

## $\beta$ -环糊精流动相添加剂法分离测定积雪草 总苷元中的羟基积雪草酸

潘 见, 开桂青, 袁传勋, 周蓓蓓, 金日生, 袁 媛

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230069)

**摘要** :以  $\beta$ -环糊精为流动相添加剂,采用反相高效液相色谱法于  $C_{18}$  反相柱上拆分了羟基积雪草酸及其同分异构体,建立了积雪草样品中羟基积雪草酸含量的测定方法,探讨了  $\beta$ -环糊精浓度、流动相 pH 对同分异构体分离度的影响。结果表明:当流动相为甲醇-水(体积比为 65:35),pH 为 4 时,同分异构体的分离度随着  $\beta$ -环糊精浓度的增加而增大,羟基积雪草酸在 0.1~5.0 g/L 范围内,峰面积与浓度呈线性关系( $r^2 = 0.9989$ ),说明该法适用于羟基积雪草酸的含量检测及有关药品的质量控制。

**关键词** :反相高效液相色谱法;  $\beta$ -环糊精; 羟基积雪草酸; terminolic acid; 同分异构体; 积雪草

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)03-0316-03 栏目类别: 研究快报

## Separation and Determination of Madecassic Acid in Triterpenic Genins of *Centella asiatica* by High Performance Liquid Chromatography Using $\beta$ -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive

PAN Jian, KAI Guiqing, YUAN Chuanxun, ZHOU Beibei, JIN Risheng, YUAN Yuan

(Engineering Research Center of Bio-process of Ministry of Education, Hefei University  
of Technology, Hefei 230069, China)

**Abstract** : *Centella asiatica* (L.) Urban is a tropical medicinal plant with a long history of therapeutic uses. Madecassic acid and terminolic acid, which are a pair of structural isomers, are two constituents of *Centella asiatica*. A method using reversed-phase high performance liquid chromatography in which  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) was the additive in mobile phase has been developed for separation of the structural isomers and determination of madecassic acid. The two compounds can be isolated with high resolution on a  $C_{18}$  reversed-phase column with the addition of  $\beta$ -CD in the mobile phase. The separation mechanism of the isomers was discussed. It was assumed that the separation of the isomers might have been resulted from different inclusion forces of complexes with  $\beta$ -CD. The effects of  $\beta$ -CD concentration and the pH of mobile phase on resolution were investigated. It was found that the resolution of the isomers increased with the increase of  $\beta$ -CD concentration when the mobile phase consisted of methanol-water (65:35, v/v) at pH 4. The correlation coefficient ( $r^2$ ) of the linear calibration curve between peak area and concentration of madecassic acid was 0.9989 in the range of 0.1–5.0 g/L. This method was successfully used to determine the madecassic acid in triterpenic genins of *Centella asiatica*.

**Key words** : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC);  $\beta$ -cyclodextrin; madecassic acid; terminolic acid; isomer; *Centella asiatica*

积雪草为伞形科植物积雪草(*Centella asiatica* (L.) Urban)的干燥全草或带根全草,又称落得打、崩大碗、半边钱,始载于《神农本草经》,列为中品,性寒,味苦,辛,具有清热利湿、解毒消肿、促进伤口

愈合、刺激生物合成、抗胃溃疡等多种药理作用<sup>[1-4]</sup>。积雪草中的成分相当复杂,含有  $\beta$ -谷甾醇、二十六醇辛酸酯、山柰酚、槲皮素、胡萝卜苷、香草酸、丁二酸、积雪草酸、羟基积雪草酸、terminolic

acid、积雪草苷、积雪草二糖苷、羟基积雪草苷、积雪草苷-B 等等。文献 [5, 6] 报道积雪草中含有多对乌苏烷型和齐墩果烷型结构异构的同分异构体, 两者的理化性质非常相似, 羟基积雪草酸和 terminolic acid 就是其中的一对同分异构体, 其结构式见图 1。

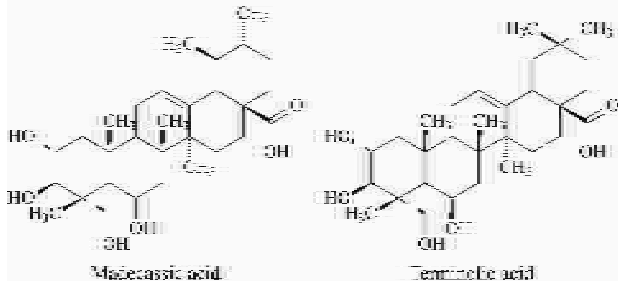


图 1 羟基积雪草酸和 terminolic acid 的结构图

Fig. 1 Structures of madecassic acid and terminolic acid

文献多采用高效液相色谱法(HPLC)对积雪草中的活性物质进行分离检测研究<sup>[7-9]</sup>, 但羟基积雪草酸和 terminolic acid 在一般的 HPLC 条件下, 无论以恒比例洗脱或梯度洗脱均显示单一的色谱峰, 无法得到理想的分离度。本实验采用  $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)为流动相添加剂对它们进行了分离, 并对分离后的物质进行了简单的确证; 实验中还考察了不同浓度的  $\beta$ -环糊精和不同流动相 pH 对其分离度的影响, 建立了积雪草样品中羟基积雪草酸含量的测定方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和药品

美国 Waters 公司生产的高效液相色谱系统, 配 Waters 515 型泵、996 型二极管阵列检测器; Agilent 1100 型液质联用仪(LC-MSD); 甲醇为色谱纯; 羟基积雪草酸对照品购自 Sigma 公司, 50% 积雪草总苷元购自广西昌洲天然产物开发有限公司,  $\beta$ -环糊精购自南开大学精细化学实验厂。

### 1.2 供试品溶液的制备

精密称取 50% 积雪草总苷元适量, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成 50% 积雪草总苷元甲醇溶液 5.58 g/L 备用。进样前用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 保护柱: Shimadzu Shim-pack ODS; 流动相: 甲醇-水(体积比为 65:35)混合液(含 4 mmol/L  $\beta$ -CD), 以乙酸调节 pH 值为 4; 流速 0.4 mL/min; 检测波长 204 nm; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ L。

## 1.4 羟基积雪草酸和 terminolic acid 的收集

将 50% 积雪草总苷元溶液重复进样, 在 HPLC 检测器的出口处分段收集羟基积雪草酸和 terminolic acid 各约 40 mL。将收集到的洗脱液蒸干后, 利用  $\beta$ -环糊精在甲醇中溶解度小而羟基积雪草酸和 terminolic acid 在甲醇中溶解度大的差异, 去除  $\beta$ -环糊精, 进样, 进行 LC-MSD 检测, 对收集的两种物质进行简单的确证。

## 2 结果与讨论

### 2.1 羟基积雪草酸同分异构体的拆分

由图 2 可以看出, 以 65% 甲醇水溶液为流动相时, 只能得到单一色谱峰 I。在流动相中添加  $\beta$ -环糊精后, 得到两个分离度较大的色谱峰(II 和 III)。可能的解释是  $\beta$ -环糊精的空穴结构外部是亲水性的, 内部是亲脂性的。羟基积雪草酸和 terminolic acid 是亲脂性的, 能嵌入  $\beta$ -环糊精的内腔内发生包合作用, 但由于其结构的差异, 羟基积雪草酸为乌苏烷型而 terminolic acid 为齐墩果烷型, 它们和  $\beta$ -环糊精发生包合作用时的空间位阻不同, 使得它们的包合作用有差异, 从而得到不同的保留时间。

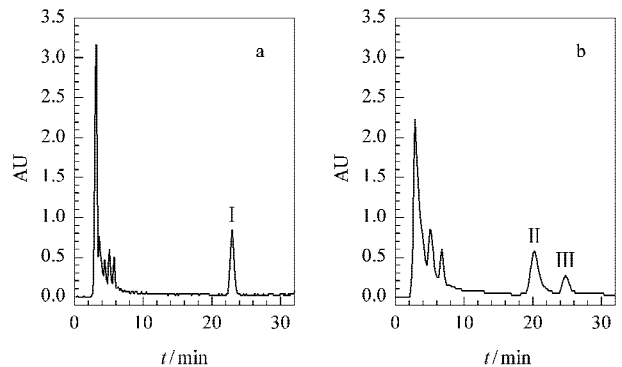


图 2 50% 积雪草总苷元的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of triterpene genins of *Centella asiatica*

Mobile phases: a. methanol-water solution (65:35, v/v, pH = 4); b. methanol-water solution (65:35, v/v, pH = 4) added with 4 mmol/L  $\beta$ -CD.

收集的两个目标物质(II 和 III)在 LC-MSD 中均可看到分子离子峰  $m/z$  527( $[M + Na]^+$ ), 故其相对分子质量均为 504, 与羟基积雪草酸和 terminolic acid 的相对分子质量相符, 说明两者是同分异构体。与对照品羟基积雪草酸的色谱图(图 3)相对照, 可知图 2-b 中峰 III 为羟基积雪草酸。由参考文献 [9] 可知羟基积雪草酸和 terminolic acid 为同分异构体, 其理化性质非常相似, 普通色谱条件下只能得到单一色谱峰; 图 2-b 中分离出来的两个色谱峰 II 和 III 的峰面积之和近似等于图 2-a 中的单一色谱

峰 I 的峰面积,因此结合参考文献[9],推测图 2-b 中的峰 II 为 terminolic acid。

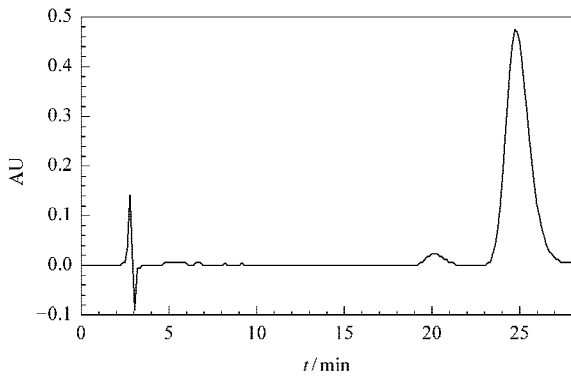


图 3 羟基积雪草酸标准品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a reference standard of madecassic acid

Mobile phase : methanol-water solution ( 65:35 , v/v , pH = 4 ) added with 4 mmol/L  $\beta$ -CD.

不同浓度的  $\beta$ -环糊精对羟基积雪草酸和 terminolic acid 分离度的影响见图 4。可以看出,同分异构体的分离度随着  $\beta$ -环糊精浓度的增加而增大。这可能是因为  $\beta$ -环糊精浓度的增加有利于增强它与同分异构体之间的相互作用,使得同分异构体之间的色谱行为差异扩大,得到不同的保留时间,从而达到分离的目的。但  $\beta$ -环糊精浓度太高时,由于受溶解度的限制,在流动相中不能完全溶解,使流动相变浑浊。因此通过微孔滤膜过滤后  $\beta$ -环糊精的浓度几乎没有增加,分离度就趋于水平了。

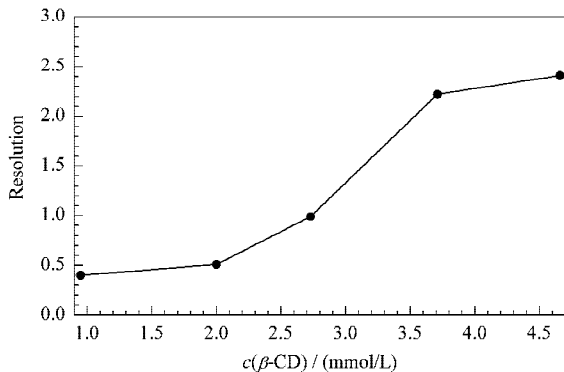


图 4  $\beta$ -CD 浓度对羟基积雪草酸同分异构体分离度的影响

Fig. 4 Effect of  $\beta$ -CD concentration on resolution of the isomers madecassic acid and terminolic acid

流动相 pH( 2, 3, 4, 5 )对分离度的影响不是很大,但对色谱峰的峰形有很大的影响。在低 pH 值时,色谱图的基线很高;而当 pH 值较大的时候,色谱峰严重拖尾。实验表明,在 pH = 4 时,羟基积雪草酸和 terminolic acid 的色谱峰都能达到较好的峰形,分离度良好,因此本实验中流动相 pH 调整为 4。

### 2.2 羟基积雪草酸的定量分析

精密称取羟基积雪草酸对照品 10.0 mg,用甲醇配制成 10.0 g/L 的溶液,然后用甲醇进行倍比稀释,配成质量浓度依次为 5.0, 2.0, 1.0, 0.5 和 0.1 g/L 的羟基积雪草酸对照品甲醇溶液。以峰面积 (y)对质量浓度 (x, g/L)进行线性回归,羟基积雪草酸的回归方程为  $y = 116.54x - 10.058$ ,  $r^2 = 0.9989$ 。结果表明,样品量在 0.1 ~ 5.0 g/L 范围内浓度与峰面积呈线性关系。

精密配制羟基积雪草酸对照品 0.5, 1.0, 2.0 g/L 3 种浓度的甲醇溶液,每种浓度重复进样 3 次,连续测定 5 d,其峰面积的日间精密度和日内精密度(以相对标准偏差(RSD)值计)均小于 2.0%。

精密量取供试品溶液,按照前面的色谱条件,重复进样 3 次,按回归方程计算供试品的含量,结果表明 50% 积雪草总苷元中羟基积雪草酸的平均质量分数为 18.1%。

### 3 结论

本文采用在甲醇-水流动相中添加  $\beta$ -环糊精的方法分离了羟基积雪草酸和其同分异构体 terminolic acid,并测定了 50% 积雪草总苷元中羟基积雪草酸的含量。本法专属性良好,羟基积雪草酸在 0.1 ~ 5.0 g/L 时其浓度与峰面积呈良好的线性关系,可用于羟基积雪草酸的含量检测及有关药品的质量控制。

#### 参考文献:

[ 1 ] Zhao Y X, Li M L, Feng W H, Kang C, Fan L. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine ( 赵宇新,李曼玲,冯伟红,康琛,范莉. 中国中医药信息杂志 ), 2002, 9( 8 ): 81

[ 2 ] Zainol M K, Abd-Hamid A, Yusof S, Muse R. Food Chem, 2003, 81 : 575

[ 3 ] Cheng C L, Guo J S, Luk J, Koo M W L. Life Sci, 2004, 74 : 2 237

[ 4 ] Babu T D, Kuttan G, Padikkala J. J Ethnopharmacol, 1995, 48 : 53

[ 5 ] Matsuda H, Morikawa T, Ueda H, Yoshikawa M. Chem Pharm Bull, 2001, 49( 10 ): 1 368

[ 6 ] Sahu N P, Roy S K, Mahato S B. Phytochemistry, 1989, 28 ( 10 ): 2 852

[ 7 ] Inamdar P K, Yeole R D, Ghogare A B, de Souza N J. J Chromatogr A, 1996, 742 : 127

[ 8 ] Schaneberg B T, Mikell J R, Bedir E, Khan I A. Pharmazie, 2003, 58( 6 ): 381

[ 9 ] Zhang L L, Wang H S, Yao Q Q, Liu Y J, Luan Y, Wang X L. Chinese Traditional and Herbal Drugs ( 张蕾磊,王海生,姚庆强,刘拥军,栾阳,王秀丽. 中草药 ), 2005, 36( 12 ): 1 761