

HPLC 法测定醒脾养儿颗粒中熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯

舒波, 刘福*

川北医学院附属医院 药剂科, 四川 南充 637000

摘要: 目的 建立 HPLC 波长切换法同时测定醒脾养儿颗粒中的熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯。方法 采用 HPLC 法, Agilent HC-C₁₈ 柱色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.4% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 0~14 min 时在 280 nm 波长下检测熊果苷, 14~18 min 在 350 nm 波长下检测槲皮苷, 18~30 min 在 256 nm 波长下检测缬草三酯和乙酰缬草三酯; 体积流量: 0.9 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量为 10 μL。结果 熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯分别在 11.97~239.40 μg/mL、4.65~93.00 μg/mL、4.18~83.60 μg/mL、5.30~106.00 μg/mL 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, *r* 分别为 0.999 8、0.999 3、0.999 9、0.999 5; 平均回收率分别为 98.78%、97.11%、99.14%、98.75%, RSD 值分别为 1.62%、0.68%、1.39%、0.87%。结论 所建立的方法样品处理方法简便, 检测的准确性和重复性均较好, 可为醒脾养儿颗粒质量标准测定方法的制定提供依据。

关键词: 醒脾养儿颗粒; 熊果苷; 槲皮苷; 缬草三酯; 乙酰缬草三酯; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)04-0584-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.04.007

Determination of arbutin, quercitrin, valepotriate and acevaltrate in Xingpi Yang'er Granules by HPLC

SHU Bo, LIU Fu

Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Abstract: Objective To develop an HPLC wavelength switching method for simultaneous determination of the contents of arbutin, quercitrin, valepotriate and acevaltrate in Xingpi Yang'er Granules. **Methods** HPLC method was adopted. The determination was carried out on Agilent HC-C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitril - 0.4% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 280 nm in 0 — 14 min (determination of arbutin), 350 nm in 14 — 18 min (determination of quercitrin), and 256 nm in 18 — 30 min (determination of valepotriate and acevaltrate). The flow rate was 0.9 mL/min, temperature of column was set at 25 °C, and volume of injection was 10 μL. **Results** The linear range of arbutin, quercitrin, valepotriate and acevaltrate were 11.97 — 239.40 μg/mL (*r*=0.999 8), 4.650 — 93.00 μg/mL (*r*=0.999 3), 4.180 — 83.60 μg/mL (*r*=0.999 9), and 5.300 — 106.0 μg/mL (*r*=0.999 5), respectively. The average recoveries were 98.78%, 97.11%, 99.14%, and 98.75% with RSD 1.62%, 0.68%, 1.39%, and 0.87%, respectively. **Conclusion** The established method is simple and accurate, has good repeatability which can be applied to the quality control for Xingpi Yang'er Granules.

Key words: Xingpi Yang'er Granules; arbutin; quercitrin; valepotriate; acevaltrate; HPLC

醒脾养儿颗粒由毛大丁草、一点红、蜘蛛香、山栀茶 4 味中药加工而成的颗粒剂, 具有醒脾开胃、养血安神、固肠止泻的功效, 临床上主要用于脾气虚所致的儿童厌食、腹泻便溏、烦躁盗汗、遗尿夜啼等的治疗。醒脾养儿颗粒执行标准为国家药品监

督管理局国家药品标准 WS-10337-(ZD-0337)-2002, 但标准中未对任何成分进行定量测定^[1]。陶剑美等^[2]采用分光光度法对醒脾养儿颗粒中总黄酮进行了测定。毛大丁草所含主要活性成分为熊果苷, 一点红所含主要活性成分为槲皮苷, 蜘蛛香所含主要活性

收稿日期: 2016-12-28

作者简介: 舒波 (1981—), 男, 四川乐至人, 主管中药师, 研究方向: 中药质量研究、临床合理用药。Tel: 15181786677 E-mail: 30387948@qq.com
*通信作者 刘福 (1965—), 男, 四川仪陇人, 主任药师, 研究方向: 临床药学及药剂学。Tel: 13890760097 E-mail: 1020267098@qq.com

成分为缬草三酯和乙酰缬草三酯。为了确保用药安全, 保证产品质量, 本实验建立了 HPLC 波长切换法对醒脾养儿颗粒中熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯进行了同时测定, 为进一步完善醒脾养儿颗粒质量标准, 确保临床用药的质量稳定和有效性提供了数据支持。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪(在线真空脱气装置、四元梯度泵、100 位自动进样器、柱恒温箱、可变波长检测器, 美国安捷伦公司); Mettler 十万分之一电子天平(瑞士); KQ-250B 超声波发生器(昆山市超声波仪器有限公司)。

乙腈为色谱纯, 磷酸和甲醇为分析纯; 熊果苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯对照品均购自中国食品药品检定研究院, 批号分别为 111951-201301、111840-201302、111841-201401; 槲皮苷对照品购自上海纯优生物科技有限公司, 质量分数 97.0%, 批号 522-12-3; 醒脾养儿颗粒购自贵州健兴药业有限公司, 规格 2 g/袋, 批号分别为 20150808、20160121、20160442。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent HC-C₁₈ 柱色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.4%磷酸溶液(B), 梯度洗脱^[3-5]: 0~9 min, 42.0% A; 9~14 min, 42.0%→54.0% A; 14~18 min, 54.0%→60.0% A; 18~26 min, 60.0%→75.0% A; 26~30 min, 75.0%→42.0% A; 0~14 min 时在 280 nm 波长^[6]下检测熊果苷, 14~18 min 在 350 nm 波长^[7]下检测槲皮苷, 18~30 min 在 256 nm 波长^[8-9]下检测缬草三酯和乙酰缬草三酯; 体积流量: 0.9 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯对照品各适量, 用 50% 甲醇分别溶解并稀释制成含熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯 1.197、0.465、0.418、0.530 mg/mL 单一成分的对照品贮备溶液, 再分别精密吸取适量, 置同一量瓶中, 用 50% 甲醇制成含熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯 119.7、9.3、20.9、10.6 μg/mL 混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取醒脾养儿颗粒约 3.0 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 50%

甲醇 50 mL, 精密称定, 超声提取 30 min, 放冷, 用 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按醒脾养儿颗粒的处方和工艺, 制备不含毛大丁草、一点红和蜘蛛香的阴性样品, 并按照 2.2.2 项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各适量, 进行检测。结果显示, 各色谱峰的对称因子均在 0.95~1.05, 峰与峰之间的分离度均大于 1.5。在与熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯对照品记录的色谱峰相应的保留时间处, 样品溶液记录的色谱图中有相应的色谱峰, 而阴性样品溶液记录的色谱图中没有对应的色谱峰, 说明阴性无干扰, 见图 1。

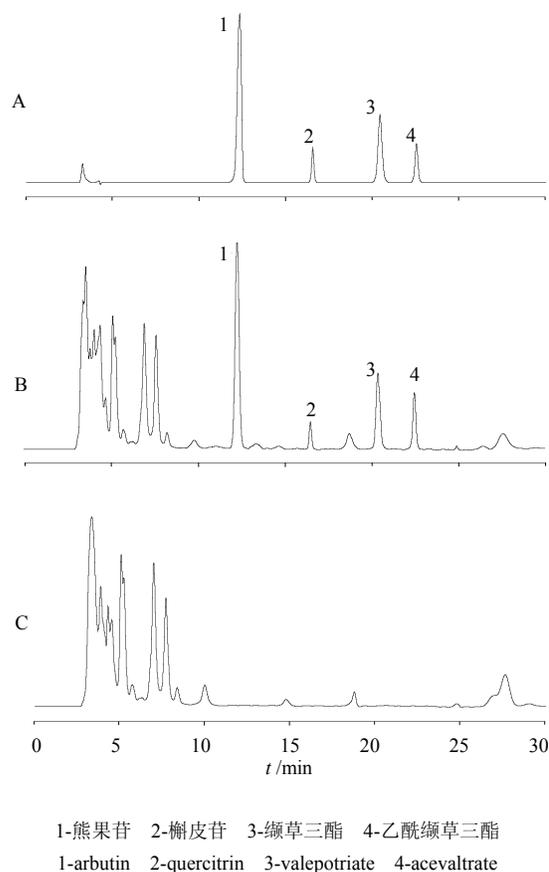


图 1 混合对照品(A)、醒脾养儿颗粒(B)和阴性样品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Xingpi Yang'er Granules (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取对照品储备溶液各 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 并用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得到一系列质量浓

度的混合对照品溶液。进样测定, 以熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯的质量浓度为横坐标, 测得的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程, 见表 1。

表 1 线性关系试验结果

Table 1 Results of linear relationship test

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
熊果苷	$Y=8.3851 \times 10^5 X+433.5$	0.999 8	11.97~239.40
槲皮苷	$Y=9.1359 \times 10^5 X+206.0$	0.999 3	4.65~93.00
缬草三酯	$Y=1.1172 \times 10^6 X-484.9$	0.999 9	4.18~83.60
乙酰缬草三酯	$Y=1.4097 \times 10^6 X-156.7$	0.999 5	5.30~106.0

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液适量, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯峰面积的 RSD 值分别为 0.81%、1.11%、0.59%、1.05%。

2.6 稳定性试验

取批号 20150808 的醒脾养儿颗粒样品, 制备供试品溶液, 在 20 °C 下放置 0、2、4、6、8 h 后, 进样检测, 记录熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯的峰面积值, 计算得其 RSD 值分别为 0.88%、1.21%、1.69%、1.50%。结果表明在 20 °C 下 8 h 内醒脾养儿颗粒供试品溶液稳定。

2.7 重复性试验

取批号 20150808 的醒脾养儿颗粒样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样检测, 分别计算熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯的质量分数, 结果其

RSD 值分别为 1.06%、1.52%、0.76%、1.26%。

2.8 回收率试验

取批号 20150808 的醒脾养儿颗粒样品 6 份, 每份约 1.5 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 依次精密加入质量浓度分别为熊果苷 0.653 mg/mL、槲皮苷 0.201 mg/mL、缬草三酯 0.536 mg/mL、乙酰缬草三酯 0.305 mg/mL 的单一成分对照品溶液 5.0、1.0、1.0、1.0 mL, 制备供试品溶液, 进样检测, 计算这 4 个成分的回收率, 结果平均回收率分别为 98.78%、97.11%、99.14%、98.75%, RSD 值分别为 1.62%、0.68%、1.39%、0.87%。

2.9 样品的测定

精密称取 3 批醒脾养儿颗粒样品, 制备供试品溶液, 进样测定, 采用外标法计算样品中熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯的质量分数, 结果见表 2。

表 2 醒脾养儿颗粒中熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯 ($n=3$)

Table 2 Determination of arbutin, quercitrin, valepotriate and acevaltrate in Xingpi Yang'er Granules ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	熊果苷	槲皮苷	缬草三酯	乙酰缬草三酯
20150808	2.171	0.132	0.359	0.203
20160121	1.902	0.119	0.297	0.186
20160442	2.465	0.148	0.425	0.234

3 讨论

实验过程中, 以所测各成分熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯的提取率为指标, 考察了不同提取方式 (超声提取、加热回流提取) 对所测成分的影响, 结果发现加热回流提取和超声提取所

测各成分的提取率相近。从实验操作的便捷性等因素考虑, 选取超声提取作为供试品溶液的制备方式。同时对提取溶剂 (50% 甲醇、甲醇) 和提取时间 (20、30、40 min) 进行考察, 结果发现选择 50% 甲醇作为提取溶剂, 采用超声 30 min 的提取方法作为提取

条件时,熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯的提取率最高。

高效液相色谱-波长切换联合梯度洗脱法同时测定醒脾养儿颗粒中4种主要成分熊果苷、槲皮苷、缬草三酯和乙酰缬草三酯,样品处理方法简便,检测的准确性和重复性均较好,可为醒脾养儿颗粒质量标准测定方法的制定提供依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 国家药品监督管理局标准 [S]. WS-10337(ZD-0377)-2002. 2002.
 [2] 陶剑美, 范晓萍, 钱亚芳, 等. 分光光度法测定醒脾养儿颗粒中总黄酮的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(6): 845-846.
 [3] 中国药典 [M]. 一部. 2015: 368-369.
 [4] 孟繁浩, 陈秋晨, 王琳, 等. 高效液相色谱法测定一

点红中槲皮素的含量 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(6): 414-415.
 [5] 侯文慧, 刘勇, 王春国, 等. HPLC 法同时测定蜘蛛香药材中缬草三酯类化合物及其降解产物的含量 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(12): 2658-2663.
 [6] 麻秀萍, 谭静, 蒋朝晖, 等. HPLC 测定毛大丁草中的熊果苷 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(3): 307-308.
 [7] 宁娱, 祝晨蓀, 莫洁丽, 等. HPLC 法测定一点红中槲皮苷的含量 [J]. 中国药品标准, 2015, 16(2): 117-119.
 [8] 王素娟, 郑承剑, 岳伟, 等. 用 HPLC 法同时测定蜘蛛香中4种缬草素类成分的含量 [J]. 药学服务与研究, 2014, 14(5): 376-378.
 [9] 狄宏晔, 石晋丽, 闫兴丽, 等. HPLC 法测定蜘蛛香中缬草素、乙酰缬草素及其分解产物 baldrinal [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1892-1894.