

· 研究报告 ·

HPLC法测定积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷含量

杨梅, 李峻媛, 吴家彬, 玉秋萍, 韦敏灵, 韦红言 [培力(南宁)药业有限公司, 广西南宁 530007]

[摘要] **目的** 建立积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷的 HPLC 含量测定方法。**方法** 色谱柱为 UltimateAQ-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-2 mmol/L β-环糊精溶液为流动相进行梯度洗脱(0~30 min: 21% A→23% A; 30~60 min: 23% A→25% A), 流速 1.0 ml/min, 柱温 30 °C, 检测波长 205 nm。**结果** 羟基积雪草苷和积雪草苷分别在 0.187 7~3.754 μg 和 0.184 3~3.686 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系($r>0.9995$)。经专属性、重复性、精密度、加样回收率、稳定性实验, 结果均符合《中华人民共和国药典(2015年版)》方法验证的要求。**结论** 该含量测定方法适用于积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷的含量检测。

[关键词] 积雪草; 配方颗粒; 含量测定; 羟基积雪草苷; 积雪草苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)04-0359-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.018

Determination of madecassoside and asiaticoside in *Centella asiatica* formula granules by HPLC method

YANG Mei, LI Junyuan, WU Jiabin, YU Qiuping, WEI Minling, WEI Hongyan [PuraPharm (Nanning) Pharmaceutical Company Limited, Nanning 530007, China]

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for determination of madecassoside and asiaticoside in *Centella asiatica* formula granules. **Methods** Chromatographic separation was performed on Ultimate AQ-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile(A)-2 mmol/L β-cyclodextrin(0~30 min; 21% A→23% A; 30~60 min; 23% A→25% A). The flow rate was set at 1.0 ml/min, the column temperature at 30 °C and detection wavelength at 205 nm. **Results** Madecassoside and asiaticoside showed good linearity ($r>0.9995$) in the ranges of 0.187 7~3.754 μg and 0.184 3~3.686 μg respectively. The specificity, repeatability, precision, recovery and stability were satisfied to the method validation requirements of China Pharmacopoeia. **Conclusion** The method can determine madecassoside and asiaticoside in *Centella asiatica* formula granules.

[Key words] *Centella asiatica*; formula granules; content determination; madecassoside; asiaticoside; HPLC

配方颗粒是药材或饮片经现代工艺提取制成的颗粒剂,与中药饮片相比更为方便快捷,已被广泛关注并应用于临床。由于配方颗粒失去了传统药材和饮片的外形性状,故制定一种特征性强、能准确表征配方颗粒剂的质量控制方法成为一项重要课题^[1]。2015年12月,为加强对中药配方颗粒的管理,中国食品药品监督管理局发布了《中药配方颗粒管理办法(征求意见稿)》,指出将由国家药典委员会组织对

中药配方颗粒的药品标准逐步进行统一。

积雪草为伞形科积雪草属植物 *Centella asiatica*(L.) Urb. 的干燥全草,具有清热利湿,解毒消肿的功效,用于治疗湿热黄疸,中暑腹泻,石淋血淋,痈肿疮毒,跌扑损伤^[2]。积雪草为具有广西壮族民族特色的壮药,俗名又称雷公根、酒杯菜等,广泛分布于广西各地,多生长于海拔 2 000 米以下的山路旁、沟边、田边、草地等肥沃阴湿处,野生资源极为丰富。积雪草中具有治疗外伤、瘢痕作用的活性成分主要为积雪草总苷,对于积雪草配方颗粒中的此类成分,已有含量测定报道,多以乙腈-水为流动相,无法有效分离羟基积雪草苷与其同分异构体。为更好地检测积雪草配方颗粒总苷中的有关成分,本研究参考《中华人民共和国药典(2015年版)》中有关“积雪草”的内容,建立了积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷的高效液相色谱

[基金项目] 2014年自治区重大科技专项(桂科攻 14124002-13); 南宁市本级科学研究与技术开发计划项目(20153326); 南宁市人才小高地项目(2015023)

[作者简介] 杨梅, 硕士, 工程师, 研究方向: 中药质量控制。Email: myang@purapharm.com.cn

[通讯作者] 韦红言, 硕士, 工程师。Email: hywei@purapharm.com.cn

(HPLC)含量测定法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 1260 安捷伦液相色谱仪, Open LAB CDS Chemstation 数据工作站(美国安捷伦公司), 电子分析天平(型号 GR-202, 日本 AND 公司), 数控超声波清洗器(型号 KQ-500DE, 昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 积雪草配方颗粒, 培力(南宁)药业有限公司生产。羟基积雪草苷对照品(批号: MUST-11080101, 纯度 99.00%, 成都曼思特生物科技有限公司), 积雪草苷对照品(批号: MUST-12010605, 纯度 98.20%, 成都曼思特生物科技有限公司), 乙腈(Merk)为色谱纯, 水为超纯水, 试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 取羟基积雪草苷、积雪草苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 含羟基积雪草苷、积雪草苷各 0.2 mg 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备 取样品适量, 研细, 取

1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 70% 乙醇 25 ml, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 UltimateAQ-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Welch 公司); 以乙腈(A)-2 mmol/L β-环糊精溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~30 min: 21% A → 23% A; 30~60 min: 23% A → 25% A); 流速 1.0 ml/min; 柱温 30 °C; 检测波长 205 nm, 供试品溶液和对照品溶液进样量分别为 10、20 μl。理论塔板数按积雪草苷峰计算应不低于 5 000。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取按处方比例及制备工艺制得的不含积雪草的阴性对照样品, 按“2.2”项下方法制备阴性样品溶液。精密吸取阴性样品和供试品溶液各 10 μl、对照品 20 μl 进行测定。结果显示阴性样品色谱图在相应位置无干扰, 表明本方法专属性良好, 见图 1。

2.4.2 线性关系 精密称取羟基积雪草苷 11.85 mg

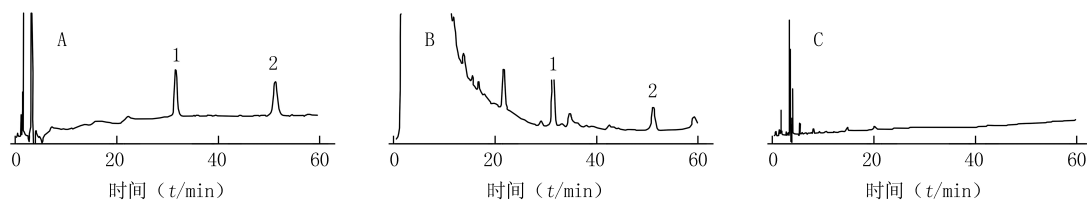


图 1 积雪草配方颗粒的 HPLC 图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 羟基积雪草苷; 2. 积雪草苷

和积雪草苷对照品 11.73 mg, 加甲醇制成混合对照品储备液(每 1 ml 含羟基积雪草苷 0.187 7 mg 及积雪草苷 0.184 3 mg)。再精密吸取混合对照品储备液适量, 制成 10、20、25、35、55、90、180 μg/ml 系列浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液 20 μl 进样测定, 以进样量(X, μg)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。结果羟基积雪草苷在 0.187 7~3.754 μg 范围内与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y = 223.76X + 3.338 2 (r = 0.999 9)$; 积雪草苷在 0.1 843~3.686 μg 范围内与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y = 221.63X + 1.616 4 (r = 0.999 9)$ 。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.1”项下的混合对照品溶液 20 μl, 重复进样 6 次, 羟基积雪草苷和积雪草苷峰面积 RSD 值分别为 1.0% 和 1.0%, 表明精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取样品按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、4、8、18、42、48 h 按色谱条件

测定。供试品溶液中羟基积雪草苷和积雪草苷峰面积 RSD 值分别为 0.9% 和 2.1%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取样品按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按色谱条件测定, 羟基积雪草苷和积雪草苷含量 RSD 值分别为 2.4% 和 3.0%。表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入适量的对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液并测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。结果表明, 羟基积雪草苷回收率在 95.64%~97.95% 之间, 平均值为 97.0%, RSD 值为 1.0%; 积雪草苷回收率在 97.76%~103.71%, 平均值为 100.4%, RSD 值为 1.9%, 表明该法准确度良好。

2.5 样品含量的测定 取 6 批积雪草配方颗粒, 按照“2.2”项下操作, 制备供试品溶液并测定, 计算含量。结果见表 2。

表1 羟基积雪草苷和积雪草苷回收率试验结果(n=6)

成分	取样量 (m/g)	样品量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
羟基积雪草苷	0.500 8	1.532 4	1.407 9	2.88	95.64	97.0	1.0
	0.501 9	1.535 8	1.407 9	2.91	97.95		
	0.503 6	1.541 0	1.407 9	2.91	97.35		
	0.502 0	1.536 1	1.407 9	2.91	97.62		
	0.503 0	1.539 2	1.407 9	2.90	96.61		
	0.501 0	1.533 1	1.407 9	2.90	97.36		
积雪草苷	0.500 8	0.886 4	0.921 6	1.81	100.12	100.4	1.9
	0.501 9	0.888 4	0.921 6	1.82	100.88		
	0.503 6	0.891 4	0.921 6	1.81	99.77		
	0.502 0	0.888 5	0.921 6	1.84	103.71		
	0.503 0	0.890 3	0.921 6	1.79	97.76		
	0.501 0	0.886 8	0.921 6	1.81	100.39		

表2 积雪草配方颗粒含量测定结果(mg/g, n=6)

编号	羟基积雪草苷	积雪草苷
1646-01	5.8	2.3
1646-02	3.2	1.7
1646-03	3.1	1.7
1646-04	4.4	1.2
1646-05	3.2	1.8
1646-06	3.7	3.1

3 讨论

3.1 流动相的选择 羟基积雪草苷和积雪草苷属于三萜皂苷类成分,积雪草中还存在羟基积雪草苷的另一同分异构体积雪草苷-B,其结构区别在于前者为齐墩果烷型三萜,后者为乌苏烷型三萜^[3],给分离造成了困难。文献曾报道用 HPLC 法测定积雪草配方颗粒中相关苷类成分的含量测定方法^[4,5],采用乙腈-水为流动相,无法有效分离羟基积雪草苷与其同分异构体。近期研究报道^[6-8]表明,在流动相中加入适量的β-环糊精可使羟基积雪草苷与积雪草苷-B 得到良好的分离;β-环糊精浓度越高,两个同分异构体的分离度越高,原因在于β-环糊精与各异构体形成不同空间位阻的包含物,可以得到不同的保留时间。《中华人民共和国药典(2015年版)》一部“积雪草”项下含量测定也采用了乙腈-2 mmol/Lβ-环糊精溶液(24:76)为流动相。鉴于上述原因,并针对积雪草配方颗粒水溶性成分较多的特点,笔者对色谱条件进行了优化,选择以乙腈-2 mmol/Lβ-环糊精溶液为流动相进行梯度洗脱,取得了良好的分离效果。

3.2 供试品溶液制备方法的考察 以乙醇、70%乙醇、50%乙醇作为提取溶剂进行考察,结果显示高浓度乙醇几乎提取不出苷类成分,50%乙醇、70%乙

醇溶液的提取效果相差不大;考虑到70%乙醇易过滤,故选择70%乙醇为提取溶剂。采用超声处理和加热回流对提取方法进行了考察,经含量计算的结果表明,两种方法无明显差别。从操作简便的角度考虑,选择超声处理。

本研究建立了积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷的 HPLC 含量测定方法,并对多批样品进行了测定,方法稳定、结果准确,且操作快速简便,适用于积雪草配方颗粒的含量检测,为积雪草配方颗粒的质量控制提供了参考。

【参考文献】

- [1] 张红梅,宋景政,谭红胜,等.从汤剂到颗粒剂:中药配方颗粒20年回顾与展望[J].世界科学技术:中医药现代化,2012,14(4):1740-1753.
- [2] 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,2015:283-284.
- [3] 张蕾磊,王海生,姚庆强,等.积雪草化学成分研究[J].中草药,2005,36(12):1761-1763.
- [4] 曹金华,谷莉,吕磊,等.HPLC-ELSD法测定积雪草药材及配方颗粒剂中积雪草苷的含量[J].药学实践杂志,2013,31(5):384-385,392.
- [5] 黄晟,谷莉,姜子洋,等.高效液相法测定积雪草配方颗粒中积雪草苷的含量[J].药物分析杂志,2004,24(5):516-518.
- [6] 郑征伟,毛秀红,陈钊,等.手性流动相添加剂法测定积雪草中积雪草总苷的量及其总苷特征图谱[J].中草药,2010,41(12):2070-2074.
- [7] 陈云艳,邵燕,周靖,等.积雪草总苷及其制剂的含量研究. II.积雪草总苷中积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷B含量的HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2010,41(4):276-279.
- [8] 陈云艳,邵燕,欧阳丹薇,等.积雪草总苷及其制剂的含量研究. IV.积雪草苷B、羟基积雪草苷工作对照品的制备[J].中国医药工业杂志,2014,45(5):479-481.

[收稿日期] 2016-12-21 [修回日期] 2017-03-10

[本文编辑] 李睿曼