

· 实验研究 ·

毛细管区带电泳法测定积雪草配方颗粒中积雪草苷的含量

Determination of asiaticoside in formula particles of *Centella asiatica* by capillary zone electrophoresis

谷莉, 黄晟, 姜子洋, 赵亮, 柴逸峰*

(第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 建立测定积雪草配方颗粒中积雪草苷含量的毛细管区带电泳法(CZE)。方法: 积雪草配方颗粒用甲醇超声提取, 用未涂渍熔融石英毛细管(内径 75 μm , 长度 48.5 cm, 有效长度 40 cm), 以 25 mmol $\cdot$ L⁻¹ 硼砂溶液(含 50% 甲醇)为背景电解质溶液(pH 9.1), 运行电压 27 kV, 温度 23°C, 压力进样 5 kPa $\times$ 5 s, 检测波长为 206 nm。结果: 在 11 min 内积雪草苷与内标及其他成分能达到基线分离, 最低检测限 0.010 3 mg $\cdot$ mL⁻¹, 积雪草苷在 0.048 6~0.173 5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系($r=0.9998$), 加样回收率为(97.6 $\pm$ 2.6)%, 低、中、高 3 种浓度的日内和日间的精密度结果分别为 3.5%、2.1%、2.6% 和 4.1%、2.8%、3.7%, 3 个批号的样品中积雪草苷的含量分别为(0.39 $\pm$ 0.01)%, (1.17 $\pm$ 0.02)%, (1.74 $\pm$ 0.04)%。结论: 毛细管电泳法测定结果准确可靠, 方法简便、快速、环保, 可用于样品中积雪草苷的含量测定。

[关键词] 积雪草配方颗粒; 积雪草苷; 电泳; 毛细管

[中图分类号] R 917

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)07-0796-02

[1] 积雪草为伞形科植物 *Centella asiatica* (L.) Urban 的干燥全草, 有促进伤口愈合、抗抑郁症等多种药理作用^[1,2]。积雪草主要含积雪草苷、羟基积雪草苷等三萜类化合物, 其公认的活性和特征成分是积雪草苷, 目前主要用 HPLC 法测定其含量^[3,4], 但样品处理过程较复杂, 测试时间长, 成本较高。本研究试用毛细管区带电泳法(capillary zone electrophoresis, CZE)测定中药积雪草配方颗粒中积雪草苷的含量。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Agilent3D 毛细管电泳仪。未涂渍熔融石英毛细管 48.5 cm $\times$ 75 μm (内径), 有效长度 40 cm, 河北永年光纤厂生产。积雪草苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(纯度 95%), 积雪草配方颗粒由江阴天江药业有限公司生产提供, 批号为 990316、0104048、0208107, 每袋相当于饮片 15 g。硼砂为分析纯, 上海云岭化工厂。甲醇为分析纯, 中国医药(集团)上海化学试剂公司。

1.2 电泳条件 分离电压 27 kV; 检测波长 206 nm; 温度 23°C。压力进样 5 kPa, 进样时间 5 s; 25 mmol $\cdot$ L⁻¹ 硼砂的 50% 甲醇溶液为运行背景电解质溶液(pH 9.1)。每次进样前用 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ NaOH 和缓冲液各冲洗 4 min, 运行时间为 15 min。

1.3 标准曲线的建立 精密称定积雪草苷对照品 6.94 mg, 加甲醇溶解稀释并定容至 10 mL, 摇匀, 置 4°C 冰箱中贮存。精密称取内标替加色罗(tegaserod, 商品名 Zelnac, 为 5-HT₄ 受体激动剂, 纯度 > 99.0%) 28.12 mg, 加甲醇溶解稀释并定容至 100 mL, 摇匀, 置 4°C 冰箱中贮存。取积雪草苷对照品储备液, 分别精密量取 0.7、1.0、1.4、2.0、2.5 mL, 分别加入内标 0.1 mL 混匀, 加入甲醇溶解稀释并定容至 10 mL, 稀释成浓度为 0.048 6、0.069 4、0.097 2、0.138 8、0.173 5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品溶液, 按 1.2 节所述条件进行测定。

1.4 样品测定 取样品 0.1 g, 精密称定, 加甲醇适量, 超声

提取 1 h, 加甲醇定容至 10 mL; 取上清液适量, 置离心管中 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL, 加内标 0.1 mL, 混匀, 按 1.2 节所述条件进行测定。

2 结果和讨论

2.1 线性关系与线性范围 以对照品同内标峰面积之比为纵坐标(Y), 对照品溶液的浓度为横坐标(X), 得回归方程 $Y=0.0087X-0.1211$, $r=0.9998$ ($n=4$); 线性范围: 0.048 6~0.173 5 mg $\cdot$ mL⁻¹, 表明线性关系良好。

2.2 方法学考察 配制系列稀释对照品溶液, 按 1.2 节所述条件测定, 当 S/N 为 3 时最低检测限为 0.010 3 mg $\cdot$ mL⁻¹。在 1 d 内以及 3 d 内对 0.048 6、0.097 2、0.173 5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品溶液分别进行 3 次测定, 低、中、高 3 种浓度的日内和日间的精密度结果分别为 3.5%、2.1%、2.6% 和 4.1%、2.8%、3.7% ($n=3$)。取已知含量样品 0.1 g, 准确加入积雪草苷对照品溶液(0.694 mg $\cdot$ mL⁻¹) 1.0 mL 按样品测定条件操作, 计算回收率为(97.6 $\pm$ 2.6)%。

2.3 样品含量测定 3 批样品含量分别为(0.39 $\pm$ 0.01)%, (1.17 $\pm$ 0.02)%, (1.74 $\pm$ 0.03)% ($n=3$)。

2.4 分离条件的影响与优化 由于硼砂与积雪草苷中多糖部分的羟基可形成糖-硼酸盐配合物^[5], 可以实现选择性分离, 故采用 CZE 模式。对积雪草苷标准品溶液在 190~400 nm 进行紫外扫描, 积雪草苷紫外吸收弱, 在近紫外区有末端吸收, 其最大吸收峰在 197 nm 处。但检测波长低于 200 nm, 溶剂本身的吸收以及噪音的影响也会加大, 综合考虑, 以 206 nm 作为检测波长。由于积雪草苷在水中略溶, 在背景电解质溶液中加入有机溶剂常能改善分离度或分离选择性, 本文考察了甲醇对分离的影响。当甲醇的浓度 < 50% 时, 积雪

[基金项目] 上海市科委科技攻关项目(01DJ9012)。

[作者简介] 谷莉(1972-), 女(汉族), 硕士生

*Corresponding author. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

草苷和内标,其他杂峰分离度不佳,峰形展宽;当甲醇的浓度为50%时,积雪草苷的峰形好;当甲醇浓度再高时,保留时间明显延长。故本文选择50%甲醇溶液作为硼砂缓冲液的溶剂。考察了背景电解质溶液的pH值(8.0~9.3)对分离的影响。当pH>9.1时,样品与内标的分离度较差;当pH<9.1时,所有峰位前移,分离度变差,柱效降低。选择pH为9.1作为最佳pH值。温度对迁移的时间不大,分离电压以27 kV为佳。

[参考文献]

[1] Shukla A, Rasik AM, Jain GK, et al. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*

[J]. *J Ethnopharmacol*, 1999, 65: 1-11.

[2] 陈瑶,秦路平,郑汉臣,等.积雪草总苷对抑郁症大鼠神经内分泌功能的影响[J].第二军医大学学报,2002,23(11):1224-1226.

[3] 肖隽,车镇涛,毕开顺.柱前衍生化HPLC法测定积雪草及三金片中积雪草苷的含量[J].药科学报,2000,35(8):605-608.

[4] 曾建国,宋云飞,侯团章,等.HPLC法测定积雪草中三萜类化合物的含量[J].基层中药杂志,2000,14(6):7-8.

[5] 林炳承.毛细管电泳导论[M].北京:科学出版社,1996.196-198.

[收稿日期] 2003-12-29

[修回日期] 2004-04-12

[本文编辑] 尹茶

· 实验研究 ·

褶合光谱-标准加入法测定复方磺胺甲噁唑片中SMZ和TMP

Determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in sulfamethoxazole tablet by convolution spectrum standard addition method

闻俊,陆峰,殷学平*(第二军医大学药学院药物分析学教研室,上海200433)

[摘要] 目的:探讨褶合光谱-标准加入法测定复方磺胺甲噁唑片中磺胺甲噁唑(SMZ)和甲氧苄啶(TMP)含量的可操作性和准确性。方法:采用TMP标准加入法,用紫外可见分光光度计采集吸收度信息,通过褶合光谱程序双组分定量分析系统计算出SMZ与TMP含量。结果:SMZ、TMP平均回收率分别为100.42%、96.83%,RSD值为0.37%和2.55%。结论:对于处方比例悬殊且紫外光谱吸收强度差异大的双组分药物,在确定最佳标准加入量后,采用褶合光谱法可以不经分离同时测定。

[关键词] 复方磺胺甲噁唑;磺胺甲噁唑;甲氧苄啶;标准加入法;褶合光谱法

[中图分类号] R 978.2

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)07-0797-01

复方磺胺甲噁唑是临床常用的抗菌消炎药物,内含磺胺甲噁唑(SMZ)和甲氧苄啶(TMP)两个组分。《中国药典(2000版)》^[1]采用等吸收双波长消去法分别在两种溶剂里测定其两个组分的含量,操作较为烦琐。本研究运用褶合光谱法^[2,3]结合标准加入法,在同一种溶剂中不经分离同时测定SMZ和TMP的含量,操作简单,结果准确。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Cary100紫外可见分光光度计(Varian公司);褶合光谱分析系统(第二军医大学研制);SMZ、TMP对照品(取自上海新亚闵行药厂);复方磺胺甲噁唑片剂(样品1)由上海利生制药厂生产,批号:001252;自制样品(样品2)按处方比例混合原料药配制。所有试剂均为分析纯。

1.2 溶液配制 精密称定SMZ 100 mg, TMP 40 mg,分别用无水乙醇溶解并定容于100 ml容量瓶,配成对照品贮备液。精密量取适量对照品贮备液用0.1 mol/L NaOH定容于50 ml容量瓶中,配成对照品液。按SMZ与TMP的处方比例配制5份不同浓度的模拟样品,其浓度范围控制在处方比例的±10%之内,并且标准加入TMP适量。精密称定5片复方磺胺甲噁唑片剂,研细,然后精密称取相当于SMZ 100 mg、TMP 20 mg的片粉适量,用无水乙醇溶解并定容于100

ml容量瓶,配成样品贮备液。取出适量样品母液用滤纸过滤,精密量取其续滤液0.50 ml,并准确加入0.50 ml TMP对照品贮备液,用0.1 mol/L NaOH定容于50 ml容量瓶,使其SMZ为10 μg/ml, TMP为6 μg/ml。

1.3 样品测定 以0.1 mol/L NaOH溶液为空白,用紫外可见分光光度计分别采集230~330 nm(间隔1 nm)区间内的对照品溶液、模拟样品液及样品溶液的吸光度数据,用褶合光谱双组分分析系统处理。

2 结果

2.1 模拟样品回收率 褶合光谱双组分分析系统可根据模拟样品回收率与RSD的结果,自动寻找最佳测试条件为:SMZ, $N = 22$, $J = 1$, $W_m = 251$; TMP, $N = 25$, $J = 4$, $W_m = 241$ (N 为褶合的点数, J 为褶合的阶数, W_m 为平均波长)。

2.2 样品测定 样品1中SMZ和TMP含量分别为标示量的100.42%和96.83%;RSD分别为0.37%和2.55% ($n = 9$)。样品2中的SMZ和TMP含量分别为标示量的102.02%

[作者简介] 闻俊(1979-),男(汉族),硕士

E-mail: wenjunn@etang.com

*Corresponding author