



DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2023.03.0022

## 黄芩苷铝 HPLC 检测方法的建立

赵鸣,余瑞雪,陈蓉,邱银生,叶纯\*

(武汉轻工大学 动物科学与营养工程学院,武汉 430023)



中图分类号:S853.7

文献标识码:A

文章编号:1004-7034(2024)06-0097-05

**摘要:**为了探究测定黄芩苷铝含量的有效方法,试验先摸索了供试品前处理方法,将黄芩苷铝完全转化成黄芩苷后以黄芩苷为对照品,建立测定黄芩苷含量的高效液相色谱(HPLC)检测方法,绘制标准曲线,并考察该方法的系统适用性、准确度、精密度、重复性、耐用性和稳定性,最后利用该方法对样品含量进行检测。结果表明:供试品前处理条件为向黄芩苷铝中加入乙腈-0.05%磷酸溶液(40:60)并超声30 min;液相色谱条件,色谱柱为Hypersil ODS色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(30:70),检测波长为278 nm,流速为1.00 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。在该条件下,黄芩苷在20~320 μg/mL内线性关系良好( $R^2=0.9999$ ),精密度高、重复性好,平均回收率为101.24%,供试品溶液在36 h内稳定。在测试范围内,柱温、流速和色谱柱对样品中黄芩苷的含量测定无影响。说明建立的黄芩苷铝HPLC检测方法操作简单,可靠性高,可以用作黄芩苷铝含量的测定。

**关键词:**黄芩苷铝;前处理;黄芩苷;含量测定;高效液相色谱

## Establishment of HPLC determination method for baicalin aluminum

ZHAO Ming, YU Ruixue, CHEN Rong, QIU Yinsheng, YE Chun\*

(College of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** In order to explore the effective method for the determination of baicalin aluminum content, in the experiment, firstly, the pretreatment method of the test sample was explored; the high-performance liquid chromatography (HPLC) detection method for the determination of baicalin content was established after the aluminum baicalin was completely converted into baicalin and the baicalin was used as the reference substance; the standard curve was drawn, and the system applicability, accuracy, precision, repeatability, durability and stability of the method were investigated, and finally the sample content was detected by the method. The results showed that the pretreatment conditions of the test samples were acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (40:60) to baicalin aluminum and sonication for 30 min; liquid chromatography conditions were Hypersil ODS column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous solution (30:70); the detection wavelength was 278 nm; the flow rate was 1.00 mL/min; the column temperature was 30 ℃; and the injection volume was 10 μL. Under these conditions, baicalin had a good linear relationship ( $R^2=0.9999$ ) in 20-320 μg/mL, high precision and good repeatability; the average recovery rate was 101.24%, and the test solution was stable within 36 h. Within the test range, column temperature, flow rate, and column had no effect on the determination of baicalin content in the sample. The results indicated that the established HPLC method for the detection of baicalin aluminum was simple to operate and had high reliability, and could be used as the determination of the content of baicalin aluminum.

**Keywords:** baicalin aluminum; pretreatment; baicalin; content determination; HPLC

仔猪腹泻是导致仔猪生长受阻和死亡的重要原因,给养猪业带来了重大的经济损失<sup>[1-2]</sup>。仔猪细菌性腹泻的主要病原菌之一为大肠杆菌<sup>[3]</sup>。长期使用抗生素会导致细菌耐药和抗生素残留的问题<sup>[4]</sup>,因此寻找有效控制仔猪腹泻的抗生素替代品是目前亟需解决的问题。黄芩素铝胶囊具有清热解毒、燥湿止泻的功效,主要用于治疗肠炎、痢疾<sup>[5]</sup>。黄芩素铝胶囊的有效成分为黄芩苷铝,黄芩苷铝是黄芩苷与铝离子以2:1的配合比形成的金属离子配合物<sup>[6-8]</sup>。刘衍季等<sup>[9]</sup>研究发现,黄芩苷铝对革兰氏阳性菌、革兰

氏阴性菌和真菌均有一定的抑制作用,并且抑菌效果优于黄芩苷。另外,研究发现,黄芩苷铝可以调节肠道微生物群的组成,进而有助于缓解仔猪和肉鸡的腹泻<sup>[10-11]</sup>。武汉轻工大学兽用新药的创制与评价科技创新团队前期成功制备了黄芩苷铝干混悬剂,用于治疗仔猪细菌性腹泻,治愈率达到77%~100%,尤其对一些抗生素耐药的仔猪依然有很好的疗效<sup>[12]</sup>。黄芩素铝胶囊目前执行的标准为卫生部颁布的《中药方制剂(第七册)》(WS3-B-1425-93),内容仅有鉴别与检查,无含量测定项<sup>[13]</sup>,其主要成分黄芩苷铝的

收稿日期:2023-03-02;修回日期:2023-12-22

基金项目:国家自然科学基金项目(32002333)

作者简介:赵鸣(1998—),女,硕士研究生,研究方向为动物安全生产与环境工程,1797207909@qq.com.

通信作者:叶纯(1988—),女,副教授,博士,硕士生导师,研究方向为天然产物在兽药中的应用和兽用新药的创制,yechun0226@163.com.



含量测定方法也少见报道。因此,本试验旨在建立用于黄芩苷铝含量测定的高效液相色谱(HPLC)法并进行方法学考察,以期为该类药物及其制剂的质量控制提供方法与依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要药物、试剂与仪器

黄芩苷铝(粉剂,批号为20211023,20211109,20211126),均为自制;黄芩苷标准品(粉剂,批号为Z0271910,含量为96.1%),购自中国兽医药品监察所。

甲醇(批号为20210914)和乙腈(批号为20210308)均为色谱纯,碳酸氢钠(批号为20120704)、十八水硫酸铝(批号为20200519)、氢氧化钠(批号为20190317)、无水乙醇(批号为20210825)、二甲基亚砷(批号为20200317)和磷酸(批号为20201201)均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪(型号为Waters-2489,配2487紫外吸收检测器),购自Waters公司;X-Bridge C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),购自Waters公司;Diamonsil C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),购自迪马科技有限公司;Hypersil ODS色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),购自大连依利特分析仪器有限公司;酸度pH计(型号为E-301-D),购自上海力辰仪器科技有限公司;紫外可见分光光度计(型号为Agilent8543),购自美国Agilent公司;纯水仪(型号为Milli Direct-Q),购自美国Millipore公司;精密分析天平(型号为BS-110S),购自北京塞多利斯仪器系统有限公司;超声波清洗器(型号为KQ5200),购自昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为Hypersil ODS(150 mm×4.6 mm,5 mm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(30:70,V/V),流速为1.00 mL/min,柱温为30℃,进样量为10 μL。

### 1.3 前处理条件及检测波长的选择

取黄芩苷标准品和黄芩苷铝适量,溶于不同溶剂[水、甲醇、30%乙腈、40%乙腈、乙腈-0.05%磷酸溶液(30:70)和乙腈-0.05%磷酸溶液(40:60)]中,超声不同时间(10,20,30,40 min)得到黄芩苷对照品溶液和黄芩苷铝供试品溶液,然后用紫外可见分光光度计全波长扫描,扫描波长范围为250~800 nm。根据紫外吸收曲线和最大吸收波长处的吸光度(OD)值,判断黄芩苷铝是否全部分解成黄芩苷,并确定检测波长。

### 1.4 系统适用性

按照1.3中确定的前处理方法制备黄芩苷标准

品溶液,按照1.2中色谱条件用高效液相色谱仪进行测定,记录色谱图、理论塔板数和拖尾因子。

### 1.5 线性关系考察

精密称取黄芩苷标准品适量,配制质量浓度为20,40,80,160,320 μg/mL的溶液,按照1.2中色谱条件进行测定,每个浓度重复进样3针,以黄芩苷浓度为横坐标( $x$ )、色谱峰峰面积为纵坐标( $y$ )绘制标准曲线,计算相关系数( $R^2$ )。

### 1.6 准确度考察

将供试品称样量减半,分别精密称取8.31 mg和8.43 mg的黄芩苷标准品,配制成黄芩苷供试品溶液,共配制6份。按照1.2中色谱条件测定,记录峰面积并计算回收率及相对标准偏差(RSD)。

### 1.7 精密度考察

按照1.3中确定的前处理方法制备黄芩苷对照品溶液,按照1.2中色谱条件用高效液相色谱仪进行测定,连续进样6次,记录色谱图,计算峰面积和RSD。

### 1.8 重复性考察

取同一批(批号为20211126)黄芩苷铝样品,平行配制成质量浓度为80 μg/mL(以黄芩苷计)的溶液6份,按照1.2中色谱条件进行检测,记录峰面积并计算各供试品溶液中黄芩苷含量和RSD值。

### 1.9 专属性考察

精密量取空白溶剂(1.3中确定的溶剂)、黄芩苷对照品溶液(80 μg/mL)和黄芩苷铝供试品溶液(80 μg/mL,以黄芩苷计)各10 μL,注入液相色谱仪,按照1.2中色谱条件进行测定,记录色谱图。

### 1.10 耐用性考察

采用不同柱温(25,30,35℃)、流速(0.95,1.00,1.05 mL/min)及不同品牌的色谱柱(X-Bridge C<sub>18</sub>、Diamonsil C<sub>18</sub>、Hypersil ODS)对色谱条件进行微调,检测黄芩苷铝供试品溶液在不同色谱条件下的含量,考察方法的耐用性。

### 1.11 稳定性考察

取黄芩苷铝供试品溶液(80 μg/mL,以黄芩苷计),在室温下放置0,6,12,18,24,30,36 h后按照1.2中色谱条件进行测定,计算放置不同时间下黄芩苷含量,并与0 h初始峰面积比较。

### 1.12 供试品含量的测定

取三批(20211023,20211109,20211126)黄芩苷铝样品,按照1.3中确定的前处理方法制备黄芩苷铝供试品溶液,按照1.2中色谱条件进行检测,计算黄芩苷含量,再折算成黄芩苷铝含量。

### 1.13 数据的统计分析

采用Microsoft Excel 2021软件模拟标准曲线并进行回收率、RSD和含量的计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理条件及检测波长的选择

将黄芩苷铝分别溶于水、甲醇、30%乙腈、40%乙腈、乙腈-0.05%磷酸溶液(30:70)中超声时间小于30 min时,均有部分黄芩苷铝没有分解成黄芩苷。同浓度的黄芩苷对照品及黄芩苷铝供试品溶液用乙腈-0.05%磷酸溶液(40:60)超声30 min至彻底溶解,其全波长扫描结果(见图1)显示,黄芩苷铝紫外吸收曲线与黄芩苷一致,均有两个吸收峰,两处吸收峰的吸光度比值约为2:1,说明黄芩苷铝在该条件下能完全解离成黄芩苷。因此,确定前处理条件为供试品溶液于乙腈-0.05%磷酸溶液(40:60)中超声30 min至彻底溶解。黄芩苷铝和黄芩苷紫外吸收曲线中最大吸收峰波长为278 nm,结合参考文献[13-15]选择黄芩苷的最大吸收波长278 nm进行测定。

### 2.2 系统适用性

结果显示,黄芩苷对照品保留时间为3.761 min,无其他色谱峰干扰主成分峰,理论塔板数大于4 000,拖尾因子为1.05,得到的色谱峰峰型对称,说明本试验建立的黄芩苷铝检测方法柱效高,系统适用性好。

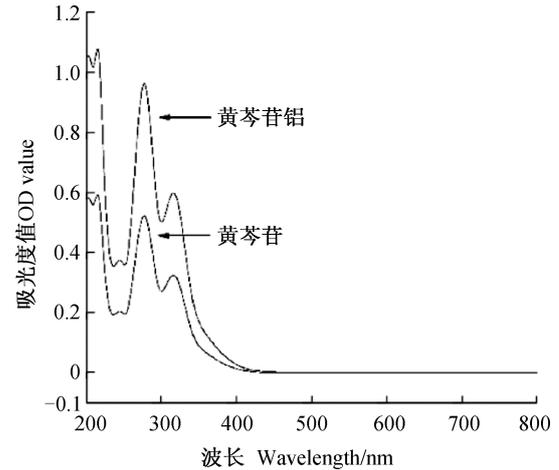


图1 相同处理下黄芩苷与黄芩苷铝紫外吸收曲线

Fig.1 The ultraviolet absorption spectrum of baicalin and baicalin aluminum under the same treatment

### 2.3 线性关系考察

不同质量浓度(20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )黄芩苷与峰面积的线性回归方程为 $y = 31\ 648x + 17\ 231$ ,  $R^2 = 0.999\ 9$ ,见图2。表明黄芩苷在20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,峰面积与质量浓度线性关系良好。

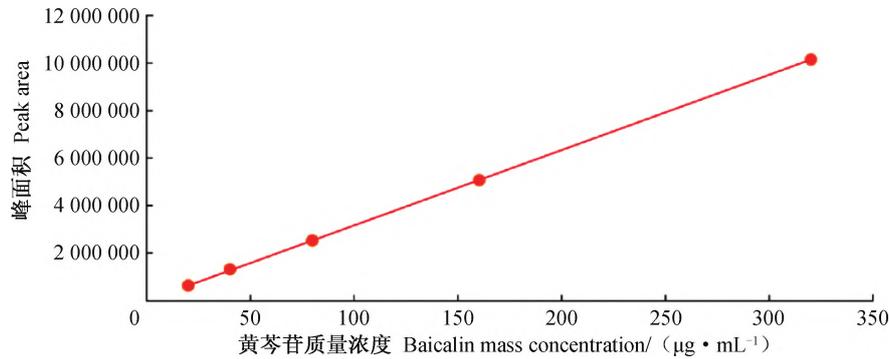


图2 黄芩苷标准曲线

Fig.2 Standard curve of baicalin

### 2.4 准确度考察

结果显示,标准品加样回收率为100.59%~

102.65%,平均回收率为101.24%,RSD为0.72%,见表1。

表1 准确度测定结果

Table 1 Determination results of accuracy

编号 Code	添加量 Addition/mg	测得量 Measured amount/mg	回收率 Recovery rate/%	平均回收率 Average recovery rate/%	RSD/%
1	8.31	8.41	101.20	101.24	0.72
2	8.31	8.53	102.65		
3	8.31	8.38	100.84		
4	8.43	8.51	100.95		
5	8.43	8.53	101.19		
6	8.43	8.48	100.59		

说明本试验建立的黄芩苷铝 HPLC 检测方法准确度高,适用于黄芩苷铝含量的测定。



### 2.5 精密度考察

结果显示,黄芩苷对照品溶液连续进样6次得到的峰面积RSD为0.63%,见表2。说明本试验建立的黄芩苷铝HPLC检测方法具有良好的精密度。

表2 精密度测定结果

Table 2 Precision determination results

编号 Code	峰面积 Peak area	RSD/%
1	2 516 574	0.63
2	2 528 964	
3	2 528 357	
4	2 530 815	
5	2 547 735	
6	2 561 296	

### 2.6 重复性考察

结果显示,对同一批黄芩苷铝制备的6份供试品溶液进行测定,RSD为1.13%,见表3。说明本试验建立的黄芩苷铝HPLC检测方法具有良好的重复性。

表3 重复性测定结果

Table 3 Repeatability determination results %

编号 Code	含量 Content	RSD
1	83.90	1.13
2	85.54	
3	82.99	
4	83.57	
5	84.31	
6	85.07	

### 2.7 专属性考察

在该色谱条件下,黄芩苷铝供试品溶液和黄芩苷对照品溶液出峰时间吻合,峰型良好,空白溶剂不干扰待测物的测定(见图3),说明本试验建立的黄芩苷

铝HPLC检测方法专属性良好。

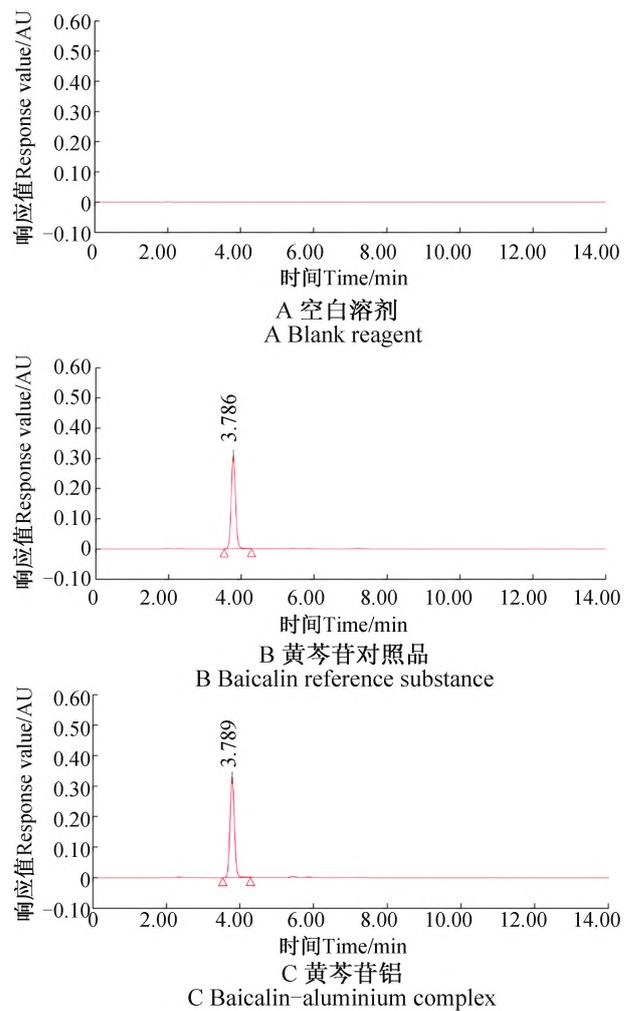


图3 专属性HPLC图

Fig. 3 Specific HPLC chromatogram

### 2.8 耐用性考察

结果显示,在柱温、流速或色谱柱发生变化时,黄芩苷铝含量并未发生明显变化,RSD均小于1%,见表4。说明本试验建立的黄芩苷铝HPLC检测方法的耐用性良好。

表4 方法耐用性检测结果

Table 4 Determination results of method durability

项目 Item	条件 Condition	含量 Content/%	RSD/%
柱温 Column temperature	25 °C	85.42	0.32
	30 °C	85.38	
	35 °C	84.92	
流速 Flow velocity	0.95 mL·min <sup>-1</sup>	82.43	0.81
	1.00 mL·min <sup>-1</sup>	83.52	
	1.05 mL·min <sup>-1</sup>	83.67	
色谱柱 Chromatographic column	X-Bridge C <sub>18</sub>	84.83	0.47
	Hypersil ODS	84.52	
	Diamonsil C <sub>18</sub>	84.04	



## 2.9 稳定性考察

结果显示,黄芩苷铝供试品溶液放置 6, 12, 18, 24, 30, 36 h 峰面积分别为初始值的 99.47%、100.05%、99.67%、99.14%、98.54%和 98.36%,黄芩苷含量 *RSD* 为 0.68%,表明该溶液在 36 h 内含量未发生明显变化,具有很好的稳定性。

## 2.10 黄芩苷铝供试品含量的测定

三批(20211023, 20211109, 20211126)黄芩苷铝供试品经测定后,再折算成黄芩苷铝的含量分别为 82.01%、80.68%、83.90%。

## 3 讨论

### 3.1 检测方法的选择

目前,黄芩苷含量测定方法主要有原子吸收分光光度法、乙二胺四乙酸(EDTA)滴定法和 HPLC 法,而关于黄芩苷金属配合物含量测定的报道较少。原子吸收分光光度法检测选择性较差,结果也受多种因素影响<sup>[16]</sup>。冯蕾<sup>[17]</sup>通过对比这三种常用含量测定方法后发现,采用 EDTA 滴定法检测黄芩苷锌含量准确度高,重复性较其他两种方法好。但由于 EDTA 滴定法测定的是游离的金属离子,而样品前处理过程中会用到硝酸或浓硫酸等强酸,且需要马弗炉高温长时间的灰化,导致该方法误差较大且耗时长。HPLC 法是药物含量测定比较常用的方法,本试验通过前处理将黄芩苷铝完全转化成黄芩苷,该方法操作更简单,测量更准确。

### 3.2 HPLC 检测方法条件的优化

《中华人民共和国兽药典(一部)》(2020年版)中黄芩苷 HPLC 检测以甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)为流动相,检测波长为 280 nm<sup>[18]</sup>。本试验对黄芩苷 HPLC 法进行了调整。前期试验发现黄芩苷铝在一定浓度弱酸溶液中常温超声处理后紫外吸收曲线会发生变化,最终转变成与黄芩苷一致的紫外吸收曲线。因此本试验在考察不同提取条件后,确定提取溶剂乙腈-0.05%磷酸溶液=40:60 时可将黄芩苷铝全部转化成黄芩苷,并通过紫外分光光度法确定其最大吸收峰波长 278 nm 为检测波长。当乙腈-0.05%磷酸溶液=40:60 作为流动相时,黄芩苷出峰时间过早,经过调整最终确定流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液=30:70。

## 4 结论

本试验结果显示,黄芩苷铝于乙腈-0.05%磷酸

溶液(40:60)中超声 30 min 可全部转化成黄芩苷;建立的黄芩苷铝 HPLC 检测方法重复性好、精密度高、准确度良好、稳定性和耐用性好,且操作简便、结果准确可靠,能有效测定黄芩苷铝的含量,可以用作黄芩苷铝及含有黄芩苷铝成分的药物含量分析。

## 参考文献:

- [1] 耿健,向志宇,赵宝凯. 仔猪腹泻概述[J]. 猪业科学, 2017, 34(6):107-109.
- [2] IKWAP K, LARSSON J, JACOBSON M, et al. Prevalence of adhesin and toxin genes in *E. coli* strains isolated from diarrheic and non-diarrheic pigs from smallholder herds in northern and eastern Uganda[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1):178.
- [3] DUBREUIL J D, ISAACSON R E, SCHIFFERLI D M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. EcoSal Plus, 2016, 7(1).
- [4] DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2010, 74(3):417-433.
- [5] 闫玉冰,杨东岩,李晓英,等. HPLC 法测定黄芩素铝胶囊中的黄芩苷[J]. 国外医药(植物药分册), 2007, 22(5):206-207.
- [6] 卞毓平. 一种黄芩素铝胶囊及其制备方法:CN106176935A[P]. 2016-12-07.
- [7] 胡功政,管倩,李凌峰,等. 一种黄芩素铝络合物及其制剂的制备方法:CN107721962A[P]. 2018-02-23.
- [8] 吴仲元,邱银生,叶纯,等. 一种用于猪混饲料黄芩苷铝配合物的制备方法:CN108794553B[P]. 2022-02-15.
- [9] 刘衍季,何小燕,刘晓华,等. 黄芩苷铜和铝配合物的合成及其生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9):1296-1302.
- [10] FU S L, ZHUANG F, GUO L, et al. Effect of baicalin-aluminum complexes on fecal microbiome in piglets[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10):2390.
- [11] GUO L, HE J, ZHANG J C, et al. Baicalin-aluminum modulates the broiler gut microbiome[J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(7):881-894.
- [12] 邱银生,吴仲元,刘宇,等. 一种治疗仔猪腹泻的黄芩苷铝干混悬剂及其制备方法:CN109091462A[P]. 2018-12-28.
- [13] 中华人民共和国卫生部. WS3-B-1425-93 黄芩素铝胶囊[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 1993.
- [14] 何艳,胡小祥,张霞,等. HPLC 测定杜仲降压片中的绿原酸、迷迭香酸和黄芩苷[J]. 华西药学杂志, 2019, 34(4):410-412.
- [15] 齐喜红,高萌,贺凯,等. HPLC 双波长法同时测定舒肝止痛丸中药药苷和黄芩苷的含量[J]. 宁夏医科大学学报, 2021, 43(2):199-202.
- [16] 段玮,张梅卿,张金海. 高效液相色谱法测定射麻口服液中黄芩苷含量[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(24):163-165.
- [17] 冯蕾. 黄芩苷锌质量控制与稳定性实验研究[D]. 昆明:昆明医学院, 2009.
- [18] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:二部[M]. 北京:中国农业出版社, 2020.

(021)