

HPLC 法测定黄芩苷- β -环糊精包合物中黄芩苷的含量

于生兰, 孙 玲, 张小华, 张 龙

(江苏畜牧兽医职业技术学院动物药理学系, 江苏泰州 225300)

[收稿日期] 2003-07-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2004)02-0029-03 [中图分类号] TQ460.72

[摘 要] 建立了用 HPLC 测定黄芩苷- β -环糊精包合物中黄芩苷含量的方法。色谱柱为 CLC-ODS C_{18} 柱, 以 甲醇- 水- 磷酸(47530.2) 为流动相, 检测波长 280 nm, 外标法定量。检测的线性范围为 20.0~ 80.0 $\mu\text{g/mL}$, 回归方程为 $y = 9\,753.1x + 1\,546$, $r = 0.999\,3$ ($n = 5$), 平均加样回收率为 99.37% ($n = 5$), RSD 为 0.67% ($n = 6$)。本方法准确、可靠、重现性好, 可作为黄芩苷- β -环糊精包合物中黄芩苷的含量测定方法。

[关键词] 黄芩苷; 黄芩苷- β -环糊精包合物; HPLC 法

黄芩苷是中兽药黄芩的主要成分, 现代药理学研究表明黄芩苷具有较强的抗菌、抗病毒、消炎等作用^[1]。但黄芩苷水溶性小(160 $\mu\text{g/mL}$)、吸收差, 且性质不稳定, 易氧化变质, 具有一定的苦味, 因此使其在兽医临床上的应用受到一定影响^[2]。为使黄芩中主要有效成分黄芩苷得到充分有效地利用, 笔者根据 β -环糊精(β -CD) 的包合特点, 以黄芩苷作为客体, 用溶液- 电动搅拌法制备黄芩苷- β -CD 包合物并进行了鉴定^[3]。本实验采用 HPLC 法测定包合物中黄芩苷的含量, 获得了满意的效果。

1 仪器和材料

1.1 仪器 LC-10A 高效液相色谱仪、TVP 微机控制处理器, 日本岛津; 756-CRT 紫外- 可见分光光度计, 上海第一分析仪器厂; TG 335 微量分析天平, 上海第一分析仪器厂。

1.2 试药 黄芩苷对照品, 含量 > 99.99%, 批号 10715-200212, 中国药品生物制品检定所提供; 甲醇, 色谱纯, 上海陆都化学试剂厂; 磷酸, AR 级, 上海化学试剂厂; 水为自制双重蒸馏水; 样品, 批号 20021112, 20021116, 20021124 自制。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择 取黄芩苷对照品适量, 加甲

醇配制成浓度约为 60 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 于波长 200~ 600 nm 波长范围内进行扫描, 测得黄芩苷 λ_{max} 为 280 nm, 见图 1。

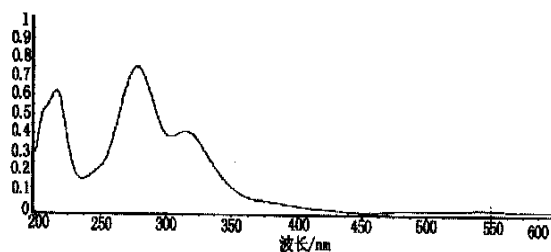


图 1 黄芩苷紫外吸收光谱图

2.2 色谱条件与系统适应性 色谱柱为 CLC-ODS C_{18} (i. d. 4.6 mm $\times$ 150 mm); 流动相为 甲醇- 水- 磷酸(47530.2); 检测波长 280 nm; 流速 1.0 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样 20 μL 。理论塔板数按黄芩苷峰计算为 2 500。

2.3 脱包条件的选择 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验分别考察脱包方法、溶剂种类、溶剂用量及脱包时间等对脱包效果的影响, 结果发现: 加水回流 1 h, 样品与加水量的比例约为 1:1 (mg/mL) 时脱包效果最佳。

2.4 对照品溶液与样品溶液的制备 取在 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 6 mg, 精密称定, 置 10 mL

量瓶中, 加无水甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 浓度为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密量取 1.00 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加双蒸水稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 即得每 1 mL 含黄芩苷约 60 μg 的对照品溶液; 另取在 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥 4 h 的样品约 25 mg, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 25.0 mL 双蒸水, 回流 1 h, 自然冷却至室温, 粗滤, 滤液再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得精滤液。精密吸取精滤液 1.00 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用双蒸水稀释至刻度。

2.5 线性关系考察 分别吸取浓度为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液 0.33、0.67、1.00、1.33、1.67 mL, 各置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 各进样 20 μL , 以测得的色谱峰面积为纵坐标, 对照品浓度为横坐标绘制标准曲线。结果为: 对照品溶液浓度在 20.0~ 80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内呈线性关系。回归方程为 $y = 9\,753.1x + 1\,546$, $r = 0.999\,3$ ($n = 5$)。在此范围内, 采用外标一点法测定含量。

2.6 精密度试验 取同一浓度的黄芩苷对照品溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 连续进样 6 次(各 20 μL), 测得结果见表 1。

表 1 精密度试验结果($n = 6$)

编号	峰面积	峰面积平均值	RSD/ %
	$/ \times 10^4$	$/ \times 10^4$	
1	63.08	63.45	0.30%
2	63.54		
3	63.29		
4	63.87		
5	63.24		
6	63.67		

2.7 加样回收率试验 取批号为 20021116 的样品, 精密称取 5 份, 分别加入对照品适量, 依含量测定方法处理, 计算结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果

组 别	黄芩苷含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$				
样品测得值	64.51	64.51	64.51	64.51	64.51
对照品加入量	64.84	64.84	64.84	64.84	64.84
测得值	128.93	128.18	128.82	128.26	128.48
回收率/ %	99.68	99.10	99.59	99.16	99.33
平均回收率/ %	99.37				
RSD/ %	0.26				

2.8 重复性试验 精密称取黄芩苷- β -环糊精包合物约 24 mg 共 6 份, 分别按供试品溶液的制备方法处理; 另取黄芩苷对照品溶液(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 同法测

定, 按外标法以峰面积进行计算, 结果包合物中黄芩苷含量测定的 RSD 为 0.67% ($n = 5$)。

2.9 样品测定 分别精密称取 3 个不同批号的样品适量, 按 2.4 项下的方法处理。分别吸取对照品溶液与各批号样品溶液适量, 注入高效液相色谱仪测定, 即得。测定结果见表 3 和图 2、图 3。

表 3 样品中黄芩苷含量测定结果($n = 3$)

批 号	黄芩苷含量的			各批含量	平均含量	RSD
	重复测定值/ %					
20021112	25.50	25.51	25.52	25.51	25.61	0.23%
20021116	25.90	25.88	25.87	25.88		
20021124	25.41	25.44	25.45	25.43		

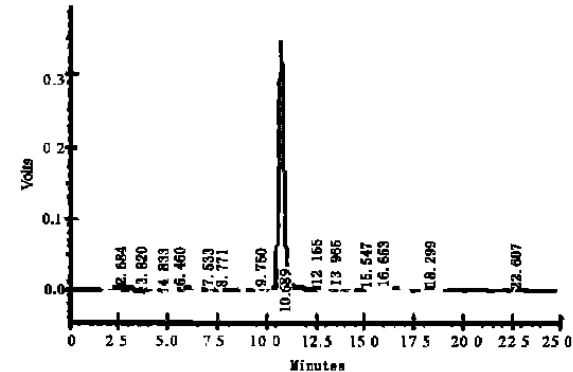


图 2 黄芩苷对照品 HPLC 图谱

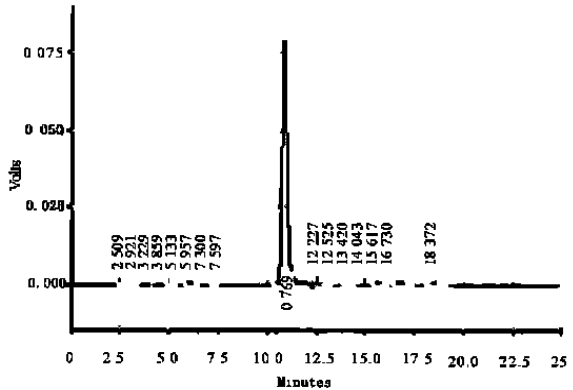


图 3 样品 HPLC 图谱

3 讨论

3.1 样品的制备 为使包合物中黄芩苷能充分溶出, 需经脱包处理。经正交试验筛选出采用水作为溶剂进行回流处理的方法, 操作简便, 脱包完全。

3.2 流动相的选择 HPLC 法测定黄芩苷含量所用的流动相主要有甲醇-水-磷酸系统^[4]和甲醇-水-醋酸系统^[5], 经比较以甲醇-水-磷酸系统较好。

参考文献:

- [1] 吴立军. 中药化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社. 2001: 113-114.
- [2] 何心, 石春伟, 李欣, 等. 双黄连粉针中黄芩苷的药理学[J]. 中国新药杂志, 1998, 7(2): 146-148.
- [3] 于生兰, 孙玲, 张龙, 等. 黄芩苷- β -环糊精包合物的制备与鉴

定[J]. 中国兽药杂志, 2003, 36(6): 11-13.

- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二部 二〇〇〇年版[S]. 北京: 化学工业出版社. 256.
- [5] 杜海燕, 马静, 郑, 等. HPLC法测定黄芩提取物中黄芩苷的含量[J]. 中草药, 2001, 32(8): 706-707.

Determination of baicalin in inclusion compound of baicalin- β -cyclodextrin by HPLC

YU Sheng-lan, SUN Ling, ZHANG Xiao-hua, ZHANG Long

(Animal Pharmacology Department, Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300; China)

Abstract: A HPLC method for determination of baicalin's content in baicalin- β -cyclodextrin (baicalin- β -CD) was described. The inclusion was detected with CLC-ODS C_{18} column and methanol-water-phosphoric acid (47530.2) as the mobile at 280 nm. The baicalin in samples were quantified by method of external standard. The calibration curve was linear in a range of 20.0~80.0 $\mu\text{g/mL}$ for baicalin, the regression equation was $y = 9\,753.1x + 1\,546$, $r = 0.9993$ ($n = 5$). The average recovery was 99.37% ($n = 5$) and the RSD was 0.30% ($n = 6$). The method is reliable and reproducible. It may be used for the determination of baicalin in inclusion compound of baicalin- β -cyclodextrin.

Key words: baicalin; inclusion compound of baicalin- β -cyclodextrin; HPLC

人如何预防禽流感

对禽流感防重于治, 卫生专家就如何避免感染禽流感提出了若干建议。

①不与活禽接触。高致病性禽流感病毒在一定条件下可以存活很久, 在禽的粪便中能够存活 105 天, 在羽毛中能存活 18 天, 所以接触病禽的人感染的机会要大得多。专家建议: 要养成接触禽类、蛋类和生冷禽类制品后勤洗手的习惯, 用洗手液和清水彻底洗净双手, 儿童尤其应避免与活禽接触。②对病鸡不碰不吃。禽流感的传染途径主要是直接接触病禽, 通常病禽高密度的地区, 病毒的浓度会比较高。普通大众预防的关键是不接触和食用病鸡, 在市场上买一只活鸡基本上是安全的, 即使有病毒存在, 在空气中浓度较低, 往往也不会被传染。但是, 无论买鸡还是吃鸡, 都要先看看鸡是否经过检疫, 正规市场上经过检疫的禽蛋可以放心食用。③要改变饮食习惯, 在目前这段时间里不要自行宰杀禽类。吃鸡肉、鹅肉、鸭肉等禽肉时一定要煮熟后食用, 在厨房中务必将生熟分开。不熟的动物血液制品不要吃。鸡蛋也一定要做熟再吃, 煮鸡蛋的话, 60℃左右 10 分钟以上就应该没问题了。“溏心儿蛋”应暂

时不吃。煎鸡蛋一定要煎透, 避免蛋黄不熟。成型的蛋花应该说不存在感染危险, 保险起见可多煮一、两分钟。吃鸡蛋要小心鸡蛋皮。鸡蛋壳上容易存有禽流感病毒, 手接触后也有可能沾染上。目前全国正规的养禽业都比较重视消毒、预防工作, 一般都会在鸡蛋送到市场之前进行消毒, 所以不必担心。但日常生活中, 也要养成摸过鸡蛋或生冷禽类制品后洗手的习惯。④由于禽流感病毒对烧碱、醛类、氧化剂类、氯制剂类、双季胺盐类等普通消毒剂都敏感, 所以平时对工作、生活的环境要经常消毒; 保持地面、天花板、家具及墙壁清洁; 确保排水道通畅; 使用可清洗的地毯; 养鸟者更要加强对鸽舍鸟笼的消毒。另外, 高温及紫外线都可以消灭禽流感病毒, 60℃以下 10 min、100℃下 1 min 以及长时间日照均可杀死禽流感病毒, 所以, 应保持室内有充分的通风和日照。⑤羽绒服、鸭绒被等是不会传染禽流感的。因为羽绒制品通常经过消毒、高温等多个环节处理, 病毒存活可能性微乎其微, 不太可能对人的健康造成危害。但最好不买小商贩提供的廉价羽绒制品。