

UPLC同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A

刘金欣^{1,2}, 孟繁蕴^{1,2}, 张胜海⁴, 卢恒^{1,2}, 周晓腾^{1,2}, 侯静怡^{1,2}, 李耿^{1,3*}

1. 北京师范大学 中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875

2. 北京师范大学 资源学院资源生态与中药资源研究所, 北京 100088

3. 中日友好医院 全国中西医结合心血管病中心, 北京 100029

4. 北京中医药大学, 北京 100102

摘要: **目的** 建立用超高效液相色谱(UPLC)同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A 5种成分的方法。**方法** 采用UPLC色谱系统, BEH C₁₈色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸, 梯度洗脱, 体积流量为0.6 mL/min; 进样量为2 μL; 检测波长为280 nm。**结果** 本方法可在15 min内完成1次色谱分析, 黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A 5种成分之间有良好的分离度, 5种成分的浓度和各自峰面积之间有着良好的线性关系, 精密度、重复性及加样回收率的RSD均小于3.0%。**结论** 本方法快捷、准确, 重复性好, 能同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A 5种成分的量。

关键词: 黄芩; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩苷; 汉黄芩素; 千层纸素A; 超高效液相色谱

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)10-1477-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.023

Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, and oroxylin-A in *Scutellaria baicalensis* by UPLC

LIU Jin-xin^{1,2}, MENG Fan-yun^{1,2}, ZHANG Sheng-hai⁴, LU Heng^{1,2}, ZHOU Xiao-teng^{1,2}, HOU Jing-yi^{1,2}, LI Geng^{1,3}

1. Beijing Key Laboratory of Protection and Application of Chinese Medicinal Resources, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2. Institute of Natural Medicine and Chinese Medicine Resources, College of Resource Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100088, China

3. National Integrative Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

4. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To establish a UPLC method for the simultaneous determination of five constituents (baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, and oroxylin-A) in *Scutellaria baicalensis*. **Methods** Five constituents in *S. baicalensis* were simultaneously determined by UPLC with Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). With a gradient program of acetonitrile-0.1% formic acid at the flow rate of 0.6 mL/min, and the detection wavelength was set at 280 nm. **Results** Baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, and oroxylin-A in *S. baicalensis* were clearly and respectively separated in 15 min. The relationship between the concentration and the peak areas of the five constituents in *S. baicalensis* was all linear. The RSD of recovery, precision, and reproducibility was all less than 3.0%. **Conclusion** The method is rapid, simple, reliable, and accurate, and has been successfully used to the quantification of the five constituents in *S. baicalensis*.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; oroxylin-A; UPLC

黄芩是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 始载于公元前 100 多年的《神农本草经》, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的

功效, 常用于湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽、痈肿疮毒、胎动不安等病症的治疗^[1], 是中医临床上应用广泛的大宗药材。黄芩还是双黄连口服液、

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072999)

作者简介: 刘金欣(1986—)女, 在读博士研究生, 从事中药资源相关研究。E-mail: liujx_23@163.com

*通信作者 李耿 Tel: (010)84205625 E-mail: ligeng001@aliyun.com

黄芩复方颗粒、银黄片等常用中成药的重要原材料,受到世界的广泛关注,成为新药研究开发的热点。目前,野生黄芩主要来源于河北、内蒙古、山西、陕西、山东等地,不同产地的野生黄芩有效成分的量有所不同,尤以河北北部的野生黄芩为佳,素有“热河黄芩”之称,被列为我国传统的道地药材^[2-5]。黄芩中的主要活性成分为黄酮类化学成分,其中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 5 种成分量较高,活性明确,其量的高低是黄芩质量优劣的主要指标^[6-11]。本研究采用 UPLC 技术,建立了同时测定黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 5 种主要有效成分的方法,此方法简便、快捷、准确,可更全面、便捷地控制黄芩的质量。

1 仪器与试剂

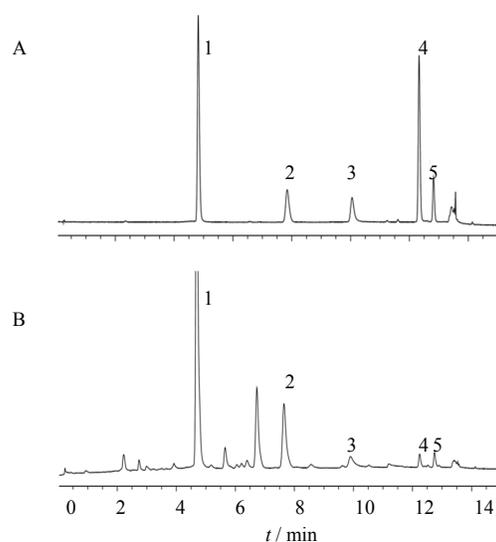
美国 Waters 超高效液相色谱 Accuricy (UPLC) 系统,包括二元超高压溶剂系统 (BSM)、自动进样样本管理器 (SM)、二极管阵列检测器 (PDA)、Empower 3 色谱工作站;美国热电公司 Thermo 超纯水机;德国赛多利斯 CP225D 电子分析天平;江苏昆山 KQ5200DE 超声波仪。乙腈 (色谱纯,美国 Fisher 公司),甲酸 (分析纯,北京化工厂),乙醇 (分析纯,北京化工厂),色谱用水:Thermo 超纯水机制备超纯水。

对照品黄芩苷 (批号 715-200111)、汉黄芩素 (批号 1514-200001) 购自中国食品药品检定研究院;汉黄芩苷 (批号 130523)、黄芩素 (批号 130624)、千层纸素 A (批号 130609),均购于上海融合医药科技有限公司,所有对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。黄芩样品:2013 年 8~10 月采于河北省承德市、秦皇岛市、承德县、围场县、滦平县、张北县、崇礼县和内蒙古自治区赤峰市、阿尔山市、东乌旗、霍林郭勒市、锡林浩特市等地,样品经北京师范大学中药所孟繁蕴教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters accuricy UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈 (B)-0.1%甲酸 (A),梯度洗脱 (0~9 min, 11%~19%B; 9~10 min, 19%~23%B; 10~13 min, 23%~36%B; 13~15 min, 36%~90%B);体积流量为 0.6 mL/min;进样量为 2 μL ;检测波长 280 nm;对照品和黄芩样品的色谱图见图 1。



1-黄芩苷 2-汉黄芩苷 3-黄芩素 4-汉黄芩素 5-千层纸素 A
1-baicalin 2-wogonoside 3-baicalein 4-wogonin 5-oroxylin A

图 1 对照品混合溶液 (A) 和黄芩样品 (B) 的色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference solution (A) and *S. baicalensis* sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品黄芩苷 2.25 mg、黄芩素 0.47 mg、汉黄芩苷 0.58 mg、汉黄芩素 0.82 mg、千层纸素 A 0.30 mg,用甲醇溶解并定容至 10 mL,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取已干燥的黄芩样品适量,粉碎,过 60 目筛,精密称取约 0.1 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加 70%乙醇 50 mL,称定质量,超声 40 min (功率 280 W,频率 40 kHz)后,放置室温,用 70%乙醇补足减失的质量,摇匀,静置至上层溶液澄清,取上清液过 0.22 μm 滤膜,续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下的对照品溶液,依次精密取黄芩苷对照品溶液 0.8、1.5、2.0、2.4、3.0、5.0 μL ;黄芩素对照品溶液 1.0、1.2、1.4、1.8、2.0、3.0 μL ;汉黄芩苷对照品溶液 0.5、0.8、1.0、2.0、4.0 μL ;汉黄芩素对照品溶液 0.4、0.5、0.8、1.2、1.5 μL ;千层纸素 A 对照品 0.5、0.8、1.0、1.2、1.8 μL ;按照“2.1”项下的色谱条件分别进样,测定峰面积。分别以各色谱峰面积为纵坐标 (Y),以进样量为横坐标 (X),绘制标准曲线,得到黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 的回归方程,见表 1。

2.5 精密度试验

取黄芩供试品溶液连续进样 6 次,测定,计算

表1 线性关系考察

Table 1 Investigation of linear relationship

| 成分 | 线性范围 / μg | 回归方程 | r |
|--------|-----------------|----------------------------|---------|
| 黄芩苷 | 0.180 0~1.125 0 | $Y=6\ 079\ 286 X-704\ 655$ | 0.999 1 |
| 黄芩素 | 0.047 0~0.141 0 | $Y=539\ 725 X-250\ 885$ | 0.999 4 |
| 汉黄芩苷 | 0.029 0~0.232 0 | $Y=6\ 290\ 908 X-121\ 018$ | 0.999 1 |
| 汉黄芩素 | 0.032 8~0.123 0 | $Y=9\ 705\ 871 X-206\ 820$ | 0.999 9 |
| 千层纸素 A | 0.015 0~0.054 0 | $Y=6\ 689\ 264 X-62\ 779$ | 0.999 3 |

各成分峰面积的 RSD 分别为黄芩苷 1.14%、黄芩素 1.86%、汉黄芩苷 1.15%、汉黄芩素 2.55%、千层纸素 A 1.62%。

2.6 稳定性试验

取“2.3”项下供试品溶液，按上述色谱条件，在 24 h 内每隔 4 h 进样测定各成分峰面积积分值，黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 的 RSD 值分别为 1.21%、1.62%、1.32%、1.87%、2.11%。

2.7 重复性试验

取同一黄芩样品，按“2.3”项下方法，平行操作制备 6 份供试品溶液，分别进样，测定其峰面积，计算黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 的质量分数平均值(n=6)，结果分别为 115、9.25、19.6、6.29、1.70 mg/g，其 RSD 值分别为 1.92%、2.60%、1.82%、1.39%、1.73%。

2.8 回收率试验

精密称取已测定的黄芩样品约 10.0 mg，平行

操作 6 份，加入的黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 对照品溶液，按“2.3”项下的方法制备供试品溶液 10 mL，分别进样，测定，计算回收率，结果黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 的回收率平均值分别为 102%、101%、102%、102%、102%，RSD 值分别为 1.45%、2.34%、2.20%、2.7%、2.60%。

2.9 样品测定

取各黄芩样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样，记录峰面积，按外标法计算各样品中各成分的质量分数，结果见表 2。

3 讨论

对乙腈、甲醇与不同浓度甲酸、醋酸、磷酸溶液的不同配比流动相系统进行考察，结果表明，以乙腈-0.1%甲酸溶液系统为流动相对黄芩各成分的分离效果较好，其色谱峰与相应对照品的色谱峰保留时间及紫外光谱一致；选择检测波长时，采用二

表2 5个成分的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of five constituents (n=3)

| 样品 编号 | 野生/栽培 | 产地 | 质量分数 / (mg·g ⁻¹) | | | | |
|----------|-------|-------|------------------------------|------|------|-------|--------|
| | | | 黄芩苷 | 汉黄芩苷 | 黄芩素 | 汉黄芩素 | 千层纸素 A |
| 1 | 野生 | 赤峰市 | 102.0 | 20.5 | 3.43 | 1.350 | 1.810 |
| 2 | 野生 | 阿尔山市 | 101.0 | 21.3 | 3.81 | 1.730 | 1.170 |
| 3 | 野生 | 东乌旗 | 76.2 | 17.1 | 3.37 | 1.740 | 2.060 |
| 4 | 野生 | 锡林浩特市 | 79.3 | 22.0 | 1.13 | 1.120 | 0.664 |
| 5 | 野生 | 霍林郭勒市 | 103.0 | 21.9 | 3.97 | 1.750 | 1.380 |
| 6 | 野生 | 承德围场 | 130.0 | 22.3 | 4.67 | 2.310 | 0.689 |
| 7 | 野生 | 崇礼县 | 112.0 | 23.5 | 3.44 | 1.750 | 1.090 |
| 8 | 野生 | 张北县 | 97.4 | 18.9 | 1.55 | 1.180 | 0.512 |
| 9 | 野生 | 承德市区 | 123.0 | 19.7 | 3.68 | 0.280 | 1.400 |
| 10 | 栽培 | 承德县 | 154.0 | 22.5 | 2.01 | 0.445 | 0.202 |
| 11 | 栽培 | 滦平县 | 160.0 | 25.0 | 2.52 | 1.380 | 0.600 |
| 12 | 栽培 | 秦皇岛市 | 127.0 | 21.5 | 2.85 | 1.210 | 0.836 |

极管阵列检测器, 分别对各指标成分的对照品溶液在 200~400 nm 进行了全波长扫描, 结果显示 5 个成分在 280 nm 处均有良好的紫外吸收强度, 因此最终选择在 280 nm 波长处同时检测 5 个成分, 各成分响应信号较稳定。

此前多采用高效液相色谱进行黄芩中黄酮类成分分析和指纹图谱研究^[12-14], 检测时间较长, 测定 6 个成分的量, 完成一次进样分析就需要 120 min, 且进样量及溶剂消耗量较大^[11,15], 而本研究采用 UPLC 方法, 在 15 min 内即可完成一次进样色谱分离, 各成分间分离良好, 溶剂消耗少。

采用本研究建立的 UPLC 方法对 12 个产地的黄芩药材样品进行测定, 测定结果显示, 仅有东乌和锡林浩特 2 个样品的黄芩苷量未达到《中国药典》2010 年版标准, 其他样品均符合要求; 栽培黄芩的黄芩苷量普遍高于野生黄芩, 而汉黄芩素、千层质素 A 的量则通常低于野生黄芩, 不同产地黄芩中的汉黄芩苷量差异很小, 不同产地的野生黄芩中黄芩素量差异很大。本研究样本量较小, 结果有一定参考性, 大样本实验或能进一步确证有关结论; 不同产地样品中的化学成分在上述差异, 与黄芩的药效活性及其道地性是否存在某种关联性, 尚待进一步深入研究。

本研究采用 UPLC 法, 在 15 min 内即可完成一次进样色谱分离, 可对黄芩中的 5 个指标性成分同时进行便捷、快速、准确的定量, 可用于控制其质量, 加强对黄芩药材、中间体、成药质量的整体控制。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 陶弘景. 名医别录 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [3] 苏 颂, 胡乃长. 图经本草 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1993.
- [4] 唐慎微. 证类本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [5] 苏 敬. 唐本草 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1981.
- [6] 徐丹洋, 陈佩东, 张 丽, 等. 黄芩的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 78-80.
- [7] 符 洪, 肖新月, 张南平, 等. 药用黄芩中主要化学成分分析 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(1): 42-47.
- [8] 战渤玉, 高 明, 李东霞, 等. 中药材黄芩的研究进展 [J]. 中医药信息, 2008, 25(6): 16-20.
- [9] Lu Y, Joerger R, Wu C. Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(20): 10934-10942.
- [10] 张 婷, 热西提美尔哈巴, 林 潇, 等. HPLC-MS/MS 法测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 711-713.
- [11] 侯学智, 张振秋, 尤春雪, 等. HPLC 测定黄芩中 6 个成分的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(11): 1010-1014.
- [12] 赵渤年, 于宗渊, 丁晓彦, 等. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 380-383.
- [13] 肖 蓉, 袁志芳, 王春英, 等. 不同产地黄芩药材 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 743-745.
- [14] 张振巍, 张娜娜, 石 磊, 等. 黄芩药材指纹图谱研究 [J]. 中国药师, 2013, 16(10): 1449-1451.
- [15] 潘鹏飞, 孙 菲, 李延雪. HPLC 法同时测定黄芩中黄芩苷, 黄芩素, 汉黄芩素的含量 [J]. 中国药师, 2012, 15(1): 75-76.