

红外光谱三级鉴别法联合高效液相色谱-质谱法研究不同采收期黄芩药材的质量^Δ

赵胜男*,刘素丽,徐杨璐,李守拙[#](承德医学院中药研究所/河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德067000)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1669-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.17

摘要 目的:研究不同生长期春秋两季采收黄芩药材中有效成分种类及含量的差异,为确定黄芩的最佳采收期提供技术支持。方法:对赤峰产黄芩不同采收期药材样品(一年、二年、三年生长期,在各年份的春季和秋季分别采挖),应用红外光谱三级鉴别技术(IR-TL)分析其整体成分构成变化,以高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)分析药材中6种黄酮类成分(千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷)含量的变化。结果:IR-TL分析结果显示,不同生长期黄芩所含黄酮类、苷类、糖类、酯类等成分均有所不同,其中二年生黄芩中的苷类物质含量最高、药材质量更稳定;6种黄酮类成分含量测定结果显示,不同采收期对上述指标成分含量有较大影响,其中二年生春季采收样品的整体含量高于同年份秋季采收样品。结论:本研究可为黄芩药材质量的控制提供可靠的分析方法;二年生长期春季采收可能为黄芩的最佳采收时间。

关键词 黄芩;红外光谱三级鉴别;高效液相色谱-质谱联用法;采收期;鉴定;含量测定;质量控制

Study on the Quality of *Scutellaria baicalensis* with Different Harvesting Periods by IR-TL and HPLC-MS

ZHAO Shengnan, LIU Suli, XU Yanglu, LI Shouzhuo (TCM Institute of Chengde Medical College, Chengde Medical College/Hebei Key Lab of Research and Development for TCM, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study effective component kinds and content difference of *Scutellaria baicalensis* with different harvesting periods collected in spring and autumn, and to determine the optimal harvesting time. METHODS: IR-IL was used to analyze the constitutions change of the components in *S. baicalensis* collected in different harvesting periods (annual, biennial and triennial, in spring and autumn, respectively). HPLC-MS method was used to analyze the contents change of 6 flavonoids (quoxylin A, chrysin, wogonin, wogonoside, baicalin, baicalein). RESULTS: Results of IR-TL analysis showed that *S. baicalensis* contained different components such as flavonoids, glycosides, saccharides, esters in different growth stages, among which the contents of glycosides in biennial *S. baicalensis* were the highest with more stable quality. The results of content determination of 6 flavonoids showed that different harvesting periods had a great influence on the contents of the above indicators. The overall content of biennial samples collected in spring was higher than that of autumn samples collected in the same year. CONCLUSIONS: This study provides a reliable analytical method for the quality control of *S. baicalensis*; spring harvest in two-year growth period may be the best harvesting time for *S. baicalensis*.

KEYWORDS *Scutellaria baicalensis*; IR-TL; HPLC-MS; Harvesting period; Identification; Content determination; Quality control

[16] 申晓娟,段书涛,俞培. RP-HPLC法测定椭圆叶花锚和花锚中异龙胆黄素的含量[J].天然产物研究与开发,2008,20(1):107-109.

[17] 彭芳,刘晓波,方春生,等.紫红獐牙菜对实验性肝损伤的保护作用[J].中国新药与临床药理,2002,13(6):376-378.

[18] 张经明,鲍文莲,高海平,等.花锚及其口山酮苷抗肝损伤

^Δ基金项目:河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No.冀中医药[2015]11号-2015156);河北省高校重点学科建设项目(No.冀教高[2013]4号)

* 讲师,硕士。研究方向:中药分析。电话:0314-2291186。E-mail:dadashengnan@126.com

[#] 通信作者:教授。研究方向:药物分析。电话:0314-2291186。E-mail:1192620149@qq.com

和毒性的研究[J].中草药,1984,15(10):34-36.

[19] 朱田田,张裴斯,晋玲,等.当归简单重复序列区间-聚合酶链反应体系的建立及优化与品种(系)间遗传关系研究[J].中国药房,2014,25(35):3265-3269.

[20] DOYLE JJ. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[M]/HEWITT GM, JOHNSTON AWB, YOUNG JPW. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer-Verlag, 1991:283-293.

[21] 田辉,蒋嫦月,朱华,等.广西产鸡血藤遗传多样性的RAPD与ISSR标记方法的比较研究[J].中国药房,2015,26(31):4348-4350.

(收稿日期:2018-10-17 修回日期:2019-04-26)

(编辑:段思怡)

对中药制剂的质量起关键性作用的是其制剂工艺的稳定性 and 中药材质量的均一性,但中药材的品种、采收期、产地、储藏期及储藏条件等因素^[1-4]常导致中药材的质量存在差异,进而影响中药制剂质量的稳定性和安全性。采收期是影响中药材质量的重要因素之一,如何确定中药材的适宜采收期一直是该领域的研究重点和热点。黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,其最早在《神农本草经》中出现,在该书及多种经典文献中均有对其功效的记载^[5],传统中医主要将其用于泻火解毒、清热燥湿^[6]。本文以黄芩药材为研究对象,应用红外光谱三级鉴别法(IR-TL)联合高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)对不同采收期的药材样品进行成分分析。

传统的中药材分析方法一般是先对中药材进行提取分离,然后对提取物进行分析。然而,药材中的原始物质与提取分离后的成分可能具有一定差异,因此传统分析方法可能无法完全反映原始药材的真实信息。IR-TL法可在增大样品光谱分辨率的基础上逐级放大相似光谱之间的差异,实现对成分复杂的样品的区分^[7]。采用IR-TL法对黄芩不提取而直接进行原药材分析,有望全面反映药材的整体成分信息。HPLC-MS法综合了HPLC的分离能力和MS的分辨能力,其MS检测器是一种高灵敏度、高分辨的检测器,不需要色谱峰完全分离即可准确定量,尤其适于一些含量较低或者极性相近的成分分析^[8]。黄芩中主要有效成分为黄酮类成分,2015年版《中国药典》(一部)“黄芩”项下是以黄芩苷含量为质量控制指标^[9],但单个成分无法全面反映中药材质量。因此,本课题组采用IR-TL法联合HPLC-MS法,对不同采收期黄芩药材的成分种类和含量进行综合分析,并对千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷等6种黄酮类成分进行含量测定,旨在为合理确定黄芩的最佳采收期提供可靠的技术支持。

1 材料

1.1 仪器

Mettler AG245型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Spectrum GX型FTIR光谱仪(美国PerkinElmer公司);Agilent 6310型液相色谱-质谱联用仪(包含1100型高效液相色谱仪、6310型质谱仪,美国Agilent公司);CKW-II型温控仪(北京市朝阳自动仪表厂)。

1.2 药品与试剂

千层纸素A对照品(批号:20091124,纯度:>99%)、白杨素对照品(批号:20090518,纯度:>99%)、汉黄芩苷对照品(批号:20090319,纯度:>99%)均购自上海顺勃生物工程技术有限公司;黄芩素对照品(批号:111595-200604,纯度:>99%)、汉黄芩素对照品(批号:111514-200403,纯度:>99%)、黄芩苷对照品(批号:715-9506,纯度:>99%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为质谱纯,甲酸、乙醇为分析纯,水为纯

净水。

1.3 药材

栽培黄芩药材采自内蒙古赤峰(分别采集一年、二年、三年生的黄芩药材,在各年份的春季和秋季分别采挖),所有药材均采自同一地块,课题组在每个时间点选取其中质量较好的10株作为试验样品(一年生春季采挖的10株样品编号为1-1-1~1-1-10,秋季采挖的10株样品编号为1-2-1~1-2-10;二年生春季采挖的10株样品编号为2-1-1~2-1-10,秋季采挖的10株样品编号为2-2-1~2-2-10;三年生春季采挖的10株样品编号为3-1-1~3-1-10,秋季采挖的10株样品编号为3-2-1~3-2-10)。本课题组成员亲自考察药材产地并进行采挖,所采药材由中国科学院植物研究所与进化植物学国家重点实验室周世良研究员鉴定为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根。

2 IR-TL法检测黄芩药材中化学成分组成

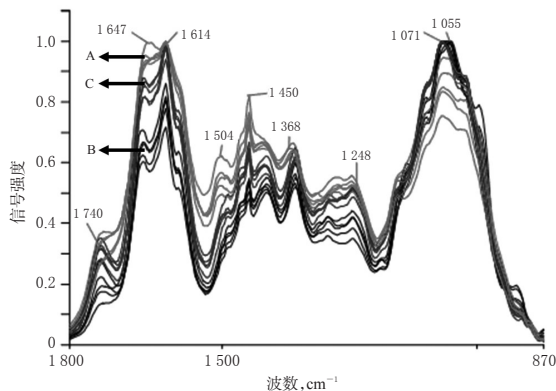
2.1 样品检测

取药材样品适量,粉碎,过筛(200目),称取样品粉末2 mg和溴化钾约200 mg,于玛瑙研钵中轻轻研磨混匀后压片,立刻进行红外光谱检测。采用Spectrum v3.02操作软件(PerkinElmer公司)获得二阶导数红外图谱(平滑点数为13)。选择 400 cm^{-1} 与 2000 cm^{-1} 为光谱基线起止点,计算光谱特征峰的高度比,然后将样品压片装入程序控制变温附件中,以升温速度 $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 加热,每隔 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($50\sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$)检测样品的IR-TL光谱,计算二维相关数据^[9],得到二维红外光谱。

2.2 IR-TL光谱数据分析

2.2.1 不同生长年份黄芩的一级红外光谱 本研究所获一级红外光谱结果显示,一年生黄芩的各样品谱图之间有较大区别,有的样品谱图中有明显的 1059 cm^{-1} 峰,其代表了糖类吸收峰;有的样品谱图中有明显的 1071 cm^{-1} 峰,其代表了苷类吸收峰;有的样品谱图中有明显的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰 1740 cm^{-1} ,其代表了酯类吸收峰^[9-11]。二年生黄芩的各样品谱图间的一致性较高,所有样品的谱图中均含有 1071 、 1740 cm^{-1} 峰。三年生黄芩的各样品谱图间也有较大差异,部分样品谱图中的 1071 cm^{-1} 峰移至 1059 cm^{-1} ,并且有的样品谱图中无明显的 1740 cm^{-1} 峰。3个生长年份黄芩样品的红外光谱图有明显差异,其中二年生黄芩有代表黄酮类成分苯环骨架振动吸收峰的 1614 cm^{-1} 峰^[12-13],其信号稍弱于三年生样品,同时 1740 cm^{-1} 峰明显强于一年或三年生样品。不同生长年份春季采收黄芩药材的一级红外光谱对比图见图1(限于篇幅,秋季采收样品的图谱略,下同)。

2.2.2 不同生长年份黄芩的二阶导数红外光谱 二阶导数光谱可在一级光谱基础上增大信号峰的分辨率,提供更多的信号信息^[5]。本研究所获二阶导数红外光谱显示,不同生长年份黄芩药材的二阶导数红外谱图在



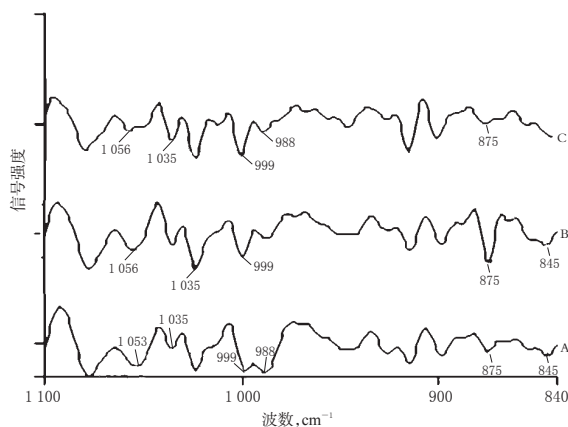
注:A.一年生黄芩;B.二年生黄芩;C.三年生黄芩

Note: A. annual *S. baicalensis*; B. biennial *S. baicalensis*; C. triennial *S. baicalensis*

图1 不同生长年份春季采收黄芩的一级红外光谱对比图

Fig 1 Comparison of first-level infrared spectroscopy of *S. baicalensis* with different growth years in spring

1100~840 cm^{-1} 波数范围内有一定差异:(1)在999~988 cm^{-1} 范围内均有2个信号峰,其中一年生黄芩这2个峰信号较弱、强度接近;二年生黄芩这2个峰信号强度明显增强;三年生黄芩与二年生黄芩比较变化不明显。(2)在875 cm^{-1} 峰处,二年生黄芩的信号最强,一年生黄芩次之,三年生黄芩最弱。(3)在845 cm^{-1} 峰处,一年、二年生黄芩的信号强度变化不大,但是三年生黄芩在该峰处的信号几乎消失。由此表明,不同生长年份黄芩中所含成分种类和含量不同,以二年时达到成分种类和含量的最高峰。不同生长年份春季采收黄芩的二阶导数红外光谱对比图见图2。



注:A.一年生黄芩;B.二年生黄芩;C.三年生黄芩

Note: A. annual *S. baicalensis*; B. biennial *S. baicalensis*; C. triennial *S. baicalensis*

图2 不同生长年份春季采收黄芩的二阶导数红外光谱对比图

Fig 2 Comparison of second-level derivative infrared spectroscopy of *S. baicalensis* with different growth years in spring

2.2.3 不同生长年份黄芩的二维相关红外光谱 二维红外光谱图可通过光谱颜色区分信号强度,其中橙红色区域信号最强,代表此区域成分含量较高,其次为黄色区域,蓝色和绿色区域信号则较弱^[9]。图3为不同生长年份黄芩在1150~900 cm^{-1} 范围内的二维光谱,此波段主要反映糖类C—O振动基团或苷类^[14-15]。由图3可见,一年生黄芩谱图中存在4个主要的信号峰,分别为1031、1010、970、909 cm^{-1} ,其中以970 cm^{-1} 峰信号最强,此波段代表糖类成分^[14],由此提示该生长年份样品中含有较多糖类成分;二年生黄芩谱图中同样有4个主要信号峰,分别为1120、1080、980、940 cm^{-1} ,其中以1080 cm^{-1} 峰信号最强,此波段代表苷类成分^[15],由此提示该生长年份样品含有较多苷类成分;三年生黄芩谱图中有2个较强信号峰,分别为1120、1080 cm^{-1} ,其中以1080 cm^{-1} 峰信号最强,但是与二年生样品比较,其糖类信号峰区域970、909 cm^{-1} 的信号强度和苷类信号峰区域1120、1080 cm^{-1} 的信号强度均变弱,且信号峰位置未见明显移动。这提示三年生黄芩的糖类和苷类成分种类和含量变化明显,与二年生黄芩比较上述成分有所减少。

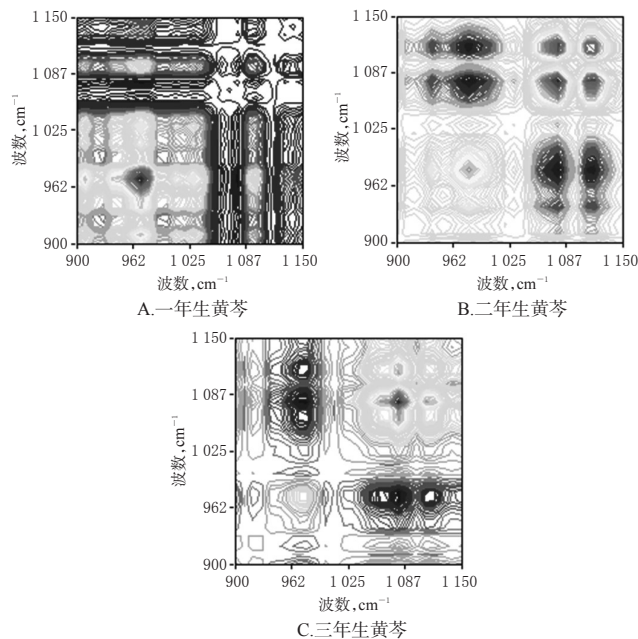


图3 不同生长年份春季采收黄芩的二维红外光谱图

Fig 3 Two-dimensional infrared spectra of *S. baicalensis* with different growth years in spring

3 HPLC-MS法测定黄芩药材中6种黄酮类成分的含量

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液 精密称量千层纸素A对照品0.12 mg、白杨素对照品0.12 mg、黄芩素对照品8.38 mg、汉黄芩素对照品2.09 mg、黄芩苷对照品17.74 mg、汉黄芩苷对照品4.66 mg,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为各对照品贮备液;精密量取上述贮备液1 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩

苷质量浓度分别为1.20、1.20、83.8、20.9、177.4、46.6 $\mu\text{g/L}$ 的溶液,作为各对照品溶液。

3.1.2 供试品溶液 精密称量药材粉末约0.25 g,置于50 mL平底烧瓶中,精密加入混合溶剂[冰醋酸-乙酸乙酯-乙醇-水(1:5:49:50, $V/V/V/V$)]25 mL,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流90 min后,静置5 min,取上清液,以0.45 μm 有机膜滤过,取续滤液,即得。

3.2 色谱条件与质谱条件

3.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB C_{18} (150 mm \times 2.1 mm,3.5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min,18% A \rightarrow 20% A;10~18 min,20% A \rightarrow 25% A;18~30 min,25% A \rightarrow 30% A;30~40 min,30% A \rightarrow 40% A;40~60 min,40% A \rightarrow 60% A);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:276 nm;流速:0.2 mL/min;进样量:2 μL ^[6]。

3.2.2 质谱条件 电喷雾离子(ESI)源;检测方式:多反应监测(MRM)模式;采用正离子模式检测;喷雾电压:3 500 V,离子源温度:350 $^{\circ}\text{C}$;质荷比(m/z)扫描范围:100~1 200。其中,千层纸素A m/z :285 \rightarrow 270,碰撞电压:1.00 V;白杨素 m/z :255 \rightarrow 153,碰撞电压:0.92 V;黄芩素 m/z :271 \rightarrow 123,碰撞电压:0.67 V;汉黄芩素 m/z :286 \rightarrow 270,碰撞电压:1.00 V;黄芩苷 m/z :447 \rightarrow 271,碰撞电压:0.22 V;汉黄芩苷 m/z :461 \rightarrow 285,碰撞电压:1.00 V。

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系考察 分别精密量取各对照品溶液适量,加甲醇稀释制成千层纸素A质量浓度分别为0.04、0.06、0.15、0.30、0.60、1.20 $\mu\text{g/mL}$,白杨素质量浓度分别为0.04、0.06、0.15、0.30、0.60、1.20 $\mu\text{g/mL}$,黄芩素质量浓度分别为2.62、5.23、10.48、20.95、41.90、83.80 $\mu\text{g/mL}$,汉黄芩素质量浓度分别为0.30、0.52、2.61、5.22、10.50、20.90 $\mu\text{g/mL}$,黄芩苷质量浓度分别为8.86、11.10、22.20、44.40、88.60、177.40 $\mu\text{g/mL}$,汉黄芩苷质量浓度分别为3.63、5.83、11.70、15.50、23.30、46.60 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,再按“3.2”项下色谱与质谱条件进样测定。以各对照品的质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/mL}$)、峰面积(MRM模式)为纵坐标(y)进行回归分析,结果见表1。6种成分回归方程的 r 值均大于0.999,表明各对照品在上述质量浓度范围内线性关系良好。

表1 6种黄酮类成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linear range of 6 kinds of flavonoids

待测成分	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	回归方程	r
千层纸素A	0.04~1.20	$y=3\ 703.9x+483.86$	0.999 5
白杨素	0.04~1.20	$y=3\ 727.4x+292.71$	0.999 5
黄芩素	2.62~83.80	$y=412.13x+2\ 888.2$	0.999 4
汉黄芩素	0.30~20.90	$y=2\ 590.1x+61.35$	0.999 1
黄芩苷	8.86~177.40	$y=5\ 407.1x-41\ 983$	0.999 1
汉黄芩苷	3.63~46.60	$y=157.06x+678.51$	0.999 3

3.3.2 精密度试验 取“3.1.2”项下制备的同一供试品溶液(样品编号:2-10-1),按“3.2”项下色谱与质谱条件

进样测定6次。结果显示,千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷峰面积RSD分别为2.02%、1.18%、2.44%、0.61%、0.94%、1.10% ($n=6$),表明方法精密度良好。

3.3.3 重复性试验 精密称取药材样品(样品编号:2-10-1)约0.25 g,共6份,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.2”项下色谱与质谱条件进样测定。结果显示,千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷含量的RSD分别为1.08%、2.52%、1.68%、1.32%、2.28%、1.52% ($n=6$),表明方法重复性良好。

3.3.4 稳定性试验 取“3.1.2”项下制备的同一供试品溶液(样品编号:2-10-1),分别于室温放置0、2、4、8、12、24 h时按“3.2”项下色谱与质谱条件进样测定。结果显示,千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷峰面积的RSD分别为2.68%、1.95%、1.67%、0.51%、1.86%、2.23% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

3.3.5 加样回收率试验 精密称取黄芩样品(样品编号:2-10-1)0.125 g,共6份,分别精密加入各对照品贮备液适量,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.2”项下色谱与质谱条件进样测定并计算加样回收率。结果显示,千层纸素A、白杨素、黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷平均加样回收率分别为99.8%、98.9%、99.8%、100.6%、100.2%、98.1%,RSD分别为1.90%、1.44%、2.99%、2.27%、3.59%、1.77% ($n=6$),表明方法准确度良好。

3.4 样品含量测定

取所有黄芩药材样品各适量,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“3.2”项下色谱与质谱条件进样测定,以待测成分的峰面积(MRM模式)代入表2中的线性回归方程,计算待测成分含量。样品中6种黄酮类成分含量测定结果见表2、表3,离子流示意图见图4。

结果显示,赤峰产一年到三年生春季采收的药材样品中千层纸素A平均含量由0.035%逐渐升至0.172%,白杨素平均含量由0.008%逐渐升至0.065%,黄芩素平均含量由0.34%逐渐升至2.71%,汉黄芩素平均含量由1.71%逐渐升至6.10%,黄芩苷平均含量由11.99%升至13.58%再降至11.48%,汉黄芩苷平均含量由3.35%逐渐降至0.51%,总黄酮平均含量由17.43%升至21.43%再降至21.04%;秋季采收黄芩中千层纸素A平均含量由0.057%逐渐降至0.029%,白杨素平均含量由0.017%降至0.008%再升至0.011%,黄芩素平均含量由0.74%逐渐降至0.25%,汉黄芩素平均含量由3.04%逐渐降至1.48%,黄芩苷平均含量由12.77%逐渐降至9.68%,汉黄芩苷平均含量由3.42%逐渐降至0.64%,总黄酮平均含量由20.04%逐渐降至12.09%。由此可知,不同采收期对黄芩药材中这6种成分含量有较大影响,其中二年生春季采收样品的整体含量高于同年份秋季采收样品。

表2 不同生长年份春季采收黄芩中6种黄酮类成分含量(%)

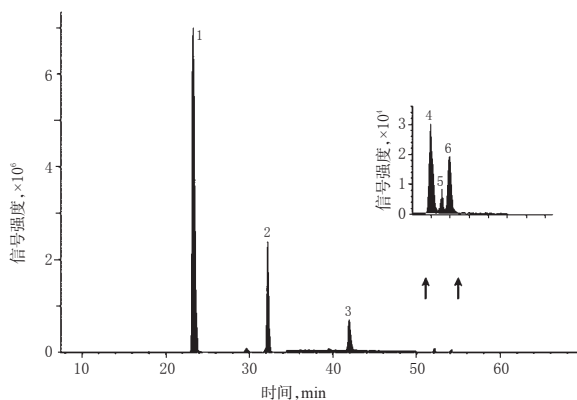
Tab 2 Contents of 6 kinds of flavonoids in *S. baicalensis* with different growth years in spring(%)

生长年份	样品编号	千层纸素A	白杨素	黄芩素	汉黄芩素	黄芩苷	汉黄芩苷	总黄酮
一年	1-1-1	0.045	0.008	0.30	1.66	10.25	3.12	15.38
	1-1-2	0.039	0.009	0.35	1.77	12.89	3.46	18.52
	1-1-3	0.029	0.007	0.28	1.62	11.45	4.05	17.44
	1-1-4	0.033	0.008	0.38	1.75	12.48	3.48	18.13
	1-1-5	0.042	0.006	0.23	1.55	10.89	3.28	16.00
	1-1-6	0.026	0.012	0.42	1.88	13.56	3.22	19.12
	1-1-7	0.036	0.006	0.28	1.56	11.06	2.95	15.89
	1-1-8	0.037	0.008	0.34	1.72	11.76	3.06	16.93
	1-1-9	0.032	0.009	0.34	1.70	11.72	3.62	17.42
	1-1-10	0.033	0.011	0.46	1.85	13.88	3.28	19.51
	平均值	0.035	0.008	0.34	1.71	11.99	3.35	17.43
二年	2-1-1	0.106	0.033	1.75	4.68	13.66	1.26	21.49
	2-1-2	0.098	0.038	1.75	4.68	13.62	1.28	21.47
	2-1-3	0.102	0.028	1.79	4.70	13.70	1.36	21.68
	2-1-4	0.100	0.030	1.77	4.62	12.58	1.22	20.32
	2-1-5	0.102	0.032	1.69	4.59	13.55	1.22	21.18
	2-1-6	0.103	0.036	1.78	4.72	13.88	1.32	21.84
	2-1-7	0.106	0.033	1.80	4.72	13.92	1.30	21.88
	2-1-8	0.102	0.039	1.74	4.66	13.64	1.28	21.46
	2-1-9	0.098	0.032	1.74	4.65	13.66	1.26	21.44
	2-1-10	0.100	0.035	1.76	4.69	13.62	1.28	21.49
	平均值	0.102	0.034	1.76	4.67	13.58	1.28	21.43
三年	3-1-1	0.182	0.078	2.85	6.35	12.66	0.48	22.60
	3-1-2	0.163	0.069	2.79	6.12	11.75	0.52	21.41
	3-1-3	0.168	0.065	2.75	6.18	11.82	0.48	21.46
	3-1-4	0.172	0.066	2.73	6.10	11.10	0.46	20.63
	3-1-5	0.175	0.062	2.66	5.98	10.88	0.55	20.31
	3-1-6	0.152	0.056	2.56	5.86	10.26	0.42	19.31
	3-1-7	0.196	0.072	2.79	6.28	11.96	0.56	21.86
	3-1-8	0.177	0.069	2.72	6.16	11.72	0.62	21.47
	3-1-9	0.173	0.058	2.55	5.79	10.88	0.44	19.89
	3-1-10	0.169	0.059	2.70	6.22	11.85	0.59	21.59
	平均值	0.172	0.065	2.71	6.10	11.48	0.51	21.04

表3 不同生长年份秋季采收黄芩中6种黄酮类成分含量(%)

Tab 3 Contents of 6 kinds of flavonoids in *S. baicalensis* with different growth years in autumn(%)

生长年份	样品编号	千层纸素A	白杨素	黄芩素	汉黄芩素	黄芩苷	汉黄芩苷	总黄酮
一年	1-2-1	0.060	0.018	0.75	3.02	12.52	3.24	19.61
	1-2-2	0.059	0.019	0.66	3.11	11.98	2.89	18.72
	1-2-3	0.055	0.015	0.81	3.05	13.55	3.78	21.26
	1-2-4	0.050	0.022	0.85	2.98	13.28	3.66	20.84
	1-2-5	0.057	0.016	0.75	3.06	12.89	3.48	20.25
	1-2-6	0.069	0.014	0.79	3.14	12.88	3.46	20.35
	1-2-7	0.049	0.018	0.70	2.95	12.45	3.22	19.39
	1-2-8	0.058	0.016	0.77	3.08	11.67	3.35	18.94
	1-2-9	0.057	0.013	0.65	3.12	13.64	3.74	21.22
	1-2-10	0.051	0.023	0.67	2.93	12.85	3.42	19.94
	平均值	0.057	0.017	0.74	3.04	12.77	3.42	20.04
二年	2-2-1	0.054	0.007	0.47	2.05	11.87	2.76	17.21
	2-2-2	0.058	0.008	0.45	2.07	11.85	2.75	17.19
	2-2-3	0.050	0.008	0.46	2.09	11.95	2.79	17.35
	2-2-4	0.048	0.009	0.45	2.00	11.82	2.72	17.05
	2-2-5	0.055	0.006	0.47	2.07	11.75	2.82	17.17
	2-2-6	0.054	0.008	0.46	2.09	11.92	2.65	17.18
	2-2-7	0.054	0.008	0.47	2.07	11.94	2.77	17.31
	2-2-8	0.062	0.007	0.45	2.09	11.87	2.79	17.27
	2-2-9	0.060	0.009	0.46	2.03	11.85	2.73	17.14
	2-2-10	0.046	0.007	0.46	2.09	11.83	2.77	17.20
	平均值	0.054	0.008	0.46	2.07	11.86	2.76	17.21
三年	3-2-1	0.033	0.011	0.22	1.38	10.85	0.72	13.21
	3-2-2	0.038	0.010	0.28	1.45	9.95	0.63	12.36
	3-2-3	0.022	0.012	0.26	1.55	8.74	0.56	11.14
	3-2-4	0.031	0.009	0.24	1.59	8.94	0.59	11.40
	3-2-5	0.029	0.007	0.25	1.37	9.95	0.68	12.29
	3-2-6	0.025	0.013	0.26	1.46	9.56	0.62	11.94
	3-2-7	0.030	0.012	0.24	1.50	9.98	0.66	12.42
	3-2-8	0.029	0.010	0.26	1.62	10.06	0.76	12.74
	3-2-9	0.035	0.010	0.26	1.37	8.88	0.54	11.10
	3-2-10	0.033	0.011	0.27	1.55	9.91	0.65	12.42
	平均值	0.029	0.011	0.25	1.48	9.68	0.64	12.09



注:1.黄芩苷;2.汉黄芩苷;3.黄芩素;4.汉黄芩素;5.白杨素;6.千层纸素A

Note: 1. baicalin; 2. baicalein; 3. wogonin; 4. wogonoside; 5. chrysin; 6. quoxylin A

图4 黄芩中6种黄酮类成分离子流图(MRM模式,样品编号:2-10-1)

Fig 4 Ion current diagram of 6 kinds of flavonoids in *S. baicalensis* (MRM mode, sample No. 2-10-1)

3 讨论

黄芩属多年生草本植物,其所含有效成分种类及含量会随着不同生长期有着较大的波动。目前对于黄芩采收期的确定多选用HPLC法测定其中单个或几个成分的含量作为指标,如缪晓素等^[17]采用HPLC法对不同采收期黄芩有效成分的含量进行了研究,安瑜等^[18]采用HPLC法对不同采收期黄芩中黄芩苷的含量进行了研究。这些研究多采用单一分析手段或以几个目标成分作为指标,当药材中有极性相近的成分干扰时,或者某些成分含量较低时,对结果的影响较大。而本研究综合IR-TL法和HPLC-MS法对不同采收期黄芩进行研究,首先对原药材不分离即进行成分定性检测,再对6种主要黄酮类成分进行定量测定,可获得更加全面的原药材物质信息。

本研究通过三级红外光谱中特征峰位置和信号强度判断,不同生长期黄芩所含糖类成分不同,其中二年生黄芩中的苷类物质含量最高。而通过一级红外光谱

对同一生长年份的不同样本的比较结果提示,三年生黄芩成分组成不稳定,其可能原因在于黄芩生长到第三年时会有部分变成枯芩,造成酯类成分含量降低,有效成分苷类会分解成糖类成分。由于结果数据较多,笔者在本文只列出了3个生长年份春季采收样品的对比结果,而秋季采收样品所得红外三级光谱比较结果与春季样品相同。笔者综合不同年份样品的多个成分指标后认为,二年生黄芩质量可能更稳定。本课题组曾对比了二年生春秋两季采收黄芩的红外光谱,结果显示,秋季采收样品中黄酮类、酯类成分的含量要低于春季采收样品,且两季样品所含糖类成分种类不同(已另文发表)^[19]。综合考虑上述结果,从保证用药质量并缩短药材种植时间出发,初步确定二年生春季采挖可能为黄芩的最佳采收期。

此外,考虑到黄酮类成分为黄芩的主要有效成分,因此基于市面上能获取的相应对照品,本研究对6种黄酮类成分进行了含量测定,尤其是对其中含量较低的千层纸素A和白杨素进行了准确定量。由于黄酮类成分本身有紫外吸收,研究者通常认为紫外检测器完全可以满足检测条件。但本课题组在前期对比紫外检测器和MS检测器时发现,所测6种成分中,除了黄芩苷含量测定结果差别不大外,其他5种成分的测定结果均有不同程度的差异,尤其是含量较低的千层纸素A和白杨素(将另文报道)。因此,本研究重点对质谱条件进行了优化:首先,对比ESI源和大气压离子(APCI)源后发现,前者检测条件下6种待测成分的灵敏度更高;其次,采用交替离子模式进行条件考察,结果显示正离子模式下得到的离子碎片数据更多;最后,在MRM模式下测定时,以每种成分的离子对响应值在0.1~1.2 V范围内对碰撞电压进行考察,并优选出各成分最适宜的碰撞电压。本研究通过比较6种黄酮类成分含量测定结果,进一步确定了不同采收期黄芩质量存在差异,并证实二年生春季采收样品的质量整体优于同年份秋季采收样品。2015年版《中国药典》(一部)规定黄芩在春、秋两季采挖^[6],但本研究结果提示,两季黄芩药材的成分构成及含量有差异,其临床药效可能也会不同。

综上所述,本研究采用了IR-TL法和HPLC-MS法对黄芩药材进行了成分鉴定与含量测定,可为其质量控制提供可靠的分析方法;同时,确定二年生春季采挖为黄芩的最佳采收期。但本研究只是从化学成分变化的角度评价不同采收期黄芩质量的优劣,但这些化学信息能否代表药材疗效的优劣,还需进一步研究;此外,本研究采用的分析技术虽能在一定程度上尽可能多地反映了黄芩成分变化,但仍需进一步运用更多技术,建立目标成分与药效的关系,以完善黄芩药材质量标准。

参考文献

[1] 魏莹莹,王晓,张琳,等.不同生长年限黄芩根部活性成分分布及微观结构研究[J].中药材,2015,38(5):911-914.
[2] 刘佳,黄晓,余坤,等.云南野生和湖北引种鞘蕊苏有效成

分含量与其生态环境的相关性研究[J].中药材,2015,38(6):1141-1143.
[3] 胡云飞,吴德玲,徐国兵,等.GC-MS结合化学计量学对5个产地牡丹皮提取物的比较分析[J].中成药,2015,37(9):2003-2007.
[4] 叶菊,邱黛玉,曾擎义,等.不同采收期各品种甘草产量和有效成分的比较[J].中成药,2016,38(5):1088-1092.
[5] 宋旦哥.基于不同来源的黄芩物质基础与其药效学相关性研究[D].北京:北京中医药大学,2010.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:301-302.
[7] 马芳.红外光谱分析在茯苓资源研究中的应用[D].武汉:武汉轻工大学,2013.
[8] GAJBHIYE NA, MAKASANA J, KUMAR S. Accumulation of three important bioactive compounds in different plant parts of *Withania somnifera* and its determination by the LC-ESI-MS-MS (MRM) method[J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(10): 1749-1756.
[9] 刘素丽.黄芩药材的质量控制研究[D].承德:承德医学院,2013.
[10] 王鹏,郭庆梅,赵启韬,等.白花丹参不同部位的红外光谱三级鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):113-117.
[11] 金哲雄,徐胜艳,孙素琴,等.刺五加不同部位的红外光谱分析与鉴定[J].光谱学与光谱分析,2008,28(12):2859-2863.
[12] 徐荣,孙素琴,刘友刚,等.红外光谱法用于肉苁蓉属中药鉴别研究[J].光谱学与光谱分析,2010,30(4):897-900.
[13] 张春晖,张贵君,孙素琴,等.黄芩及其提取物红外光谱与二维相关光谱的鉴别[J].光谱学与光谱分析,2010,30(7):1774-1779.
[14] LEI Y, ZHOU Q, ZHANG YL, et al. Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy[J]. *J Mol Struct*, 2010, 974(1/2/3): 88-93.
[15] WU YW, SUN SQ, ZHAO J, et al. Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy[J]. *J Mol Struct*, 2008. DOI: 10.1016/j.molstruc.2007.12.009.
[16] 徐杨璐.基于液质联用技术的黄芩物质基础研究[D].承德:承德医学院,2015.
[17] 缪晓素,宋国虎,刘容秀,等.不同栽培年限及采收期对黄芩药材有效成分含量的影响研究[J].中国现代中药,2015,17(8):836-839.
[18] 安瑜,王旭鹏,赵建军.宁夏六盘山栽培黄芩适宜采收期研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):161-164.
[19] 刘素丽,陈建波,周群,等.黄芩采收季节的红外光谱三级鉴别与主成分分析[J].光谱学与光谱分析,2012,32(10):2669-2673.

(收稿日期:2018-12-24 修回日期:2019-04-30)

(编辑:段思怡)