

RP-HPLC测定积雪苷缓释片释放液中的 2 个指标成分

尹丽娜,王胜浩*,王虎根(浙江省医学科学院,杭州 310013)

摘要:目的 建立可同时测定积雪苷缓释片释放液中的 2 个指标成分——积雪草苷 (asiaticoside, AS)和羟基积雪草苷 (madecassoside, MS)的 RP-HPLC。方法 以 DIAMONSIL C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱,乙腈-甲醇-水 (22:35:50) 为流动相,柱温控制在 25 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长为 204 nm,建立了可同时用于释放液中的 AS 和 MS 分离测定的 RP-HPLC。结果 方法学评价结果显示,积雪草总苷中 MS 和 AS 的峰面积与浓度之间呈良好的线性 (浓度范围均为 2 ~ 200 μg·mL⁻¹, $r=0.999\ 9$),方法的回收率 MS 为 99.9% ~ 101.0%, AS 为 100.3% ~ 103.1% ($n=6$),日内日间精密度小于 1.9%。结论 本方法可同时测定积雪苷缓释片释放液中的 2 个指标成分。方法专属性强,快速简单,重现性好。

关键词:积雪苷缓释片;高效液相色谱法;积雪草苷;羟基积雪草苷;体外释放

中图分类号: R917.101; R917.4; R943.3 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)06-0527-03

Simultaneous Determination of Madecassoside and Asiaticoside Released from the *Centella asiatica* Sustained Tablets by RP-HPLC

YIN Li-na, WANG Sheng-hao*, WANG Hu-gen(*Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of madecassoside and asiaticoside released from the *Centella asiatica* sustained tablets *in vitro* release. **METHODS** HPLC analysis was performed on a DIAMONSIL C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the acetonitrile-methanol-water (22:35:50) as mobile phase, the column temperature was set at 25 ℃, flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and detecting wavelength was at 204 nm. **RESULTS** The linear response of madecassoside and asiaticoside both ranges from 2 to 200 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), the recoveries ($n=6$) of madecassoside and asiaticoside were 99.9% - 101.0% and 100.3% - 103.1%, respectively. The precisions for assay of asiaticoside and madecassoside were within 1.9%. **CONCLUSION** The method is accurate, simple and reproducible, which is suitable for the determination of madecassoside and asiaticoside of the *Centella asiatica* sustained tablets.

KEY WORDS: *Centella asiatica* sustained tablets; HPLC; asiaticoside; madecassoside; *in vitro* release

积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L) Urban 于《神农本草经》,列为中品,性寒,味苦、辛,具有清热利湿、解毒消肿之功效^[1]。其水溶性提取物主要含积雪草苷的干燥全草或带根全草,又称落得打、崩大碗、半边钱,始载

基金项目:浙江省中医药管理局重点项目 (2004KF001) 和省经贸委中药现代化项目 (2006-164-43)

作者简介:尹丽娜,女,硕士研究生 * 通讯作者:王胜浩,男,博士,研究员

Tel: (0571) 88215622 E-mail: wshenghao@yahoo.com

(asiaticoside AS)和羟基积雪草苷 (madecassoside MS)等, 具有显著软化结缔组织以及使该组织均匀生长的作用^[2], 常用于与美化皮肤有关的疤痕治疗。由积雪草总苷提取物制备的市售积雪苷普通片, 需口服 3 次, 一般需连续治疗 3~6 个月, 而缓释给药系统可为患者带来便利。

在普通片的基础上进行的积雪苷缓释片新药二次研究, 释放度考察是处方评价和设计的关键之一。关于积雪草的 HPLC 测定方法, 文献报道的多采用紫外检测器, 以单一成分作为对象^[3-6]。近来也有报道采用 HPLC-ELSD 同时测定三金片中的积雪草苷和羟基积雪草苷^[7]。笔者在上述文献的基础上, 采用 UV 检测器, 建立了可同时测定反映积雪草主要药效的指标成分——积雪草苷 (AS) 和羟基积雪草苷 (MS) 的 HPLC, 并成功应用于该中药缓释片各处方的释放度测定。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

LC-10AT VP 双泵高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD-10AT VP 紫外检测器 (日本岛津); ZRS-8G 药物溶出仪 (天津大学仪器厂)。

1.2 试剂

6 种处方积雪苷缓释片 (本院自制); 积雪草苷和羟基积雪草苷对照品 (广西药检所, 批号: 040802, 040513, HPLC 纯度大于 98.0%); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 实验方法和结果

2.1 色谱条件

参考文献方法并进行改进^[3-7], 色谱柱为 DIAMON SIL C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Dikma Tech), 流动相为乙腈-甲醇-水 (22:35:50), 检测波长为 204 nm, 柱温: 25 °C, 流速: 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 50 μL。

2.2 对照品溶液配制

精密称取积雪草苷 (AS) 和羟基积雪草苷 (MS) 对照品适量, 置同一量瓶中, 加甲醇超声溶解, 稀释至刻度, 得对照溶液储备液 (浓度均约为 200 μg·mL⁻¹)。4 °C 放置备用, 在 2 个月内稳定。

2.3 专属性试验

按处方辅料配制空白释放液, 过滤, 按“2.1”项下色谱条件测定。同时与对照品溶液进行比较。结果有效组分 MS 和 AS 的保留时间分别在 8~9 min 及 11~12 min, 空白辅料无干扰。结果见图 1。

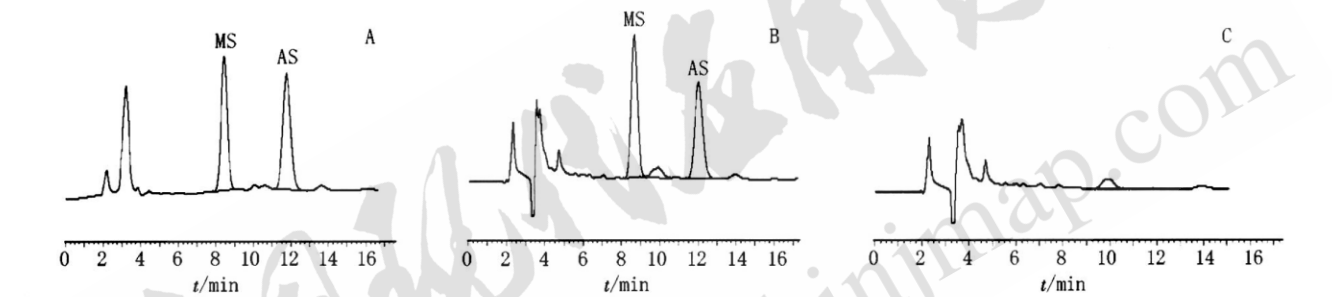


图 1 色谱图
A-对照品溶液; B-样品; C-空白辅料释放液

Fig 1 HPLC chromatograms

A- reference of madecassoside and asiaticoside B- sample C- blank

2.4 线性试验

精密量取标准储备液适量, 加甲醇稀释至刻度, 分别使成 2, 4, 8, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 200 μg·mL⁻¹ 系列浓度。精密吸取 50 μL 续滤液, 按“2.1”项下色谱条件测定。以峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程: Y (峰面积) = 149 694.3 X - 2 040.3 (r = 0.999 9, MS); Y (峰面积) = 148 979.1 X - 5 987.8 (r = 0.999 9, AS)。结果表明, AS 和 MS 分别在 2~200 μg·mL⁻¹ 浓度内, 线性关系良好。

2.5 精密度和回收率

精密量取 AS 和 MS 标准储备液适量, 加入空白缓释片释放液, 使成浓度为 9, 36, 90, 180 μg·mL⁻¹ 的溶液 (相当于缓释片释放 5%, 20%, 50%, 100% 的浓度), 每个浓度进行 6 样本分析, 进行日内和日间精密度考察 (连续测定 5 d), 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 根据当日标准曲线, 计算样品的浓度。根据样品结果计算方法的回收率和精密度。结果显示方法的回收率在 99.9%~103.1% 之间, 日内、日间的精

密度小于 1.9%, 结果见表 1。

表 1 测定方法的精密度和回收率 (n = 6 $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Recovery and precision for assay of asiaticoside and madecassoside in vitro release (n = 6 $\bar{x} \pm s$)

浓度 /μg·mL ⁻¹	回收率 %		精密度 %			
	积雪草苷	羟基积雪草苷	积雪草苷		羟基积雪草苷	
			日内	日间	日内	日间
9	100.3 ± 1.6	99.9 ± 1.4	1.6	1.6	1.4	1.7
36	101.6 ± 1.3	101.0 ± 1.5	1.3	1.4	1.5	1.6
90	101.9 ± 0.5	100.5 ± 0.7	0.5	1.9	0.7	1.2
180	103.1 ± 0.3	100.5 ± 0.4	0.2	1.7	0.4	0.8

2.6 检测限

将标准储备液经空白辅料释放液反复稀释后测定, 信噪比为 2~3 倍时, 确定方法的检测限, 羟基积雪草苷和积雪草苷的最低检测限均为 0.08 μg·mL⁻¹ (S/N = 3), 定量下限 (LOQ, S/N > 10) 为 2 μg·mL⁻¹, 以标准曲线最低点表示。

2.7 RP-HPLC 应用于积雪苷缓释片中 2 个指标成分的释放

度考察

取 6 个不同处方的积雪苷缓释片, 依照中国药典 2005 年版二部释放度测定法 (附录 XC) 第三法^[8]进行, 以水为释放介质, 转速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别于 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 3.5, 7, 10, 12 h 取样, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 同时补加相同体积的新鲜介质, 放冷至室温, 过滤, 按“2.1”项下色谱条件测定 MS 和 AS。6 个处方释放度测定结果见图 2。

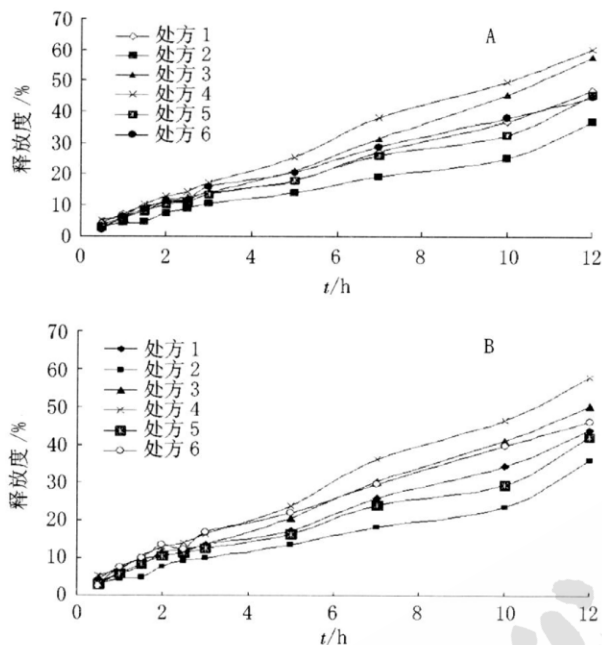


图 2 处方 1~6 积雪苷缓释片体外药物释放曲线
A—处方 1~6 积雪苷缓释片总苷累积释药-时间曲线; B—处方 1~6 积雪苷缓释片羟基积雪草苷累积释药-时间的曲线

Fig 2 Curve of percent released vs time from different *Centella asiatica* sustained tablets

A—The curve of percent of total glucosides released vs time from different *Centella asiatica* sustained tablets B—The curve of percent of madecassoside released vs time from different *Centella asiatica* sustained tablets

3 讨论

3.1 在文献的基础上, 本实验采用的流动相为乙腈-甲醇-水 (22:35:50), 该流动相使有效组分 MS 的保留时间在 8~9

min 使有效组分 AS 的保留时间在 11~12 min 杂质峰干扰较少, 经多次试验后表明该流动相能达到令人满意的结果。由于积雪草苷和羟基积雪草苷无明显紫外吸收, 最大吸收峰在 197 nm 处, 最大吸收波长处溶剂本身的吸收造成噪音的影响加大, 故流动相有机溶剂选择本底紫外吸收相对较弱的乙腈, 同时以 204 nm 作为检测波长。方法学研究结果表明, 所建立的 HPLC 可用于缓释片释放液中两个主要成分的测定。

3.2 由于积雪草指标成分 MS 和 AS 具有类似的结构 (差一个羟基), 因此, 建立同时测定 MS 和 AS 的 HPLC 是可行的。实践证明所建立的方法不但专属性强, 重现性好, 快速简单。研究思路对其它中药缓释制剂处方的释放特性评价可能也有一定的借鉴作用。

REFERENCES

- [1] ZHANG L L, WANG H S, YAO Q Q, *et al*. Chemical constituents from whole plant of *Centella asiatica* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(12): 1761-1763
- [2] Drug Standard (药品标准) WS₃-B-2596-97-2002 [S].
- [3] HUANG S, GU L, LOU Z Y, *et al*. Determination of the Asiaticoside in formula particles of *Centella asiatica* L. by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 2004, 24(5): 516-518
- [4] ZOU J M, ZHOU Y H. Study on quality standards for Sanjin tablet [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2003, 10(5): 33-34
- [5] YAN G L, DOU Q, WANG J M. Studies on quality standard of Sanjin Tea [J]. *Chin J Current Pract Med* (中华现代实用医药杂志), 2005, 4(11): 22-24
- [6] XIAO J, CHEN Z T, BIK S. Pre-column derivatization HPLC method for the determination of Asiaticoside in *Centella asiatica* and Sanjin pian [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000, 35(8): 605-606
- [7] ZOU J M, ZHOU Y L, WU M J. HPLC-ELSD Determination of Asiaticoside and Madecassoside in Sanjin tablets and Sanjin capsules [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 2005, 25(10): 1250-1252
- [8] Ch P (2005) Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005 Appendix XC.

收稿日期: 2007-11-27