

不同采收期黄芩中黄酮类成分含量比例的研究

赵胜男, 李守拙*

(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:以黄芩中 19 种黄酮类成分含量比例为指标,考察不同采收期黄芩中黄酮类成分动态变化,以确定药材的最佳采收期,找出最优质黄芩为临床用药标准提供依据。方法:采用梯度洗脱方法进行色谱分离,TC-C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent),流动相乙腈与 0.1% 冰醋酸溶液进行梯度洗脱,检测波长 276 nm,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,以面积归一化法对数据进行分析。结果:春秋两季黄芩从一年生到三年生中黄酮类成分含量比例各不相同。结论:该方法为确定黄芩最佳采收期,为全面控制黄芩药材的质量提供可靠的科学依据。

[关键词] 黄芩; 采收期; 含量比例; 化学成分; 面积归一化法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0086-04

Study on the Content Ratio of Flavonoid Fractions in Different Harvesting Period of *Scutellariae Baicalensis*

ZHAO Sheng-nan, LI Shou-zhuo*

(Chengde Medical College, Hebei Key Laboratory of Research and Development for Traditional Chinese Medicine, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the dynamic change of flavonoid fractions in different harvesting period of *Scutellariae baicalensis* that use the content ratio of 19 kinds flavonoid fractions for the standard. And it can define the optimal harvesting period of medicinal materials. At the same time it can find the best *Scutellariae baicalensis* to provide basis for the standard of clinical medication. **Method:** A gradient mobile system was applied in the experiment. The HPLC separation was performed on a C₁₈ analytical column gradient eluted with acetonitrile-0.1% CH₃COOH, detection wavelength was set at 276 nm, at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the temperature of column was maintained at 25 °C and use the area normalization method for data analysis. **Result:** The content ratio of flavonoid fractions is different form a year to three years between spring and fall. **Conclusion:** The method provide reliable scientific basis for the the optimal harvesting period and quality control of *S. baicalensis*.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; harvest period; the content ratio; chemical constituent; area normalization method

黄芩是唇形科植物黄芩的干燥根,为古今常用中药,始载于《神农本草经》,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效。黄芩含有多种化学成分,其中

大多数为黄酮类成分,作者结合对照品^[1]与相关文献查阅^[2-5]以及运用液质联用技术获得的数据进行分析,鉴定出了 19 个黄酮类化学成分。选取赤峰与山东产区的不同采收期种植的黄芩,在比较不同采收期黄芩中黄酮类成分比例不同的同时,也对道地黄芩与非道地黄芩不同之处有一个初步的判断。2010 年版《中国药典》规定黄芩采收期为春秋二季,但不同采收期对黄芩药材化学组分及其质量有无影响,目前尚无明确的报道。对于黄芩采收期的研究,大都以单一成分黄芩苷或者是几个黄酮类成分的含

[收稿日期] 20111027(013)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2011031)

[第一作者] 赵胜男,硕士生,从事道地黄芩与非道地黄芩药材的种质资源及其物质基础之间差异的研究, Tel: 15233419639, E-mail: dadashengnan@yahoo.cn

[通讯作者] * 李守拙,高级工程师, Tel: 0314-2291186, E-mail: lysz0114@yahoo.com.cn

量为观察指标。中药是一个复杂体系,体现了多组分、多层次、多靶点的作用特点,它应该有其固定品种、固定产地、固定采收期,这就同时应该有固定的化学组成与含量的关系。本实验运用高效液相色谱法和面积归一化法,以19个黄酮类成分比例为观察指标,找出最适成分含量比例,进而为确定黄芩最佳采收期,筛选优质道地黄芩提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),DAD检测器,Agilent Chemstation System色谱工作站,梅特勒-托利多AG245型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药 栽培黄芩药材采自赤峰与山东地区,其中赤峰黄芩春秋两季各3个年份,分别为一年生、二年生、三年生,山东黄芩春季2个年份,分别为一年生、二年生,且在居群取样的基础上采集黄芩。药材产地由课题组人员亲自考察且药材由中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室的周世良研究员鉴定为黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi。黄芩苷(批号715-9506,纯度>99%)、黄芩素(批号111595-200604,纯度>99%)、汉黄芩素(批号111514-200403,纯度>99%)均购自中国药品生物制品检定所、汉黄芩苷(批号20090319,纯度>99%)、千层纸素A(批号20091124,纯度>99%)、白杨素(批号090518,纯度>99%)均购自上海顺勃生物工程有限公司。甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),冰醋酸、乙酸乙酯等试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent TC- C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.1%冰醋酸水溶液-乙腈,梯度洗脱(0~5 min, 21%乙腈; 5~12 min, 21%~22%乙腈; 12~30 min, 22%~30%乙腈; 30~50 min, 30%~58%乙腈), 柱温25℃, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长276 nm, 进样量10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称量对照品黄芩苷3.50 mg, 汉黄芩苷1.90 mg, 黄芩素2.02 mg, 千层纸素A 2.02 mg, 汉黄芩素3.88 mg, 白杨素2.82 mg, 分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。再分别取1 mL以上对照品溶液分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为35.0, 19.0, 20.2, 20.2, 38.8, 28.2 mg·L⁻¹的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称量黄芩粉末约0.25 g, 置平底烧瓶中, 精密量取溶剂(水-乙醇-乙

酸乙酯-冰醋酸 50:49:5:1)25 mL, 加热回流90 min, 静置, 过0.45 μm膜, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样6次, 每次进样10 μL, 测定黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素A的峰面积, RSD依次分别0.63%, 0.60%, 1.33%, 0.61%, 0.72%, 0.43%, 结果表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一样品6份, 按供试品溶液的制备项下方法制备供试品溶液, 进样10 μL, 测得6种组分的峰面积值, RSD依次分别0.68%, 0.98%, 1.68%, 1.02%, 1.09%, 1.32%, 结果表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h测定, 测得6种组分的峰面积值, RSD依次分别1.09%, 0.89%, 1.86%, 0.82%, 1.12%, 1.24%, 结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

3 结果

3.1 指纹图谱的建立 按照2.1项下的色谱条件与2.3项下的样品制备方法得到HPLC图, 结果见图1。通过对对照品的分析^[1]与相关文献^[2-5]的查阅, 并结合实验采集到的相关质谱数据进行综合分析, 标定出了19个黄酮类化学成分, 具体的色谱峰已经在图1中标注出来。从1~19号峰依次是白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷, 白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷, 5, 7, 3, 2', 6'-五羟基黄烷酮, 5, 7, 2'-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖酸苷, 黄芩素-7-O-葡萄糖酸苷(黄芩苷), 5, 6, 7-三羟基黄烷酮-7-O-葡萄糖酸苷, 去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖酸苷, 5, 6, 7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖酸苷, 木蝴蝶素-7-O-葡萄糖酸苷, 黄芩素-6-O-葡萄糖酸苷, 汉黄芩素-7-O-葡萄糖酸苷(汉黄芩苷), 5, 7-二羟基-6, 8-

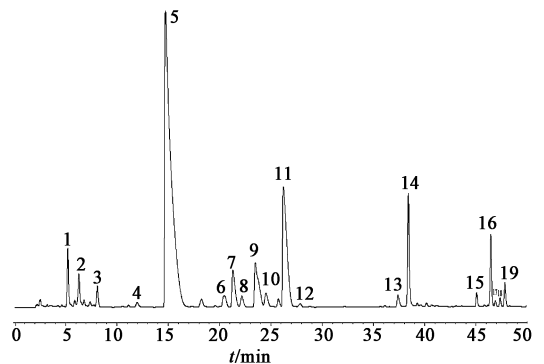
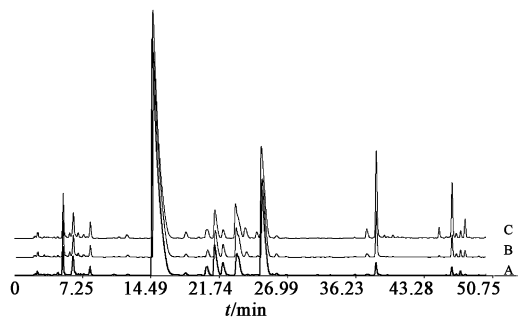


图1 黄芩指纹图谱

二甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖酸苷, 5,7,8-三羟基黄酮, 5,6,7-三羟基黄酮(黄芩素), 5,5'',6,6'',7,7''-六羟基-8,8''-二黄酮, 5,7-二羟基-8-甲氧基黄酮(汉黄芩素), 5,7-二羟基黄酮(白杨素), 5,2'-二羟基-6,7,8,6'-四甲氧基黄酮, 5,7-二羟基-6-甲氧基黄酮(千层纸素 A)。

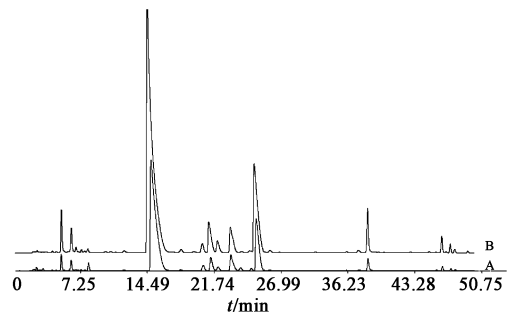
3.2 赤峰地区不同采收期黄芩的黄酮类成分比较 取秋季与春季 3 个年份的黄芩, 每批 20 株, 按照 2.1 项下的色谱条件与 2.3 项下的样品制备方法得到 HPLC 图, 以面积归一化法得到 19 个黄酮类化学成分的含量比例并取得平均值, 结果见表 1。秋季 3 个年份的黄芩从化学成分的组成上来说并没有看出明显的区别, 但从成分比例上来看有一定的差异性, 从外观上来看, 三年生的黄芩根部出现一层木质部, 而一、二年的黄芩并没有, 说明三年为黄芩成熟期, 化学组成与量的关系处于一种平衡状态, 为适宜采收期。结果见表 1 与图 2。从表 1 中看出秋季黄芩随着年份的增长 5, 8, 9, 11 号峰所占的含量比例越来越少, 而 13, 14, 15, 16, 18, 19 号峰所占的含量比例越来越多, 其他组分如 1, 2, 3, 4, 10 号峰所占的含量从一年到二年有明显增长, 从二年到三年几乎无明显变化。而春季 3 个年份的黄芩从化学成分含量比例上看区别反而不是非常明显。对于春秋两个季度的黄芩比较来说, 秋季采收的黄芩明显随着年份的增长其化学成分的含量比例处于一种动态变化过程, 而春季采收的黄芩这种特点不是非常明显, 可能此时期采收的黄芩是处于一种相对原始的静止状态, 从植物学来说秋季更适宜采收黄芩。



A. 秋季一年生黄芩; B. 秋季二年生黄芩; C. 秋季三年生黄芩

图 2 赤峰秋季三个年份的指纹图谱比较

3.3 不同产地黄芩的比较 取山东地区秋季一年、二年种植黄芩, 每批 20 株, 按照 2.1 项下的色谱条件与 2.3 项下的样品制备方法得到 HPLC 图, 以面积归一化法得到 19 个黄酮类化学成分的含量并取得平均值, 结果见表 1。单从指纹图谱上来比较, 两个地区的黄芩对应生长年份仍然无法明显区别开来, 结果见图 2, 3。而从化学成分的含量之间的比例上来看, 两个地区的黄芩都有其自己特有的含量比例, 不同地区黄芩有明显的区别, 结果见表 1。



A. 秋季一年生黄芩; B. 秋季二年生黄芩

图 3 山东秋季两个年份的指纹图谱比较

表 1 不同采收期黄芩样品中黄酮类成分含量的比例 (%)

采收期	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
赤峰秋一年	1.72	1.47	0.87	0.18	61.05	1.02	3.34	1.28	6.29	0.64	16.40	0.37	0.16	1.37	0.04	0.53	0.10	0.40	0.16
赤峰秋二年	2.29	1.77	0.96	0.26	53.97	0.95	3.29	1.23	6.01	0.77	13.00	0.44	0.54	5.83	0.19	2.30	0.33	0.45	0.99
赤峰秋三年	2.27	1.74	1.00	0.25	51.33	1.10	3.41	1.12	5.66	0.61	11.74	0.36	0.83	7.55	0.41	2.67	0.34	0.53	1.12
山东秋一年	2.00	1.49	0.72	0.11	62.76	1.17	2.80	1.46	3.96	0.46	16.92	0.24	0.18	1.72	0.03	0.47	0.06	0.43	0.15
山东秋二年	2.46	1.81	0.40	1.15	54.67	0.74	3.74	1.46	3.86	0.40	14.60	0.33	0.62	6.71	0.13	1.96	0.17	0.45	0.38
赤峰春一年	2.28	1.86	0.91	0.26	58.23	0.97	3.77	1.17	7.01	0.69	14.47	0.45	0.27	2.03	0.12	0.81	0.13	0.54	0.30
赤峰春二年	2.20	1.92	0.97	0.28	56.34	0.97	3.97	1.12	6.74	0.78	14.39	0.43	0.38	2.82	0.10	1.34	0.19	0.46	0.45
赤峰春三年	2.25	2.12	0.80	0.24	56.44	1.15	3.41	1.51	5.63	0.33	11.65	0.47	0.48	3.19	0.18	1.59	0.23	0.49	0.58

4 讨论

人们一直以黄芩苷的量来判断黄芩的质量, 认为黄芩苷的量越高, 黄芩的质量越好, 后来又以几种化学成分来判断, 但仍然认为其含量越高, 质量越

好。从本实验可看出山东秋季一年黄芩苷的含量为最高, 其次为赤峰秋季一年, 但是一年并不是最佳采收期。每一种中药都应有固定品种、固定产地、固定采收期, 这就同时应该有固定的化学组成和化学组

HPLC 测定不同产地辣蓼中槲皮素的含量

高雅¹, 张可锋², 朱华^{3*}

(1. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004;
3. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 测定辣蓼药材中槲皮素的含量, 测定 10 个产地辣蓼中槲皮素的含量。方法: Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸(50:50)等度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 室温, 检测波长 365 nm, 进样量 20 μL。结果: 槲皮素标准曲线回归方程为 $A = 73.185C - 21.47$ ($r = 0.9995$), 在 0.004 ~ 0.014 g·L⁻¹ 线性关系良好, 平均回收率为 99.29%, RSD 1.30%。结论: 所用方法分离效果好, 简便、准确, 可用于辣蓼药材的质量控制。

[关键词] 辣蓼; 槲皮素; 高效液相色谱法; 不同产地

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0089-03

HPLC Determination of Quercetin in *Polygonum flaccidum* from Different Growing Areas

GAO Ya¹, ZHANG Ke-feng², ZHU Hua^{3*}

(1. Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China;

[收稿日期] 20110919(001)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 10100027-1)

[第一作者] 高雅, 硕士, 从事生药质量及活性成分药效研究, Tel: 13977314085, E-mail: svidy@163.com

[通讯作者] * 朱华, 教授, 博士, 博士生导师, 从事生药质量与开发, E-mail: xueshengcailiao@163.com

成与含量的关系, 应该遵从中药的道地性。

本实验对于取样问题尤其注意, 认为每一次实验的样品来源尤其重要, 样品的处理更是重中之重。在实验过程中发现在一株黄芩中分成上中下三段后取样, 得到的结果有很大的差异, 认为不同取样部位对试验的影响较大, 所以本实验在处理样品时采取整根研磨后取样的方法, 而且每批样品选取 20 株测定后取平均值, 这就保证了取样的均衡性, 使得得到的数据更加可靠。

不同采收期的黄芩药材的化学组成与量的关系有一定的差异, 通过多种黄酮类成分含量的比例对不同采收期黄芩药材进行综合宏观分析, 有利于全面控制药材质量, 促进黄芩药材及临床用药质量控制的全面提高, 为区分道地黄芩与非道地黄芩做好了准备。

[参考文献]

[1] 沈红, 段金殿, 钱大玮, 等. 黄芩及复方野马追胶囊中

黄酮类成分的 LC-MS/MS 分析[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1425.

[2] Emika Ohkoshi, Tomomi Nagashima, Hiroyasu Sato, et al. Simple preparation of baicalin from *Scutellariae Radix* [J]. *J Chromatography A*, 2009, 1216(11): 2192.

[3] Shang Xiao fei, He Xi-rui, He Xiao-ying, et al. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 279.

[4] Jian Han, Min Ye, Man Xu, et al. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatography B*, 2007, 848(2): 355.

[5] 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.

[责任编辑 顾雪竹]