

[质 量]

HPLC法同时测定小儿泄泻停颗粒中9种成分

胡巍巍¹, 王茜^{2*}, 韩雪², 刘晨旭²

(1. 石家庄医学高等专科学校, 河北 石家庄 050051; 2. 河北中医学院药学院, 河北 石家庄 050200)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定小儿泄泻停颗粒(羌活、车前子、苍术等)中紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素的含量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Kromasil Eternity C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.5% 冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254、270、315 nm。**结果** 9 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999 1$), 平均加样回收率 96.98%~99.85%, RSD 0.87%~1.57%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于小儿泄泻停颗粒的质量控制。

关键词: 小儿泄泻停颗粒; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0029-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.007

Simultaneous determination of nine constituents in Xiao'er Xiexieting Granules by HPLC

HU Wei-wei¹, WANG Qian^{2*}, HAN Xue², LIU Chen-xu²

(1. Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050051, China; 2. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of nodakenin, noptopterol, isoimperatorin, geniposidic acid, verbascoside, isoacteoside, atractylodinol, atracylenolide II and atractylodin in Xiao'er Xiexieting Granules (*Nopterygium Rhizoma et Radix, Plantaginis Semen, Atractylodis Rhizoma, etc.*). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Kromasil Eternity C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.5% acetic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 254, 270, 315 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999 1$), whose average recoveries were 96.98%–99.85% with the RSDs of 0.87%–1.57%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Xiao'er Xiexieting Granules.

KEY WORDS: Xiao'er Xiexieting Granules; chemical constituents; HPLC

小儿泄泻停颗粒由羌活、车前子、苍术、大黄、制大黄、甘草、制川乌 7 味药材加工而成, 具有健脾化湿、消积止泻的作用, 主要用于婴幼儿腹泻的治疗, 尤其对小儿脾虚湿蕴食津所引起的大便蛋花汤样或糊状, 夹有粘液泡沫、乳块, 反复迁延

不愈的婴幼儿腹泻效果最佳^[1-6]。但该制剂现行质量标准^[7]及袁蔼芝等^[8]仅对大黄所含成分大黄酸含量进行测定, 未检索到多成分同时定量测定的报道。

小儿泄泻停颗粒中羌活祛风胜湿, 升阳补脾,

收稿日期: 2019-06-10

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2018210)

作者简介: 胡巍巍(1979—), 女, 硕士, 讲师, 从事中药质量控制、中医诊断学研究。Tel: 15632109629

* 通信作者: 王茜(1983—), 女, 博士, 副教授, 从事中药质量控制、中药药性理论研究。Tel: 15633688246, E-mail: wxi830205@qq.com

含有挥发油、香豆素、有机酸等化合物，其中紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素为主要成分^[9]；车前子利水渗湿止泻，利小便，实大便，含有环烯醚萜、苯乙醇苷、三萜、多糖、苯丙素苷、黄酮类化合物，其中京尼平苷酸为其环烯醚萜类代表性成分，毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷为其苯乙醇苷类代表性成分^[10-11]；苍术健脾燥湿，含有聚乙烯炔、倍半萜、倍半萜苷成分，其中苍术素醇、苍术素为其聚乙烯炔类主要成分，白术内酯Ⅱ为其倍半萜类主要成分^[12-13]；大黄清利湿热，消积导滞，制川乌温中祛寒，甘草调和胃气，诸药合用，共奏健脾化湿、消积止泻之效。因此，本实验首次建立HPLC法同时测定小儿泄泻停颗粒中紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素的含量，为该制剂质量标准的提高和完善提供理论依据和实验基础。

1 材料

Waters 2695型高效液相色谱仪，配置Waters可变波长检测器、Empower工作站（美国Waters公司）；BP211D型电子分析天平（德国Sartorius公司）；KQ-250E型超声波清洗器（上海量壹科学仪器有限公司）。紫花前胡苷（111821-201604，质量分数99.6%）、羌活醇（111820-201705，质量分数99.9%）、异欧前胡素（110827-201812，质量分数99.6%）、京尼平苷酸（111828-201604，质量分数97.4%）、毛蕊花糖苷（111530-201713，质量分数92.5%）、白术内酯Ⅱ（111976-201501，质量分数99.9%）、苍术素（111924-201605，质量分数99.8%）对照品均购自中国食品药品检定研究院；异毛蕊花糖苷（61303-13-7，质量分数95.0%）对照品购自上海纯优生物科技有限公司；苍术素醇（61642-89-5，质量分数99.8%）对照品购自贵州迪大科技有限责任公司。小儿泄泻停颗粒（每袋装2g，批号1807216、1809104、1809158）购自杭州胡庆余堂药业有限公司。乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，甲醇制成每1 mL分别含紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素2.912、0.674、4.730、1.318、0.896、0.492、0.216、0.958、2.194 mg的贮备液，各精密吸取2.5 mL

于50 mL量瓶中，甲醇稀释至刻度，即得。

2.2 供试品溶液制备 取颗粒适量，研细，精密称取2.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入25 mL甲醇，密塞，称定质量，超声提取30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得。

2.3 阴性样品溶液制备 按颗粒质量标准项下处方及工艺，分别制备缺羌活、缺车前子、缺苍术的阴性样品，按“2.2”项下方法制备，即得。

2.4 色谱条件 Kromasil Eternity C₁₈色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.5%冰醋酸（B），梯度洗脱（0~15.0 min，18.0% A；15.0~28.0 min，18.0%~35.0% A；28.0~46.0 min，35.0%~42.0% A；46.0~64.0 min，42.0%~49.0% A；64.0~75.0 min，49.0%~18.0% A）；体积流量1.0 mL/min；柱温30℃；0~28.0 min在315 nm^[9]波长处检测紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素，28.0~46.0 min在254 nm^[10]波长处检测京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷，46.0~75.0 min在270 nm^[13]波长处检测苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素；进样量10 μL。

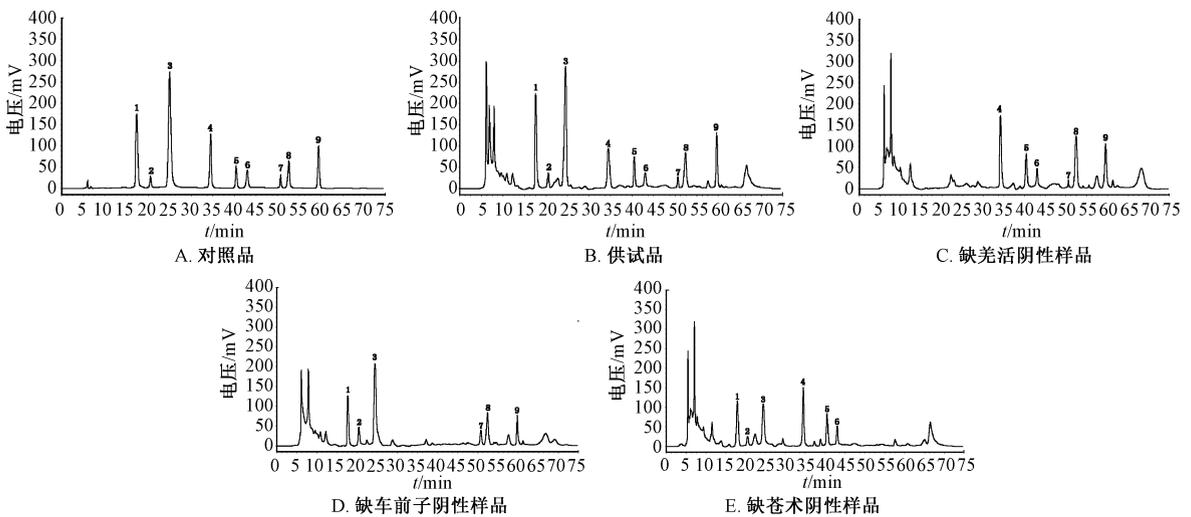
2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，结果见图1。由此可知，各成分分离度均大于1.5，理论塔板数按均不低于3 500，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL，置于20 mL量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，得到不同质量浓度对照品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 取“2.2”项下供试品溶液（批号1807216），在“2.4”项色谱条件下进样测定6次，测得紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素峰面积RSD分别为0.59%、0.81%、1.52%、0.75%、1.34%、0.59%、0.96%、1.85%、0.62%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同1批颗粒（批号1807216）适量，按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，测得紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼



1. 紫花前胡苷 2. 羌活醇 3. 异欧前胡素 4. 京尼平苷酸 5. 毛蕊花糖苷 6. 异毛蕊花糖苷 7. 苍术素醇 8. 白术内酯Ⅱ 9. 苍术素
1. nodakenin 2. notopterol 3. isoimperatorin 4. geniposidic acid 5. verbascoside 6. isoacteoside 7. atractylodinol 8. atracylenolide Ⅱ
9. atractylodin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
紫花前胡苷	$Y=1.0156\times 10^6 X+335.5$	0.9996	14.56~291.20
羌活醇	$Y=6.3019\times 10^5 X-298.1$	0.9992	3.37~67.40
异欧前胡素	$Y=7.5192\times 10^5 X+257.7$	0.9999	23.65~473.00
京尼平苷酸	$Y=9.9853\times 10^5 X+189.0$	0.9991	6.59~131.80
毛蕊花糖苷	$Y=8.1151\times 10^5 X-476.9$	0.9997	4.48~89.60
异毛蕊花糖苷	$Y=5.9576\times 10^5 X-305.4$	0.9993	2.46~49.20
苍术素醇	$Y=8.9327\times 10^5 X-274.5$	0.9992	1.08~21.60
白术内酯Ⅱ	$Y=1.1395\times 10^6 X+436.8$	0.9999	4.79~95.80
苍术素	$Y=7.4941\times 10^5 X+388.1$	0.9998	10.97~219.40

平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素含有量 RSD 分别为 1.42%、0.59%、1.33%、1.75%、0.48%、1.63%、1.91%、0.61%、1.24%，表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取同 1 批供试品溶液（批号 1807216），室温下于 0、1、2、4、8、16 h 在“2.4”项色谱条件下进样测定，测得紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素峰面积 RSD 分别为 0.57%、0.86%、1.54%、0.77%、0.33%、0.96%、0.45%、1.83%、0.59%，表明溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取含有量已知的颗粒 9 份，每份 1.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入对照品溶液（含 2.016 mg/mL 紫花前胡苷、

0.502 mg/mL 羌活醇、3.494 mg/mL 异欧前胡素、0.858 mg/mL 京尼平苷酸、0.606 mg/mL 毛蕊花糖苷、0.332 mg/mL 异毛蕊花糖苷、0.118 mg/mL 苍术素醇、0.654 mg/mL 白术内酯Ⅱ、1.452 mg/mL 苍术素）0.5、1.0、1.5 mL，各 3 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素平均加样回收率分别为 99.12%、98.26%、99.85%、98.79%、98.05%、97.99%、96.98%、98.74%、99.01%，RSD 分别为 0.90%、1.19%、0.87%、1.17%、1.06%、0.97%、1.57%、1.34%、0.94%。

2.6 样品含有量测定 取 3 批颗粒适量，研细，精密称取 2.0 g，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，外标法计算含有量，结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相筛选 参照 2015 年版《中国药典》一部中羌活、车前子、苍术含有量测定条件，本实验考察了流动相乙腈-水^[14-15]、甲醇-0.5%醋酸^[10]、甲醇-水^[16]，发现各成分色谱峰峰形均存在一定缺陷，故又采用乙腈-0.5%醋酸梯度洗脱^[9,17]，同时其比例进行摸索，最终确定为“2.4”项下条件，此时各成分色谱峰峰形较好，而且与相邻杂质峰的分离度均能达到要求。

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

成分	批号		
	1807216	1809104	1809158
紫花前胡苷	1.971	1.778	2.062
羌活醇	0.494	0.422	0.558
异欧前胡素	3.525	3.703	3.180
京尼平苷酸	0.862	0.986	0.734
毛蕊花糖苷	0.617	0.702	0.527
异毛蕊花糖苷	0.329	0.377	0.348
苍术素醇	0.115	0.098	0.130
白术内酯Ⅱ	0.659	0.561	0.752
苍术素	1.463	1.676	1.322

3.2 供试品溶液制备方法筛选 本实验考察以甲醇^[9,13-16,18]、60% 甲醇^[10,17,19]、稀乙醇为溶剂超声 30 min 的提取效果,发现用甲醇提取时不仅各成分综合提取率最佳,而且峰形良好,杂质无干扰,故选择其作为提取溶剂。再考察超声提取^[9,13-16]、加热回流提取^[10]、室温浸渍过夜提取的效果,发现加热回流提取率略高于超声,但杂质明显更多,而室温浸渍过夜时提取率最低,故选择超声作为提取方法。最后,考察超声时间 15、30、45 min,发现提取 30、45 min 时提取率相差不大,但均明显优于提取 15 min 时,故最终确定供试品溶液制备方法为甲醇超声提取 30 min。

4 结论

本实验首次建立 HPLC 法同时测定小儿泄泻停颗粒中紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、苍术素醇、白术内酯Ⅱ、苍术素的含有量,该方法简便准确,重复性好,可实现对该制剂更全面的质量控制,也为其质量标准提高提供依据。

参考文献:

[1] 桑 泉, 吴建军. 小儿泄泻停治疗婴幼儿腹泻 33 例[J]. 浙江中医杂志, 1998, 33(9): 393.
[2] 赵金叶. 小儿泄泻停及潘生丁治疗秋冬季腹泻 60 例[J].

实用中医药杂志, 2002, 18(8): 30.

[3] 张冬卿. 小儿泄泻停冲剂治疗婴幼儿秋冬季腹泻疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 1997, 6(3): 179.
[4] 沈雅娟, 时毓民, 傅美娣. 小儿泄泻停冲剂治疗婴幼儿腹泻的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2000, 34(7): 45.
[5] 佚名. 小儿泄泻停冲剂治疗小儿腹泻 105 例疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 1998, 32(5): 33.
[6] 蔡华芳, 蒋幼芳. 小儿泄泻停冲剂的止泻及改善肠道吸收作用[J]. 儿科药学杂志, 2005, 11(6): 3-4.
[7] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第十五册)[S]. 1998: 15.
[8] 袁蒿芝, 王敏娟, 陈洛怡. 高效液相色谱法测定小儿泄泻停中大黄酸的含量[J]. 中成药, 1998, 20(2): 10-11.
[9] 唐国琳, 黄 凤, 高天元, 等. HPLC 同时测定宽叶羌活药材中 5 种成分含量[J]. 中药与临床, 2018, 9(6): 14-17.
[10] 关书博, 王 宇, 张振秋, 等. 波长切换法测定车前子生品及盐炙品中 3 个成分的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(8): 1711-1715.
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 68-69; 161-162; 182.
[12] 朱利霞, 黄 青, 王茹静, 等. 苍术药材的质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 3046-3051.
[13] 王爱妮, 刘玉强, 才 谦. 3 种苍术的特征图谱及苍术素醇、苍术素和白术内酯Ⅱ含量测定研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(1): 91-95.
[14] 鱼 江, 封家福, 曾邦国. HPLC 测定羌活药材中羌活醇和异欧前胡素含量的效果分析[J]. 重庆医学, 2014, 43(35): 4769-4770; 4773.
[15] 韩春丽, 郭晔红. 异地栽培对羌活生长及有效成分含量的影响[J]. 资源开发与市场, 2015, 31(7): 769-772; 807.
[16] 赵森森, 王 瑞, 俞桂新, 等. 苍术的定性定量分析方法研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 954-958.
[17] 田 伟, 甄亚钦, 范帅帅, 等. 高效液相色谱法同时测定车前子配方颗粒中京尼平苷酸、咖啡酸、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(2): 140-144.
[18] 陈文婷, 陈 阳, 张意涵, 等. GC 法同时测定不同种类苍术中 6 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1124-1129.
[19] 邵嘉欣, 孙 洁, 卢丹逸, 等. 车前子的 HPLC 特征图谱研究[J]. 海峡药学, 2018, 30(4): 69-72.