

文章编号:2095-7386(2022)01-0025-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2022.01.004

HPLC 法测定黄芩苷微乳凝胶中黄芩苷的含量

肖晶晶,刘岑峰,王英舟,魏卓昕,徐凌云
(武汉轻工大学 生命科学与技术学院,武汉 430023)

摘要:建立 HPLC 法测定黄芩苷微乳凝胶中黄芩苷的含量。色谱柱为依利特 Supersil ODS-B C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以甲醇—0.09% 磷酸水溶液(55:45,体积比)为流动相,检测波长 277 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量 20 μL。黄芩苷在 4.8~153.8 g/mL 与峰面积线性关系良好(r 为 0.9992, n 为 6);平均回收率为 99.3% (n 为 6),RSD 为 2.1%;日内和日间稳定性试验 RSD 分别为 0.13% (n 为 6)、1.49% (n 为 3)。此方法简单快速,其准确性、重现性、专属性符合要求,可用于黄芩苷微乳凝胶的含量测定。

关键词:黄芩苷微乳凝胶;高效液相色谱法;黄芩苷;含量检测

中图分类号:R 945

文献标识码:A

Determination of baicalin in baicalin content microemulsion-based gel by HPLC

XIAO Jing-jing, LIU Cen-feng, WANG Ying-zhou, WEI Zhuo-xin, XU Ling-yun

(School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To establish a HPLC method for the determination of baicalin content in baicalin microemulsion-based gel (B-MEG). The ODS-B C₁₈ (Supersil, 250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used at wavelength of 277 nm and the column temperature of 30 ℃. Mobile Phase used was methanol-0.09% phosphoric acid (55:45, volume) at flow rate of 1.0 mL/min. A 20 μL sample was injected. The linear relationship between baicalin and peak area was good at the concentration of 4.8-153.8 μg/mL ($r=0.9992$, n is 6). The average recovery was 99.3% (n is 6), RSD was 2.1%. The RSDs of intra-day and inter-day stability tests were 0.13% (n is 6) and 1.49% (n is 3), respectively. This method is accurate, simple, rapid, reproducible and specific, which can be used for the content determination of B-MEG.

Key words: baicalin microemulsion-based gel (B-MEG); HPLC; baicalin; content determination

1 引言

黄芩苷(Baicalin, BA),是从唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根中提取出来的黄酮类化合物^[1],是黄芩的主要活性成分之一,其分子式为 C₂₁H₁₈O₁₁,相对分子量为 446.37,结构式如图 1 所示。黄芩苷常温下为淡黄色粉末状结晶,

几乎不溶于水(水溶性为 0.052 mg/mL),难溶于脂(表观渗透系数 P_{app} 为 0.037×10^{-6} cm/s),导致口服吸收差、生物利用度低^[2]。黄芩苷具有抗过敏、抗炎和抗氧化作用^[3-4]。文学平等研究表明黄芩苷通过抑制 NLRP3 的 mRNA 表达,减少炎症因子 TNF-α, IL-1β 和 IL-18 的分泌而发挥抗炎作用^[5]。目前已上市的黄芩苷制剂主要有片剂和胶囊剂,用

收稿日期:2021-12-24.

作者简介:肖晶晶(1991-),女,硕士研究生, E-mail:1774730845@qq.com.

通信作者:徐凌云(1967-),女,博士,教授, E-mail:doctordly9898@163.com.

于治疗急、慢性肝炎等疾病。针对黄芩苷的药理作用和理化性质,结合微乳和凝胶的优点,本课题组研究制备了黄芩苷微乳凝胶(Baicalin microemulsion-based gel, B-MEG)新型皮肤制剂^[6]。微乳凝胶在增加药物的生物利用度的同时,提高药物稳定性,延长作用时间,使血药浓度更稳定^[7]。本研究旨在建立一个准确、高效的 HPLC 法,检测 B-MEG 中黄芩苷的含量,为 B-MEG 的质量控制提供依据。

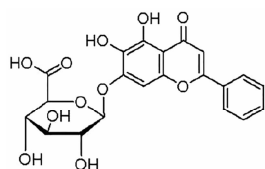


图1 黄芩苷结构式

2 材料

2.1 仪器

Agilent 1260 II 高效液相色谱仪;XS 型十万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);AL204/01 万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SHZ-D III 真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);超纯水机(上海阳沅精密设备科技有限公司)。

2.2 试剂

黄芩苷对照品(中国兽医药品监察所,批号 Z0271910,含量 96.1%);甲醇(色谱纯,美国天地试剂公司);磷酸(优级纯,天津市大茂化学试剂厂)。以下试剂为自制^[6]:空白微乳凝胶,主要成分为吐温 80、甘油、油酸乙酯、丁香油、冰片、磷酸盐缓冲液、焦亚硫酸钠和黄原胶,批号为 21040702;黄芩苷微乳凝胶,在空白微乳凝胶中加入黄芩苷,规格为 0.5%,批号为 2104901、21041902、21041903。

3 方法与结果

3.1 溶液配制

3.1.1 黄芩苷对照品溶液的配制

精密称取黄芩苷对照品 10.01 mg 置于 25 mL 棕色容量瓶中,加入适量甲醇超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)5 min 使黄芩苷溶解,冷却至室温后用甲醇定容至刻度,震荡摇匀得到 384.78 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷对照品储备液。

分别精密移取 0.125 mL、0.25 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL 黄芩苷对照品储备液于 10 mL 棕色容量瓶中用甲醇定容,配成浓度为 4.81 $\mu\text{g/mL}$ 、9.62 $\mu\text{g/mL}$ 、19.24 $\mu\text{g/mL}$ 、38.48 $\mu\text{g/mL}$ 、76.96 $\mu\text{g/mL}$ 、153.91 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液。进样前用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。

3.1.2 黄芩苷微乳凝胶供试品溶液的配制

精密称取黄芩苷微乳凝胶约 0.08 g(约相当于黄芩苷 0.4 mg)至 10 mL 棕色容量瓶中,用 50% 甲醇水溶液超声(功率 250 W,频率 40 kHz)5 min 使溶解,冷却至室温后用 50% 甲醇水溶液定容摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤即得。

3.1.3 空白微乳凝胶溶液的配制

精密称取空白微乳凝胶约 0.08 g,至 10 mL 棕色容量瓶中,用 50% 甲醇水溶液超声(功率 250 W,频率 40 kHz)5 min 使溶解,冷却至室温后用 50% 甲醇水溶液定容摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤即得。

3.2 色谱条件与系统适应试验

色谱柱为依利特 Supersil ODS-B C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇—0.09% 磷酸水溶液(55:45,体积比),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 277 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。分别精密吸取“3.1”项下的 38.48 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液、B-MEG 溶液和空白微乳凝胶溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行检测,结果如图 2 所示。B-MEG 供试品溶液中黄芩苷保留时间约为 6.0 min,与黄芩苷对照品溶液中黄芩苷主峰保留时间一致,黄芩苷主峰峰形良好,与前峰分离度为 9.75,空白微乳凝胶对主峰无干扰。

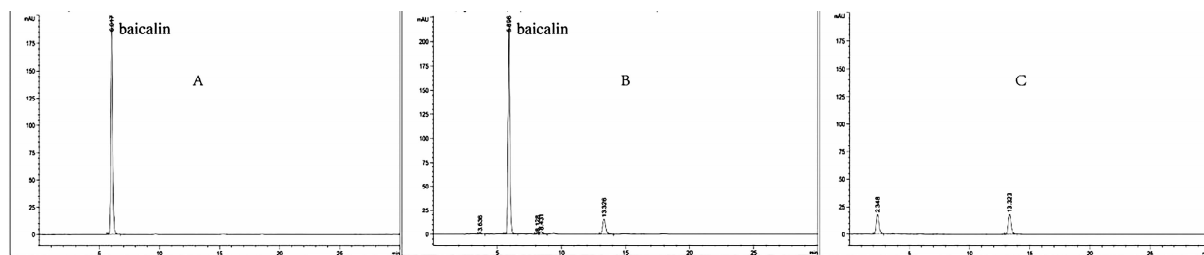


图2 黄芩苷对照品溶液(A)、B-MEG 供试品溶液(B)、空白微乳凝胶溶液(C)的 HPLC 图谱

3.3 线性关系试验

取 3.1.1”项下的一系列黄芩苷对照品溶液,按“3.2”项下的色谱条件检测,记录峰面积。以峰面积 $A(\text{mAu})$ 为纵坐标,黄芩苷浓度 $C(\text{g/mL})$ 为横坐标做标准曲线,线性回归方程为 $A = 47.35C + 129.29 (n = 6, r = 0.9992)$,表明黄芩苷在 $4.81 \sim 153.91 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

3.4 精密度试验

取 3.1.1 项下的黄芩苷对照品溶液($38.48 \mu\text{g/mL}$),按“3.2”项下的色谱条件检测,连续进样 6 针,记录色谱图峰面积,其峰面积 RSD 为 0.8%。表明该方法检测黄芩苷的色谱条件稳定,仪器精密度良好。

3.5 稳定性试验

取同一批黄芩苷微乳凝胶(批号为 2104901),按 3.1.2 项下准备供试品溶液,分别于室温放置 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 后,按 3.2 项下的色谱条件检测,记录色谱图峰面积,测得日内(24 h 内)黄芩苷峰面积 RSD 为 0.13% ($n = 6$)、日间(0 h、24 h、48 h)黄芩苷峰面积 RSD 为 1.5%

($n = 3$),表明黄芩苷微乳凝胶供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

3.6 重复性试验

取同一批黄芩苷微乳凝胶(批号为 2104901),按 3.1.2 项下准备供试品溶液,平行 6 份,按 3.2 项下的色谱条件检测,记录色谱图峰面积,按外标法计算得到黄芩苷的平均质量浓度为 5.1 mg/g ,RSD 为 1.3% ($n = 6$)。结果表明,该方法重复性良好。

3.7 加样回收率试验

参考《中华人民共和国药典》(四部)通则 9101 分析方法验证指导原则进行回收率试验^[8]。取空白微乳凝胶 0.08 g ,置于 10mL 容量瓶中,平行共 6 份,分别精密加入 $384.78 \mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液 1 mL ,并用 50% 甲醇水溶液定容至刻度,得到黄芩苷供试品溶液。按 3.2 项下的色谱条件检测,记录峰面积,用外标法计算黄芩苷的含量,得到回收率及其 RSD 值,结果如表 1 所示。各样品回收率均在 92% ~ 105% 之间,平均加样回收率为 99.3%,RSD = 2.1% ($n = 6$),表明此方法的回收率良好。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

空白微乳凝胶取样量/g	样品中的量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率%	平均回收率%	RSD/%
0.07734	0	384.78	377.60	98.13	99.3	2.1
0.07809	0	384.78	383.17	99.58		
0.07814	0	384.78	397.30	103.25		
0.07836	0	384.78	376.98	97.97		
0.07812	0	384.78	382.25	99.34		
0.07825	0	384.78	374.31	97.28		

3.8 样品含量测定

取黄芩苷微乳凝胶 3 批(批号:21041901、21041902 和 21041903),按“3.1.2”项下准备供试品溶液,各平行 3 份,按“3.2”项下的色谱条件检测,记录峰面积,计算黄芩苷含量,结果表明 3 批次 B-MEG 中黄芩苷的平均含量分别为 5.13 mg/g ($n = 3$)、 5.26 mg/g ($n = 3$)、 5.07 mg/g ($n = 3$),其 RSD 分别为 1.6%、0.7%、1.2%。

4 讨论

4.1 流动相的选择

本文参考文献^[1,14,17]中的液相条件,选择甲醇—水(55:45,体积比)为基础流动相。以往的研究表明,少量磷酸可作为扫尾剂改善黄芩苷色谱峰的峰形^[9]。本试验使用 0.09% 磷酸水溶液时分离效果较好,最终选择 3.2 项下的色谱条件检测,结果黄芩苷的色谱峰

峰形良好、出峰时间合适、分离效果良好。

4.2 提取溶剂的选择

样品提取溶剂的选择应从微乳凝胶的性质和黄芩苷的理化性质两方面来考虑。对于微乳凝胶中药物含量的测定,文献报道采用水、甲醇或无水乙醇作为提取溶剂^[10-13],结果如表 2 所示;对于黄芩苷的含量测定,文献中多采用甲醇或甲醇水溶液为提取溶剂^[1,14-17],结果如表 3 所示。综合这两方面因素,本研究选用了纯水、20% 甲醇水溶液、50% 甲醇水溶液和纯甲醇作为提取溶剂进行对比。黄芩苷微乳凝胶在水和甲醇水溶液中均能较好分散,而在纯甲醇中不能完全分散。按 3.2 项下的色谱条件检测,用纯水和 20% 甲醇水溶液提取的样品中黄芩苷的含量较低,用 50% 甲醇水溶液提取的样品中黄芩苷的含量和以纯甲醇为溶剂的样品中黄芩苷的含量相当,但用纯甲醇为溶剂的样品中黄芩苷色谱图峰形

较宽,有前沿峰,而用 50% 甲醇水溶液提取的样品中黄芩苷的色谱图峰形尖锐,分离度良好,这与王彬等的结果一致^[18],故本研究选用 50% 甲醇水溶液作为提取溶剂。

表 2 几种微乳凝胶制剂中药物含量检测的提取溶剂

制剂名称	检测药物	提取溶剂
复方紫草微乳凝胶 ^[10]	紫草素	纯甲醇
灯盏花素微乳凝胶 ^[11]	野黄芩苷	纯甲醇
复方甘草微乳凝胶 ^[12]	氧化苦参碱、甘草酸和甘草苷	无水乙醇
硝酸益康唑微乳凝胶 ^[13]	硝酸益康唑	纯甲醇

表 3 几种不同制剂中黄芩苷的 HPLC 法含量检测

制剂名称	提取溶剂	色谱条件
黄芩苷自微乳 ^[1]	纯甲醇	C ₁₈ 柱,甲醇—水—磷酸(55:45:0.04,体积比)为流动相,检测波长为 277 nm(UV),流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃。
助产凝胶 ^[14]	80% 甲醇	C ₁₈ 柱,甲醇—0.1% 磷酸溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长为 280 nm(UV),流速为 1.0 mL/min,柱温 35 ℃。
黄芩苷胶囊 ^[15]	纯甲醇	C ₁₈ 柱,甲醇—0.1% 磷酸溶液(47:53,体积比)为流动相,检测波长为 280 nm(UV),流速 mL/min,柱温 30 ℃。
黄芩苷分散片 ^[16]	流动相	C ₁₈ 柱,乙腈—水(60:40,体积比);检测波长为 290nm(UV),流速 1.0mL/min,柱温 30 ℃。
化瘀祛斑胶囊 ^[17]	70% 甲醇	C ₁₈ 柱,甲醇—0.1% 磷酸溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长为 277 nm(UV),流速为 1.0 mL/min,柱温 25 ℃。

5 结论

在本文中,采用 HPLC 法测定黄芩苷微乳凝胶中黄芩苷的含量,对提取溶剂和液相条件进行试验,在该条件下进行专属性检测、标准曲线、精密度、重复性、含量检测等试验均符合要求,表明本方法检测黄芩苷含量准确可靠。

参考文献:

[1] 卢秀霞,关杏英,蔡慧娴,等. HPLC 法测定黄芩苷自微乳中黄芩苷的含量[J]. 广东药学院学报,2015,31(03):341-344.

[2] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 131:68-80.

[3] Long Y, Xiang Y, Liu S, et al. Baicalin liposome alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via inhibiting TLR4/JNK/ERK/NF-κB pathway[J]. Mediators of Inflammation, 2020, 11:8414062.

[4] Martínez Medina J J, Naso LG, Pérez A L, et al.

Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and its oxidovanadium(IV) complex[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017, 166:150-161.

[5] 文学平,刘德俊,裴忆雪,等. 黄芩苷对尿酸钠诱导 RAW264. 7 细胞 NLRP3 及炎症因子表达的影响[J]. 中国新药杂志,2018,27(02):190-194.

[6] 徐凌云,李俊杰,邱银生,等. 一种黄芩苷微乳溶液和黄芩苷微乳凝胶剂及其制备方法和应用:中国. CN108175744B[P]. 2020-12-18.

[7] 吴超群,李小芳,郑宇,等. 微乳凝胶在中药经皮给药系统中的应用进展[J]. 山东化工, 2019,48(11):38-40.

[8] 国家药典委员会. 中国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.

[9] 刘翠哲,刘喜纲,陈大为,等. RP-HPLC 测定三黄片中黄芩苷的含量[J]. 中成药,2005,27(9):1116.

[10] Chen J, He Y, Gao T, et al. Preparation and properties of compound Arnebiae Radix micro-emulsion gel [J]. African Journal of Tradition-

- al, Complementary, and Alternative Medicines, 2017, 14(3):274-279.
- [11] 黄庆德,姚娜,胡建萍,等. HPLC 法测定灯盏花素微乳凝胶剂中野黄芩苷的含量[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(06):39-41.
- [12] 王景雁,马书伟,赵馨雨,等. 复方甘草微乳凝胶剂的制备与药效学评价[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21):5193-5199.
- [13] 丁乐,杨人泽,李小兰,等. 硝酸益康唑微乳凝胶的制备及其体外释放研究[J]. 中国药业, 2020, 29(13):35-38.
- [14] 魏元刚,易铭,杨永安. HPLC 法同时测定助产凝胶中黄芩苷、厚朴酚及和厚朴酚含量[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2018, 5(33):17-19.
- [15] 杨昌云,林淑瑜,李玉堂. HPLC 法测定黄芩苷胶囊中黄芩苷的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(23):2182-2184.
- [16] 冯鹏飞,叶晓娅,张磊. 黄芩苷分散片的制备及溶出度分析[J]. 河南医学高等专科学校学报, 2021, 33(02):196-199.
- [17] 黎春彤,段斯庭,李翔,等. HPLC 法同时测定化痰祛斑胶囊中芍药苷、黄芩苷和黄芩素的含量[J]. 中国药师, 2018, 21(07):1287-1289.
- [18] 王彬,章荣叶,汤赛飞,等. 清瘟解毒口服液质量控制试验[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(04):101-104.
-
- (上接第 15 页)
- [56] 王云,倪晔,孙志浩,等. *Clostridium saccharobutylicum* 利用玉米秸秆水解液发酵生产燃料丁醇[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9):904-911.
- [57] 王凤芹,原欢,楚乐然,等. 玉米秸秆水解液燃料丁醇发酵条件优化研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10):79-83.
- [58] 田磊,刘自勇,张培玉,等. 拜氏梭菌发酵玉米秸秆水解液生产燃料丁醇[J]. 可再生能源, 2015, 33(4):618-624.
- [59] 张强,戈兴炜, THYGESEN A, 等. 利用树干毕赤酵母发酵玉米秸秆制备燃料酒精[J]. 化工进展, 2010, 29(10):2270-2273.
- [60] 李婷婷,郭舒婷,薛天福,等. 响应面法优化玉米秸秆糠发酵燃料乙醇的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42(2):229-236.
- [61] 储秋露,杨德良,马斌,等. 玉米秸秆制备燃料乙醇的集成技术研究[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(5):20-24.
- [62] 姜庆宏,姜月,张铁军,等. 玉米秸秆真菌降解液生产燃料乙醇的发酵条件优化[J]. 可再生能源, 2015, 33(12):1872-1875.
- [63] 宋安东,任天宝,张百良. 玉米秸秆生产燃料乙醇的经济性分析[J]. 农业工程学报, 2010, 26(6):283-286.
- [64] 朱均均,陈尚钊,勇强,等. 玉米秸秆生物炼制燃料乙醇的研究[J]. 林产化学与工业, 2011, 31(6):35-40.
- [65] SUI W, LIU X, SUN H, et al. Improved high-solid loading enzymatic hydrolysis of steam exploded corn stalk using rapid room temperature γ -valerolactone delignification [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 165:113389.
- [66] 汤斌,陈中碧,张庆庆,等. 玉米秸秆发酵燃料乙醇预处理条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(6):65-67.
- [67] LIU C, LIU M, WANG P, et al. Effect of steam-assisted alkaline pretreatment plus enzymolysis on converting corn stalk into reducing sugar [J]. Renewable Energy, 2020, 159:982-990.
- [68] 陈胜杰,高翔,袁戎宇. 玉米秸秆生产燃料乙醇的 SHF 发酵工艺优化[J]. 发酵科技通讯, 2020, 49(1):32-36, 53.