

• 质量标准 •

高效液相色谱法测定黄芩愈伤组织中 黄芩苷、黄芩素含量

李晓明, 罗毓健, 袁媛, 黄璐琦*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究黄芩愈伤组织中黄芩苷, 黄芩素的含量测定方法。方法: 采用 HPLC 法测定黄芩愈伤组织中黄芩苷, 黄芩素的含量。结果: 黄芩愈伤组织中黄芩苷, 黄芩素的含量分别为 0.39% 和 0.051%。结论: 建立了黄芩愈伤组织中黄芩苷, 黄芩素的含量测定方法。

[关键词] 黄芩; 黄芩苷; 黄芩素; 愈伤组织; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0001-03

HPLC Determination of Baicalin and Baicalein in the Callus of *Scutellaria Baicalensis Cpeorgi*

LI Xiao-ming, LUO Yurjian, YUAN Yuan, HUANG Lu-qi*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of baicalin and baicalein in the callus of *Scutellaria Baicalensis Cpeorgi*. **Methods:** The HPLC was used. **Results:** The contents of baicalin and baicalein in the callus of *Radix Scutellaria Baicalensis Cpeorgi* were 0.39% and 0.051% respectively. **Conclusion:** The developed method can be used for determination of baicalin and baicalein in the callus of *Scutellaria Baicalensis Cpeorgi*.

[Key words] *Scutellaria Baicalensis Cpeorgi*; baicalin; baicalein; callus; HPLC

黄芩是我国常用中药材之一, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效^[1]。随着黄芩用量加大, 人们对其过度挖采, 野生资源锐减, 加剧了黄芩资源的破坏, 黄芩已被我国列为三级保护濒危植物^[2]。目前, 植物组织培养体系的建立可以为药材质量成因研究提供可靠的受控试验平台。

本文采用高效液相色谱法对黄芩愈伤组织中的主要化学成分黄芩苷、黄芩素进行了含量测定研究,

为黄芩有效成分积累的机制研究提供了化学技术平台。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪, Waters2996 二极管阵列检测器; 对照品黄芩苷、黄芩素均购自中国药品生物制品检定所; 黄芩苷(批号: 110715-200815; 供含量测定用)、黄芩素(批号: 111595-200604; 供含量测定用)。分析纯甲酸, 色谱纯乙腈(Fisher 公司), 高纯水为本所自制。

黄芩无菌苗由中国中医科学院中药所分子生药试验室保存。选取 10~15 d 龄的黄芩无菌苗, 将其茎切成 0.5 cm 小段, 在黑暗条件下, 放在含有 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA、0.5 mg·L⁻¹ 2, 4-D、1.0 mg·L⁻¹ NAA 的 MS 固体培养基上诱导愈伤组织, 30 d 后收集愈伤组织, 冷冻干燥后, 备用。

[收稿日期] 2008-11-26

[基金项目] 国家中医药管理局项目(06-07ZP51); 北京市科技新星项目(2008B82); 中国中医科学院自主选题(ZZ2008062)

[通讯作者] * 黄璐琦, Tel: (010) 64052409; E-mail: huangluqi@263.net.

2 方法与分析条件

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈-水-甲酸(23: 77: 1.0) (A); 乙腈-水-甲酸(80: 20: 1.0) (B); 梯度洗脱, 梯度洗脱程序为: 0~ 15 min, 100% (A); 15~ 25 min, 100% ~ 87% (A); 25~ 40 min, 87% ~ 52% (A); 40~ 60 min, 52% ~ 0% (A)。检测波长 280 nm; 分析时间 60 min。柱温: 30 ℃; 在此条件下黄芩苷、黄芩素与其他成分能达到有效分离(见图 1)。

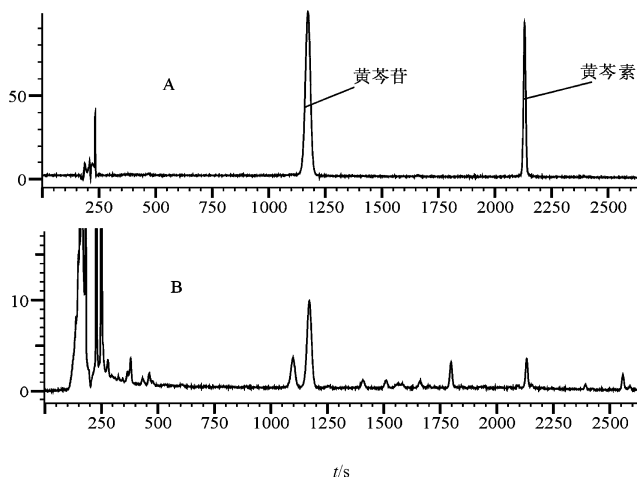


图 1 黄芩的液相色谱图

A. 对照品(黄芩苷、黄芩素) B. 黄芩愈伤组织样品

2.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品 5.2 mg, 黄芩素对照品 1.9 mg 精密称定, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀。精密吸取黄芩苷对照品液 1 mL, 黄芩素对照品液 0.8 mL 于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成含黄芩苷(20.8 μg·mL⁻¹)、黄芩素(6.08 μg·mL⁻¹) 对照品的混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取黄芩愈伤组织样品(40 目)0.10 g 左右, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇-水(3: 1)25 mL, 称定重量, 超声提取 30 min, 取出, 再称定重量, 用甲醇-水(3: 1)补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

测定法自动进样器, 对照品溶液 6 μL, 供试品溶液 10 μL, 测定, 即得。

3 结果

3.1 线性关系考察 精密吸取上述对照品混合溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 μL, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, 黄芩苷、黄芩素量为横坐标, 绘制标准曲线。结果表明: 黄芩苷在 0.041 6 ~ 0.416 μg 范围内具有良好的线性关系, 计算得回归方程为: $Y = 3.49 \times 10^6 X + 8.61 \times 10^{-3}$, $r =$

0.999 5; 黄芩素在 0.012 16 ~ 0.121 6 μg 范围内具有良好的线性关系, 计算得回归方程为: $Y = 4.81 \times 10^6 X + 3.05 \times 10^{-3}$, $r = 0.998 9$ 。

3.2 检测限、定量限考察 将黄芩苷、黄芩素对照品溶液进行稀释, 测得最低检测限分别为 0.003 00 μg, 0.001 22 μg, 定量限分别为 0.01 μg, 0.004 μg。

3.3 精密度试验 精密吸取黄芩苷、黄芩素对照品溶液, 重复进样 5 次, 求得相对标准偏差, 结果表明黄芩苷和黄芩素的 RSD 分别为 0.32% 和 0.66%。

3.4 稳定性试验 按供试品制备方法对同一批样品(批号)制成供试品溶液, 在所确定的 HPLC 条件下, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 24 h 测定, 结果表明, 在 24 h 内的黄芩苷和黄芩素的 RSD 分别为 0.50% 和 1.25%。

3.5 重复性试验 按供试品制备方法, 对同一愈伤组织样品制成 5 份供试品溶液, 在所确定的 HPLC 条件下进行测定, 求得相对标准偏差, 结果黄芩苷和黄芩素的 RSD 分别为 2.90% 和 2.98%。

3.6 加样回收试验 采用加样回收法, 精密称取黄芩愈伤组织样品 0.1 g 左右。精密添加对照品溶液适量, 按样品测定法测定黄芩苷、黄芩素的含量, 结果见表 1。

表 1 加样试验结果

样品	称重 (g)	已知含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
黄芩苷	0.114 6	0.429	0.400	0.824	98.75		
	0.099 0	0.370	0.400	0.760	97.50		
	0.105 3	0.394	0.400	0.791	99.25	98.80	0.79
	0.104 3	0.390	0.400	0.786	99.00		
	0.101 0	0.378	0.400	0.776	99.50		
黄芩素	0.114 6	0.058 4	0.053	0.110 7	98.68		
	0.099 0	0.050 5	0.053	0.103 6	100.21		
	0.105 3	0.053 7	0.053	0.107 5	101.51	99.82	1.15
	0.104 3	0.053 2	0.053	0.106 1	99.81		
	0.101 0	0.051 5	0.053	0.104 1	99.24		

3.7 样品测定结果 按上述方法测定黄芩愈伤组织中黄芩苷和黄芩素的含量, 结果黄芩苷为 0.39%, 黄芩素为 0.051%。

4 讨论

与传统种植技术不同, 利用植物愈伤组织培养体系生产药用植物有效成分, 是一种高效、快速、低廉的方法。利用 HPLC 测定复方中黄芩苷是常用的研究方法^[3,4]。本研究建立 HPLC 检测黄芩愈伤组织中黄酮类有效成分含量的方法, 研究表明利用该

方法可以对黄芩愈伤组织中黄芩苷、黄芩素含量进行定量检测,该方法的建立为利用黄芩愈伤组织生产黄酮类有效成分,并为研究其积累的机制提供化学技术平台。

[参考文献]

[1] 徐国钧,何宏贤,徐珞珊,等. 中国药材学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:398.

- [2] 邵玺文,韩梅,杨利民. 我国黄芩野生驯化研究进展[J]. 中草药,2006,37(7):2-5.
- [3] 王厚伟,高德民,田景振. 高效液相色谱法测定复方黄芩消炎片中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(4):13.
- [4] 陈两绵,王锦玉,全燕,等. HPLC同时测定双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷及连翘苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):18.