

黄芩不同生长发育期的指纹图谱研究

李化¹, 黄璐琦¹, 蒋金成², 李韦¹, 杨滨^{1*} (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京市延庆县农业技术推广站, 北京 102100)

摘要: 目的 建立黄芩 RP-HPLC 指纹图谱, 考察黄芩不同生长发育期的主要化学成分的变化。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水-甲酸 (21: 78: 1, A) 和乙腈-水-甲酸 (80: 20: 1, B) 为流动相进行梯度洗脱; 检测波长 280 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹。对黄芩指纹图谱进行分析, 并比较了 10 个化学成分含量在不同生长发育期的变化趋势。结果 黄芩中主要化学成分在不同生长发育期的积累具有| 定规律。苷类和苷元类成分含量在生长过程中虽发生了不同的变化, 但最终二者含量均在枯黄期恢复到接近休眠期时的含量水平。结论 揭示黄芩中主要化学成分在不同生长发育期的变化趋势。

关键词: 黄芩; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学成分

中图分类号: R282 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494 (2008) 15-1140-03

Fingerprint of *Scutellaria baicalensis* at Different Growth

LI Hua¹, HUANG Lu-qi¹, JIANG Jin-cheng², LI Wei¹, YANG Bin^{1*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Agro-technical Extension and Service Center, Yanqing Beijing 102100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a RP-HPLC method of fingerprint analysis for *Scutellaria baicalensis* and to investigate the variation of main components in samples at different growth periods. **METHODS** Analysis were carried out on a ODS Diamonsil (C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column at 30 °C. The mobile phase was in the gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. Mobile phase A consisted of acetonitrile, water and formic acid (21: 78: 1) while mobile phase B consisted of acetonitrile, water and formic acid (80: 20: 1). The detection wavelength was set at 280 nm. The fingerprints of *Scutellaria baicalensis* were analyzed, and the content change trend of 10 ingredients in samples at different growth was compared. **RESULTS** There were some rules for the change of main components in *Scutellaria baicalensis* at different growth periods. Although the contents of flavonoid glycosides and flavonoid aglycones varied during the development, at last both recovered approximately to the content level of dormancy period at yellow period. **CONCLUSION** The variation trend of main components in *Scutellaria baicalensis* at different growth periods was found.

KEY WORDS *Scutellaria baicalensis*; HPLC; fingerprint chromatography; components

中药黄芩是唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) 的干燥根, 为《中国药典》2005 年版收载品种。目前黄芩采收期主要采用高效液相色谱法去研究黄芩苷含量的变化^[1-3], 李滨等^[4]采用薄层扫描色谱法以黄芩苷为指标进行栽培黄芩质量的动态研究, 但从上述文献研究结果可以发现, 黄芩中黄芩苷含量最大值出现的月份并不一致。本实验建立了黄芩 RP-HPLC 指纹图谱研究方法, 结合 LC-MS 提供的质谱数据, 确认 7 个化合物, 通过对不同生长发育期黄芩指纹图谱中主要色谱峰变化的分析, 找出黄芩中主要黄酮苷类和苷元类成分的变化规律, 为评价黄芩在不同生长发育期的质量提供

帮助。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Alliance 高效液相色谱系统 (2695 Separations Module, 2996 Photodiode Array Detector Empower 色谱工作站, Waters 公司); Micromass LCT 液质联用色谱仪 (Waters 公司); 2004MP6 型微量电子显示天平 (德国 Sartorius 公司); ScoutTM Pro 型普通电子天平 (梅特勒-托利多称重设备系统有限公司); KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572338)

作者简介: 李化, 女, 博士研究生, 助理研究员 * 通讯作者: 杨滨, 女, 博士, 研究员 Tel: (010)64014411-2848 E-mail: ybinmm@hotmail.com

1.2 试药

2年生栽培黄芩采自延庆种子推广站实验田。五点法采集, 每个点3株, 每次15株。从2006年4月开始, 依次在休眠期(2006年4月25日), 萌发期(2006年5月23日), 展叶期(2006年6月27日), 始花期(2006年7月27日), 盛花期(2006年8月23日), 果实成熟期(2006年9月27日), 枯黄期(2006年10月25日)进行采样。鲜品55℃烘干至恒重后, 粉碎, 置干燥器中备用。

黄芩苷对照品(批号110715-200212, 供含量测定用), 黄芩素对照品(批号111595-200301, 供含量测定用), 汉黄芩素对照品(批号1514-200001, 供鉴别用), 野黄芩苷对照品(批号110842-200403, 供含量测定用), 均购自中国药品生物制品检定所; 千层纸素、黄芩新素由本所刘美兰研究员惠赠; 白杨黄素(含量>98.0%, Sigma公司)。甲醇, 甲酸, 乙醇均为分析纯, 乙腈为色谱纯。

2 实验方法

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相 A: 乙腈-水-甲酸 (21: 78: 1); 流动相 B: 乙腈-水-甲酸 (80: 20: 1), 梯度洗脱: 0~10 min (100% A), 10~35 min (100% A ~ 90% A), 35~70 min (90% A ~ 65% A), 70~90 min (65% A ~ 5% A), 90~100 min (5% A); 检测波长 280 nm; 柱温 30℃; 流速 1.0 mL · min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备

取适量的野黄芩苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、黄芩新素、千层纸素、白杨黄素对照品加甲醇分别配制成适宜浓度的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取黄芩粉末约 0.1 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加体积分数 70% 乙醇 20 mL, 称定重量, 超声提取 1 h, 放冷, 称重, 以体积分数 70% 乙醇补足, 滤过, 续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 参照峰的选择 由于黄芩苷是黄芩中的主要有效成分, 且 2005年版《中国药典》规定其为评价黄芩质量的指标性成分, 又鉴于该色谱峰峰面积值较大且较稳定, 故选择黄芩苷色谱峰作为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.4.2 精密度实验 取黄芩粉末约 0.1 g 精密称定, 按“2.3”项下供试品溶液的制备方法制样, 连

续进样 5 次, 记录指纹图谱。各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.3% 和 2.6%。

2.4.3 重复性实验 取黄芩粉末约 0.1 g 共 5 份, 精密称定, 按“2.3”项下供试品溶液的制备方法制样, 分别进样, 记录指纹图谱。各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.3% 和 7.0%。

2.4.4 稳定性实验 取黄芩粉末约 0.1 g 精密称定, 按“2.3”项下供试品溶液的制备方法制样, 分别在 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 25 h 检测, 记录指纹图谱。各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.3% 和 2.5%, 表明供试品溶液在室温下 25 h 内稳定性良好。

2.5 黄芩指纹图谱的建立

分别取不同生长发育期黄芩, 每个时期 15 株, 共 105 株, 按“2.3”项下供试品溶液的制备方法制样, 进样, 记录色谱图。

2.6 共有峰的标定和确认

采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”软件, 对黄芩指纹图谱进行自动匹配, 标定 10 个共有峰, 依次编号。为了尽可能了解黄芩指纹图谱中各成分的结构信息, 通过黄芩样品溶液和对照品溶液的 LC-MS 数据分析得到 [M + H]⁺ 分子离子和 [M - Glu + H]⁺ 碎片离子的相对分子质量, 又将二者色谱峰的保留时间和紫外光谱数据进行对照, 参考文献数据^[5-6], 确认 7 个色谱峰, 见表 1。供试品溶液在该色谱条件下, 没有检测到野黄芩苷和白杨黄素的色谱峰。

表 1 黄芩 HPLC 指纹图谱中色谱峰的确认

Tab. 1 Affirmation chromatogram peaks of samples

Peak number	t _R /min	[M + H] ⁺	[M + H - Glu] ⁺	λ _{max} /nm	Identified component
2	24.40	447	271	277	Baicalin
3	30.73	447	271	279	Nonogonin-7-O-glucuronide
6	40.96	461	285	274	Wogonoside
7	60.55	271	-	276	Baicalin
8	77.51	285	-	275	Wogonin
9	78.77	374	-	269	Skulkapflavone
10	79.53	285	-	272	Oroxylin

3 讨论与结论

分别对不同生长发育期的 15 株黄芩进行全谱相似度计算, 生成了该时期相应的对照图谱 (图 1), 再将不同生长发育期的对照图谱导入软件, 计算各对照图谱之间的相似度, 结果表明, 黄芩不同生长发育期的对照图谱之间相似度较高, 均在 0.99 以上。从图 1 可知, 不同生长发育期的黄芩

在 15 min 以后色谱峰数目一致, 而在 5~15 min 之间峰数有明显的变化, 休眠期和展叶期黄芩的峰数比萌发期、始花期、盛花期、果实成熟期和枯黄期少, 这显示了黄芩不同生长发育期成分的差异。

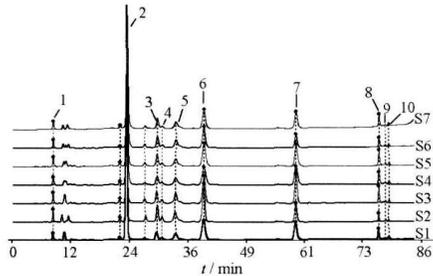


图 1 黄芩不同生长发育期的对照图谱

2- 黄芩苷; 3- 去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷; 6- 汉黄芩苷; 7- 黄芩素; 8- 汉黄芩素; 9- 黄芩新素; 10- 千层纸素; S1- 休眠期; S2- 萌发期; S3- 展叶期; S4- 始花期; S5- 盛花期; S6- 果实成熟期; S7- 枯黄期

Fig 1 Fingerprint chromatogram of samples at different growth periods

2- baicalin 3- norwogonin-7-O-glucuronide 6- wogonoside 7- baicalin 8- wogonin 9- skullcapflavone 10- oroxylin S1- dormancy period S2- bourgeon period S3- leaf expansion period S4- early flowering period S5- full blooming period S6- fruit maturation period S7- yellow period

以黄芩 HPLC 色谱指纹图谱中 10 个共有峰峰面积与称样量比值 (简称峰质比) 为指标, 我们考察了黄芩中 10 个主要化学成分含量在不同生长发育期的变化 (图 2)。

从图 2 可以看出黄芩苷、去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷和汉黄芩苷等苷类成分和峰 1 所代表的成分含量均呈“M”型曲线的变化趋势, 即上述成分的含量均在萌发期急剧上升, 在展叶期略有上升, 至始花期下降, 在盛花期回升, 到果实成熟期又回落, 峰 4 和峰 5 所代表的成分也有类似的变化; 对黄芩素、汉黄芩素和千层纸素等苷元类成分而言, 含量的变化趋势为“W”型, 曲线的两个峰谷分别出现在萌发期和果实成熟期, 但黄芩新素含量变化趋势与苷类成分相似, 呈“M”型曲线。总言之, 黄芩在生长发育过程中苷类成分含量经历了升高-降低-再升高-再降低, 苷元类成分含量则发生了降低-升高-再降低-再升高的变化, 虽然二者含量的变化趋势明显不同, 但含量最终均在枯黄期恢复到接近休眠期时的含量水平。王玮等^[7] 研究结果发现, 黄芩在生长过程中查耳酮合酶 (CHS) 和黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸基转移酶 (UBGAT) 表达水平的变化呈“M”型曲线, 黄芩苷含量也有类似的变化趋势, 这与本实验结果较为一致。黄芩中的主要黄酮类成分在其体内如何维持一个动态平衡, 与黄芩生理功能

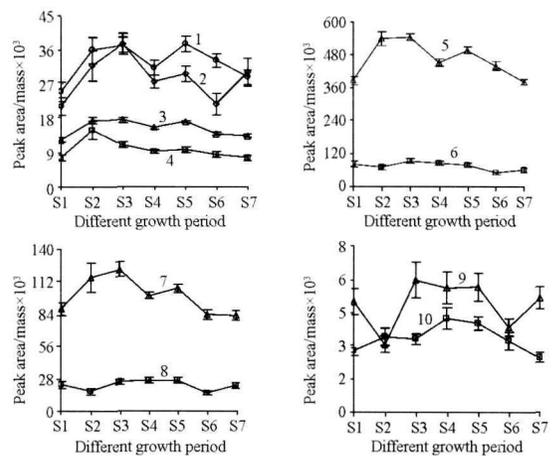


图 2 黄芩不同生长发育期化学成分含量的动态变化 $n = 15, x \pm s$

1- 成分 1 2- 成分 2 3- 去甲汉黄芩苷; 4- 成分 4 5- 黄芩苷; 6- 黄芩素; 7- 汉黄芩苷; 8- 汉黄芩素; 9- 千层纸素; 10- 黄芩新素; S1- 休眠期; S2- 萌发期; S3- 展叶期; S4- 始花期; S5- 盛花期; S6- 果实成熟期; S7- 枯黄期

Fig 2 Content dynamics of ingredients in samples at different growth periods $n = 15, x \pm s$

1- component 1 2- component 2 3- norwogonin-7-O-glucuronide 4- component 4 5- baicalin 6- baicalin 7- wogonoside 8- wogonin 9- oroxylin 10- skullcapflavone S1- dormancy period S2- bourgeon period S3- leaf expansion period S4- early flowering period S5- full blooming period S6- fruit maturation period S7- yellow period

的发挥有何关系, 则有待于进一步地研究。

REFERENCES

- [1] XU JW, HUO SX. Studies on variation of baicalin content in *Scutellaria baicalensis* georgii [J]. *J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2000, 16(4): 314-315
- [2] FANG Z, YANG JB, WANG KC. The growth characteristics of *Scutellaria baicalensis* georgii and the accumulation of active components [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(2): 84-85.
- [3] WANG XM, DENG Y, JI ZHONG H, et al. Study on optimum collecting time of *Scutellaria baicalensis* georgii cultivated in hebei huairou [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(1): 5-7.
- [4] LIB, DU XW, SUN HF, et al. Dynamic research on the quality of cultivated root of *Scutellaria baicalensis* georgii [J]. *Acta Chin Med Pharm* (中医药学报), 1999, 27(1): 45
- [5] HORVATH CR, MARTOS PA, SAXENA PK. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* George) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1062: 199-207.
- [6] XIAO LH, WANG HY, SONG SH, et al. Isolation and identification of the chemical constituents of roots of *Scutellaria amoena* C. H. Wright [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(3): 181-183.
- [7] WANG W, CHEN JK, ZHOU TS. CHS and UBGAT expression and baicalin accumulation in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi during cultivation seasons [J]. *J Fudan Univ Nat Sci* (复旦学报·自然科学版), 2006, 45(5): 674-678.

(收稿日期: 2007-06-28)