

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.020

高效液相色谱法同时测定黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量

王云龙^{1,2}, 刘春生², 陈立柱¹, 房 岐¹

(1. 黑龙江省鸡西市食品药品检验检测中心, 黑龙江 鸡西 158100; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要:目的 建立同时测定黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 335 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。结果 野黄芩苷质量浓度在 24.38~243.80 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=6$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 黄芩叶中野黄芩苷的平均回收率为 98.92%, RSD 为 0.90% ($n=6$)。结论 该方法操作简便, 专属性强, 准确度高, 重复性好, 可用于黄芩茎、叶、花中野黄芩苷的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 黄芩; 野黄芩苷; 茎; 叶; 花; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)17-0076-03

Simultaneous Determination of Scutellarin in the Stems, Leaves and Flowers of *Scutellaria Baicalensis* by HPLC

WANG Yunlong^{1,2}, LIU Chunsheng², CHEN Lizhu¹, FANG Qi¹

(1. Jixi Food and Drug Inspection and Testing Center, Jixi, Heilongjiang, China 158100; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China 100102)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of scutellarin in the stems, leaves and flowers of *Scutellaria baicalensis*. **Methods** The chromatographic column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid aqueous solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 335 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of scutellarin was 24.38-243.80 μg/mL($r=0.999\ 9$, $n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recovery of scutellarin in the leaves of *Scutellaria baicalensis* was 98.92% with RSD of 0.90% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, specific, accurate and reproducible, which can be used for the content determination of scutellarin in stems, leaves and flowers of *Scutellaria baicalensis*.

Key words: HPLC; *Scutellaria baicalensis*; scutellarin; stem; leaves; flower; content determination

黄芩为大宗药材, 源于唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 用于治疗各种热证和湿

证^[1], 采收时仅保留地下主根作为药用部位, 地上部分茎、叶、花往往当作废弃物处理, 造成大量资源浪费。野

第一作者: 王云龙, 男, 博士研究生, 副主任药师, 研究方向为药效物质基础、质量控制与新药研发, (电子信箱)379005534@qq.com。

及测定杂质种类有限, 不能全面分析葛根和丹参提取回收乙醇中挥发性杂质的含量和变化趋势, 但对药品生产中类似回收乙醇的使用具有指导意义。

参考文献

- [1] 胡昌勤, 张 夏. 化学药品杂质谱控制的现状与展望[J]. 药学报, 2019, 54(12): 2214-2231.
- [2] 曹雨震. 气相色谱法测定药用酒精中挥发性杂质[J]. 中国药学杂志, 1990, 25(2): 96-97.
- [3] 徐小力, 青旺旺, 邹佳佳, 等. 气相色谱-质谱联用法测定不同厂家盐酸二甲双胍缓释片中 *N*-亚硝基二甲胺的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(24): 2531-2534.
- [4] 覃济恒, 张兆佳, 王海燕, 等. 气相色谱法测定注射用血栓通(冻干)中两种成分的残留[J]. 大众科技, 2020, 22(8): 45-47.
- [5] 兰 文, 刘 轶, 李晓燕. 气相色谱法测定盐酸阿莫地喹中乙醇及醋酸的残留量[J]. 中国药师, 2019, 22(11): 2105-2107.
- [6] 刘树春, 安 彦, 王 卫. 顶空气相色谱法测定氯化可的松中有机挥发性杂质[J]. 天津药学, 2002, 14(8): 77-78.

- [7] 王 森, 梁蔚阳, 谢正福. 顶空气相色谱法测定乙酸纤维素中有机挥发性杂质[J]. 药物鉴定, 2008, 17(24): 30-31.
- [8] 吕 尚, 魏惠珍, 饶 毅, 等. 静态顶空气相色谱法测定不同药用料中 4 种有机挥发性杂质[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(11): 2012-2017.
- [9] 徐艳梅, 郭永辉, 裴丽娟, 等. 顶空-气相色谱法测定依度沙班原料药中 8 种有机溶剂[J]. 化学分析计量, 2020, 29(4): 83-87.
- [10] 马秋冉, 杨 星, 杨秀玉, 等. 顶空气相色谱法检测羧基甲硝唑对照品中的残留溶剂[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(6): 56-60.
- [11] 文松松, 牛 冲, 毕晓杰, 等. 气相色谱-质谱法测定盐酸雷尼替丁中基因毒性杂质[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(18): 2153-2156.
- [12] 吴兆伟, 杜 凯, 王 琳, 等. GC-MS 法测定缬沙坦中的 *N*-亚硝基二甲胺[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(20): 2478-2481.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 480-483.

(收稿日期: 2020-11-17; 修回日期: 2021-01-28)

黄芩苷是黄芩地上部分的主要成分^[2-3],具有抗肿瘤^[4]、神经保护^[5]、抗炎^[6-7]等药理作用,目前尚无同时测定黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量的研究。本研究中建立了同时测定黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量的高效液相色谱法,为其质量标准的制订和进一步开发利用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC2010 A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);XPE205 型电子天平(德国 Mettler Toledo 公司,精度为 0.01 mg);XM-300UVF 型智能静音超声波清洗机(小美超声仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz)。

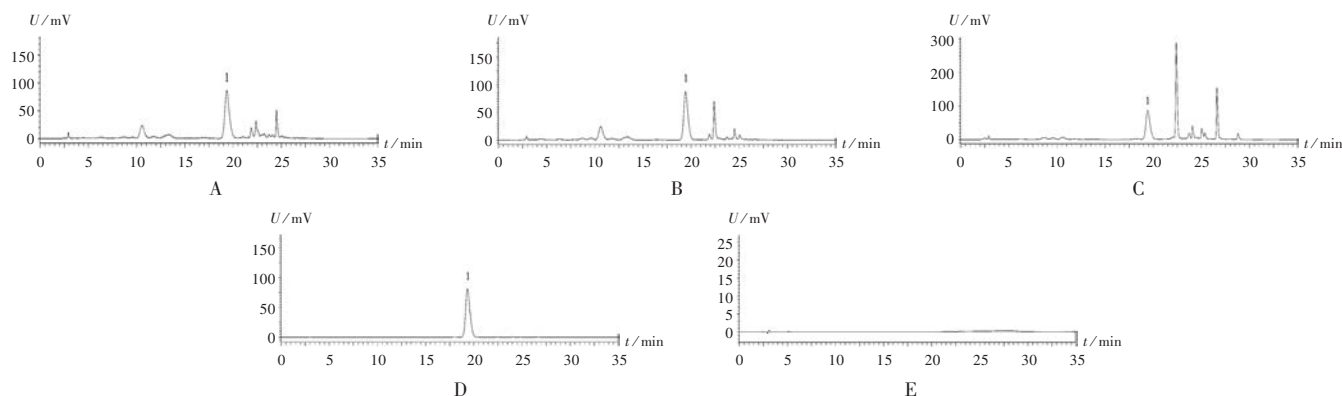
1.2 试剂

野黄芩苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为 Y24F11Y16967,纯度为 98.0%);甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);黄芩茎、叶、花 3 批样品均采自黑龙江省鸡西市黄芩栽培基地,采集时根据种植面积平均分为 3 个区域,每个区域随机采取 2 株,共 6 株。样品采集后,每株分别摘取叶和花,除去杂质,干燥,得干燥叶和花;茎切段,干燥,得干燥茎。所得样品经鸡西市食品药品检验检测中心杨立志主任药师鉴定为黄芩的干燥茎、叶和花。样品来源及相关信息见表 1。

表 1 样品来源及相关信息

Tab. 1 Sources and related information of the samples

样品编号	来源	生长年限(年)	采集时间
1	鸡东县东保中药材种植农民专业合作社	2	2020 年 7 月
2	密山市康华中药材种植专业合作社	2	2020 年 8 月
3	黑龙江靖龙农产品有限公司	6	2020 年 7 月



1. 野黄芩苷

A. 供试品溶液(茎) B. 供试品溶液(叶) C. 供试品溶液(花) D. 对照品溶液 E. 阴性对照药材溶液

图 1 高效液相色谱图

1. scutellarin

A. Test solution(stem) B. Test solution(leaf) C. Test solution(flower) D. Reference solution E. Negative reference medicinal material solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.4%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min 时 35% A, 15~25 min 时 35% A~80% A, 25~32 min 时 80% A~35% A, 32~35 min 时 35% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:335 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取野黄芩苷对照品 24.88 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶解并定容,即得质量浓度为 243.82 μg/mL 的对照品贮备液,精密吸取 4 mL,置 10 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇定容,混匀,即得质量浓度为 97.53 μg/mL 的对照品溶液。分别取 3 号样品的茎、叶、花,研成细粉,过 4 号筛,取茎粉末 0.50 g、叶粉末 0.13 g、花粉 0.25 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇定容,密塞,静置 30 min,超声处理(功率为 300 W,频率为 40 kHz)30 min,放冷,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。取缺黄芩茎、叶、花的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照药材溶液各适量,按 2.1 项下色谱条进样测定。结果供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,阴性对照无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.2 项下对照品贮备液 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇定容,摇匀,得系列质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、对

照品溶液质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 25\,881X + 93\,582$ ($r = 0.999\,9$, $n = 6$)。结果表明, 野黄芩苷质量浓度在 $24.38 \sim 243.80\, \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取黄芩叶(3号样品), 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果野黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.31% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取黄芩叶(3号样品) 0.13 g , 精密称定, 共6份, 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定。结果野黄芩苷含量的 RSD 为 1.53% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取黄芩叶(3号样品), 依法制备供试品溶液, 分别于 $0, 2, 4, 8, 16, 24, 48\text{ h}$ 时按2.1项下色谱条件进样测定。结果野黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.92% ($n = 7$), 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

加样回收试验: 取已知含量的黄芩叶(3号样品)粉末 65 mg , 精密称定, 共6份, 分别置 50 mL 容量瓶中, 精密加入2.2项下对照品贮备液 10 mL , 用 70% 乙醇定容, 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 并计算加样回收率。结果见表2。

表2 黄芩叶中野黄芩苷加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery test of scutellarin in the leaves of *Scutellaria baicalensis* ($n = 6$)

取样量 (mg)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
65.12	2.449	2.438	4.863	99.02	98.92	0.90
65.23	2.453	2.438	4.850	98.32		
65.28	2.455	2.438	4.903	100.41		
65.03	2.445	2.438	4.830	97.83		
65.19	2.451	2.438	4.856	98.65		
65.30	2.455	2.438	4.875	99.26		

2.4 样品含量测定

分别取3批黄芩茎、叶、花, 各3份, 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 采用外标法计算野黄芩苷的含量, 结果见表3。可见, 黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量由高至低依次为叶、花、茎, 叶中野黄芩苷的含量为茎或花的2~3倍。3批样品中野黄芩苷含量

表3 黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量测定结果($\%$, $n = 3$)

Tab. 3 Content determination of scutellarin in the stems, leaves and flowers of *Scutellaria baicalensis* ($\%$, $n = 3$)

样品编号	茎	叶	花
1	0.94	3.67	1.19
2	1.11	3.19	1.74
3	1.08	3.77	1.94

差异不大, 表明生长年限对黄芩茎、叶、花中野黄芩苷含量的影响不显著。

3 讨论

在前期试验中发现, 采用高效液相色谱法测定时, 黄芩茎、叶、花中野黄芩苷色谱峰的信号较强, 故选择野黄芩苷为检测指标。考察了不同提取方法(70% 乙醇超声提取、 70% 乙醇回流提取、甲醇超声提取、甲醇回流提取)对含量测定结果的影响, 结果以 70% 乙醇为提取溶剂时, 先静置 30 min , 再超声处理 30 min , 黄芩茎、叶、花中野黄芩苷的含量最高, 考虑超声提取法简便, 故选择 70% 乙醇超声提取。通过扫描紫外光谱发现, 在 335 nm 波长下有最大吸收, 故选择 335 nm 为检测波长。

前期试验中发现, 不同样品黄芩叶含量差异较大, 考虑其化学成分可能受生长时间和不同生长部位等因素影响, 故仅选择黄芩叶样品进行方法学考察。黄酮类化合物多显弱酸性, 易解离, 影响分离效果, 采用离子抑制色谱法加入一定量磷酸, 通过梯度洗脱, 各色谱峰分离较好。

测定样品含量时发现, 叶中野黄芩苷的含量为茎或花的2~3倍, 提示今后制订黄芩茎、叶、花的质量标准时, 应充分考虑茎、叶、花的质量比例。生长年限对黄芩茎、叶、花野黄芩苷含量的影响不显著, 其原因可能与每年秋季对茎、叶、花割秧或焚烧处理使次年发新枝叶有关。

综上所述, 本方法操作简便, 专属性强, 准确度高, 重复性好, 可用于黄芩茎、叶、花中野黄芩苷的含量测定, 可为今后黄芩地上部分质量标准的制订和进一步开发利用提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 301-302.
- [2] 张雅蓉, 徐 犇, 李 纳. HPLC法测定黄芩茎及叶中野黄芩苷的含量[J]. 药学研究, 2018, 37(8): 449-452.
- [3] 洪诚韬, 陈 君, 陆美斐, 等. HPLC同时测定黄芩花中野黄芩苷和黄芩苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(11): 1320-1323.
- [4] 雷 楠, 熊思会, 谭 琛, 等. 野黄芩苷通过 hedgehog 信号通路抑制结肠肿瘤干细胞分化的研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1676-1683.
- [5] 张 静, 吕秀梅, 盛艳梅, 等. 野黄芩苷及其衍生物的脑靶向神经保护作用[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(2): 143-146.
- [6] 刘 俊, 李晓芸, 张晨晨, 等. 野黄芩苷对 LPS 诱发巨噬细胞炎症模型中 MAPK 信号通路及细胞因子基因表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1707-1709.
- [7] YUAN Y, ZHA H, RANGARAJAN P, et al. Anti-inflammatory effects of edaravone and scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-microglia[J]. BMC Neurosci, 2014, 15(1): 1-21.

(收稿日期: 2020-12-15; 修回日期: 2021-03-09)