

柱前衍生化 HPLC 法测定积雪草及三金片中积雪草苷的含量

肖 隽¹, 车镇涛², 毕开顺^{1*}

(1. 沈阳药科大学药物分析研究室, 辽宁 沈阳 110015; 2. 香港中文大学中医学院, 香港)

摘要: 目的 建立积雪草中积雪草苷的柱前衍生化高效液相色谱测定法,并用该法测定积雪草和三金片中积雪草苷的含量。方法 以吡啶-苯甲酰氯为衍生化试剂,对积雪草苷分子中的羟基进行苯甲酰化后,采用 RP-HPLC 法测定。色谱柱: Spherisorb ODS C₁₈柱;流动相: 甲醇-四氢呋喃-水(90:4:6, 0.1%三乙胺);柱温: 25℃;流速: 0.8 mL·min⁻¹;检测波长: 235 nm;内标物: V_{D3}。结果 积雪草苷 0.396~3.960 μg 与峰面积比呈线性关系,相关系数为 0.9985。用此法对不同产地的积雪草和三金片中积雪草苷进行测定,结果积雪草中积雪草苷的平均回收率为 99.6%,RSD 为 2.3%(n=6);三金片中积雪草苷的平均回收率为 99.2%,RSD 为 2.7%(n=6)。结论 此法准确、灵敏度高,重现性好,为中药积雪草和中成药三金片的质量评价提供了科学依据。

关键词: 积雪草;三金片;积雪草苷;衍生化;高效液相色谱法

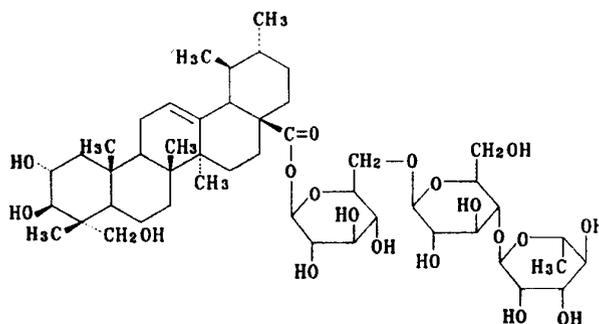
中图分类号: R927.2; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2000)08-0605-04

积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 的全草,有清热利湿、解毒消肿之功效,《神农本草经》列为中品。现代药理研究表明,积雪

草有促进伤口愈合、刺激生物合成、抗胃溃疡等多种药理作用^[1~4]。积雪草苷(asiaticoside)是积雪草的主要活性成分之一,其分子结构如下:



Asiaticoside

我国积雪草资源丰富,1977 年收入中国药典,至今尚无质量控制方法。近年来,有关积雪草苷的定量分析方法,有滴定法^[5]、双波长薄层扫描法^[6]、GC/MS、高速逆流分配法与薄层色谱联用^[7]和 HPLC 法^[8~12]等。但这些方法的选择性、专属性、灵敏度和准确度低。GC/MS 和高速逆流分配法虽然性能指标较好,但不易应用于常规分析。本研究采用柱前衍生化方法,将积雪草苷苯甲酰化,再用高效液相色谱法进行含量测定,并对不同产地的积雪草和

中成药三金片(由积雪草、海金沙、金樱根、金刚刺等五味药材组成)进行了含量测定,为中药积雪草及其制剂质量控制提供新方法。

实验部分

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪 Shimadzu LC-4A 恒流泵; Shimadzu SPD-4A 紫外检测器; Shimadzu CTO-2A 柱温箱; Shimadzu C-2AX 积分仪。对照品积雪草苷(asiaticoside)由上海医药工业研究院提供;内标物 vitamin D₃(V_{D3})购自 Merck 公司。积雪草样品经

收稿日期: 1999-10-25

基金项目: 香港研究资助局资助项目(1998-1999 年度)

* 联系人 Tel: (024) 23843711 - 3363,

E-mail: ksbi@mail.sy.jn.cn

沈阳药科大学孙启时教授鉴定。试剂为去离子水、吡啶(分析纯,经重蒸馏处理为无水吡啶)、甲醇(色谱纯)、四氢呋喃、三乙胺、乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、苯甲酰氯均为分析纯。

积雪草苷对照品溶液的配制:精密称取积雪草苷对照品约 3 mg,加吡啶 650 μL 溶解作为对照品溶液。

内标物溶液的配制:精密称取 V_{D_3} 24.80 mg,置于 100 mL 量瓶中,以甲醇溶解并稀释至刻度,得浓度为 0.248 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

2 色谱条件

固定相: Spherisorb ODS C_{18} 柱(4.4 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇—四氢呋喃—水(90:4:6, 0.1%三乙胺); 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 235 nm; 进样量: 15 μL 。

结 果

1 衍生化条件的优化

本实验根据衍生化反应机理,以吡啶—苯甲酰氯为衍生化试剂,对积雪草苷分子中的羟基进行苯甲酰化。通过单因素轮换法和均匀设计试验对反应时间(0~24 h)、温度(4~50 $^{\circ}\text{C}$)及吡啶用量进行考察,确定了最佳反应条件为:吡啶 250 μL 、室温、反应 19 h。

2 衍生化反应条件

称取积雪草苷适量置于 25 mL 具塞圆底烧瓶中,用吡啶 250 μL 溶解后,在冰水浴温度下加入苯甲酰氯 150 μL ,摇匀后室温放置 19 h,使反应完全。反应液用甲醇稀释定量转移至 5 mL 量瓶中,加入内标物溶液 1 mL,用甲醇定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取各续滤液 20 μL ,按上述色谱条件进行分析。

3 衍生化产物的质谱分析

积雪草苷的衍生化产物经制备液相色谱分离纯化后,以 FAB-MS 谱确定其产物的分子离子峰 m/z 为 1270,比积雪草苷分子的分子离子峰(m/z 958)多 312 个质量单位,说明积雪草苷分子中有 3 个—OH 与苯甲酰氯发生反应,生成了三苯甲酰化积雪草苷。

4 HPLC 的线性范围考察

以微量取样器分别吸取积雪草苷对照品溶液 20, 40, 80, 120, 160 和 200 μL 置于 25 mL 具塞反应瓶中,以吡啶稀释至 250 μL ,按上述“衍生化反应条

件”和“色谱条件”进行分析。色谱图见图 1。以积雪草苷衍生物峰面积与内标峰面积之比对积雪草苷的浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)作图。结果表明,积雪草苷 0.396~3.960 μg 线性关系良好,回归方程为 $A/A_{\text{内标}} = 9.8977C + 0.0147$, $r = 0.9985$ 。

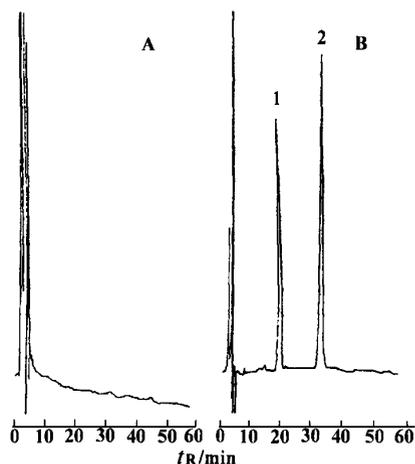


Fig 1 Chromatograms of derivatized asiaticoside
A. Blank solution; B. Standard asiaticoside
1. Internal standard (V_{D_3}); 2. Derivatized asiaticoside

5 样品测定方法

积雪草:将积雪草样品去除杂物后粉碎,60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重。精密称取样品约 1 g(可按品种不同增减称样量),在 Soxhlet 提取器中乙醇浸泡过夜,回流提取 12 h,回收乙醇,残渣以少量蒸馏水转移至 50 mL 分液漏斗中,分别以石油醚、乙酸乙酯洗涤 2 次,每次 10 mL。再用水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 10 mL。合并正丁醇层,挥干,将残渣按上述衍生化反应条件和色谱条件进行分析。每份供试液进样 3 次。以待测峰面积与内标峰面积的比值,计算积雪草苷的含量,所得结果见表 1。代表性的色谱图见图 2A。

三金片:取三金片 20 片精密称重,求得平均片重。将三金片去除糖衣,粉碎,备用。精密称取三金片粉末约 2 g 置于 Soxhlet 提取器中,先以乙酸乙酯 30 mL 回流提取 8 h,挥尽乙酸乙酯后,再用乙醇回流提取 12 h,旋转蒸发回收乙醇,残渣以少量蒸馏水转移至 50 mL 分液漏斗中,用水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 10 mL。合并正丁醇层,挥干,将残渣按对照液中制备方法进行衍生化反应后,加入内标液 5 mL,用甲醇定量转移至 25 mL 量瓶中,定容至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 20 μL ,按

上述色谱条件进行分析。每份供试液进样 3 次。以待测峰面积与内标峰面积的比值, 计算积雪草苷的含量, 所得结果见表 2。代表性的色谱图见图 2B。

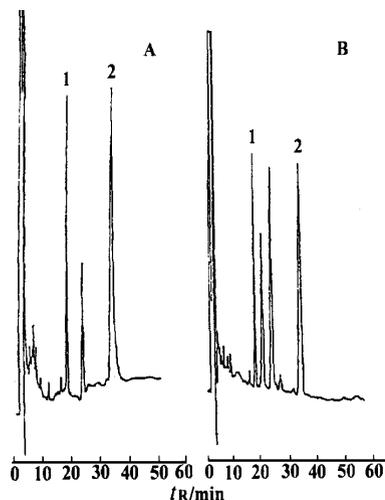


Fig 2 Chromatograms of *Centella asiatica* sample (No.1) and Sanjinpian sample
A. *Centella asiatica* sample No.1; B. Sanjinpian sample. 1. Internal standard V_{D_3} ; 2. Derivatized asiaticoside

Tab 1 Content of asiaticoside in sample of *Centella asiatica* (L.) Urban from different habitats

Sample No.	Habitat	Content of asiaticoside/ %
1	Xianyou, Fujian	0.20
2	Jinhua, Zhejiang	0.17
3	Tunxi, Anhui	0.16
4	Nanning, Guangxi	0.18
5	Nanjing, Jiangsu	0.14

Tab 2 Results of Sanjinpian tablet assay ($n = 3$)

Batch No.	Asiaticoside / (mg/ tablet)	RSD/ %
9805093	0.28	2.5
9804135	0.27	3.0
9803025	0.29	2.6

6 精密度试验

仪器精密度: 取上述某一对照品衍生化溶液, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 根据测定的对照品含量 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 计算 RSD 为 1.3%。

方法精密度: 取积雪草苷对照品溶液 6 份, 每份 100 μL , 同“线性范围”项操作, 进行衍生化和 HPLC 分析。根据测出的标准品含量, 计算 RSD 为 1.6% ($n = 6$)。

样品测定的精密度: 精密称取同一生药样品 1 g

和三金片粉末 2 g 各 6 份, 同“样品测定方法”项分别测定积雪草苷的含量, 其 RSD 分别为 2.3% ($n = 6$) 和 2.0% ($n = 6$)。

7 稳定性试验

积雪草苷对照品衍生化溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 3 个月, 测得其含量无明显变化。表明积雪草苷的苯甲酰化衍生化稳定。

8 回收率试验

精密称取已知含量的积雪草样品 1 g 和三金片粉末 2 g 各 6 份, 加入一定量的积雪草苷对照品, 同“样品测定方法”项操作, 进行衍生化和 HPLC 分析, 求出积雪草苷的含量, 平均回收率分别为 99.6% 和 99.2%, RSD 均小于 3%。

讨 论

积雪草所含化学成分复杂, 除积雪草苷外, 尚有多种其他皂苷、氨基酸、多糖和黄酮类成分。这些成分大多数在 200 nm 左右有吸收, 且积雪草中含有与积雪草苷相差一个羟基的羟基积雪草苷, 使直接采用 HPLC 法在 200 nm 左右测定积雪草苷的含量干扰多而准确度低, 给定量分析带来一定困难。

本研究首先采用柱前衍生化 HPLC 法, 对积雪草苷分子的羟基进行苯甲酰化反应, 使最大吸收波长移至 235 nm 处, 提高了分离选择性和检测灵敏度, 且样品中其他成分对积雪草苷的测定无干扰, 实现了样品中积雪草苷的定量分析。此法衍生化反应条件温和、产物稳定、样品进样前处理简单、内标物 (V_{D_3} 虽遇光能分解, 但在冰箱中避光保存半年内无变化) 选择适当, 是一个较好的积雪草质量控制方法。

经对 5 个不同产地的积雪草样品中积雪草苷进行定量分析结果表明: 不同产地积雪草中所含积雪草苷差异较大, 其中以福建仙游的含量较高, 平均含量为 0.20%, 本研究得出的结果可以作为选择生产原料的参考。对中成药三金片中积雪草苷进行了含量测定, 测定结果稳定、重现性好、灵敏度高, 可考虑作为三金片质量控制的指标。

REFERENCES:

- [1] Tsurumi K, Hiramatsu Y, Hayashi M, et al. Effect of madecassol on wound healing [J]. *Oyo Yakuri*, 1973, 7 (6): 833 - 843.
- [2] Poizot A, Dumez D. Modification of the healing kinetics

- after iterative exercise in the rat. Action of titrated extract of *Centella asiatica* (TECA) on duration of healing [J]. *C R Hebd Seances Acad Sci, Ser D*, 1978, **286**(10):789 - 792.
- [3] Teeni R, Zanaboni G, De Agostini MP, *et al.* Effect of triterpenoid fraction of *Centella asiatica* on macromolecules of the connective matrix in human skin fibroblast cultures [J]. *Ital J Biochem*, 1988, **37**(2):69 - 77.
- [4] Del Vecchio A, Senni Z, Cossu G, *et al.* Effects of *Centella asiatica* on biosynthetic activity in cultured fibroblasts [J]. *Farm Ed Prat*, 1984, **39**(10):355 - 364.
- [5] Wan S W, Liu Q, Li P, *et al.* Comparison between two different preparing processes of asiaticoside tablets [J]. *Chin Tradit Pat Med* (in Chinese), 1990, **12**(5):2 - 3.
- [6] Meng Z M, Zheng Y N. Determination of asiaticoside contained in Sanjin pian [J]. *J China Pharm Univ* (in Chinese), 1988, **19**(3):205 - 206.
- [7] Diallo B, Vanhaelen Fastre R, Vanhaelen M. Direct coupling of high-speed counter-current chromatography to thin-layer chromatography application to the separation of asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica* [J]. *J Chromatogr*, 1991, **558**(2):446 - 450.
- [8] Mirjana BR, Norman ED. High performance liquid chromatography of triterpene saponins [J]. *J Chromatogr*, 1986, **368**(2):433 - 438.
- [9] Niranjana PS, Subodh KR, Shashi BM. Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica* [J]. *Phytochemistry*, 1989, **28**(10):2852 - 2854.
- [10] Inamdar PK, Yeole RD, Ghogare AB. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica* [J]. *J Chromatogr*, 1996, **742**(1):127 - 130.
- [11] Inamdar PK, Yeole RD, Srivastava MM, *et al.* Stability study of active constituents in the *Centella asiatica* extract [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1996, **22**(3):211 - 216.
- [12] Laugel C, Baillet A, Ferrier D. Improved HPLC determination of the *Centella asiatica* terpenes: analysis in a multiple emulsion, influence of the surfactants on the retention [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 1998, **21**(9):1333 - 1345.

PRE COLUMN DERIVATIZATION HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ASIATICOSIDE IN CENTELLA ASIATICA AND SANJINPIAN

XIAO Jun¹, CHE Zhur-tao², BI Kai-shun¹

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China; 2. School of Chinese Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N. T., Hong Kong, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop a pre-column derivatization HPLC method for the determination of asiaticoside in *Centella asiatica* samples from different habitats and the traditional Chinese medicine (TCM) recipe Sanjin pian containing *Centella asiatica*. **METHODS** The derivatizing reagent was benzoyl chloride in pyridine; the eluent consisted of methanol-tetrahydrofuran-water (90:4:6, 0.1% triethylamine); V_{D3} served as internal standard. The detection wavelength was set at 235 nm. **RESULTS** Assay linearity was obtained in the range of 0.396 ~ 3.960 μg ($r = 0.9985$). The average recovery of asiaticoside from *Centella asiatica* and Sanjin pian were 99.6% and 99.2%, respectively. The results suggest that the method developed is suitable for estimating asiaticoside in plant material and Sanjin pian. **CONCLUSION** This method was accurate, sensitive and reproducible. It offered a scientific basis for the routine assay of *Centella asiatica* and the TCM recipe Sanjin pian containing *Centella asiatica*.

KEY WORDS: *Centella asiatica*; Sanjin pian; asiaticoside; derivatization; high performance liquid chromatography