

UPLC法比较黄芩不同炮制品中5种黄酮类成分

罗兰¹, 魏劭恒², 张英^{2,3}, 吴孟华^{2,3}, 曹晖^{2,3}, 马志国^{2,3*}

(1. 中山大学新华学院药学院, 广东广州 510520; 2. 暨南大学药学院, 广东广州 510632; 3. 暨南大学岭南传统中药研究中心, 广东广州 510632)

摘要: 目的 建立UPLC法比较生黄芩、酒黄芩、黄芩炭中5种黄酮类成分的含量。方法 各样品溶液的分析采用Acquity UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-0.5%甲酸, 梯度洗脱; 体积流量0.3 mL/min; 检测波长280 nm。结果 5种黄酮类成分在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 9$), 平均加样回收率100.17%~106.00%, RSD 2.00%~3.37%。黄芩酒炙后, 野黄芩苷、黄芩苷和汉黄芩苷3种黄酮苷含量均有所下降, 而黄芩素和汉黄芩素2种黄酮苷元含量有所增加; 黄芩炒炭后, 3种黄酮苷的含量下降更为明显, 而2种黄酮苷元的含量明显增加。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于黄芩的质量控制。

关键词: 黄芩; 生黄芩; 酒黄芩; 黄芩炭; 黄酮; UPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2021)04-0966-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.025

UPLC-based comparison of five flavonoids in different processed products of *Scutellaria baicalensis*

LUO Lan¹, WEI Shao-heng², ZHANG Ying^{2,3}, WU Meng-hua^{2,3}, CAO Hui^{2,3}, MA Zhi-guo^{2,3*}

(1. College of Pharmacy, Xinhua College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510520, China; 2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Research Center for TCM of Lingnan, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a UPLC method for comparing content of five flavonoids in crude *Scutellariae Radix*, wine-processed *Scutellariae Radix* and charred *Scutellariae Radix*. **METHODS** The analysis of various samples was performed on a thermostatic Acquity UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.5% formic acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 280 nm. **RESULTS** Five flavonoids showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 9$), whose average recoveries were 100.17%–106.00%, with the RSDs of 2.00%–3.37%. Wine processing brought forth decreased contents of three flavonoid glycosides, scutellarin, baicalin and wogonoside; but increased contents of two flavonoid aglycons, baicalein and wogonin. Carbonizing process significantly decreased the contents of three flavonoid glycosides, and sharply increased the contents of two flavonoid aglycons. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *Scutellaria baicalensis* Georgi..

KEY WORDS: *Scutellaria baicalensis* Georgi.; *Scutellariae Radix*; wine-processed *Scutellariae Radix*; charred *Scutellariae Radix*; flavonoids; UPLC

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效^[1]。黄芩临床应用广泛, 炮制规格

较多, 除生品外, 酒黄芩和黄芩炭是常用的2种饮片规格。清热泻火解毒多用生品、清上焦肺热多用酒炙品、清热止血多用炭品^[2-3]。以黄芩苷为代表

收稿日期: 2020-05-27

作者简介: 罗兰(1984—), 女, 硕士, 实验师, 从事药物质量分析研究。E-mail: 453446578@qq.com

*通信作者: 马志国(1979—), 男, 博士, 教授, 从事中药炮制与饮片质量研究。Tel: (020) 85223784, E-mail: mzg79@hotmail.com

的黄酮类是黄芩的主要活性成分^[4-5]，黄芩不同炮制品黄酮类成分的比较研究虽有研究报道，但主要是采用 HPLC 指纹图谱^[6-7]或多成分定量的方法^[8-12]，或采用 LC-MS 法对成分进行定性定量分析^[6,13]，且多是生品与酒黄芩或黄芩炭 2 种炮制品之间的比较。UPLC 法因具有更高的分离度和更快的分析速度，在黄芩药材中已有应用^[14-15]，但未见采用 UPLC 法对黄芩 3 种饮片种 5 种黄酮类成分（黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素和野黄芩苷）进行对比研究的报道。本研究采用 UPLC 法比较黄芩生品、酒黄芩、黄芩炭中 5 种黄酮类成分的含量变化，以期为黄芩及其炮制品质量评价提供参考，为黄芩炮制原理的阐释提供研究基础。

1 材料

Agilent 1290 超高效液相色谱仪 [四元超高压梯度泵、光电二极管阵列检测器 (DAD)、自动进样器、柱温箱、Agilent Chemstation 工作站, 美国安捷伦公司]; ALC-110.4 电子分析天平 (万分之一, 德国赛多利斯公司); AX223ZH 电子天平 (美国奥豪斯公司); KQ5200E 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 多功能粉碎机 (永康市绿可食品机械有限公司)。

黄芩苷对照品 (批号 110-715-201016, 中国食品药品检定研究院); 黄芩素 (批号 H-018-170426)、汉黄芩苷 (批号 H-019-161221)、汉黄芩素 (批号 H-029-171216)、野黄芩苷 (批号 Y-012-170825) 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。乙腈、甲酸 (色谱纯, 上海晶纯试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水 (华润怡宝食品饮料有限公司)。

黄芩饮片 (生品) 3 批, 分别购自广州二天堂大药房 (批号 180501541)、广州老百姓大药房 (批号 180309)、广州林和药业 (批号 180528), 经暨南大学岭南传统中药研究中心马志国教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 干燥根的炮制品。

2 方法与结果

2.1 炮制品制备

2.1.1 酒黄芩 参照 2020 年版《中国药典》一部黄芩项下的酒黄芩炮制方法, 取 3 批黄芩饮片生品各约 100 g, 分别加黄酒 10 mL, 拌匀, 闷透, 置炒锅中, 用文火炒至深黄色, 取出, 放凉, 备用。

2.1.2 黄芩炭制备 参照 2020 年版《中国药典》

一部附录“0213 炮制通则”中的炒炭法, 取 3 批黄芩饮片生品各约 100 g, 分别置热锅内, 用武火炒至黑褐色, 喷淋清水少许, 熄灭火星, 取出, 晾干, 备用。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 0.110、0.278、0.119、0.125、0.115 mg/mL 的贮备液, 分别精密吸取 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液 将生黄芩、酒黄芩、黄芩炭饮片分别粉碎过 4 号筛, 各取约 0.3 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 40 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 取出, 放冷, 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈 (A) -0.5% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 20% ~ 50% A; 20 ~ 21 min, 50% ~ 90% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 280 nm; 进样量 1 μL。在该色谱条件下, 5 种成分理论板数均大于 10 000, 分离度均大于 1.5, 色谱图见图 1。

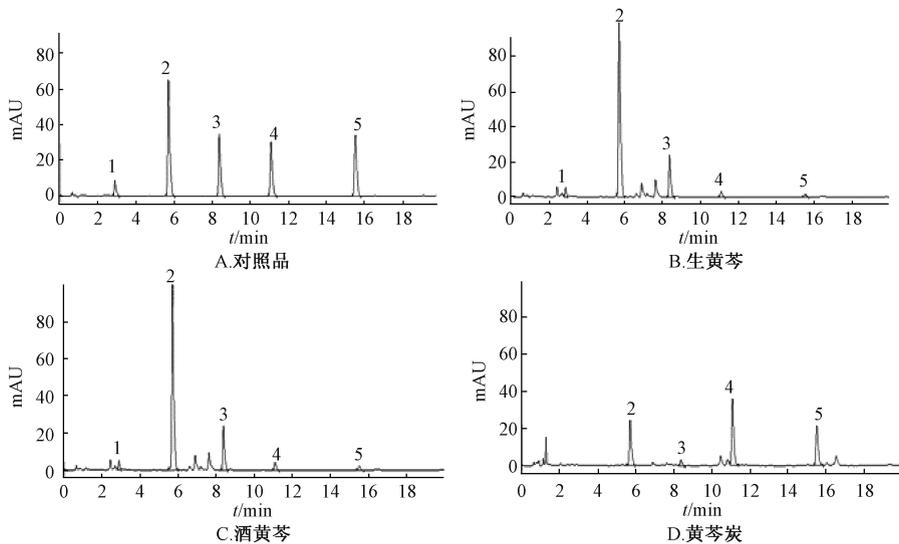
2.4 线性关系考察 取“2.2.1”项下不同质量浓度的对照品溶液, 在“2.3”项色谱条件下分别进样 1 μL。以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行回归, 结果见表 1, 表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
野黄芩苷	Y=2 487.5X-0.548 3	0.999 9	1.11~111
黄芩苷	Y=8 293.9X-3.787 1	1.000 0	2.78~278
汉黄芩苷	Y=9 835.3X-2.072 1	0.999 9	1.19~119
黄芩素	Y=10 832X-4.340 8	0.999 9	1.25~125
汉黄芩素	Y=12 996X-2.768 2	0.999 9	1.15~115

2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样 6 次, 每次 1 μL, 测得野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积 RSD 分别为 0.56%、0.69%、0.55%、0.69%、0.64%, 表明仪器精密



1. 野黄芩苷 2. 黄芩苷 3. 汉黄芩苷 4. 黄芩素 5. 汉黄芩素
1. scutellarin 2. baicalin 3. wogonoside 4. baicalein 5. wogonin

图1 各成分UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下于0、2、4、6、8、12、16 h进样，每次1 μ L，测得野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积RSD分别为0.72%、0.26%、0.29%、0.65%、0.94%，表明供试品溶液在16 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取生品粉末6份，每份约0.3 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样，测得野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量RSD分别为1.23%、1.20%、1.15%、1.15%、1.05%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取“2.7”项下含量已知的生品粉末5份，每份约0.15 g，精密称定，置于100 mL具塞锥形瓶中，精密加入野黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品溶液各5.0 mL，黄芩苷对照品溶液10 mL，70%乙醇补足至40 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样分析，结果见表2。

2.9 样品含量测定 分别取生黄芩、酒黄芩和黄芩炭样品粉末各3批，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样，计算野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量。结果见表3。

3 讨论

本实验采用DAD全波长扫描对检测波长进行考察，结果表明5种成分均在280 nm处有最大吸收，故选择280 nm为检测波长。此外，比较了乙腈-0.1%甲酸和乙腈-0.5%甲酸，发现0.1%甲酸作为流动相时不仅出峰晚，且存在拖尾现象，而0.5%甲酸分离度高，在此基础上，对梯度洗脱程序进行了优化。综合考虑色谱峰的出峰时间、分离度、峰型，最终选择“2.3”项下色谱条件。

本研究结果显示，黄芩生品酒炙后5种黄酮类成分总量下降了3.9%，其中野黄芩苷、黄芩苷和汉黄芩苷含量分别降低了13.3%、6.5%、12.2%，而黄芩素和汉黄芩素含量分别增加了102.8%、114.2%。与生品相比，黄芩炭中5种黄酮类成分总量下降了67.8%，其中野黄芩苷含量极低，已无法检测到；黄芩苷和汉黄芩苷含量分别降低了88.9%、89.9%，而黄芩素和汉黄芩素含量分别增加了444.2%、750.0%。黄芩苷与黄芩素、汉黄芩苷与汉黄芩素互为黄酮苷与苷元，表明酒炙、炒炭等加热炮制方法，均会造成黄芩中黄酮类成分总量减少，且黄酮苷类成分会发生部分分解生成相应的苷元，这种变化与炮制程度呈正相关。因酒炙采用文火加热，温度低，对黄酮类成分影响程度较低；而炒炭为武火加热，温度高，黄酮苷类成分大部分被破坏，或分解为苷元，此结果与文献报道的基本一致^[8,16-18]。此外，图1中黄芩炭色谱图中16.5 min处出现一新的色谱峰，通过与文献[8]对比，

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=5)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=5)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
野黄芩苷	0.148 7	3.063	3.100	6.282	103.85	106.00	2.14
	0.151 2	3.115	3.100	6.334	103.85		
	0.149 3	3.076	3.100	6.391	106.92		
	0.153 1	3.154	3.100	6.540	109.23		
	0.151 3	3.117	3.100	6.408	106.15		
黄芩苷	0.148 7	22.75	23.00	46.82	104.65	101.06	3.37
	0.151 2	23.13	23.00	46.01	99.46		
	0.149 3	22.84	23.00	46.81	104.22		
	0.153 1	23.42	23.00	45.63	96.54		
	0.151 3	23.15	23.00	46.25	100.43		
汉黄芩苷	0.148 7	4.506	4.550	9.258	104.44	103.11	2.89
	0.151 2	4.581	4.550	9.080	98.89		
	0.149 3	4.524	4.550	9.327	105.56		
	0.153 1	4.639	4.550	9.442	105.56		
	0.151 3	4.584	4.550	9.176	101.12		
黄芩素	0.148 7	0.629	0.650	1.290	101.69	101.20	2.00
	0.151 2	0.640	0.650	1.282	98.78		
	0.149 3	0.632	0.650	1.286	100.62		
	0.153 1	0.648	0.650	1.326	104.31		
	0.151 3	0.640	0.650	1.294	100.62		
汉黄芩素	0.148 7	0.305	0.310	0.614	99.42	100.17	2.54
	0.151 2	0.311	0.310	0.613	97.42		
	0.149 3	0.307	0.310	0.614	99.03		
	0.153 1	0.314	0.310	0.637	104.19		
	0.151 3	0.311	0.310	0.623	100.77		

表3 各成分含量测定结果 (mg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 3 Results of content determination for various constituents (mg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

成分	生黄芩	酒黄芩	黄芩炭
野黄芩苷	14.46±7.00	12.54±7.48	0
黄芩苷	146.72±21.29	137.11±18.62	16.32±7.22
汉黄芩苷	28.65±4.74	25.16±5.16	2.88±1.52
黄芩素	5.02±0.64	10.18±5.33	27.32±16.93
汉黄芩素	1.97±0.26	4.22±1.95	16.74±7.99

此成分可能为千层纸素 A, 其转化生成路径及结构还有待于进一步研究。

本研究结果显示, 黄芩炮制后, 黄酮类成分的含量与相对比例均发生了明显变化, 这与黄芩不同炮制品间功效的差异密切相关。生黄芩, 味苦、性寒, 所含 5 种黄酮类成分总量最高, 且以黄芩苷为主, 长于清热泻火。黄芩酒炙后, 总黄酮含量略有减少, 且酒性大热, 从而缓和了苦寒之性, 用于上焦肺热及四肢肤表之湿热。黄芩炒炭后, 总黄酮含量大大降低, 苦寒之性大减, 但黄芩素、汉黄芩素等苷元含量及在总黄酮中所占比例均明显增加, 以清热止血为主, 但黄芩炭止血作用是否与黄芩素、汉黄芩素等黄酮苷元有关, 尚有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 成龙, 马丹, 施峰文. 黄芩的不同炮制法对临床作用的影响[J]. 中国医药指南, 2015, 13(10): 216-217.

[3] 杨颖, 陈智. 炮制对黄芩药理作用与化学成分影响研究进展 [J/OL]. 中华中医药刊, [2020-06-16]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20200615.1752.036.html>.

[4] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.

[5] Zhao T T, Tang H L, Long X, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(9): 1353-1369.

[6] 柴冲冲, 曹妍, 毛民, 等. 基于 HPLC 特征图谱、UPLC-Q-TOF/MS 定性及多成分定量的黄芩酒炙前后化学成分变化研究[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2436-2447.

[7] 熊优, 王雅琪, 曹丽娟, 等. 不同产地黄芩片、酒黄芩质量评价研究[J]. 中药材, 2018, 41(9): 2127-2133.

[8] 吴婷, 周军挺, 王丽. 黄芩炮制前后主要成分的比较研究[J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(4): 303-304.

[9] 谭安军. 黄芩药材不同产地及不同炮制品的质量评价[J]. 中国药业, 2017, 26(9): 16-19.

- [10] 熊 优, 王雅琪, 焦姣姣, 等. 黄芩酒炙过程中化学成分含量变化及其与药效的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 1-6.
- [11] 刘 岩, 计小清, 孔令娟, 等. 不同炮制方法对黄芩化学成分及产品质量的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 605-608.
- [12] 杨志军, 杨秀娟, 耿广琴, 等. HPLC同时测定甘肃不同产地黄芩及不同炮制品中黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的含量[J]. 中医研究, 2015, 28(9): 72-75.
- [13] Cui X B, Qian X C, Huang P, et al. Simultaneous determination of ten flavonoids of crude and wine-processed *Radix Scutellariae* aqueous extracts in rat plasma by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study[J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(7): 1112-1123.
- [14] 连中学, 刘 玉, 柴俊雯, 等. UPLC法同时测定黄芩中9种黄酮类成分的含量[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(5): 604-606.
- [15] Yan B F, Xu W J, Su S L, et al. Comparative analysis of 15 chemical constituents in *Scutellaria baicalensis* stem-leaf from different regions in China by ultra-high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(18): 3570-3581.
- [16] 陈 智, 田景振. 基于模拟炮制法研究黄芩炒炭前后苷类成分的变化[J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(1): 79-84.
- [17] 李秀贤. 从化学成分变化及检测看黄芩炮制的质量控制[J]. 广州化工, 2017, 45(20): 22-24.
- [18] 齐贵阳. 不同炮制方式对中药质量的影响研究[J]. 中国社区医师, 2018, 34(27): 10; 12.

基于多元统计分析和多指标评价假东风草和东风草的质量

苏宏娜^{1,2}, 李学学^{1,2}, 农常东⁵, 李修善⁵, 李文兵^{2,3*}, 刘 圆^{2,4*}

(1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225; 3. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610041; 4. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041; 5. 广西万寿堂药业有限公司, 广西南宁 530000)

摘要: 目的 基于多元统计分析和多指标评价假东风草和东风草药材的质量。方法 采用2020年版《中国药典》方法测定水分、灰分、浸出物, 紫外-可见光光度法测定总黄酮含量, HPLC法测定3, 4-二咖啡酰奎宁酸和3, 5-二咖啡酰奎宁酸的含量, 聚类分析和主成分分析进行数据处理。结果 9批假东风草和东风草(大花种, 非标品种)水分平均值分别为9.21%、8.00%, 总灰分平均值分别为6.50%、8.90%, 酸不溶性灰分平均值分别为0.87%、1.21%, 浸出物平均值分别为22.21%、13.56%, 总黄酮平均质量分数分别为126.16、82.65 mg/g, 3, 4-二咖啡酰奎宁酸平均质量分数分别为7.80、3.52 mg/g, 3, 5-二咖啡酰奎宁酸平均质量分数分别为4.18、4.43 mg/g。以水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、总黄酮含量、3, 4-二咖啡酰奎宁酸和3, 5-二咖啡酰奎宁酸含量为指标时, 不能将假东风草和东风草(大花种, 非标品种)明显区分开。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于假东风草和东风草的质量控制。

关键词: 假东风草; 东风草; 总黄酮; 3, 4-二咖啡酰奎宁酸; 3, 5-二咖啡酰奎宁酸; 多元统计分析; 多指标

中图分类号: R282

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2021)04-0970-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.026

收稿日期: 2020-08-25

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1708005); 西南民族大学2020年研究生创新型项目资助硕士重点项目(CX2020SZ76); 广西万寿堂药业有限公司项目(2018)

作者简介: 苏宏娜(1996—), 女(白族), 硕士生, 研究方向为民族药资源与鉴定。Tel: 18328380447, E-mail: 634159339@qq.com

* **通信作者:** 李文兵(1988—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为民族药炮制工艺及质量标准。Tel: 13540876731, E-mail: 285892232@qq.com

刘 圆(1968—), 女, 博士, 教授, 研究方向为民族药品种、品质评价及新药资源保护与利用。Tel: (028) 85528812, E-mail: 499769896@qq.com