇含量偏低不能很好地抑制黄芩苷酶解,黄芩苷提取率偏低,所以25%乙醇提取率低于50%乙醇提取率。醇浓度加大,提取液颜色向红颜色加深,25%的中性乙醇提取液为淡绿色,50%的中性乙醇提取液为黄色偏橘红,75%的中性乙醇提取液为红色。

3.3 碱性条件导致提取溶液颜色变化与黄芩苷提取率对比:碱性条件并未能提高黄芩苷的提取率,虽然黄芩苷为多酚羟基化合物,具有较强的酸性,易溶于碱性溶液,但由于碱性条件使黄芩苷更容易被氧化和酶解,所以加碱后各种不同醇浓度提取液的黄芩苷提取率都低于中性条件的黄芩苷提取率。水提取时,漉液很快变为棕绿色,稍微有些淡黄色;25%碱性乙醇提取时,漉液开始为红色,而后逐渐变为绿色;50%碱性乙醇和75%碱性乙醇提取的漉液由黄色转变至红色,没有变绿的现象。

3.4 浸泡时间加长导致提取溶液颜色变化与黄芩苷提取率对比:黄芩苷含量随浸泡时间加长而减少,醇浓度较低的提取溶液颜色逐渐变绿,醇浓度较高的提取溶液则随浸泡时间加长而逐渐变红色。浸泡时间加长,低醇浓度中的黄芩苷酶解变绿,高醇浓度中的黄芩苷被氧化变红。所以提取黄芩苷时浸泡时间一般以30~60 min为宜。

综上所述,提取液颜色变绿可能是酶解指标,提取液颜色变红可能是氧化指标。黄芩中含有黄芩苷等黄酮类成分,同时还含有酶,使得苷类成分非常容易酶解成绿色苷元,酶解生成的苷元性质很不稳定,在空气中继续氧化而变为醌类成分。通常醌型化合物具有颜色,对位的醌多呈现黄色,邻位的醌多呈现红色或橙色。在醇中提取液颜色变红可能是由于酶解时生成的大部分黄芩苷元和少量含邻位羟基的黄酮成分被氧化的缘故。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [3] Zhu Y M. *Record of Neimenggu Plant Medicine* (内蒙古植物药志) [M]. Vol 1. Huhhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 1989.
- [4] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Vol 1. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.