doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2019.09.07

高效液相色谱法测定七清败毒颗粒中黄芩苷含量的方法研究

侯丽丽[1],刘春龙[1],王 成[1],米彦飞[1],马晋东[1],刘 星[2]

(1. 山西省饲料兽药监察所,太原 030027;2. 山西鑫华泽药业有限公司,晋中 030900)

[收稿日期] 2019 - 02 - 26　[文献标识码]A　[文章编号]1002 - 1280 (2019) 09 - 0041 - 08　[中图分类号]S853.7

[摘　要] 为完善七清败毒颗粒质量标准,采用高液相色谱法对七清败毒颗粒中黄芩苷的含量测定进行了研究。色谱柱为 C18(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇 - 水 - 磷酸(41∶59∶0.2),检测波长为 280 nm,流速为 1 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。黄芩苷进样浓度在 0.005 ~ 0.12 mg/mL 范围内,峰面积与黄芩苷含量呈良好的线性关系(r = 0.9991),样品平均回收率为 99.2% (n = 6),*RSD* 为 1.04%。该方法简便、准确度高、重复性好,为进一步控制七清败毒颗粒的质量标准提供了依据。

[关键词] 高效液相色谱法;七清败毒颗粒;黄芩苷

Determination of Baicalin in Qiqingbaidu Particle by HPLC

HOU Li - li[1], LIU Chun - long[1], WANG Cheng[1], Mi Yan - Fei[1], Ma Jin - Dong[1], LIU Xing[2]

(1. *Shanxi Iinstitute of Feed Veterinary Drug Control*, *Taiyuan* 030027, *China*;
2. *Shanxi Xinhuaze Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Jinzhong*, *Shanxi* 030900, *China*)

Abstract: In order to improve the quality standard of Qiqingbaidu Granules, the content of Baicalin in Qiqing Baidu Granules was determined by HPLC. The isolation was performed on a C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of methyl alcohol - water - phosphoric acid (41∶59∶0.2), and the detection wavelength was 280 nm. The flow rate was 1 mL/min, and the column temperature was 30℃. The injection volume was 10 μL. In the range of 0.005 ~ 0.12 mg/mL, the peak area had a good linear relationship with baicalin content (r = 0.9991). The average recovery of baicalin was 99.2% and *RSD* was 1.04% (n = 60). The results indicated that the method was simple, accurate and repeatable. It can be used for the quality control of Qiqingbaidu Granules.

Key words: HPLC; Qiqingbaidu Granules; Baicalin

七清败毒颗粒收载于《中国兽药典》2015 版二部,具有清热解毒,燥湿止泻功能,主治湿热泄泻,雏鸡白痢[1],处方中黄芩为君药。黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis Georgi*)的干燥的

作者简介:侯丽丽,高级兽医师,从事中兽药检测及方法研究方面工作。E - mail:kyzp_090@163.com

根,属于传统中药[2-3]。春、秋二季采挖,除去须根和泥沙,晒后撞去粗皮,晒干。黄芩苷为黄酮类化合物,无臭,味苦,是中药黄芩的主要有效成分[4-6]。七清败毒颗粒标准中无黄芩苷的含量测定项,为了更好控制产品质量,试验对七清败毒颗粒中黄芩苷的含量测定方法进行了研究。

1　仪器与材料

Agilent1200 高效液相色谱系统,原装色谱工作站,四元梯度泵/G1311A,自动进样器/G1329A,柱温箱/G1316A,紫外检测器/G1314B,购于安捷伦科技有限公司。甲醇为色谱级,磷酸为优级,水为超纯水。黄芩苷对照品(批号 Z0271705,含量 96.8%)购自中国兽医药品监察所。七清败毒颗粒(批号 20180415)100g/袋,山西双鹰动物药业有限公司提供。3 家自制样,12 家市售样共 15 个批次样品。不加黄芩的阴性样(批号 20180415)100g/袋,山西双鹰动物药业有限公司提供。

2　方法与结果

2.1　高效液相色谱条件　根据参考文献方法[1,7-11]和实验结果,采用色谱柱 Thermo scientific BDS C18(4.6 mm×250 mm,5μm),流动相为甲醇-水-磷酸(41∶59∶0.2),检测波长为 280 nm,流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

2.2　系统适用性试验　取供试品溶液 10 μL 注入色谱仪,记录色谱图,结果表明:黄芩苷与相邻峰达到基线分离,分离度达到 1.75,黄芩苷峰保留时间为 16.0 min,理论板数为 7923,峰面积为 1399.80,峰高为 51.24。试验证实,该方法系统适用性良好,见图 1。

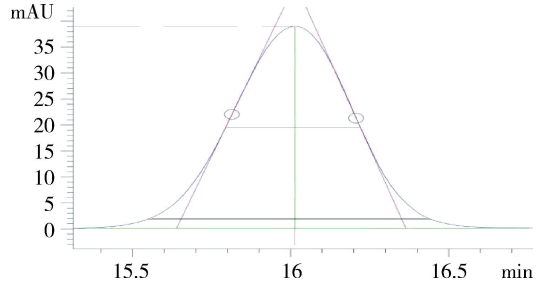


图 1　系统适应性实验图

Fig 1　Experimental diagram of system adaptability

2.3　对照品溶液的制备　精密称取黄芩苷对照品 30 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 600 μg/mL 的黄芩苷对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液,加甲醇稀释成 30 μg/mL黄芩苷对照品溶液,即得。

2.4　供试品溶液的制备　取本品研细的粉末 1.0 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理 30 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5　阴性样品溶液的制备　用不含黄芩的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制备得到阴性样品溶液。

2.6　专属性试验　精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,在上述高效液相色谱条件下进行测定,供试品色谱中在与对照品色谱峰相应的位置出相同峰,阴性样品无吸收峰、无干扰,说明处方中其它成分不影响黄芩苷的含量测定,结果见图 2~图 4。

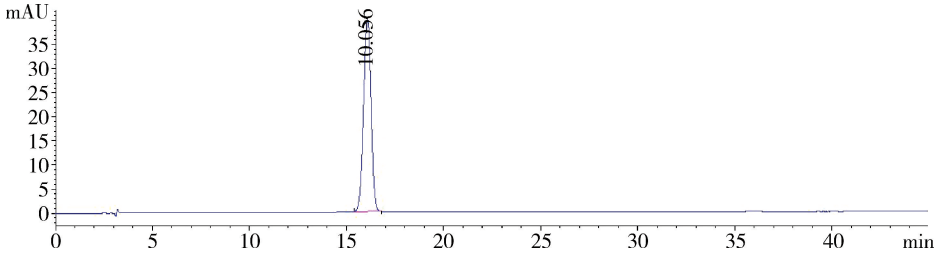


图 2　黄芩苷对照品 HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of baicalin reference

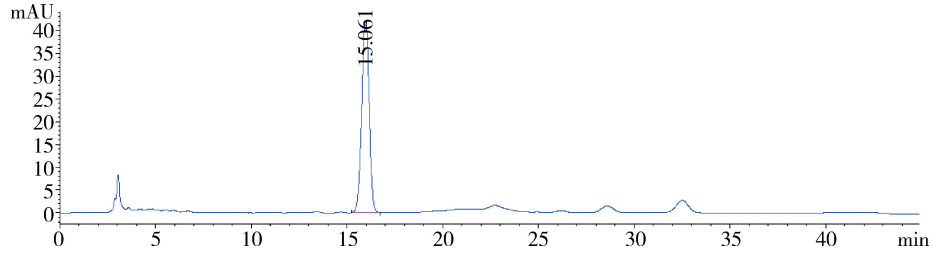


图 3　七清败毒颗粒样品 HPLC 色谱图

Fig 3　HPLC chromatogram of qiqing xiedu granules

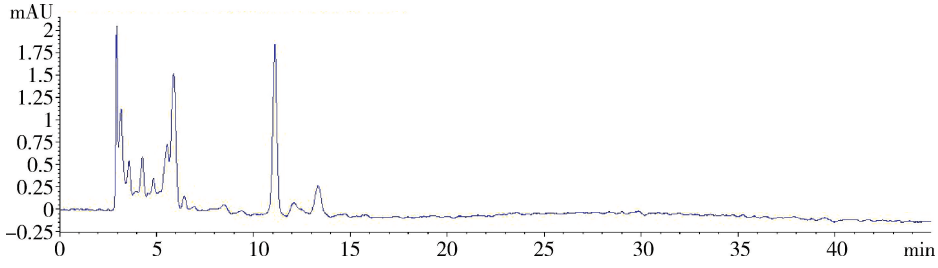


图 4　黄芩阴性样品 HPLC 色谱图

Fig 4　HPLC chromatogram of scutellaria negative sample

2.7　*方法学考察*

2.7.1　*线性关系试验*　取黄芩苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含黄芩苷 600 μg 的溶液，即得对照品储备液。分别取储备液适量制成 5、15、30、45、60、120 μg/mL 黄芩苷对照品溶液，滤过，取续滤液，分别按上述色谱条件进样 10 μL，测定峰面积。结果见表 1。

表 1　线性试验数据表

Tab 1　Linear test data sheet

对照溶液进样浓度/(mg·mL^{-1})	黄芩苷的量/μg	峰面积
0.005	0.05	157.840
0.015	0.15	506.689
0.03	0.3	1054.175
0.045	0.45	1613.029
0.06	0.6	2093.658
0.12	1.2	4049.303

以峰面积为纵坐标，黄芩苷含量(X－mg/mL)为横坐标作线性回归，回归方程为：y = 33.822 x + 28.9555，r = 0.9991，结果表明，黄芩苷在 0.005 ~ 0.12 mg/mL(0.05 ~ 0.12 μg)范围内，峰面积与黄芩苷含量呈良好的线性关系。

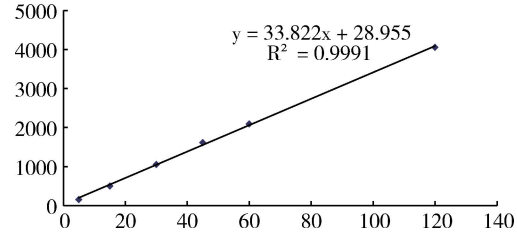


图 5　黄芩苷线性关系图

Fig 5　Linear diagram of baicalin

2.7.2　*精密度试验*　取线性试验项下的同一份对照品(30 μg/mL)溶液，连续进样 6 次，每次进样 10 μL，测定峰面积，精密度试验相对标准偏差 *RSD* 为 0.92%，结果表明仪器有良好的精密度。结果见表 2。

表 2　精密度试验数据表

Tab 2　Precision test data sheet

次数	1	2	3	4	5	6
峰面积	1085. 224	1066. 273	1085. 268	1084. 500	1085. 792	1065. 797
平均值	1078. 809					
RSD	0. 92%					

2. 7. 3　重复性试验　对同一批供试品样品 QK - 002(批号 20180415),配制 6 份供试品溶液,各取 10 μL 注入色谱仪,6 份样品相对标准偏差 *RSD* 为 0. 93%,结果表明重复性良好。结果见表 3。

表 3　重复性试验数据表

Tab 3　Repeatability test data sheet

供试品	1	2	3	4	5	6
峰面积	1404. 485	1440. 700	1406. 021	1421. 215	1416. 853	1414. 897
平均值	1417. 362					
RSD	0. 93%					

2. 7. 4　溶液稳定性试验　取同一供试品 QK - 002(批号 20180415)溶液,分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 10 μL,记录色谱图和黄芩苷峰面积,供试品 12 h 内峰面积相对标准偏差 *RSD* 为 0. 82%,结果表明,样品溶液在 12 h 内稳定。

试验结果见表 4。

表 4　溶液稳定性试验数据表

Tab 4　Solution stability test data sheet

时间/h	0	2	4	6	8	10	12
峰面积	1399. 800	1403. 990	1404. 663	1430. 794	1405. 810	1396. 527	1399. 328
平均值	1405. 845						
RSD	0. 82%						

2. 7. 5　加样回收率试验　对照品溶液制备:取黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含黄芩苷 600 μg 的溶液,即得对照品溶液。

加样回收样品溶液制备:精密称取同一批七清败毒颗粒阴性样品(批号 20180415)1 g,置 100 mL 量瓶,分别加入上述对照品溶液 2. 5、2. 5、5、5、7. 5、7. 5 mL,加甲醇适量,超声 30 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

照上述供试品方法制备 6 份供试品溶液,取 10 μL注入色谱仪,记录色谱图,计算加样回收率。

回收率 = (加对照品后测得的含量 - 加对照品前的含量)/实际所加对照品量 × 100%。结果见表 5 ~ 表 7。

表 5　加样回收率试验结果 1

Tab 5　Recovery test results 1

样品号	1	2	3	4	5	6
加对照品前的量 A/mg	0	0	0	0	0	0
加入对照品的量 B/mg	1. 5	1. 5	3. 0	3. 0	4. 5	4. 5
实测量 C/mg	1. 491	1. 489	2. 914	2. 912	4. 516	4. 516
回收率/%	99. 40%	99. 27%	97. 13%	97. 07%	100. 36%	100. 36%
平均回收率/%	98. 93%					
RSD	1. 51%					

表 6　加样回收率试验结果 2

Tab 6　Recovery test results 2

样品号	1	2	3	4	5	6
加对照品前的量 A/mg	0	0	0	0	0	0
加入对照品的量 B/mg	1.5	1.5	3.0	3.0	4.5	4.5
实测量 C/mg	1.477	1.479	2.947	2.945	4.557	4.562
回收率/%	98.47%	98.60%	98.77%	98.87%	100.02%	100.13%
平均回收率/%	99.14%					
RSD	0.74%					

表 7　加样回收率试验结果 3

Tab 7　Recovery test results 3

样品号	1	2	3	4	5	6
加对照品前的量 A/mg	0	0	0	0	0	0
加入对照品的量 B/mg	1.5	1.5	3.0	3.0	4.5	4.5
实测量 C/mg	1.479	1.477	2.985	2.984	4.524	4.521
回收率/%	98.60%	98.47%	99.50%	99.47%	100.53%	100.47%
平均回收率/%	99.51%					
RSD	0.89%					

结果表明,3 次试验相对标准偏差 *RSD* 分别为 1.51%、0.74%、0.89%,回收率试验符合规定。

2.8　耐用性试验

2.8.1　改变流动相中磷酸比例　取同一批供试品,改变流动相溶液比例(甲醇 – 水 – 磷酸的比例分别为 43∶57∶0.18、43∶57∶0.22)进行测定,结果见表 8。

表 8　不同流动相比例试验数据表

Tab 8　Test data sheet of different mobile phase ratios

流动相比例	41∶59∶0.18		41∶59∶0.2		41∶59∶0.22	
峰面积	1456.018	1453.487	1440.700	1449.363	1448.947	1453.371
含量/(mg·g^{-1})	3.76	3.75	3.72	3.74	3.74	3.75
平均值	3.74					
RSD	0.36%					

结果同一供试品改变流动相比例后,*RSD* 为 0.36%。

2.8.2　改变供试品超声时间　改变超声时间(10 min,50 min)进行测定,结果见表 9。

表 9　不同超声时间试验数据表

Tab 9　Test data sheets of different ultrasonic time

时间/min	15		30		45	
峰面积	1426.893	1428.971	1440.700	1449.363	1444.336	1444.613
含量/(mg·g^{-1})	3.74	3.74	3.72	3.74	3.73	3.73
平均值	3.73					
RSD	0.22%					

同一供试品在改变超声时间的条件下,*RSD* 为 0.22%。

2.8.3　改变柱温　改变柱温(28℃、32℃)进行测定,结果见表 10。

同一供试品在改变柱温的条件下,*RSD* 为 0.57%。

2.9.4　不同色谱柱　分别用 Thermo scientific BDS HYPERSIL C18(5 μm,4.6 mm×250 mm),Syncroni

AQC18(5 μm,4.6 mm×250 mm),Agilent XDB C18(5 μm,4.6 mm×250 mm)三种不同的色谱柱进行测定,结果见表 11。

表 10　不同柱温试验数据表

Tab 10　Test data table of different column temperatures

柱温	28℃		30℃		32℃	
峰面积	1464.033	1449.236	1440.700	1449.363	1456.622	1458.482
含量/(mg·g^{-1})	3.77	3.73	3.72	3.74	3.76	3.77
平均值	3.75					
RSD	0.57%					

表 11　不同规格色谱柱试验数据表

Tab 11　Table of chromatographic column test data of different specifications

色谱柱规格	Thermo scientific BDS C18(250 mm)		Syncroni AQ C18(250 mm)		Agilent XDB C18(250 mm)	
峰面积	1440.700	1449.363	1174.582	1201.418	1249.451	1251.078
含量/(mg·g^{-1})	3.72	3.74	3.70	3.79	3.74	3.74
平均值	3.74					
RSD	0.80%					

同一供试品在更换不同色谱柱下进行测定,*RSD* 为 0.80%。结果表明该方法耐用性良好。

2.9　样品测定　按以上确定的高效液相色谱法测定了 15 批七清败毒颗粒中黄芩苷含量的方法,结果见表 12。

表 12　15 批样品含量测定结果

Tab 12　Content determination results of 15 batches of samples

编号	生产厂家	批号	样 1 峰面积	样 2 峰面积	平均峰面积	黄芩苷含量/(mg·g^{-1})
1	A	/	952.821	958.283	955.552	2.72
2	B	20180415	1339.363	1341.259	1340.311	3.74
3	C	/	1172.982	1150.566	1161.774	3.30
4	D	20180501	1744.439	1744.870	1744.6545	4.95
5	E	18041401	133.991	134.354	134.1725	0.38
6	F	20180814	750.480	754.363	752.4215	2.13
7	G	20180501	890.257	875.949	883.103	2.51
8	H	180401	723.580	725.378	724.479	2.06
9	I	20180413	1862.392	1826.083	1844.2375	5.23
10	J	311180415	1247.363	1249.637	1248.500	3.51
11	K	20180902	753.073	736.210	744.6415	2.12
12	L	18050802	2087.200	2053.593	2070.3965	5.89
13	M	180501	385.879	386.200	386.0395	1.10
14	N	20180303	2610.859	2561.673	2586.266	7.35
15	Q	20181112	2351.693	2354.894	2353.2935	6.66

3　讨论与结论

目前,用高效液相色谱法测定黄芩苷含量的制剂很多,所用的流动相有甲醇 – 水 – 磷酸(47∶53∶0.2)280 nm 黄芩药材[1]、(43∶57∶0.2)278 nm 四黄止痢颗粒[2]、(50∶50∶0.3)276 nm,甲醇 – 水 – 冰醋酸(50∶50∶1)274 nm/276 nm 双黄连可溶性粉/双黄连注射液[3]等。用《中国兽药典》中黄芩药材流动相为甲醇 – 水 – 磷酸(47∶53∶0.2)[1],检测波长 280 nm,Agilent 150 mm 色谱柱,6 min 出峰;Agilent 250 mm 色谱柱,流动相甲醇 – 水 – 磷酸(47∶53∶0.2),11 min 出峰,理论塔板数 2500;Thermo scientific BDS C18 250 mm,流动相甲醇 – 水 – 磷酸(47∶53∶0.2),9 min 出峰,有前沿峰、拖尾,调整流动相为甲醇 – 水 – 磷酸(45∶55∶0.2)11 min 出峰,理论板数 7000,但发现对照主峰前有小峰,与主峰的分离度仅为 1.32,再调整流动相为甲醇 – 水 – 磷酸(41∶59∶0.2),用 Thermo scientific BDS C18 250 mm 试验,主峰约 15.797 min 出峰,用分离度切线法统计,理论塔板数达 7837,分离度 1.66,峰宽 0.4174,对称因子 1.09,峰高 79.65,峰起始点 14.957,结束点 16.938,保留时间 15.797 符合要求,设置进样时间 45 min/针。再换 Agilent 250 mm 色谱柱,流动相为甲醇 – 水 – 磷酸(41∶59∶0.2)出峰时间 21 min,右边有一小峰,理论板数 7000,分离度差别不明显。考虑样品杂峰较多,最终确定用 Thermo scientific BDS C18 250 mm 色谱柱,流动相为甲醇 – 水 – 磷酸(41∶59∶0.2)达到良好分离效果。

供试品溶液制备时比较了回流提取法与超声提取法的效果,结果二者无明显差异,超声提取法较为简单,故选用超声提取法。按超声提取法分别超声时间 15、30、45 min,测定黄芩苷含量,结果表明 15 min 结果偏低,超声 30 min 与 45 min 无明显差异,故超声时间定为 30 min。

用高效液相色谱法测定七清败毒颗粒中黄芩苷含量的方法,简便、准确度高、重复性好,为进一步控制七清败毒颗粒的质量提供了依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中国人民共和国兽药典 2015 版(二部)[S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, volume Ⅱ, 2015 edition [S].

[2] 李永杰, 刘容秀, 田文仓, 等. 不同种源黄芩(子代) 药用成分含量的地理变异研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(13): 2664 – 2669.
Li Y J, Liu R X, Tian W C, *et al.* Study on geographical variation of medicinal ingredients contents in Scutellaria baicalensis from different provenances[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(13): 2664 – 2669.

[3] 李云静, 张建逵, 王 冰, 等. 不同产地黄芩药材中黄芩苷等 5 种黄酮类成分含量的比较[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(12): 2985.
Li Y J, Zhang J K, Wang B, *et al.* Content comparison of five flavonoids in scutellaria baicalensis from different habitats[J]. Shi zhen national medicine national medicine, 2016, 27(12): 2985.

[4] 周红潮, 杜 锐, 王 慧, 等. 黄芩苷药代动力学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 684.
Zhou H C, Du R, Wang H, *et al.* Advances in pharmacokinetics of baicalin[J]. Chinese journal of traditional Chinese medicine, 2018, 43(4): 684.

[5] 陈腾飞, 刘建勋, 张 颖, 等. 基于 LC – MS /MS 技术研究黄芩苷在脑、血微透析探针体内外回收率[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2168.
Chen T F, Liu J X, Zhang Y, *et al.* Analysis on microdialysis probe recovery of baicalin *in vitro* and in vivo based on LC – MS/MS[J]. Chinese journal of traditional Chinese medicine, 2017, 42(11): 2168.

[6] 金 鹏, 许海舰, 徐宝欣, 等. 黄芩苷研究现状及其镁盐研究前景[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 228.
Jin P, Xu H J, Xu B X, *et al.* Research Status of Baicalin and Prospect of Its Magnesium Salt[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017, 23(20): 228.

[7] 中国兽药典委员会. 四黄止痢颗粒. 中国人民共和国兽药典 2015 版(二部)[S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Sihuang zhili granule. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, volume Ⅱ, 2015 edition[S].

[8] 中国兽药典委员会. 双黄连可溶性粉. 兽药质量标准 2017 年版(中药卷)[S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Shuanghuanglian soluble powder. Veterinary drug quality standards, 2017 edition (Traditional Chinese medicine volume)[S].

[9] 李岩岩,周 妍. HPLC 法测定牛黄芩连丸中黄芩苷含量[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(61):12 – 14.
Li Y Y, Zhou Y. Determination the content of Baicalin in bolus of radix scutellariae by HPLC [J]. World Latest Medicine Information, 2018, 18(61):12 – 14.

[10] 盛家峰,许文静,于耀杰. HPLC 法测定银黄颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素含量[J]. 湖北医药学院学报, 2018, 37(05): 444 – 446.
Sheng J F, Xu W J, Yu Y J. Application of HPLC in the determination of Baicalin, Baicalein and Baicalein in Yinhuang Granules [J]. Journal of Hubei University of Medicine, 2018, 37(05): 444 – 446.

[11] 吴国华,代那音台,奥·乌力吉. 蒙药材黄花黄芩定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志,2018,38(11):2014 – 2020.
Wu G H, DAI na yin tai, Ao Wu li ji. Qualitative and quantitative analysis on Mongolian medicine Scutellariae Viscidulae Radix [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 38(11): 2014 – 2020.

(编 辑:陈 希)