

HPLC-CAD 法分离测定三金片中同分异构体积雪草苷 B 和羟基积雪草苷

邹 准, 闵建国, 吴敏菊, 钟小清, 周艳林*, 邹节明*

桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

摘要:目的 建立一种高效液相色谱-电喷雾检测器(HPLC-CAD)法分离测定三金片中积雪草苷 B 和羟基积雪草苷 2 个同分异构体含量的方法。方法 采用 Thermo Acclaim™ C₃₀ 色谱柱, 甲醇-乙腈-水(35:8:57)为流动相, 柱温 35 °C, CAD 气化温度为 50 °C, 采集频率为 10 Hz, 分离测定积雪草苷 B 和羟基积雪草苷的含量。结果 积雪草苷 B 和羟基积雪草苷线性关系良好, *r* 分别为 0.999 8、0.998 4, 线性范围分别为 0.240 7~2.406 9、0.573 1~5.730 8 μg, 平均加样回收率分别为 100.26%、98.32%, RSD 分别为 0.69%、1.78%; 11 批样品中积雪草苷 B 为 1.65~3.18 mg/g, 羟基积雪草苷为 3.49~7.90 mg/g。结论 该方法简便、灵敏、准确度高, 能有效分离测定积雪草苷 B 和羟基积雪草苷 2 个同分异构体, 可用于三金片现行药典标准的提高完善。

关键词: HPLC; 电喷雾检测器; 三金片; 同分异构体; 积雪草苷 B; 羟基积雪草苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4217-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.012

Determination of two isomers asiaticoside B and madecassoside in Sanjin Tablets by HPLC-CAD

ZOU Zhun, MIN Jian-guo, WU Min-ju, ZHONG Xiao-qing, ZHOU Yan-lin, ZOU Jie-ming

Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

Abstract: Objective To establish a HPLC-CAD method for the determination of asiaticoside B and madecassoside in Sanjin Tablets (三金片). **Methods** The separation was performed on Thermo Acclaim™ C₃₀ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water (35:8:57). The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 35 °C. CAD detection condition included that the nebulization temperature was 50 °C and data acquisition frequency was 10 Hz. The content of asiaticoside B and madecassoside was determined. **Results** The linear ranges of asiaticoside B and madecassoside were 0.240 7—2.406 9 μg (*r* = 0.999 8) and 0.573 1—5.730 8 μg (*r* = 0.998 4), respectively. The average recoveries of asiaticoside B and madecassoside were 100.26% (RSD 0.69%) and 98.32% (RSD 1.78%), respectively. The contents of asiaticoside B and madecassoside in 11 batches of samples were 1.65—3.18 mg/g and 3.49—7.90 mg/g. **Conclusion** The method is accurate, convenient and sensitive for the quality control of two isomers (asiaticoside B and madecassoside) in Sanjin Tablets.

Key words: HPLC; CAD; Sanjin Tablets; isomer; asiaticoside B; madecassoside

三金片由积雪草、金樱根、金沙藤等 5 味中药组成, 具有清热解毒、利湿通淋、益肾之功效, 临床应用于治疗急、慢性肾盂肾炎, 膀胱炎、尿路感染及慢性非细菌性前列腺炎等泌尿系感染疾病, 临床疗效确切, 成长为中药大品种之一。

自《中国药典》2000 年版收载以来, 质量标准不断提升完善, 现行标准【含量测定】采用 HPLC-ELSD 法测定处方药味积雪草的主要药效成分羟基

积雪草苷含量^[1]。研究进展发现, 按照《中国药典》2020 年版方法检测的羟基积雪草苷, 实际混杂有难以分离的同分异构体积雪草苷 B^[2]。有关二者的分离测定研究, 一直是制药行业的难点, 特别是在处方中含积雪草药材的中成药制剂中二者的准确定量分析^[3-4]和纯化分离研究富有挑战性^[5], 2 个成分的化学结构式如图 1 所示。

为了真实反映其内在质量属性, 本实验创新性

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 广西创新驱动发展科技重大专项(桂科 AA17202045)

作者简介: 邹 准(1980—), 男, 工程师, 主要从事中药新药研究。Tel: (0773)5842588 E-mail: zouzhu@hotm.com

*通信作者: 邹节明, 男, 教授级高工, 博士生导师, 主要从事中药新药研究。Tel: (0773)5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

周艳林, 男, 教授级高工, 博士生导师, 主要从事中药工艺质量研究。Tel: (0773)5843106 E-mail: zhouyanlin@sanjin.com.cn

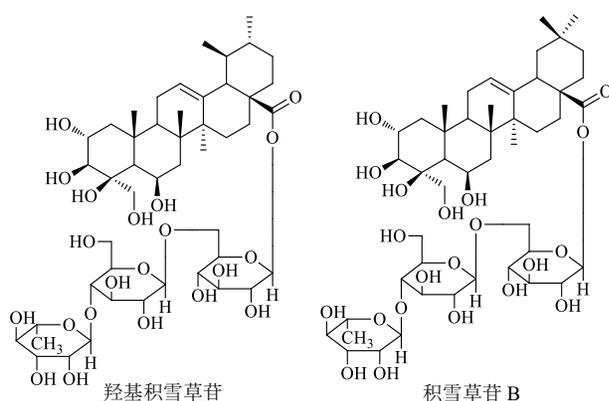


图1 羟基积雪草苷和积雪草苷B的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of madecassoside and asiaticoside B

地利用 C₃₀ 色谱柱进行分离, 并结合近年来发展应用于无紫外吸收物质检测的新型通用型电喷雾检测器 (CAD) 分析测定了其中积雪草苷 B 和羟基积雪草苷的含量^[6], 结果表明该方法具有灵敏度高、专属性强、重现性好的特点, 可用于本品药典质量标准的提升研究。

1 仪器、药品与试剂

1.1 仪器

赛默飞 Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 配三元泵、Corona Veo 电喷雾检测器和变色龙色谱软件 (7.1 版), 美国赛默飞世尔科技公司; BG-60 超声仪, 必能信 (上海) 有限公司。

1.2 对照品来源及纯度

羟基积雪草苷, 中国食品药品检定研究院, 批号 110893-201403, 质量分数 91.4%; 积雪草苷 B 为自制, 并按《中药新药质量标准研究用对照品研究技术要求》进行了结构确证和纯度检查。

1.2.1 积雪草苷 B 结构鉴定 白色无定形粉末。mp 217~220 °C; UV (CH₃OH) λ_{max}: 192 nm; IR (KBr) cm⁻¹: 3 418.3 (OH), 2 935.8 (C-H), 1 732.2 (COO-), 1 644.3 (C=C), 1 460.3, 1 382.4, 1 262.6, 1 238.0, 1 062.9 (C-O), 1 033.8, 812.5; ESI-MS *m/z*: 1019, 974, 503; ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₃N) δ: 6.32 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, -C=CH), 5.12 (12H, 4-CH₂OH), 0.98 (3H, d, *J* = 8.0 Hz), 1.29 (3H, s), 1.83, 1.93 (6H, s), 1.99 (3H, s), 2.17 (3H, s); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₃N) δ: 47.5 (C-1), 69.4 (C-2), 78.7 (C-3), 43.2 (C-4), 49.2 (C-5), 68 (C-6), 42.1 (C-7), 39.8 (C-8), 49.2 (C-9), 38.6 (C-10), 24 (C-11), 123.5 (C-12), 143.9 (C-13), 44.9 (C-14), 28.7 (C-15), 24.4 (C-16), 44.9 (C-17), 42.1 (C-18), 47.4

(C-19), 31.1 (C-20), 33.4 (C-21), 32.9 (C-22), 66.6 (C-23), 16.4 (C-24), 18.9 (C-25), 19.5 (C-26), 26.4 (C-27), 176.9 (C-28), 33.4 (C-29), 24 (C-30), 96.1 (Glu C-1'), 74.4 (Glu C-2'), 78.6 (Glu C-3'), 70.7 (Glu C-4'), 76.9 (Glu C-5'), 70.7 (Glu C-6'), 105.2 (Glu C-1''), 75.7 (Glu C-2''), 76.9 (Glu C-3''), 78.3 (Glu C-4''), 76.9 (Glu C-5''), 61.7 (Glu C-6''), 103.1 (Rha C-1'''), 72.9 (Rha C-2'''), 73.1 (Rha C-3'''), 74.4 (Rha C-4'''), 69.4 (Rha C-5'''), 19.2 (Rha C-6'''). 上述波谱数据与文献报道的积雪草苷 B 数据一致^[7]。

1.2.2 积雪草苷 B 纯度检测 精密称取干燥至恒定质量的积雪草苷 B 对照品适量, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含 1 mg/mL 积雪草苷 B 对照品溶液, 精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 连续测定 3 次, 用归一化法计算平均质量分数为 98.0%, RSD 为 0.22%, 符合定量用对照品纯度要求, 色谱图如图 2 所示。

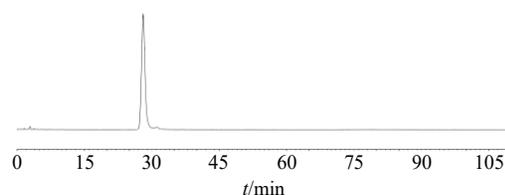


图2 积雪草苷 B 纯度检测色谱图

Fig. 2 HPLC chromatography of asiaticoside B

1.3 药品与试剂

三金片由桂林三金药业股份有限公司提供, 批号分别为 170320、170501、170910、180402、180409、180420、181208、190936、191001、191005、191102。流动相甲醇和乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Thermo Acclaim™ C₃₀ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-水 (35 : 8 : 57) 为流动相, 柱温为 35 °C, 体积流量为 1 mL/min, 电喷雾检测器 (corona veo) 的气化温度为 50 °C。供试品溶液、对照品溶液及缺积雪草阴性溶液的色谱图如图 3 所示。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒定质量的积雪草苷 B 和羟基积雪草苷对照品适量, 加甲醇溶解并分别稀释至 25、10 mL, 配制成质量浓度分别为 1.228、3.135 mg/mL 的对照品溶液。

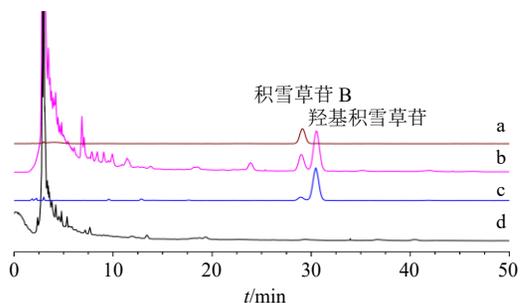


图3 积雪草苷 B (a)、三金片样品 (b)、羟基积雪草苷 (c) 及缺积雪草阴性样品 (d) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of asiaticoside B (a), Sanjin Tablets sample (b), madecassoside (c), and negative sample without *Centella asiatica* (d)

2.2.2 供试品溶液的制备 取三金片 30 片 (小片) 或 20 片 (大片), 研细, 取约 1.0 g, 精密称定, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 45 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 回收溶剂至干, 残渣加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 线性关系考察

取“2.2.1”项下各对照品溶液, 按 5、10、20、25、50 倍稀释配制系列质量浓度的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以各对照品的进样量为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为积雪草苷 B $Y=33.654 3 X-0.034 0$, $r=0.999 3$; 羟基积雪草苷 $Y=30.674 8 X+0.768 6$, $r=0.998 4$ 。结果表明, 积雪草苷 B 在进样量 0.240 7~2.406 9 μg、羟基积雪草苷在进样量 0.573 1~5.730 8 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

取同一批号样品 (批号 181208), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL, 连续进样 6 次, 计算积雪草苷 B 和羟基积雪草苷的含量。结果积雪草苷 B 的平均质量分数为 1.80 mg/g, RSD 为 0.80%, 羟基积雪草苷的平均质量分数为 4.06 mg/g, RSD 为 1.78%。

2.5 重复性试验

取同一批号样品 (批号 181208), 平行制备 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别测定, 结果积雪草苷 B 的平均质量分数为 1.77 mg/g, RSD 为 1.37%; 羟基积雪草苷的平均质量分数为 3.98 mg/g, RSD 为 1.49%。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液 (批号 181208), 分别于制备后 0、3、6、9、12、24、48 h 的时间间隔测定, 结果积雪草苷 B 平均质量分数为 1.79 mg/g, RSD 为 1.48%; 羟基积雪草苷的平均质量分数为 3.98 mg/g, RSD 为 1.11%。

2.7 加样回收率试验

取重复性试验同一批号样品 (批号 181208), 平行取 6 份, 各约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入积雪草苷 B 对照品溶液 (质量浓度为 1.228 mg/mL) 0.6 mL 和羟基积雪草苷对照品溶液 (质量浓度为 3.135 mg/mL) 0.7 mL, 按“2.2.2”项下方法制备加样回收供试品溶液, 并分别测定和计算加样回收率。结果积雪草苷 B、羟基积雪草苷平均加样回收率分别为 100.26%、98.32%, RSD 分别为 0.69%、1.78%。

2.8 方法耐用性试验

取重复性试验同一批号样品 (批号 181208), 经不同体积流量 (1±0.1) mL/min、不同色谱柱温 (35±4) °C 和流动相中乙腈比例 (8±1) % 单因素影响实验, 以及不同厂家色谱柱 (YMC carotenoid C₃₀ 250 mm×4.6 mm, 5 μm; Welch Ultimate® XB-C₃₀ 250 mm×4.6 mm, 5 μm 和 Thermo Scientific Acclaim™ C₃₀ 250 mm×4.6 mm, 5 μm) 考察, 上述各测定结果与重复性测定样品中 2 指标成分测定结果无显著性差异, RSD 小于 3%。

2.9 定量限考察

取“2.3”项下羟基积雪草苷和积雪草苷 B 对照品溶液, 加甲醇依次稀释成适宜的质量浓度, 精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 使信噪比为 10:1, 结果测得羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的定量限分别为 57.308 ng 和 60.172 ng (羟基积雪草苷对照品溶液的质量浓度为 5.730 8 μg/mL, 积雪草苷 B 对照品溶液的质量浓度为 6.017 2 μg/mL)。

2.10 样品测定

取各批次三金片样品, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液和“2.1”色谱条件测定, 结果见表 1。可见, 11 批样品中积雪草苷 B 在 1.65~3.18 mg/g, 羟基积雪草苷在 3.49~7.90 mg/g, 二者总量在 5.14~11.08 mg/g。上述检测结果表明, 三金片中 2 个指标成分较稳定, 低含量批次与高含量批次范围在 2 倍以内, 且表现出同增同减的关联性。

3 讨论

三金片为《中国药典》2020 年版收载品种, 其

表 1 11 批三金片样品含量测定结果 (n = 2)

Table 1 Determination results of 11 batches of Sanjin Tablets (n = 2)

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)		总量
	积雪草苷 B	羟基积雪草苷	
170320	2.13	5.24	7.37
170501	1.67	3.63	5.30
170910	1.65	3.49	5.14
180402	1.98	5.05	7.03
180420	1.76	4.10	5.86
180409	3.18	7.90	11.08
181208	1.77	3.98	5.75
190936	2.21	4.00	6.21
191001	2.51	4.58	7.09
191005	2.80	4.84	7.64
191102	2.55	4.55	7.10

【含量测定】项以羟基积雪草苷作为测定指标,经实验发现,常规 C₁₈ 色谱柱未能将互为同分异构体的积雪草苷 B 和羟基积雪草苷有效分离。据文献报道^[8-9],在流动相添加 β-环糊精(β-CD)可以实现二者有效分离,但添加 β-CD 的流动相存在显著缺陷,积雪草苷 B 色谱峰容易受到流动相中 β-CD 的浓度变化而发生保留时间漂移,且 β-CD 易导致色谱柱柱压升高及损耗色谱柱^[10]。C₃₀ 色谱柱采用聚合型的键合方式方法,在硅胶表面形成致密的多层 C₃₀ 烷基链,因而有比常规单层键合的 C₁₈ 色谱柱更长的烷基链,有更强的疏水性,因而对非极性溶质的保留能力和分辨率更高,同时对长链的异构体有非常好的分离能力,故而张勇等^[11]利用 C₃₀ 色谱柱分离齐墩果酸同分异构体有较好的表现。本实验通过系列研究筛选出 C₃₀ 色谱柱,采用常规流动相,即可实现有效分离并准确评价三金片中积雪草苷 B 和羟基积雪草苷含量,可供齐墩果烷型和乌苏烷型同分异构体皂苷的分离测定提供参考,相关的分离原理有待下一步深入研究。

三金片成分复杂,对比了超声提取、加热回流提取等不同提取方法,超声处理 30、45、60 min 及回流 2 h 不同提取时间,甲醇、无水乙醇、95%乙醇不同提取溶液的效果,结果表明甲醇 50 mL,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)45 min 为最简便高效提取条件。

原标准采用正丁醇提取纯化皂苷成分,实际操作繁琐,且易产生操作误差,现改进为甲醇超声处

理得到提取液,蒸干后直接采用流动相(甲醇-乙腈-水混合溶剂)进行沉淀除杂纯化,能有效富集目标成分,具有效果好、经济环保、简单快捷的特点。

本实验比较了相同液相条件下,C₃₀ 色谱柱联合不同类型检测器(UV、ELSD 和 CAD)测定二者含量的方法。结果表明,UV 检测法中,检测波长为 210 nm 时,色谱图中的 2 个目标成分难以达到基线分离,无法进行有效积分;ELSD 检测法中,平行进样中 2 个目标成分积分面积偏差较大(重复性实验 RSD 为 8.5%),特别对含量较低的积雪草苷 B 影响更为显著。CAD 检测法具有灵敏度高的特点^[12],适用于紫外吸收较弱的成分检测,较目前常用的蒸发光散射检测器灵敏度显著提高,较紫外检测器基线干扰小,可以为这类含量偏低吸收偏弱成分的定量检测提供更好的选择。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020:515.
- [2] 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.
- [3] 张锐,彭杨锐.高效液相色谱-蒸发光散射测定积雪草霜软膏中羟基积雪草苷和积雪草苷[J].中草药,2007,38(3):386-387.
- [4] 陈丹,李柯,卢茂芳,等.HPLC 法同时测定活血促愈胶囊中 5 个主要活性成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(12):2185-2190.
- [5] 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.
- [6] 李心怡,蒋运斌,马逾英.电喷雾检测器在药物 HPLC 分析中的优势及应用进展[J].中国药房,2017,28(15):2152-2156.
- [7] 于泉林.药用植物积雪草和狗筋蔓生物活性成分的研究[D].天津:天津大学,2005.
- [8] 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.
- [9] 李国卫,何民友,孙冬梅,等.基于主成分分析及聚类判别模式的积雪草药材 UPLC 指纹图谱研究[J].广东药科大学学报,2020,36(1):10-17.
- [10] 陈铭,刘文倩,苗水,等.一测多评法同时测定积雪草总苷及其 2 种制剂中 3 种成分[J].中成药,2020,42(9):2280-2284.
- [11] 张勇,薛昆鹏,周安,等.应用 C₃₀ 色谱柱高效液相色谱法同时分析枇杷叶中三萜酸类同分异构体[J].色谱,2014,32(1):47-51.
- [12] 陈学松.马鞭草 HPLC-CAD 指纹图谱及主要成分的测定[J].中草药,2017,48(10):2007-2011.

[责任编辑 郑礼胜]