

# 韩信草的高效液相指纹图谱及多组分含量测定

潘伟东, 赵胜男, 杜义龙, 李艳荣, 王肖, 杨明宇, 潘海峰\*  
(承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000)

**[摘要]** **目的:**研究韩信草的 HPLC 指纹图谱,并建立同时测定韩信草中野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素及汉黄芩素含量的方法。**方法:**采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.6% 乙酸水-乙腈-四氢呋喃梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,0~40 min 检测波长 365 nm,40~65 min 检测波长 275 nm,进样量 10 μL,柱温 30 ℃。对 16 批韩信草药材进行了指纹图谱及含量测定研究,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A)进行分析。**结果:**野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素的线性范围分别为 5.125~82.00,7.375~118.0,1.550~24.80,7.188~115.0 mg·L<sup>-1</sup>(相关系数分别为 0.999 9,0.999 9,0.999 9,0.999 9);平均加样回收率分别为 103.37% (RSD 1.8%),100.63% (RSD 1.3%),104.03% (RSD 0.8%),98.39% (RSD 2.5%);16 批药材的 HPLC 指纹图谱共标定 28 个共有峰,并对其中 4 个进行了含量测定。**结论:**该方法准确可靠,重复性好,为控制韩信草药材的质量提供科学的依据。

**[关键词]** 韩信草; 指纹图谱; 野黄芩苷; 汉黄芩苷; 芹菜素; 汉黄芩素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0087-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020087

## HPLC Fingerprint Analysis and Multi-component Content Determination of *Scutellaria indica*

PAN Wei-dong, ZHAO Sheng-nan, DU Yi-long, LI Yan-rong, WANG Xiao, YANG Ming-yu, PAN Hai-feng\*  
(Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the HPLC fingerprint of *Scutellaria indica*, establishing a method for the content determination of scutellarin, wogonin, apigenin and wogonin, simultaneously. **Method:** The separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mixture of 0.6% acetic acid and acetonitrile and tetrahydrofuran as mobile phase in a gradient elution model (flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength were 365 nm from 0 to 40 minute and 275 nm from 40 to 65 minute, column temperature 30 ℃, sample size 10 μL). 16 batches of *S. indica* were analyzed with the developed HPLC fingerprint and determination methods, the data calculation was performed with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004A). **Result:** The linear range of scutellarin, wogonin, apigenin and wogonin were 5.125-82.00 ( $r=0.999\ 9$ ), 7.375-118.0 ( $r=0.999\ 9$ ), 1.550-24.80 ( $r=0.999\ 9$ ), 7.188-115.0 ( $r=0.999\ 9$ ) mg·L<sup>-1</sup>, respectively. The average recovery rates of scutellarin, wogonin, apigenin and wogonin were 103.37% (RSD 1.8%), 100.63% (RSD 1.3%), 104.03% (RSD 0.8%), 98.39% (RSD 2.5%), respectively. In the fingerprint, 28 common peaks of *S. indica* were marked and 4 peaks were determined. **Conclusion:** This method provides a scientific basis for controlling the quality of *S. indica*.

**[Key words]** *Scutellaria indica*; fingerprint; scutellarin; wogonin; apigenin; wogonin

韩信草辛、苦、寒,归心、肝、肺经,具有清热解毒、活血止血、散瘀消肿的功效<sup>[1-2]</sup>,现虽未载入《中国药典》,但作为地方特色药广泛用于治疗肝热烦

躁、肺热咳嗽、跌打肿痛、外伤出血、牙龈肿痛、毒蛇咬伤等<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明,韩信草中黄酮类化学成分具有抗病毒、抗肿瘤的作用<sup>[5]</sup>。目前,对

**[收稿日期]** 20140516(007)

**[基金项目]** 河北省高校重点学科建设项目

**[第一作者]** 潘伟东,在读硕士,从事中药分析研究,Tel:0314-2291186,Email:panweidong1223@163.com

**[通讯作者]** \*潘海峰,从事中药分析研究,Tel:0314-2291186,Email:phf2301@163.com

韩信草的研究报道较少,文献[6-8]对该植物的野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素等黄酮类成分进行了提取分离;文献[4]仅对野黄芩苷进行了测定含量。为进一步提高韩信草药材质量,本研究拟采用 HPLC 建立韩信草的指纹图谱,并同时测定野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素 4 个黄酮类成分含量,从定性、定量两方面对韩信草进行质量控制,以保证临床用药的安全、有效。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1200 系列高效液相色谱仪(G1322A 在线脱气机,G1311A 四元泵,G1316A 柱温箱,G1315D 二极管阵列检测器,G1329A 自动进样器,Chemstation 色谱工作站,美国安捷伦),AG-245 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多)。

**1.2 试药** 野黄芩苷(批号 140109,供含量测定用)、汉黄芩苷(批号 130216,供含量测定用)、芹菜素(批号 140224,供含量测定用)对照品购自上海融禾医药科技发展有限公司,纯度 >98%;汉黄芩素(批号 111514-200403)对照品购自中国食品药品检定研究院。甲醇、四氢呋喃、乙腈为色谱纯,水为娃娃哈纯净水,其他试剂为分析纯。

韩信草由承德民族师范学院董建新教授鉴定为唇形科黄芩属植物韩信草 *Scutellaria indica* 的干燥全草。药材编号及产地见表 1。

表 1 韩信草全草药材的编号及产地

Table 1 Number and producing areas of *Scutellaria indica*

编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间
S001	浙江	2013-04	S009	安徽	2013-04
S002	云南	2013-04	S010	湖南	2013-04
S003	河南	2013-04	S011	广西	2013-04
S004	福建	2013-04	S012	广东	2013-04
S005	云南	2013-04	S013	广西	2013-04
S006	河南	2013-03	S014	安徽	2013-04
S007	广西	2013-03	S015	福建	2013-03
S008	江苏	2013-03	S016	云南	2013-03

## 2 方法与结果

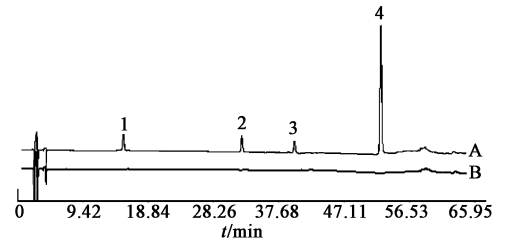
**2.1 色谱条件** Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.6% 乙酸水(A)-乙腈(B)-四氢呋喃(C)梯度洗脱,见表 2;检测波长 0~40 min 为 365 nm,40~65 min 为 275 nm;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。混合对照品色谱图见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取野黄芩苷对照品

表 2 韩信草流动相梯度程序

Table 2 Gradient elution table of *Scutellaria indica*

t/min	A/%	B/%	C/%	t/min	A/%	B/%	C/%
0	86	10	4	48	58	38	4
15	79	20	1	52	56	40	4
30	71	27	2	55	48	48	4
38	65	32	3	60	43	53	4
44	63	35	2	65	43	53	4



1. 野黄芩苷;2. 汉黄芩苷;3. 芹菜素;4. 汉黄芩素

图 1 (A)混和对照品(B)空白溶液 HPLC 色谱

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference substance (A) and blank (B)

10.25 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得野黄芩苷储备液;取芹菜素对照品 10.33 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容,摇匀,得芹菜素储备液;精密称取汉黄芩苷 12.29 mg,汉黄芩素 11.98 mg,置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容,摇匀,得汉黄芩苷、汉黄芩素储备液。精密量取野黄芩苷储备液 10 mL,芹菜素储备液 6 mL,汉黄芩苷、汉黄芩素储备液 6 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含野黄芩苷 0.082 0 mg,汉黄芩苷 0.118 mg,芹菜素 0.024 8 mg,汉黄芩素 0.115 mg 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取韩信草药材粉末(过 60 目筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 的甲醇溶液 25 mL,称定质量,超声提取 30 min,取出放置室温,再称定质量,用 60% 甲醇补足质量,摇匀,提取液于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 指纹图谱的建立

**2.4.1 精密度试验** 取同一药材(S005)供试品溶液,连续进样 5 次,按 2.1 项下色谱条件测定,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 RSD < 1.1%,相对峰面积 RSD < 2.6%,表明精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一药材(S005),按 2.3 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,分别进样,按 2.1 项下色谱条件测定,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 RSD <

1.0%, 相对峰面积 RSD < 3.0%, 表明重复性良好。

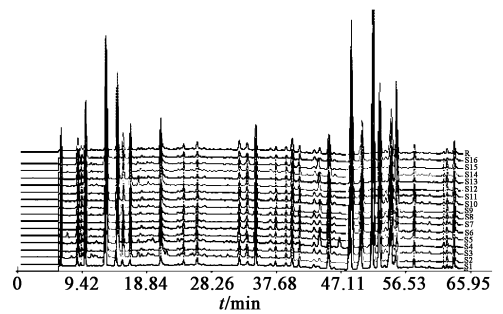
**2.4.3 稳定性试验** 取药材 (S005), 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按 2.1 项下色谱条件测定, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果相对保留时间 RSD < 1.2%, 相对峰面积 RSD < 3.0%, 表明样品在 24 h 内稳定。

**2.4.4 韩信草指纹图谱的建立** 将 16 批韩信草药材, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行分析, 记录色谱图。采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版进行数据处理, 设定  $S_1$  为参照图谱, 将其他样品的色谱峰与参照图谱自动匹配, 以中位数法生成其对照图谱, 并建立韩信草指纹图谱叠加图, 见图 2。与对照图谱匹配, 16 批样品的相似度均 > 0.85, 符合指纹图谱技术要求。

**2.4.5 共有峰的标定** 根据 16 批药材的指纹图谱检测结果, 选择图谱中峰面积较大、峰形较好的色谱峰为共有峰, 在对照图谱上共标定了 28 个共有峰。经过与对照品比对得知 7 号峰为野黄芩苷, 12 号峰为汉黄芩苷, 17 号峰为芹菜素, 23 号峰为汉黄芩素, 结果见图 3。色谱图中 23 号峰分离度好, 峰面积相对稳定, 故选此峰为参照峰。

**2.5 含量测定**

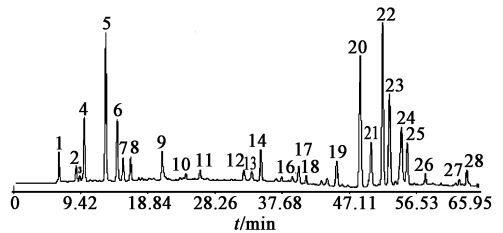
**2.5.1 线性关系考察** 以 2.2 项中混和对照品溶液作为 1 号溶液, 采用倍比稀释法制得系列浓度的混和对照品溶液 2, 3, 4, 5 号溶液。按照 2.1 项下色



R. 对照指纹图谱

图 2 16 批韩信草药材 HPLC 色谱叠加

Fig. 2 HPLC fingerprints of 16 batches of samples



7. 野黄芩苷; 12. 汉黄芩苷; 17. 芹菜素; 23. 汉黄芩素

图 3 16 批韩信草药材 HPLC 指纹图谱对照谱

Fig. 3 Reference chromatogram of 16 batches of *Scutellaria indica*

谱条件测定, 记录峰面积。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归分析, 结果见表 3。取 5 号溶液, 稀释后按 2.1 项下色谱条件分析, 色谱峰信噪比为 10:1 时对应浓度为定量限 (LOQ), 色谱峰信噪比为 3:1 时对应浓度为检测限 (LOD), 结果见表 3。

表 3 韩信草中 4 种成分线性回归分析

Table 3 Linear regression data of investigated compounds in *Scutellaria indica*

化合物	回归方程	r	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>	LOD/mg·L <sup>-1</sup>	LOQ/mg·L <sup>-1</sup>
野黄芩苷	$Y = 12.116X - 14.326$	0.999 9	5.125 ~ 82.00	0.192 2	0.640 6
汉黄芩苷	$Y = 7.350X - 7.812$	0.999 9	7.375 ~ 118.0	0.501 6	1.672 0
芹菜素	$Y = 26.605X - 8.384$	0.999 9	1.550 ~ 24.80	0.193 8	0.387 5
汉黄芩素	$Y = 69.365X - 68.137$	0.999 9	7.188 ~ 115.0	0.049 9	0.149 7

**2.5.2 精密度试验** 取同一药材 (S005) 供试品溶液, 连续进样 5 次, 按 2.1 项下色谱条件测定。结果野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素含量的 RSD 分别为 1.3%, 1.5%, 1.3%, 1.6%。

**2.5.3 重复性试验** 取同一药材 (S005), 按 2.3 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 按 2.1 项下色谱条件测定。结果野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素含量的 RSD 分别为 0.7%, 1.2%, 1.2%, 0.7%。

**2.5.4 稳定性试验** 取药材 S005, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按 2.1 项下色谱条件测定。结果野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素含量的 RSD 分别为 1.2%, 2.0%, 1.2%, 0.7%。

**2.5.5 加样回收率试验** 取已知野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素含量的同一药材 (S005) 9 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别加入 4 种对照品适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色

谱条件测定峰面积,按回归方程计算野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素的含量,回收率的测定结果见表 4。

表 4 韩信草中 4 种成分的加样回收率试验

成分	样品中量 /mg·g <sup>-1</sup>	取样量 /g	加入量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
野黄芩苷	0.533 4	0.252 8	0.119 9	104.92	103.37	1.79
		0.251 7	0.205 0	101.33		
		0.251 7	0.276 8	103.87		
汉黄芩苷	1.403 7	0.252 8	0.234 0	99.09	100.63	1.34
		0.251 7	0.295 0	101.20		
		0.251 7	0.540 0	101.61		
芹菜素	0.341 9	0.252 8	0.070 9	104.34	104.03	0.82
		0.251 7	0.062 0	103.06		
		0.251 7	0.163 7	104.69		
汉黄芩素	1.090 9	0.252 8	0.201 5	98.39	98.39	2.50
		0.251 7	0.287 5	100.85		
		0.251 7	0.465 0	95.94		

2.5.6 含量测定 分别精密称量 16 批韩信草各约 0.5 g,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,每个样品重复测定 3 次,依次测定各批样品,计算野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素、汉黄芩素的含量,结果见表 5。

表 5 16 批药材中 4 个成分的含量测定(n=3)

No.	野黄芩苷	汉黄芩苷	芹菜素	汉黄芩素
S001	0.725 1	1.283 2	0.374 5	1.139 3
S002	2.270 7	2.791 5	0.275 8	1.284 1
S003	0.714 3	1.215 1	0.387 8	1.119 2
S004	0.799 6	1.434 0	0.412 7	1.231 0
S005	0.533 4	1.403 7	0.341 9	1.090 9
S006	2.120 0	0.549 0	0.806 7	0.797 8
S007	0.741 1	1.312 8	0.386 9	1.146 9
S008	1.465 4	0.753 8	0.662 9	0.974 0
S009	0.664 8	1.250 7	0.419 5	1.195 7
S010	0.684 6	1.118 8	0.407 3	1.059 1
S011	2.255 8	0.627 0	0.837 3	0.809 8
S012	3.488 3	1.849 2	1.003 9	1.393 6
S013	1.546 5	0.797 5	0.646 7	0.988 9
S014	0.746 9	1.287 7	0.477 4	1.150 8
S015	0.139 5	0.053 0	1.425 5	0.983 7
S016	1.538 3	0.801 4	0.632 6	1.030 7

### 3 讨论

3.1 色谱条件的优化 本研究分别对水-甲醇、水-乙腈、水-乙腈-四氢呋喃、甲酸水-乙腈-四氢呋喃、乙酸水-乙腈-四氢呋喃等不同溶剂系统的不同比例进行了等度和梯度试验,并对 Agilent 不同系列的色谱

柱及检测波长进行了试验筛选。结果选用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以 0.6% 乙酸水溶液-乙腈-四氢呋喃为流动相进行梯度洗脱,在 0 ~ 40 min 是选择 365 nm,在 40 ~ 65 min 选择 275 nm 为检测波长时各色谱峰响应值适中,分离度最好。

3.2 样品处理方法的优化 本研究对韩信草不同的提取方法,索氏提取、回流提取以及超声提取进行了试验比较,并对不同的提取溶剂,甲醇、乙醇、不同浓度的甲醇以及不同的提取时间,20,30,40 min 进行了试验筛选。结果以 60% 的甲醇为提取溶剂,采用超声提取 30 min 时,样品中各成分基本提取完全。

本研究首次建立了韩信草的指纹图谱,并标出 28 个共有峰,相似度均大于 0.85,为韩信草的定性鉴别提供了重要理论依据。同时对野黄芩苷、汉黄芩苷、芹菜素以及汉黄芩素 4 个黄酮类有效成分进行了含量测定,进一步完善了韩信草药材的质量。由于实验条件的限制,韩信草中其他含量较高且相对稳定的成分,如 5 号,6 号,20 号,21 号及 22 号峰尚不能进行定性及定量分析,有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社, 2006:3234-3235.

[2] 李衍文. 中草药异名词典[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:963.

[3] 林建化, 陈剑. 韩信草可治疗牙龈肿痛[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(1):116.

[4] Ki H, Byung S, Kyung L, et al. Cytotoxic Flavonoids from *Scutellaria indica* [J]. Lanta Med, 1994, 60: 280-281.

[5] Miyaichi Y, Imoto Y, Tomimori T, et al. Studies on the constituents of *scutellaria* species. IX. On the flavonoid constituents of the Root of *Scutellaria indica* L. [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(9):3720-3725.

[6] Miyaichi Y, Kizu H, Tomimori Y, et al. Studies on the constituents of *Scutellaria species* XI. On the flavonoid constituents of the aerial parts of *Scutellaria indica* L. [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(7):794-797.

[7] Song W K, To D C, Tran M H, et al. Arginase II inhibitory activity of flavonoid compounds from *Scutellaria indica*[J]. Arch Pharm Res, 2013, 36:922-926.

[8] 黄衢, 陈学松. 韩信草药材质量标准研究[J]. 中国药业, 2010, 19(15):22-23.

[责任编辑 顾雪竹]