

文章编号:1008-1534(2012)04-228-04

熊果苷及其中间体的含量测定

姚小丽¹, 郝亮², 陈秀红¹

(1. 华北制药集团河北华民药业有限公司, 河北石家庄 052165; 2. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北石家庄 050051)

摘要:由于熊果苷对黑色素合成酶(酪氨酸酶)有很好的抑制效果, 对人体肌肤有良好的美白作用, 因而在化妆品中得到广泛应用。由于天然提取法工艺复杂, 生产成本低, 不能大规模生产, 人工合成法是熊果苷的主要制备方法。介绍了一种同时测定熊果苷及其中间体的检测方法, 指导和优化熊果苷的合成与纯化。

关键词:熊果苷; 高效液相色谱法; 葡萄糖; 对苯二酚

中图分类号: TQ460.7+2 文献标志码: A

Content determination of arbutin and its intermediate

YAO Xiao-li¹, HAO Liang², CHEN Xiu-hong¹

(1. Hebei Huamin Pharmaceutical Company Limited, NCPG, Shijiazhuang Hebei 052165, China; 2. Zhongqi Pharmaceutical Technology(Shijiazhuang)Company Limited, CSPP, Shijiazhuang Hebei 050051, China)

Abstract: Arbutin is widely used as cosmetic additive because of its inhibiting effect on human tyrosinase and excellent skin whitening property. Artificial synthesis becomes the dominant means of producing arbutin because of the complicated procedures and the high cost of extracting from natural plant. A determination method of arbutin and its intermediate is introduced to improve technical conditions of synthesis and purification of arbutin.

Key words: arbutin; HPLC; glucose; hydroquinone

熊果苷(arbutin)又名熊果甙、熊果素等, 因其最早来源于熊果属植株的叶子而得名, 其物理性状为白色针状结晶或粉末。

熊果苷是一个集“绿色”、“安全”和“高效”概念于一体的皮肤美白活性物质。它能够迅速渗入肌肤, 有效地抑制皮肤中酪氨酸酶的活性, 阻断黑色素的形成, 从而减少皮肤色素沉积, 祛除色斑和雀斑。该物质无毒害性、刺激性、致敏性, 同时还有润肤、愈创、杀菌和协同抗炎等作用。熊果苷的合成方法主要有天然产物提取法、植物组织培养法、酶转化法和化学合成法, 前 3 种方法由于产率低或者提取步骤

复杂等原因在目前状况下不适合工业化生产。现在市场上所供应的熊果苷大多是通过化学合成法生成。熊果苷化学合成的一般步骤是由葡萄糖和氢醌在适当保护后, 进行糖苷化反应, 然后脱保护而得。葡萄糖一般采用全乙酰保护, 氢醌一般是用乙酰基保护其中的一个羟基^[1-2]。

1 实验部分

1.1 仪器设备

UltiMate 3000 液相色谱系统(美国戴安公司提供), 包括: UltiMate 3000 pump(泵)、UltiMate 3000 column compartment(柱温箱)、UltiMate 3000 photodiode array detector(检测器); RI-101 示差检测器(日本 Shodex 公司提供); AS2060B 超声波清洗器; AB204-S 天平(瑞士 Mettler Toledo 公司提供)。

收稿日期: 2012-02-12; 修回日期: 2012-04-23

责任编辑: 王海云

作者简介: 姚小丽(1981-), 女, 河北藁城人, 主要从事药物合成中成品及中间体的检测、方法学验证及药物稳定性考察的研究。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯);五乙酰基葡萄糖(自制),单乙酰对苯二酚(自制),熊果苷对照品(纯度为 98%);熊果苷样品(自制)。

1.3 正交试验^[2-8]

1.3.1 方案 1

流动相:甲醇/水/盐酸,色谱柱:Agilent ZOR-

BAX Extend-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。设计 4 因素 3 水平的正交试验:流速为 *A*;甲醇与水的体积比为 *B*;柱温为 *C*;盐酸浓度为 *D*。按照色谱图的对称因子、分离度、理论塔板数来评定在各个条件下的色谱图,如表 1 所示。

表 1 正交试验方案 1

Tab. 1 Scheme 1 of orthogonal test

试验 序号	因素				评分			
	流速/(mL·min ⁻¹) <i>A</i>	φ(甲醇):φ(水) <i>B</i>	柱温/°C <i>C</i>	浓度/(mol·L ⁻¹) <i>D</i>	对称 因子	分离 度	理论塔 板数	总分
1	0.8	95:4	25	0.001	2	3	3	8
2	0.8	90:9	30	0.000 1	5	6	6	17
3	0.8	80:19	35	0.000 01	5	8	6	19
4	1.0	95:4	30	0.000 01	2	2	3	7
5	1.0	90:9	35	0.001	6	5	6	17
6	1.0	80:19	25	0.000 1	6	8	7	21
7	1.2	95:4	35	0.000 1	2	2	2	6
8	1.2	90:9	25	0.000 01	5	5	6	16
9	1.2	80:19	30	0.001	5	7	6	18

1.3.2 方案 2

流动相:甲醇/醋酸盐缓冲液/冰乙酸,色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。设计 4 因素 3 水平的正交试验:流速为 *E*;

甲醇与醋酸盐缓冲液的体积比为 *F*;柱温为 *G*;pH 值为 *H*。按照色谱图的对称因子、分离度、理论塔板数来评定在各个条件下的色谱图,如表 2 所示。

表 2 正交试验方案 2

Tab. 2 Scheme 2 of orthogonal test

试验 序号	因素				评分			
	流速/(mL·min ⁻¹) <i>E</i>	φ(甲醇):φ(醋酸盐缓冲液) <i>F</i>	柱温/°C <i>G</i>	pH 值 <i>H</i>	对称 因子	分离 度	理论塔 板数	总分
1	0.8	80:20	25	2.5	5	5	6	16
2	0.8	70:30	30	3.5	5	7	7	19
3	0.8	60:40	35	4.0	6	9	8	23
4	1.0	80:20	30	4.0	6	5	6	17
5	1.0	70:30	35	2.5	6	7	7	20
6	1.0	60:40	25	3.5	7	9	8	24
7	1.2	80:20	35	3.5	5	4	5	14
8	1.2	70:30	25	4.0	5	7	6	18
9	1.2	60:40	30	2.5	6	9	7	23

1.3.3 方案 3

流动相:乙腈/水,色谱柱为 Shim-pack V_p-ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。设计 3 因素 3 水平的

正交试验:流速为 *L*;乙腈与水的体积比为 *M*;柱温为 *N*。按照色谱图的对称因子、分离度、理论塔板数来评定在各个条件下的色谱图,如表 3 所示。

表 3 正交试验方案 3

Tab. 3 Scheme 3 of orthogonal test

试验 序号	因素			评分			
	流速/(mL·min ⁻¹)	φ(乙腈):φ(水)	柱温/°C	对称 因子	分离 度	理论塔 板数	总分
	L	M	N				
1	0.8	40:60	25	7	9	9	25
2	0.8	50:50	30	7	8	8	23
3	0.8	60:40	35	7	7	8	22
4	1.0	40:60	30	8	9	9	26
5	1.0	50:50	35	7	7	8	22
6	1.0	60:40	25	8	7	8	23
7	1.2	40:60	35	6	8	8	22
8	1.2	50:50	25	7	7	8	22
9	1.2	60:40	30	7	7	7	21

按照正交试验的计算方法,结合以上试验数据得到如表 4 所示的结果。

表 4 正交试验分析数据

Tab. 4 Analysis of orthogonal test data

项目	流速/ (mL·min ⁻¹)	φ(乙腈): φ(水)	柱温/°C	浓度/ (mol·L ⁻¹)	项目	流速/ (mL·min ⁻¹)	φ(乙腈): φ(水)	柱温/°C	浓度/ (mol·L ⁻¹)
I	44	21	45	43	K ₁	14.67	7	15	14.33
II	45	50	32	44	K ₂	15	16.67	10.67	14.67
III	40	58	42	42	K ₃	13.33	19.33	14	14
IV	58	47	58	59	K ₄	19.33	15.67	19.33	19.67
V	61	57	59	57	K ₅	20.33	19	19.67	19
VI	55	70	50	58	K ₆	18.33	23.33	16.67	19.33
VII	70	73	70		K ₇	23.33	24.33	23.33	
VIII	71	67	70		K ₈	23.67	22.33	23.33	
IX	65	66	71		K ₉	21.67	22	23.67	
R ₁	1.67	12.33	4.33	0.67					
R ₂	2	7.66	3	0.67					
R ₃	2	2.33	0.34						

根据正交试验所得的数据可以知道方案 3 中的 $L_2M_1N_2$ 是最佳方案,其中流动相比例的调节对分离度影响最大,然后是柱温箱的温度和流速。最佳色谱条件为 Shim-pack V_p-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈/水(体积比为 40:60), 流速为 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长为 268 nm。在上述色谱条件下,各物质都能很好地分离(见图 1)。

1.4 方法学考察

1.4.1 线性关系的考察

取各步反应的对照品适量,精密称定,用流动相溶解,配制成不同浓度的溶液,分别取 20 μL 注入高效液相色谱仪,以峰面积(y)对进样量的浓度(c)进行

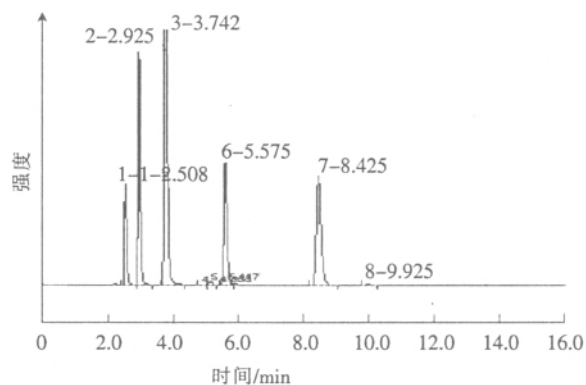


图 1 最佳方案色谱图

Fig. 1 Optimum chromatogram

线性回归,五乙酰基葡萄糖的线性方程为

$$y=18.111c-0.1274(r=0.9999),$$

线性考察范围为 1.022~5.946 mg/mL;单乙酰对苯二酚的线性方程为

$$y=28.346c+0.0349(r=0.9999),$$

线性考察范围为 0.503~2.495 mg/mL;五乙酰基熊果苷的线性方程为

$$y=0.0181c-0.0003(r=0.9999),$$

线性考察范围为 0.332~2.068 mg/mL;熊果苷的线性方程为

$$y=83.282c-0.0751(r=0.9999),$$

线性考察范围为 0.320~2.318 mg/mL,线性关系良好。

1.4.2 分析方法的精密度

在同一天的不同时间进行测定,计算精密度,结果表明熊果苷的 RSD 值为 0.15%($n=6$),五乙酰基葡萄糖 RSD 值为 0.10%($n=6$),单乙酰对苯二酚 RSD 值为 0.21%($n=6$),五乙酰熊果苷 RSD 值为 0.45%($n=6$)。结果表明精密度良好。

1.4.3 样品及回收率的测定

如表 5 所示,制备同一浓度各 3 份样品进样,其中熊果苷回收率平均值为 98.98%,RSD 值为 1.60%($n=3$);第 1 步产物回收率平均值为 99.21%,RSD 值为 1.48%($n=3$);第 2 步产物回收率平均值为 97.31%,RSD 值为 0.81%($n=3$);第 3 步产物回收率为 99.68%,RSD 值为 0.68%($n=3$)。

结果表明回收完全,方法可行。

表 5 回收率的测定结果

Tab.5 Determination results of recovery rate

物质名称	取样量/g	测量结果/g	回收率/%	物质名称	取样量/g	测量结果/g	回收率/%
熊果苷	0.0250	0.0245	98.00	单乙酰对苯二酚	0.0139	0.0135	97.10
熊果苷	0.0246	0.0248	100.80	单乙酰对苯二酚	0.0159	0.0155	97.48
熊果苷	0.0267	0.0262	98.13	单乙酰对苯二酚	0.0188	0.0183	97.34
五乙酰基葡萄糖	0.0319	0.0322	100.90	五乙酰熊果苷	0.0212	0.0210	99.06
五乙酰基葡萄糖	0.0269	0.0265	98.51	五乙酰熊果苷	0.0239	0.0238	99.58
五乙酰基葡萄糖	0.0337	0.0331	98.22	五乙酰熊果苷	0.0248	0.0249	100.4

2 结 语

建立了一种同时测定熊果苷及其中间体的方法,通过对所选方法进行的方法学考察,可以知道此方法能很好地测定各阶段的产物,能为研究各阶段的反应提供准确数据。

参考文献:

- [1] 姚 斌,陈万生,吴秋业.熊果苷合成新工艺[J].中国现代应用药学杂志,2005,22(5):389-390.
- [2] 张明光,胡立松,王石发.熊果苷的合成方法及其检测研究进展[J].化工时刊,2006,20(12):61-64.

- [3] 黄少嫦,黄百芬,陈青俊,等.应用高效液相色谱法测定化妆品中熊果苷的含量[J].香料香精化妆品,2001(1):13-16.
- [4] 程 鹏,陈梅兰,朱 松.高效液相色谱法测定 α -熊果苷、 β -熊果苷及烟酰胺[J].色谱,2010,28(1):89-92.
- [5] 邱东方,郭应臣,王宏伟.反相 HPLC 法测定化妆品中熊果苷的含量[J].化学研究,2000,11(4):34-35.
- [6] 周 峰,卢定强.高效液相色谱法同时测定美白类化妆品中熊果苷和氢醌的含量[J].南通职业大学学报,2008,22(3):97-99.
- [7] 王 亮,尚会建,王丽梅,等.葡萄糖检测方法研究进展[J].河北工业科技,2010,27(2):132-135.
- [8] 常虹飞,杨 震.正交试验法优选超临界 CO₂ 流体萃取丹参酮工艺的研究[J].河北工业科技,2008,25(6):352-353.

(上接第 223 页)

- [3] 金 星,姜长泓,王盛慧.离心式空压机防喘振广义预测控制方法的研究[J].东北师大学报(自然科学版),2010,42(4):76-79.
- [4] BOYNOV K O, LOMONOVA E A, VANDENPUT A J A, et al. Surge control of the electrically driven centrifugal compressor [J]. IEEE Transactions on Industry Applications, 2006, 42(6): 1523-1531.

- [5] 刘 超.模糊理论在压缩机喘振控制上的应用研究[J].广东化工,2011,38(3):170-171.
- [6] 张成宝.离心式压缩机的喘振分析与控制[J].压缩机技术,2002(6):4-8.
- [7] 王志标,张早校,姜培正.压缩机动态防喘振控制策略进展分析[J].风机技术,2003(4):39-42.