

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.02.10

HPLC 和原子吸收光谱法测定黄芩苷锌含量的比较研究

余瑞雪, 陈蓉, 李亚龙, 叶纯*, 邱银生

(武汉轻工大学动物科学与营养工程学院, 武汉 430023)

[收稿日期] 2023-04-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 02-0066-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了比较黄芩苷锌含量测定的不同方法, 建立更加简单、快速的含量测定方法, 分别采用高效液相色谱法和原子吸收光谱法对黄芩苷锌原料药的含量测定进行研究。结果表明, HPLC 测定黄芩苷锌线性范围为 10.0 ~ 200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相关系数 $r = 0.9999$, 精密度 ($RSD = 0.08\%$) 良好; 原子吸收光谱法线性范围为 0 ~ 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相关系数 $r = 0.9983$, 精密度 ($RSD = 0.13\%$) 良好, 但前处理过程过于复杂, 耗时太长。因此更推荐 HPLC 法。

[关键词] 黄芩苷锌; 含量测定; 高效液相色谱法; 原子光谱法

A Comparative Study of the Determination of Zinc Baicalin Content by HPLC and Atomic Absorption Spectrometry

YU Rui-xue, CHEN Rong, LI Ya-long, YE Chun^{1*}, QIU Yin-sheng

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

Corresponding author: YE Chun, E-mail: yechun 0226@163.com

Abstract: In order to compare the different methods for the determination of baicalin-zinc complex and establish a simpler and faster content determination method, HPLC method and atomic absorption spectrophotometry method were used to study the content determination of baicalin-zinc complex. The linear range of baicalin-zinc complex was 10.0 ~ 200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9999$), and the precision ($RSD = 0.08\%$) was good by HPLC. The linear range of atomic absorption spectrometry was 0 ~ 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9983$), and the precision ($RSD = 0.13\%$) was good, but the pretreatment process was too complex and time-consuming. The HPLC method was simpler, faster and accurater, which could be used to determine the content of baicalin-zinc complex.

Key words: baicalin-zinc complex; determination; HPLC; atomic absorption spectrophotometry

仔猪腹泻是困扰养殖业的一大难题^[1], 黄芩苷能够抑制炎症渗出、降低致炎细胞因子的释放从而

治疗仔猪腹泻^[2]。黄芩苷预防治疗仔猪腹泻的效果已经得到广泛的证实, 也在临床上大量投入使用^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32002333); 湖北省重点研发计划项目 (2022BBA0055)

作者简介: 余瑞雪, 硕士研究生, 从事为动物安全生产与环境工程方向研究。

通讯作者: 叶纯。E-mail: yechun0226@163.com

有研究发现,黄芩苷与金属离子形成的络合物其药理活性优于黄芩苷^[4]。锌元素是动物生长和发育必不可少的微量元素,前期研究发现,黄芩苷和锌离子的配合物比黄芩苷具有更好的活性和药理作用^[5-6],黄芩苷锌在减轻氧化、免疫调节和抗病毒方面的活性均优于黄芩苷^[7-8]。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锌,发现其在体外具有较强的抑菌功能,急性经口毒性试验评价为无毒级,口服给药后仔猪体内无残留,可作为一种安全的、有效的兽药应用于仔猪肠道疾病的防治,该发现已申请专利并授权^[9-10]。

现有文献报道的黄芩苷锌含量测定方法有 EDTA 滴定法^[11],但此方法存在缺点:黄芩苷锌的固有颜色是砖红色,会干扰滴定终点的颜色判断,此外黄芩苷锌的溶解度很小,会影响滴定的准确性。课题组前期研究发现一定前处理条件下,黄芩苷锌可分解成黄芩苷和锌离子,考虑通过测定锌或者黄芩苷的含量后换算成黄芩苷锌的量。其中《中华人民共和国兽药典(2020 版)》中药材黄芩中黄芩苷的含量测定方法为高效液相色谱法(HPLC),目前 Zn²⁺ 检测方法主要为原子吸收光谱法、分光光度法、离子色谱法等,其中精密度最高的是原子吸收光谱法^[12]。上述方法所用试剂及反应原理各有不同,因此本研究参考相关文献,采用 HPLC 和原子吸收光谱法测定黄芩苷锌的含量,并比较测定结果。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和实验材料

高效液相色谱仪(Waters-2489,美国 Waters 公司);紫外吸收检测器(Waters-2487,美国 Waters 公司);自动进样器(Waters-2707,美国 Waters 公司);高压泵(Waters-1512,美国 Waters 公司);原子吸收光谱仪(Agilent 204DUO,美国 Agilent 公司);酸度 pH 计(E-301-D,上海仪电科学仪器股份有限公司);精密分析天平(BS-110S,北京塞多利斯仪器系统有限公司);纯水仪(Millipore,德国 Merck-Millipore 公司);WatersX-Bridge C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)(Waters,美国 Waters 公司);迪马 Diamonsil C18 色谱柱(150×4.6 mm,

5 μm)(北京迪科马科技有限公司);依利特 Hyper-sil ODS 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)(大连依利特分析仪器有限公司);原子吸收分光光度计(AAS-6000,江苏天瑞仪器股份有限公司)。黄芩苷对照品(96.1%,批号:Z0271910)购自中国兽药药品监察所;无水乙醇、甲醇、乙腈(均为色谱纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;二甲基亚砜(分析级)购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸(分析级)购自天津市凯通化学试剂有限公司;盐酸、硝酸均购自中国药集团化学试剂有限公司;锌标准溶液(1000 μg/mL)购自中国计量科学研究院。

1.2 高效液相色谱法

1.2.1 色谱条件 采用 Diamonsil C18(150 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(30:70);流速 1.0 mL/min;检测波长 278 nm;进样量 20 μL;柱温:30 ℃。

1.2.2 溶液的配制 对照品溶液配制:精确称取干燥的黄芩苷对照品约 20 mg 于 100 mL 容量瓶中,加流动相适量,超声 30 min 待完全溶解后,冷却定容至刻度,得到浓度约为 200 μg/mL 的对照品储备溶液。同法制备供试品溶液。

1.3 原子吸收光谱法

1.3.1 测定方法 锌元素仪器测定条件见表 1。

表 1 仪器工作条件

Tab 1 The analytical condition of Zn element

元素	波长 (nm)	狭缝宽度 (nm)	灯电流 (mA)	乙炔流量 (L/min)	空气流量 (L/min)
Zn	213.9	0.2	3.0	1.2	6.0

按表 2 所列仪器工作条件,用原子吸收法测定样品溶液中 Zn 的含量,测定时需将供试品液稀释 200 倍后再测定。

锌离子含量计算:

$$\text{锌离子含量计算公式: Zn\%} = \frac{m_1 \times 50 \times 10^{-6}}{m_0}$$

其中 m_1 为原子吸收法测得的锌离子含量(单位:μg/mL), m_0 为检测所用的样品重量(单位:g)。

1.3.2 溶液的配制 对照品溶液的配制:取 1000 μg/mL 的锌标准溶液用 1% 的稀硝酸稀释成

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

供试品溶液的配制:准确称取 0.1 g 样品于洁净的坩埚中,炭化 1 h 待无烟冒出后,置马弗炉内 550 $^{\circ}\text{C}$ 灰化 4 h。冷却置室温后,加入 5 mL (6 mol/L) 的盐酸润湿,再滴加 5 滴浓硝酸,在电热炉上加热至微沸约 1 min,过滤后转移到 50 mL 容量瓶中,然后用 1% 稀硝酸定容,摇匀,备用。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 专属性试验 取 1.2.2 项下制备的对照品溶液和供试品溶液各 20 μL ,注入高效液相色谱仪,记录色谱图。图 1-3 表明,供试品和对照品在该色谱条件下出峰时间吻合,峰型良好,说明该方法专属性良好。

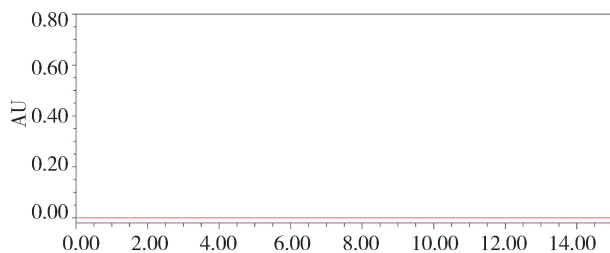


图 1 空白溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of blank solution

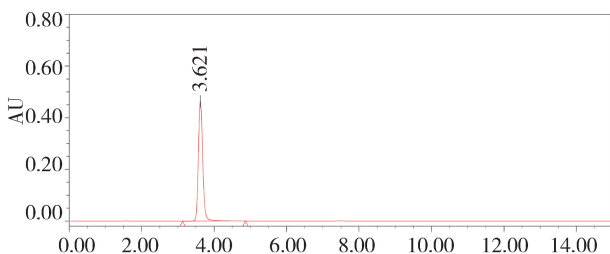


图 2 黄芩苷对照品溶液色谱图

Fig 2 Chromatogram of baicalin reference solution

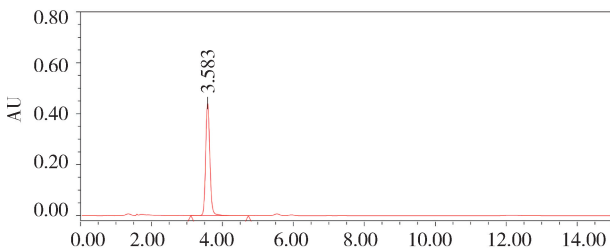


图 3 供试品溶液色谱图

Fig 3 Chromatogram of the test solution

2.1.2 线性及范围 精密量取 1.2.2 项下的对照品储备溶液适量,加流动相稀释成浓度为 10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,分别取 20 μL 注入高效液相色谱仪进行测定。以黄芩苷浓度为横坐标 (X),色谱峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归分析 (图 4),得到回归方程为 $y = 76954x - 24589$, $r = 0.9999$,说明黄芩苷在 10.0 ~ 200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

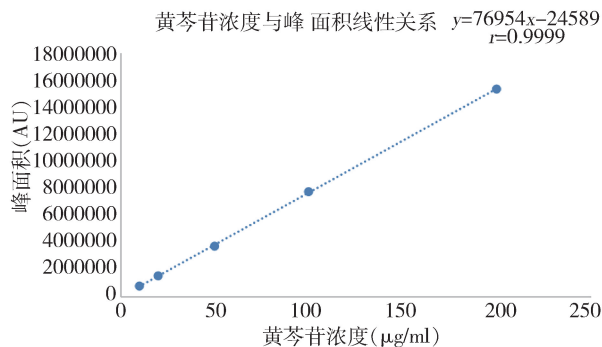


图 4 标准曲线

Fig 4 Baicalin linear diagram

2.1.3 精密度试验 精密量取 1.2.2 项下的对照品储备溶液适量,加流动相稀释成浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,按“含量测定 1.2.1”项下色谱条件测定。连续进样 6 次,记录色谱图,色谱峰面积 RSD ($n=6$) 为 0.08%,说明仪器精密度良好。

2.1.4 重复性试验 取同一批黄芩苷原料药(批号 1[#]),按 1.2.2 项下的方法制备供试品溶液共 6 份,进行平行测定,结果 6 次测定的平均含量为 99.34%, $RSD(n=6)$ 为 0.97%,说明该方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样,记录色谱峰面积, RSD ($n=6$) 为 0.94%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.6 准确度试验 将供试品(批号 1[#],含量 99.58%)称样量减半,共称取 6 份,分别加入相当于供试品 100% 的黄芩苷对照品,配制成供试品溶液。按 1.2.1 的条件进行测定,计算加样回收率,结果 6 份供试品加样回收率为 101.47% ~ 102.28%,平均加样回收率为 101.83%, $RSD(n=6)$ 为 0.33%。见表 2。

表 2 HPLC 法加样回收率测定结果

Tab 2 Results of HPLC dosing recovery

编号	取样量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	19.98	19.90	20.35	102.28		
2	20.06	19.98	20.27	101.47		
3	20.08	20.00	20.30	101.47	101.83	0.33
4	20.08	20.00	20.37	101.87		
5	20.05	19.97	20.33	101.79		
6	20.04	19.96	20.38	102.12		

2.1.7 方法耐用性考察 采用同一批黄芩苷锌原料药(批号 1[#]),按 1.2.1 项下方法制备供试品溶液,分别使用 X-Bridge C18(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Diamonsil C18(150 mm×4.6 mm,5 μm)和 Hypersil ODS(150 mm×4.6 mm,5 μm)测定,观察色谱如图 5-7,三种色谱柱主峰拖尾因子均<2,说明该方法耐用性良好。

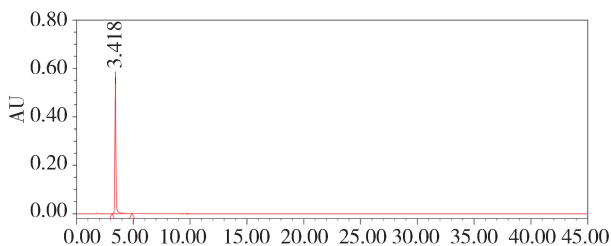


图 5 X-Bridge C18 色谱图

Fig 5 X-Bridge C18 chromatogram

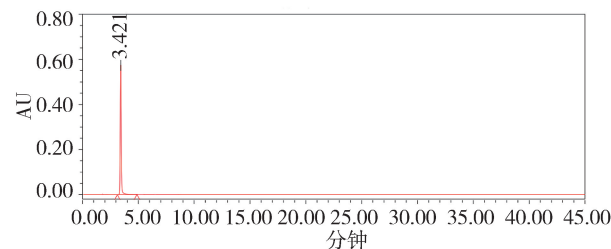


图 6 Diamonsil C18 色谱图

Fig 6 Diamonsil C18 chromatogram

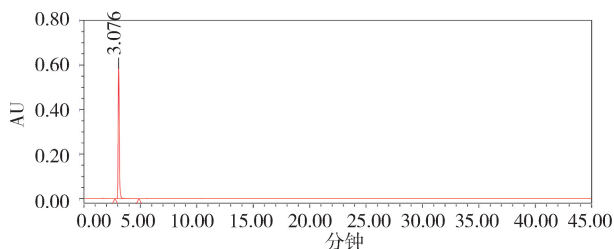


图 7 Hypersil ODS 色谱图

Fig 7 Hypersil ODS chromatogram

2.2 原子吸收光谱法

2.2.1 线性及范围 用 1% 的稀硝酸将对照品标准储备液稀释成 0、0.5、1、1.5 和 2.0 μg/mL 的标准工作溶液,注入原子分光光度仪,照 1.4.1 项下测定,根据吸光度值绘制标准曲线。得到回归方程为 $y = 0.3957x + 0.1054$, $r = 0.9983$,说明锌离子在 0~2.0 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.2 重复性 取同一批黄芩苷锌原料药(批号 1[#]),精密称取 6 份,按 2.2.1 项下的方法制备供试品溶液共 6 份,进行平行测定,结果 6 次测定的平均含量为 99.21%,RSD($n=6$)为 0.13%,说明该方法重复性良好。

2.3 两种含量测定方法结果比较 取黄芩苷锌原料药(批号 1[#],2[#]和 3[#])用高效液相色谱法和原子吸收分光法进行测定,并将结果进行 t 检分析, t 测 = 1.300($P = 0.263 > 0.05$),结果表明两种方法的测定结果无显著性差异($\alpha = 0.05$),见表 3。

表 3 两种方法测定含量的结果

Tab 3 Results of the two determination methods

批号	HPLC 法	原子吸收光谱法
1	99.58%	99.26%
2	98.34%	97.26%
3	99.52%	98.17%

3 讨论与结论

原子吸收光谱法被广泛运用于食品^[13]和环境^[14]中重金属元素检测、矿石^[15]中金属元素的检测、药物^[16]中微量元素检测,原子吸收光谱法可以检测药物中的金属元素,也可以间接测定药物中的有机成分。例如,张青雨^[17]用四苯硼钠全沉淀硫酸阿托品,在滤液中加入过量的氯化钾沉淀剩余的

四苯硼钠,再用原子吸收光谱法测定过量的钾可以计算得到硫酸阿托品的含量。关于黄芩苷含量测定的手段已经越来越成熟,主要包括薄层色谱法(TLC)、HPLC法和液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)等。在诸多含量测定方法中高效液相色谱最为常见,由于其操作简便、准确性好且重复性高,被广泛应用于黄芩苷的定量分析及质量控制研究^[18]。

由表3结果显示,HPLC和原子吸收光谱法的测定结果无显著性差异,故两种方法都可作为黄芩苷锌含量测定的方法。原子吸收光谱法测定原理为黄芩苷锌经过炭化和灰化后获得游离的锌原子,再通过原子吸收光谱仪测定锌的含量后计算黄芩苷锌的量。样品前处理中要用到强酸和高温,马弗炉灰化耗时过长(一般需要4h)。HPLC法测定的原理是在弱酸条件下,黄芩苷锌会分解成黄芩苷,以黄芩苷为对照,测定出具体含量后计算出黄芩苷锌的含量。该方法相较于原子光谱法前处理操作简单、安全,重复性好,准确度高,结果稳定可靠,推广性更好,因此,更适用于黄芩苷锌及其制剂的质量控制。

参考文献:

- [1] Zhang Xin, Hu Xingquan, Wang Weili. Diagnosis and prevention of diarrheal disease in piglets [J]. *Livestock and poultry Industry*, 2012, (07): 70-72.
- [2] Lv Jinfang, Wen Aiyou, Ning Kangjian, *et al.* Mechanism of action of baicalin in the treatment of piglet diarrhea [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016,36 (08): 1401-1405.
- [3] Geng Jian, Xiang Zhiyu, Zhao Baokai. Overview of piglet diarrhea [J]. *Pig Industry Science*, 2017,34 (06): 107-109.
- [4] He Jun, Liang Guogang. Application of coordination chemistry in traditional Chinese medicine research [J]. *Chinese Journal of Experimental Medicine*, 2008,14 (12): 77-80.
- [5] Liu Yanji, He Xiaoyan, Liu Xiaohua, *et al.* Synthesis and bioactivity of copper and aluminum complexes [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 37 (9): 1296-1302.
- [6] Wu Ronglan, Feng Shun, Wang Ji Yide. Study of antioxidant properties of baicalin and its metal complexes [J]. *Science and Technology Herald*, 2006,24 (2): 36-38.
- [7] Zha A, Tu R, Cui Z, *et al.* Baicalin-Zinc Complex Alleviates Inflammatory Responses and Hormone Profiles by Microbiome in Deoxynivalenol Induced Piglets [J]. *Front Nutr*,2020,8:738281.
- [8] Li Shangfeng. Investigation of baicalin metal ion complexes [J]. *Gansu Science and Technology*, 2012,28 (14): 149-150.
- [9] The Bear goes into town. Preparation of baicalin zinc complex and study on toxicological and pharmacological activities [D]. *Huazhong Agricultural University*, 2019.
- [10] Qiu Yinsheng, Cao Jiyue, Xiong Jincheng, and so on. A method for the preparation of baicalin zinc complex for the treatment of piglets with diarrhea [P]. *Hubei Province*: CN108659082B, 2021-09-24.
- [11] Feng Lei, Liu Xu, Yang Hui. Experimental study on the factors influencing the zinc stability in baicalin [J]. *Journal of Kunming Medical College.*, 2008, (05): 26-28.
- [12] Pan Zhong, Li Min. Fluorescent probe technique for trace zinc ion detection [J]. *Chemical Sensor*, 2009,29 (03): 13-23.
- [13] Hu Xiuzhi. Progress in food metal detection [J]. *Modern Food*, 2021 (09): 20-22.
- [14] Xu Lanshu, Zhou Jinji. Progress in sample pretreatment methods for the determination of trace elements in environmental and food samples by atomic absorption spectroscopy [J]. *Physical and chemical test (chemical book)*, 2016,52 (02): 244-248.
- [15] Hu Qiang. Atomic absorption spectral method for the determination of metal elements in uranium ore [J]. *Chemical Industry Management*, 2021, 597 (18): 105-106.
- [16] Wang Xiaoning, Li Yansheng. Progress on atomic absorption spectrometry in pharmaceutical analysis [J]. *Science and Technology Communication*, 2013,5 (01): 107-105.
- [17] Zhang Yuqing, Wang Wei. Indirect determination of atropine sulfate by atomic absorption spectroscopy [J]. *Spectroscopy Laboratory*, 2002 (05): 665-667.
- [18] Chen Xiuhua, Liu Qiang. Progress in the quantitative analysis method of baicalin in traditional Chinese medicine preparations [J]. *Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine*, 2005,17 (3): 48-49.

(编辑:陈希)