

# UV 和 HPLC 法测定黄芩黄酮总苷元 提取物中总黄酮和 3 种主要成分的含量

彭易兰<sup>1,2</sup>, 刘云华<sup>2</sup>, 黄志芳<sup>2</sup>, 刘玉红<sup>2</sup>, 陈 燕<sup>2</sup>, 易进海<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学, 成都 611137; <sup>2</sup>四川省中医药科学院, 成都 610041

**摘要:** 本文建立了黄芩黄酮总苷元提取物中总黄酮和 3 种主要成分的含量测定方法。采用 HPLC 法测定黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的含量。使用 Agilent 1200 型高效液相色谱仪, Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水 (50:50), 流速 1 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 275 nm 的方法。黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 线性范围分别为 3.501 ~ 70.016 μg/mL ( $r = 0.9999$ ), 0.832 ~ 16.640 μg/mL ( $r = 0.9998$ ), 0.418 ~ 8.352 μg/mL ( $r = 0.9999$ ); 平均加样回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 99.55%、98.86%、99.97%, RSD 分别为 1.74%、1.74%、1.70%。采用 UV 法测定总黄酮含量, 黄芩素线性范围为 1.71 ~ 8.54 μg/mL ( $r = 0.9991$ ); 平均加样回收率 ( $n = 6$ ) 为 100.93%, RSD 为 2.63%。黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 和总黄酮的含量分别为 48.22% ~ 60.36%、12.09% ~ 14.46%、5.05% ~ 8.81%、78.11% ~ 90.12%; 研究结果表明该方法准确、可靠, 适用于黄芩黄酮总苷元提取物的含量测定。

**关键词:** 黄芩黄酮总苷元提取物; 黄芩素; 汉黄芩素; 千层纸素 A; 高效液相色谱法; 紫外分光光度法; 含量测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.016

## Determination of Total Flavonoids and Three Main Components in Scutellariae Radix Total Flavone Aglycone Extract by Ultraviolet Spectrophotometry and High-performance Liquid Chromatography

PENG Yi-lan<sup>1,2</sup>, LIU Yun-hua<sup>2</sup>, HUANG Zhi-fang<sup>2</sup>, LIU Yu-hong<sup>2</sup>, CHEN Yan<sup>2</sup>, YI Jin-hai<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

<sup>2</sup>Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

**Abstract:** The paper established a method for separation and determination of total flavonoids and three main components in *Scutellaria Radix* total flavone aglycone extract by ultraviolet (UV) spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. The analysis was performed on an Agilent 1200 Series HPLC system with Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid water (50:50) with the flow rate of 1 mL/min. The column remained at 35 °C and the detection wavelength was set at 275 nm. The linear ranges of baicalin, wogonin and oroxylin A were 3.501-70.016 μg/mL ( $r = 0.9999$ ), 0.832-16.640 μg/mL ( $r = 0.9998$ ) and 0.418-8.352 μg/mL ( $r = 0.9999$ ), respectively. The average recoveries ( $n = 6$ ) were 99.55% (RSD = 1.74%), 98.86% (RSD = 1.74%) and 99.97% (RSD = 1.70%). Total flavonoids were determined by UV spectrometry. The linear range of baicalin was 1.71-8.54 μg/mL ( $r = 0.9991$ ). The average recoveries ( $n = 6$ ) were 100.93% (RSD = 2.63%). The contents of baicalin, wogonin, oroxylin A and total flavonoids were 48.22%-60.36%, 12.09%-14.46%, 5.05%-8.81% and 78.11%-90.12%, respectively.

**Key words:** *Scutellaria Radix* total flavone aglycone extract; baicalin; wogonin; oroxylin A; ultraviolet; high performance liquid chromatography; content determination

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<sup>[1]</sup>, 主要成分为黄芩苷、汉黄芩苷及少量的苷元等黄酮类成分<sup>[2]</sup>, 其中黄芩苷的含量最高, 故黄芩及其成方制剂中都以黄芩苷作为质控指标。药代动力学研究证明, 苷类成分在肠道内难以吸收、

生物利用度低、肠内滞留时间较长而易受到肠道菌群的作用,经肠道细菌代谢后被水解,生成苷元而发挥其药理作用<sup>[3,4]</sup>;如文献报道黄芩苷在肠道内难以被直接吸收,转化为黄芩素才能被吸收入血液而发挥作用<sup>[5-7]</sup>,同时大量临床药效实验证明,黄芩素的药理作用强于黄芩苷<sup>[5]</sup>。因此,将黄芩黄酮苷类成分转化苷元,提高其生物利用度和药理作用是有效提高黄芩药效的重要方法。黄芩黄酮苷元的主要成分黄芩素有抗菌消炎、抗病毒、降低血清胆固醇等作用<sup>[8,9]</sup>;汉黄芩素有抗氧化、抗肿瘤等生物活性<sup>[10]</sup>;千层纸素 A 有抗肿瘤、神经保护等活性<sup>[11]</sup>。本文采用简便的工艺方法,利用黄芩药材中自身的黄芩酶水解黄芩苷,经提取得到黄芩黄酮总苷元,分别采用 UV 法、HPLC 法测定总黄酮和黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的含量,从总黄酮和 3 种主要有效成分的含量来表征黄芩黄酮总苷元提取物,为其质量控制提供科学的参考方法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪系列(包括四元泵, DAD 检测器, 柱温箱, 自动进样器, 工作站), 759S 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), KQ-300B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), AUV200D 型 1/10 万电子天平(日本岛津), Milli-Q Integral 3 超纯水机(美国 Millipore), 电子恒温水浴锅(DZKW-4), 真空干燥箱(上海 2K-82A)。

### 1.2 试剂

对照品黄芩素(批号 111595-200905)购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用;对照品汉黄芩素(批号 MUST-14110311)、千层纸素 A(批号 MUST-14112104)均购自成都曼斯特生物科技有限

公司,供含量测定用。黄芩药材购自成都荷花池药材市场,经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。甲醇为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 黄芩黄酮总苷元提取物制备

黄芩药材粉碎过 10 目筛,第一次加水 12 倍,第二次和第三次各加水 10 倍,于 0~10℃ 动态搅拌提取三次,每次 0.5 h,过滤,合并滤液,缓慢升温至 60℃ 并保温酶解 6 h,过滤,减压干燥,即得。

### 2.2 HPLC 测定黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的含量

#### 2.2.1 溶液制备

##### 2.2.1.1 对照品储备液

精密称取黄芩素对照品 5.47 mg 置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到黄芩素对照品储备液(每 1 mL 中含黄芩素 0.2188 mg);精密称取汉黄芩素 5.20 mg 置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到汉黄芩素对照品储备液(每 1 mL 中含汉黄芩素 0.2080 mg);精密称取千层纸素 A 5.22 mg 置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到千层纸素 A 对照品储备液(每 1 mL 中含千层纸素 A 0.2088 mg)。

##### 2.2.1.2 混合对照品溶液

分别精密吸取黄芩素,汉黄芩素,千层纸素 A 对照品储备液 8、2、1 mL 置 25 mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度,制成每 1 mL 含黄芩素 70.016 μg、汉黄芩素 16.640 μg、千层纸素 A 8.352 μg 的溶液,摇匀,即得。

##### 2.2.1.3 供试品溶液

取黄芩提取物约 16 mg,精密称定,置 25 mL 容

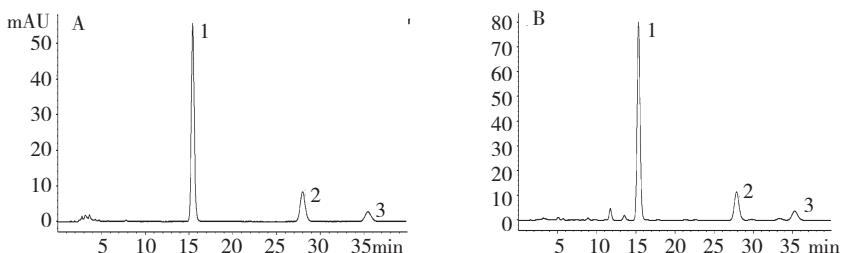


图 1 混合对照品(A)、供试品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standard (A) and sample (B)

注:1. 黄芩素;2. 汉黄芩素;3. 千层纸素 A

Note: 1. Baicalein; 2. Wogonin; 3. Oroxylin A

量瓶中加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密吸取 0.5 mL 置 5 mL 容量瓶中加入甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

### 2.2.2 色谱条件及系统适用性试验

色谱条件:色谱柱 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;流动相:甲醇-0.2% 磷酸水 (50:50);流速:1 mL/min;检测波长:275 nm;分析时间 40 min。

系统适用性试验:分别精密吸取混合对照品溶液 5 mL 及供试品溶液 10  $\mu\text{L}$  进样,记录色谱图,见

表 1 黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of baicalein, wogonin and oroxylin A

分析物 Analytes	线性方程 Regression equation	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>r</i>
黄芩素 Baicalein	$Y = 48.165X - 7.937$	3.501 ~ 70.016	0.9999
汉黄芩素 Wogonin	$Y = 62.953X - 9.181$	0.832 ~ 16.640	0.9998
千层纸素 AOroxylin A	$Y = 47.905X - 2.631$	0.418 ~ 8.352	0.9999

结果表明:黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 分别在 3.501 ~ 70.016, 0.832 ~ 16.640, 0.418 ~ 8.352  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内与峰面积呈良好线性关系。

### 2.2.4 精密度试验

精密吸取供试品溶液 (No. 2) 10  $\mu\text{L}$ , 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 色谱峰面积的 RSD 分别为 0.83%、0.34%、0.73%。结果表明仪器精密度良好。

### 2.2.5 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 (No. 2) 10  $\mu\text{L}$ , 在上述色谱条件下在 24 h 内每隔 4 h 进样测定, 黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 色谱峰面积的 RSD 分别为 1.38%、0.78% 和 1.46%。结果说明在 24 h 内检测稳定。

图 1。黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 均能达到基线分离, 理论板数均大于 8000, 分离度均大于 2.8。

### 2.2.3 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液 0.5、2、4、6、8、10 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得系列浓度 (6 个浓度) 对照品溶液。精密吸取对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  分别注入液相色谱仪, 测得峰面积。以进样浓度  $X$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表 1。

### 2.2.6 重复性试验

取同一批样品 (No. 2), 按“2.2.1.3”项下方法平行操作制备 6 份供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 记录峰面积。黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的含量 ( $n = 6$ ) 分别为 60.39%、13.00% 和 6.38%; RSD 分别为 0.94%、1.20% 和 1.29%。结果表明方法的重复性良好。

### 2.2.7 加样回收率试验

称取黄芩提取物 (No. 2), 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入黄芩素对照品的甲醇溶液 (1.094 mg/mL) 5 mL、汉黄芩素对照品的甲醇溶液 (1.04 mg/mL) 1 mL、千层纸素 A 对照品的甲醇溶液 (0.52 mg/mL) 1 mL, 以下按“2.2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。

表 2 黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 加样回收率结果

Table 2 Recovery experiment results of baicalein, wogonin and oroxylin A

分析物 Analytes	称样量 Sample (mg)	样品含量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average recovery (%)	RSD (%)
黄芩素 Baicalein	7.53	4.547	5.47	9.905	97.95	99.55	1.74
	7.81	4.716	5.47	10.300	102.08		
	8.14	4.916	5.47	10.455	101.26		
	7.36	4.445	5.47	9.855	98.90		
	7.52	4.541	5.47	9.900	97.97		

	7.34	4.433	5.47	9.855	99.12		
汉黄芩素 Wogonin	7.53	0.979	1.04	2.015	99.62	98.86	1.74
	7.81	1.015	1.04	2.045	99.04		
	8.14	1.058	1.04	2.055	95.87		
	7.36	0.957	1.04	1.980	98.37		
	7.52	0.978	1.04	2.010	99.23		
千层纸素 AOroxylin A	7.34	0.954	1.04	2.005	101.06		
	7.53	0.480	0.52	1.000	100.00	99.97	1.70
	7.81	0.498	0.52	1.010	98.46		
	8.14	0.519	0.52	1.053	102.69		
	7.36	0.470	0.52	0.980	98.08		
	7.52	0.480	0.52	0.998	99.62		
	7.34	0.468	0.52	0.993	100.96		

结果表明该方法回收率良好。

### 2.2.8 样品中黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的测定

取各批次黄芩提取物样品,按“2.2.1.3”项下方法制备供试品溶液,进样,记录峰面积,含量测定结果见表 3。

## 2.3 UV 法测定总黄酮含量

### 2.3.1 对照品溶液制备

精密称取黄芩素对照品 5.34 mg 置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到黄芩素对照品储备液;精密吸取黄芩素储备液 1 mL 置 50 mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含黄芩素 4.272  $\mu\text{g}$ )。

### 2.3.2 供试品溶液

取黄芩提取物(No. 2)约 16 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密吸取 0.5 mL 置 50 mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

### 2.3.3 最大吸收波长的选择

以甲醇作为空白溶剂,取黄芩素对照品溶液和供试品溶液(No. 2)在紫外分光光度仪于 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描测定吸收曲线,结果表明黄芩素对照品溶液和供试品溶液在 275 nm 处均有最大吸收,所以选择 275 nm 作为总黄酮测定波长。

### 2.3.4 线性关系考察

分别准确吸取黄芩素对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制得系列浓度(5 个浓度)对照品溶液,在

275 nm 波长处测定吸光度,以溶液浓度(X)为横坐标,以吸光度(Y)为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为  $Y = 0.0976X + 0.0153$ ,  $r = 0.9991$ 。黄芩素浓度在 1.7088 ~ 8.5440  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内线性关系良好。

### 2.3.5 精密度试验

取供试品溶液(No. 2)连续测定 5 次,记录吸光度值,RSD 为 0.3%,表明仪器精密度良好。

### 2.3.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(No. 2),室温放置 0、2、4、6、8 h 分别测吸光度。记录吸光度值,吸光度分别为 0.4443、0.4444、0.4482、0.4471、0.4487, RSD = 0.46%,说明在 8 h 内检测稳定。

### 2.3.7 重复性试验

准确称取同一样品(No. 2)6 份,按“2.3.2”项下平行操作制备供试品溶液,在 275 nm 检测,记录吸光度值,结果测得总黄酮的平均含量为 91.12%, RSD = 1.36%。结果表明方法的重复性良好。

### 2.3.8 加样回收率试验

称取黄芩提取物(No. 2)约 8 mg,平行 6 份,精密称定,精密加入与样品中含量约等量的黄芩素对照品,按“2.3.2”项下制备供试品溶液,在 275 nm 分别测吸光度,计算回收率,平均加样回收率( $n = 6$ )为 100.93%, RSD 为 2.63%,即该方法准确度良好。

### 2.3.9 总黄酮含量的测定

取各批次黄芩提取物样品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,于 275 nm 下测定吸光度,含量测定结果见表 3。

