

HPLC-ELSD 法测定积雪草药材及配方颗粒剂中积雪草苷的含量

曹金华¹, 谷莉², 吕磊¹, 李悦悦¹, 周闰臣¹, 赵亮¹, 张国庆¹ (1. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立高效液相-蒸发光散射器法测定积雪草药材及配方颗粒剂中积雪草苷的含量。方法 采用依利特 Hypersil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(*v/v* = 3 : 8), 流速为 0.6 ml/min。结果 积雪草苷在 23.2 ~ 580.0 μg/ml 范围内呈良好的线性关系, *r* = 0.999 6; 日内和日间精密度分别为 2.1% 和 3.6%; 药材的加样回收率为 95.2% (RSD = 3.2%, *n* = 6), 配方颗粒的加样回收率为 104.6% (RSD = 1.0%, *n* = 6); 5 个产地的药材中积雪草苷的含量分别为 0.33%、0.52%、0.22%、0.28% 和 0.39%, 5 个批号的配方颗粒中积雪草苷的含量分别为 0.40%、0.44%、0.39%、0.44% 和 0.42%。结论 该分析方法简便, 结果准确, 适用于积雪草药材及配方颗粒剂的质量控制。

[关键词] 积雪草; 积雪草苷; 高效液相-蒸发光散射器; 含量测定

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0384-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.019

Determination of asiaticoside in *Centella asiatica* and its formula particles by HPLC-ELSD

CAO Jin-hua¹, GU Li², LV Lei¹, LI Yue-yue¹, ZHOU Gui-chen¹, ZHAO Liang¹, ZHANG Guo-qing¹ (1. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To develop a method for determination of asiaticoside in *Centella asiatica* and its formula particles. **Methods** Hypersil ODS C₁₈ column was used (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile-water (*v/v* = 3 : 8) as mobile phase, and a flow rate of 0.6 ml/min. **Results** The result showed that the calibration curve was linear in the range of 23.2 ~ 580.0 μg/ml for asiaticoside, intra-day and inter-day precision results were 2.1% and 3.6%, the average recovery of asiaticoside were 95.2% (RSD = 3.2%, *n* = 6) in *Centella asiatica* and 104.6% (RSD = 1.0%, *n* = 6) in its formula particles. The contents of asiaticoside in 5 medicinal materials were 0.33%, 0.52%, 0.22%, 0.28% and 0.39%; while in 5 formula particles were 0.40%, 0.44%, 0.39%, 0.44% and 0.42%. **Conclusions** The method was simple and accurate for quality control of *Centella asiatica* and its formula particles.

[Key words] *Centella asiatica*; asiaticoside; HPLC-ELSD; determination

积雪草为伞形科植物 *Centella asiatica* (L.) Urban 的干燥全草, 始见于《神农本草经》, 具有清热利湿、解毒消肿之功效。积雪草配方颗粒是在保持药材汤剂疗效的基础上, 运用先进的生产技术和设备工艺, 经水提取积雪草药材的有效成分, 采用低温浓缩、喷雾干燥等工艺而制成的颗粒, 与传统中药饮片相比, 具有质量统一、计量准确、成分稳定、疗效确切等特点。积雪草苷 (asiaticoside) 是积雪草及其配方颗粒中的主要活性成分, 临床上可广泛应用于伤口愈合、抗胃溃疡、抗抑郁症等^[1,2]。

目前对积雪草药材及其复方制剂中活性成分的定量分析已有报道, 主要为滴定分析法^[3]、薄层色谱

法^[4]、高速逆流色谱法^[5]、高效液相色谱法^[6,7]等, 以 HPLC 法为主。蒸发光散射器 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) 是一种通用型检测器, 相比于紫外-可见光 (UV) 检测器, 其最大的优点是可以检测皂苷、糖类等无紫外吸收或紫外末端吸收的化合物, 积雪草中的主要活性成分积雪草苷属于紫外末端吸收的化合物, $\lambda_{\max} = 197 \text{ nm}$, 且含量较低, 用 ELSD 分析具有一定优越性, 已报道的 ELSD 法对积雪草苷含测的文章仅限于对单独药材或制剂的分析^[8,9], 本实验首次采用 HPLC-ELSD 法, 同时测定积雪草药材及其配方颗粒中积雪草苷的含量, 检测结果令人满意。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Waters510 泵, SEDEX 75 型蒸发光散射检测器, SrAdv 色谱数据工作站 (美国沃特世公司),

[作者简介] 曹金华 (1981-), 男, 药师. Tel: 13917134205, E-mail: nalbert@sohu.com.

[通讯作者] 张国庆. Tel: (021) 81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com.

METTLER AE240 型电子天平(德国梅特勒公司)。

1.2 药品和试剂 积雪草药材 5 批分别购于蔡同德堂(产地安徽)、上海青浦医药公司(产地江苏)、上海德康药店(产地上海)、雷允上大药房(产地湖北)和上海华宇药业(产地浙江);积雪草颗粒剂(国家级火炬计划高科技产品)5 批由江阴天江药业有限公司生产提供,批号分别为 110316, 110408, 110601, 110810, 110901, 每袋相当于饮片 15 克;积雪草苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号:110892-200604, 纯度 >98%);乙腈、甲醇为色谱纯,购自 Fisher 公司,水为重蒸水。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取积雪草苷对照品 5.8 mg,置于 5 ml 容量瓶中,用 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为标准储备液。分别精

密度取储备液 2.5、1.0、0.5、0.25、0.1 ml 于 5 ml 的容量瓶中,用 50% 甲醇溶液稀释至刻度,配成浓度为 580.0、232.0、116.0、58.0、23.2 $\mu\text{g/ml}$ 的系列标准溶液,至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.1.2 样品溶液的制备 精密称取积雪草药材粉末 1 g,加入 50% 甲醇 40 ml,超声提取 2 h,冷却定容至 50 ml 容量瓶中,即得药材样品溶液。精密称取积雪草配方颗粒 0.1 g,加 50% 甲醇 8 ml,超声提取 0.5 h,冷却定容至 10 ml 容量瓶中,即得配方颗粒样品溶液。至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,进样前用 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液进样测定。

2.2 色谱条件 色谱柱:依利特 Hypersil ODS C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),柱号: E14191062,柱温:25 $^{\circ}\text{C}$,流动相:乙腈-水($v/v=3:8$),流速:0.6 ml/min;ELSD 检测器漂移管温度:40 $^{\circ}\text{C}$,检测灵敏度:7,雾化气体(空气)压力:3.5 Bar,进样量:20 μl 。HPLC 图谱见图 1。

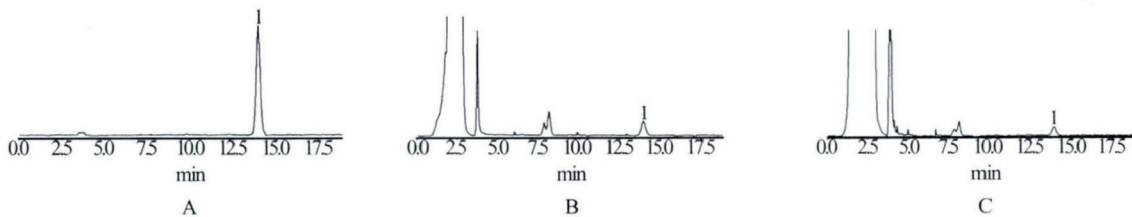


图 1 积雪草对照品(A)、药材(B)、配方颗粒(C)的 HPLC 图谱
1-积雪草苷

2.3 标准曲线的制备 分别取“2.1.1”项下制备的不同浓度系列标准溶液 20 μl ,按“2.2”项下色谱条件进样分析,重复 3 次。根据 ELSD 的检测原理: $A = a \cdot Q^b$,以进样量 Q 的自然对数($\ln Q$)对峰面积 A 的自然对数($\ln A$)回归,得线性方程: $\ln Q = 1.1579 \ln A + 3.9982$, $r = 0.9996$,线性范围:23.2 ~ 580.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.4 精密度的试验 取“2.1.1”项下制备的浓度为 116.0 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液 20 μl ,按照“2.2”项下上述色谱条件,在 1 d 之内连续进样 6 次,以及连续 6 d 进样,分别考察日内精密度和日间精密度。结果日内精密度 $\text{RSD}\% = 2.1\%$,日间精密度 $\text{RSD}\% = 3.6\%$,符合方法学要求。

2.5 定量限和检测限考察 将积雪草苷对照品溶液逐级稀释,信噪比为 10:1 时,积雪草苷的最低定量限为 19.3 $\mu\text{g/ml}$,信噪比为 3:1 时,积雪草苷的最低检测限为 5.8 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批积雪草药材 1.0 g(产地上海)和配方颗粒 0.1 g(批号 110601)各 6 份,分别准确加入一定量对照品(相当于

样品中积雪草苷含量的 100%),按“2.1.2”项下样品制备方法操作,进样分析。结果:积雪草药材的回收率为 95.2%, $\text{RSD} = 3.2\%$;配方颗粒的回收率为 104.6%, $\text{RSD} = 1.05\%$,符合方法学要求。

2.7 样品的测定 按“2.1.2”项下方法分别制备 5 个产地的积雪草药材和 5 个批次的配方颗粒样品溶液,按“2.2”项下色谱条件,进样分析,以实测浓度乘以样品溶液体积再除以样品称量量计算各样品中积雪草苷的含量,结果见表 1。

3 讨论

3.1 蒸发光散射检测器(ELSD)与紫外-可见光(UV)检测器相比,最大的优点是可以检测皂苷、糖类等无紫外吸收或紫外末端吸收的化合物,没有流动相和杂质的紫外吸收干扰,对各种物质的响应因子很近,在一次分析中可以同时检测主要成分和杂质。本实验所用的积雪草苷属于紫外末端吸收的化合物,含量较低,如用紫外检测定量分析有一定因

(下转第 392 页)

3.2 干预措施对降低退药率的作用

3.2.1 严格执行退药程序,有效遏制医生原因导致退药的发生 一是退药程序增加了审批环节,增加了医师遭遇退药时与患者和主管领导的沟通成本,使得医师在开处方时更加谨慎。二是加强了对药物不良反应的监测,退药中药物不良反应占有很大比重,以往医师不太配合药物不良反应监测,通过严格执行退药程序,加强这部分药物不良反应的监测工作。

3.2.2 及时退药反馈,有效提高医生合理用药意识 在医院机关和临床科室的配合下,本着药品无小事的原则,在每次发生退药时,与处方医师及时沟通,提醒医师注意处方问题,在提高合理用药自主意识方面起到很好的效果。

3.2.3 加强门诊药房药师与患者的沟通,有效改善患者依从性和医患关系 安排有经验的高年资药师在退药时与患者沟通,从患者的角度帮助解决问题,增强了患者对医院的信任感,提高患者服药依从性,减少了激化医患矛盾的风险。在医院的门诊退药窗口,多数患者愿意接受药师的解答。对于部分确实因处方医师的原因所致必须退药的,患者对门诊药师协助退药也表示满意。

4 小结

尽管有关规章制度严格限制退药,但门诊退药问题仍将长期存在。我院从2012年1月开始施行退药干预,经过1年的尝试,退药率明显降低,退药干预取得了显著的效果。在退药干预措施方面,退药程序制度化和退药反馈常态化加强了对医生处方的监管和教育,门诊药师退药沟通,不仅减少了患者自主退药的发生,同时也改善了医患关系,提升了医院形象。药品无小事,通过正确的干预降低因退药可能导致的药品安全风险十分必要。

【参考文献】

- [1] 孔飞飞,谭兴起,郭良君. 医院药房退药中的风险管理[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(2): 102.
- [2] 国家中医药管理局总后勤部卫生部. 医疗机构药事管理规定[S]. 2011.
- [3] 成杰,蔡明江,杨鹏飞,等. 某医院2011年度退药情况调查分析及对策[J]. 武警后勤学院学报:医学版, 2013, 22(2): 103.
- [4] 王兆斌. 2515张门诊急诊退药处方分析及管理对策[J]. 安徽医药, 2012, 16(12): 1897.

[收稿日期]2013-08-12

[修回日期]2013-09-01

(上接第385页)

表1 药材及配方颗粒中积雪草苷的含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

类别	产地/批号	含量(%)	RSD(%)
药材	安徽	0.33 ± 0.011	3.4
	江苏	0.52 ± 0.020	3.8
	上海	0.22 ± 0.005	2.4
	湖北	0.28 ± 0.006	2.1
	浙江	0.39 ± 0.010	2.6
配方颗粒	110316	0.40 ± 0.007	1.8
	110408	0.44 ± 0.008	1.9
	110601	0.39 ± 0.006	1.5
	110810	0.44 ± 0.010	2.3
	110901	0.42 ± 0.008	2.0

难,而实验显示ELSD检测灵敏度和色谱峰的分辨都较高,检测结果令人满意。由于流动相中水相含量比较高,使得基线噪声略大,但仍能保证良好的线性关系,灵敏度及稳定性亦符合含量测定的要求。

3.2 本实验分别对5个产地的积雪草药材和5个批次的积雪草配方颗粒中的积雪草苷进行了含量测定,结果发现,不同产地的积雪草中积雪草苷的含量有一定差异,与文献报道一致^[8,9],这可能与原药材的产地、采收季节不同有关;而不同批次积雪草配方颗粒中积雪草苷的含量比较稳定,证明制剂配方准

确。本试验所建分析方法简便,结果准确,适用于积雪草药材及配方颗粒剂的质量控制。

【参考文献】

- [1] 中国药典2010年版一部[S]. 2010:199.
- [2] 张晓梅. 野生植物资源积雪草的开发利用[J]. 中国园艺文摘, 2011, 27(11): 55.
- [3] 陈艳. 滴定法测定积雪草中积雪草总苷元含量[J]. 广西医学, 2009, 31(8): 1205.
- [4] 张莉,崔晓立. 薄层扫描法测定积雪草片中积雪草苷的含量[J]. 中国卫生工程学, 2009, 8(3): 174.
- [5] Diallo B, Vanhaelen FR, 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 A, 1991, 558(2): 446.
- [6] 白斌艳,张爱荣,朱小芝,等. 高效液相色谱法测定积雪草片中积雪草苷和羟基积雪草苷的含量[J]. 山西中医学院学报, 2009, 10(3): 28.
- [7] 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.
- [8] 向前,杜书良,唐强,等. HPLC-ELSD法测定积雪草中积雪草苷的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2007, 30(1): 54.
- [9] 于泉林,高文远,陈海霞,等. HPLC-ELSD测定积雪草提取物中积雪草苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(6): 503.

[收稿日期]2012-12-18

[修回日期]2013-04-07