



引用格式: 杨若朦, 田军, 李蕴哲. 积雪草主要三萜类化合物测定方法的优化研究[J]. 西北植物学报, 2024, 44(10): 1639-1645. [YANG R M, TIAN J, LI Y Z. Optimization of methods for determining major triterpenoid compounds in *Centella asiatica* (L.) Urban[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(10): 1639-1645.] DOI:10.7606/j.issn.1000-4025.20240277

积雪草主要三萜类化合物测定方法的优化研究

杨若朦¹, 田 军¹, 李蕴哲²

(1 西安文理学院, 西安 710065; 2 西安交通大学, 西安 710061)

摘 要 【目的】建立以环糊精为流动相添加剂的高效液相色谱法测定积雪草药材中三萜类化合物积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的含量, 为控制积雪草的质量提供依据。【方法】采用分子设计方法优选流动相添加剂-环糊精种类, 效应面法分析环糊精浓度、流动相中乙腈的比例、流动相 pH 对分离的影响, 优化色谱条件, 测定积雪草中积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 含量。【结果】优化后 HPLC 色谱测定方法以 γ -环糊精为流动相添加剂, 固定相为 CAPCELL PAK C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-3 mmol/L 环糊精溶液 (含 0.10% 磷酸)=20:80(V/V), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 205 nm; 羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分离度为 4.32; 积雪草苷为 200~2 000 ng, 积雪草苷 B 为 120~1 200 ng, 羟基积雪草苷为 200~2000 ng 内线性关系良好, 方法精密密度、重现性、稳定性和回收率良好。【结论】新 HPLC 色谱测定方法简便、准确、可靠, 且经济环保, 可用于测定积雪草药材中主要三萜类化合物。

关键词 积雪草; 三萜类化合物; 环糊精流动相添加法; 分子设计; 效应面法

中图分类号 Q946; S567.239

文献标志码 A

Optimization of methods for determining major triterpenoid compounds in *Centella asiatica* (L.) Urban

YANG Ruomeng¹, TIAN Jun¹, LI Yunzhe²

(1 Xi'an University, Xi'an 710065, China; 2 Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract [Objective] In order to provide a basis for quality control of *Centella asiatica* (L.) Urban, a high-performance liquid chromatography method was established using cyclodextrin as a mobile phase additive for the determination of asiaticoside, madecassoside, and asiaticoside B. [Methods] Molecular design was used to optimize the type of the mobile phase additive-cyclodextrin. The response surface method was used to analyze the effects of cyclodextrin concentration, the proportion of acetonitrile in the mobile phase, and pH of the mobile phase on separation, as well as to optimize the chromatographic condition. The optimized chromatographic condition was used to determine the content of asiaticoside, madecassoside, and asiaticoside B in *C. asiatica*. [Results] In the optimization of determination method, γ -cyclodextrin was used as a mobile phase additive. The separation of asiaticoside, asiaticoside B, and madecassoside was carried out on CAPCELL PAK C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μ m) with acetonitrile-3 mmol/L γ -cyclodextrin solution (contained 0.10% phosphoric acid) (20:80, V/V). The detecting wavelength was 205 nm. The flow rate was set at 1.0 mL/min and the column temperature was 25 $^{\circ}$ C. The resolution of madecassoside

收稿日期: 2024-05-06; 修改稿收到日期: 2024-06-01

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2019SF-277)

作者简介: 杨若朦 (1988-), 女, 在读博士研究生, 讲师, 主要从事计算机模拟图形设计研究。E-mail: 110518262@qq.com

and asiaticoside B was 4.32. Linearity was good in the range of 200—2 000 ng for asiaticoside, 120—1 200 ng for asiaticoside B, and 200—1 200 ng for madecassoside. The precision, reproducibility, stability, and recovery rate of method were good. [Conclusion] The new method is simple, accurate, reliable, and environmentally friendly, and can be used as a quality control of major triterpenoid compounds in *C. asiatica* (L.) Urban.

Key words *Centella asiatica* (L.) Urban; triterpenoid; cyclodextrin mobile phase addition method; molecular design; effect surface methodology

积雪草药材为伞形科植物积雪草 [*Centella asiatica* (L.) Urban] 的干燥全草, 具有清热利湿、解毒消肿的功效, 用于治疗湿热黄疸、中暑腹泻、石淋血淋、痈肿疮毒、跌扑损伤等^[1]。现代药理研究发现, 积雪草三萜类化合物具有抗抑郁、抗肿瘤、抗胃溃疡、抗阿尔茨海默病、促进皮肤系统修复、增强心血管系统等作用, 是积雪草的主要活性成分^[2-4]。积雪草三萜类化合物主要包括积雪草苷、羟基积雪草苷、积雪草苷 B、积雪草酸和羟基积雪草酸等化合物^[5]。《中国药典》2020 年版通过测定积雪草苷和羟基积雪草苷以控制积雪草药材的质量^[1]。但是, 羟基积雪草苷和积雪草苷 B 是同分异构体, 不易分离, 所以控制积雪草药材质量比较困难。

环糊精具有“外亲水、内疏水”的筒状结构, 作为高效液相色谱流动相添加剂, 可与分析物产生包合作用, 改善同分异构体的分离^[6], 甚至用于拆分手性对映体^[7-8]。作为流动相添加剂, 环糊精的种类和用量、有机相的比例等因素会影响异构体的分离效果^[9-10]。因此, 本研究拟采用分子设计方法优选流动相添加剂环糊精的种类, BoxBehnken 效应面法分析流动相中环糊精用量、有机相比例等因素对羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分离的影响, 从而建立环糊精流动相添加 HPLC 法测定积雪草药材中的积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的含量, 为积雪草药材质量控制提供新方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

积雪草药材购自西安市中药店, 产地为陕西、云南和江苏, 经西安交通大学牛晓峰教授鉴定为伞形科植物积雪草 [*C. asiatica* (L.) Urban] 的干燥全草。积雪草苷 (纯度为 99.0%)、羟基积雪草苷 (纯度为 99.0%) 和积雪草苷 B (纯度为 99.0%) 对照品购自西安开来生物有限公司, γ -环糊精 (γ -CD) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 乙腈 (色谱纯) 购自 TEDIA 公司, 甲醇和磷酸等均为分析纯, 购于西安化学试剂厂, 纯净水为 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 试验仪器

研究所用仪器有日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪、SPD-10Avp 检测器、LC solution 色谱工作站。梅特勒-托利多公司 AB135-S 电子分析天平 (精度 1/10000), 广东凌生公司 2500C 粉碎机, 深圳福洋科技有限公司 F-080 超声仪。

1.3 试验方法

1.3.1 供试品溶液制备

取积雪草药材适量, 粉碎, 过二号筛 [孔径 (850 $\pm$ 29) μ m], 准确称取 1.0 g, 置于索氏提取器中, 用适量石油醚加热回流提取 6 h, 弃去石油醚; 然后, 加入 80% 甲醇加热回流提取 6 h, 80% 甲醇转移至蒸发皿中, 蒸干; 残渣加适量 80% 甲醇转移至 20 mL 量瓶中, 定容, 即得供试品溶液。

1.3.2 混合对照品溶液制备

取积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 对照品适量, 精密称定, 置于同一量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含积雪草苷 1.0 mg、羟基积雪草苷 1.0 mg 和积雪草苷 B 0.6 mg 的混合对照品储备液。吸取上述对照品储备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释成每 1 mL 含积雪草苷 100 μ g、羟基积雪草苷 100 μ g 和积雪草苷 B 60 μ g 的混合对照品溶液。

1.3.3 分子设计模拟

使用 Autodock 4.2 进行分子设计模拟, 选择流动相中环糊精的种类。 α -CD、 β -CD、 γ -CD 三维立体结构取自剑桥晶体库 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>), 积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 三维立体结构取自 pubchem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。客体分子结构中可旋转的单键、非极性氢原子等均依照 Autodock 程序默认值。分子对接在立方体格子中进行, 其长、宽、高均为 12.6 nm, 格子间隔为 0.037 5 nm, 对接计算采用 Lamarckian 遗传算法。使用 LigPlot⁺ 程序分析复合物中主客体之间作用情况。

1.3.4 BoxBehnken 效应面法

以羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度为指标, 根据 BoxBehnken 试验设计原理, 选取 γ -CD 浓

度(A,mmol/L)、有机相比比例(B,%)以及磷酸浓度(C,%)为自变量,因素与水平见表 1。然后以羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度为因变量,采用 Design-Expert 13 软件对试验设计结果进行二次多项式拟合,得 3 个因素与响应值(Y)的数学模型。最后,采用 Design-Expert 13 软件,依据所拟合的模型,绘制不同因素间的效应面图。

表 1 BoxBehnken 试验设计因素与水平
Table 1 The factors and levels of BoxBehnken experimental design

因素 Factor	水平 Level		
	−1	0	1
A/(mmol/L)	1	2	3
B/%	20	25	30
C/%	0.10	0.20	0.30

1.3.5 色谱条件

采用 CAPCELL PAK C₁₈ (150 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,以乙腈-环糊精溶液为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 25 ℃,检测波长 205 nm,进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 分子设计模拟

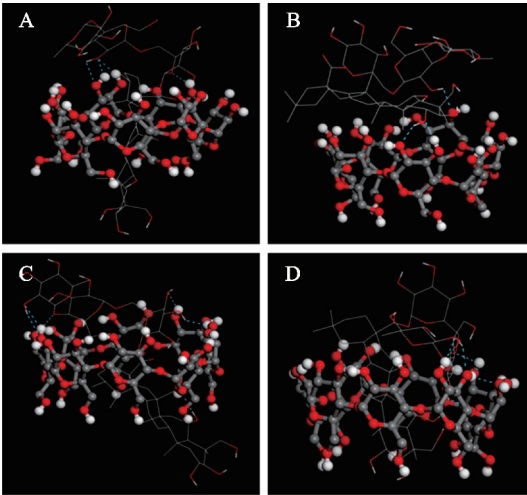
羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分子较大,而 α-CD 的空腔较小,因此羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分子不能进入 α-CD 的空腔而形成包合物。羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分别与 β-CD 和 γ-CD 分子设计模拟图见图 1。在 β-CD 模拟图中,羟基积雪草苷的甾体部分全部嵌入 β-CD 空腔中,寡糖部分与环糊精形成氢键;而积雪草苷 B 没有嵌入 β-CD 空腔中,但寡糖和甾体部分可与环糊精形成氢键(图 1,A、B)。在 γ-CD 模拟图中,羟基积雪草苷的整个分子嵌入 γ-CD 空腔中,寡糖部分与环糊精形成氢键;积雪草苷 B 全部甾体和部分寡糖嵌入 γ-CD 空腔中,寡糖和甾体部分与环糊精形成氢键(图 1,C、D)。分析可知,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 均能与 γ-CD 形成包合物;积雪草苷 B 与 γ-CD 的氢键作用强于羟基积雪草苷。因此,可选择 γ-CD 作为流动相添加剂。

2.2 BoxBehnken 效应面法

2.2.1 BoxBehnken 试验结果

依据 3 因素 3 水平的 BoxBehnken 设计,共进行 17 次试验,试验色谱条件参数 γ-CD 浓度(A)、有机相比比例(B)和磷酸浓度(C)见表 1 和表 2,每次试

验响应值(羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度)见表 2。其中,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度以试验 2 最高(4.35),相应的试验色谱条件参数 γ-CD 浓度为 3 mmol/L,有机相比比例为 20%,磷酸浓度为 0.2%。



A、C. 羟基积雪草苷;B、D. 积雪草苷 B。
图 1 羟基积雪草苷和积雪草苷 B 与 β-CD (A、B)和 γ-CD (C、D)分子设计对接图
A, C. Madecassoside. B, D. Asiaticoside B.
Fig. 1 The molecular design docking diagram of madecassoside or asiaticoside B with β-CD (A, B) and γ-CD (C, D)

表 2 BoxBehnken 试验设计与结果
Table 2 BoxBehnken experimental design and results

试验号 Number	A	B	C	分离度 Resolution
1	−1	−1	0	3.01
2	1	−1	0	4.35
3	−1	1	0	1.47
4	1	1	0	3.15
5	−1	0	−1	1.71
6	1	0	−1	3.94
7	−1	0	1	1.58
8	1	0	1	3.59
9	0	−1	−1	3.82
10	0	1	−1	2.77
11	0	−1	1	3.60
12	0	1	1	2.49
13	0	0	0	2.99
14	0	0	0	3.18
15	0	0	0	3.15
16	0	0	0	2.95
17	0	0	0	3.04

2.2.2 模型拟合

采用 Design-Expert 13 软件对表 2 的结果进行二次多项式拟合,得到 3 个因素(A、B、C)与响应值(Y)的数学模型: $Y=3.06+0.9075A-0.6125B-0.1225C+0.0850AB-0.0550AC-0.0150BC-0.2660A^2+0.1990B^2-0.0910C^2$ 。该数学模型($P<0.0001, R^2>0.9$)具有较高的可信度,可用于流动相最佳参数的预测。在数学模型中,各自变量的方差分析结果(表 3)表明,A 和 B 的一次项达到极显著水平($P<0.0001$),A 的二次项达到显著水平

($P<0.05$),其他项均不显著。

2.2.3 效应面分析

采用 Design-Expert 13 软件,依据所拟合的模型,绘制不同因素间的效应面图(图 2)。随着 γ -CD 浓度增大,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度逐渐增加,但是增加幅度逐渐减小;随着有机相乙腈浓度增加,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度逐渐减小;磷酸浓度对羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度几乎没有影响。因此,优化的色谱条件为流动相为乙腈-3 mmol/L γ -CD 溶液(含 0.10%磷酸)=20:80 (V/V)。

表 3 数学模型中各自变量的方差分析

Table 3 Variance analysis of individual variables in mathematical models

来源 Source	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F	P
模型 Model	9	10.230 0	1.140 0	29.690 0	<0.000 1
A	1	6.590 0	6.590 0	172.070 0	<0.000 1
B	1	3.000 0	3.000 0	78.380 0	<0.000 1
C	1	0.120 0	0.120 0	3.140 0	0.119 9
AB	1	0.028 9	0.028 9	0.754 8	0.413 8
AC	1	0.012 1	0.012 1	0.316 0	0.591 6
BC	1	0.000 9	0.000 9	0.023 5	0.882 5
A ²	1	0.297 9	0.297 9	7.780 0	0.026 9
B ²	1	0.166 7	0.166 7	4.350 0	0.075 3
C ²	1	0.034 9	0.034 9	0.910 6	0.371 7
残差 Residual	7	0.268 0	0.038 3		
失拟性 Lack of fit	3	0.228 1	0.076 0	7.630 0	0.039 4
纯误差 Pure error	4	0.039 9	0.010 0		
总离性 Total	16	10.500 0			

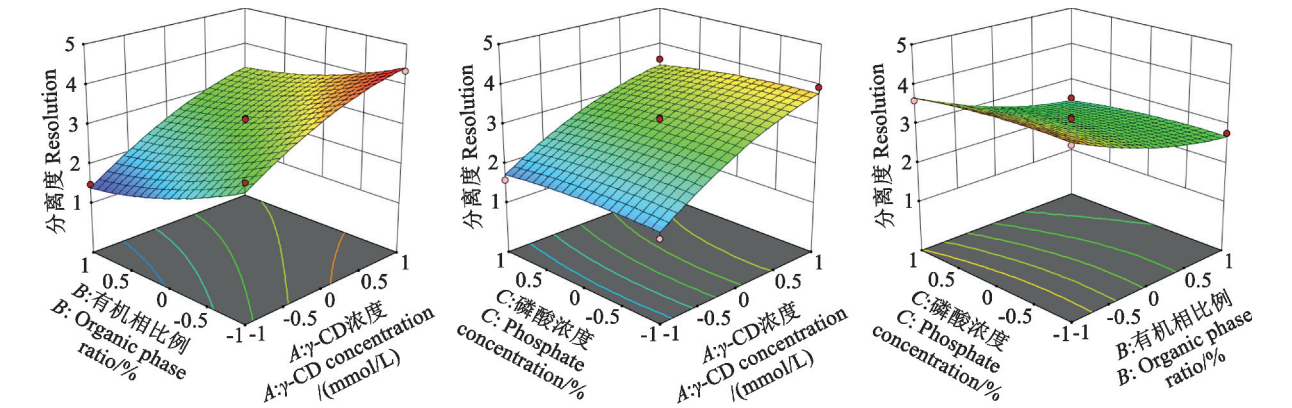


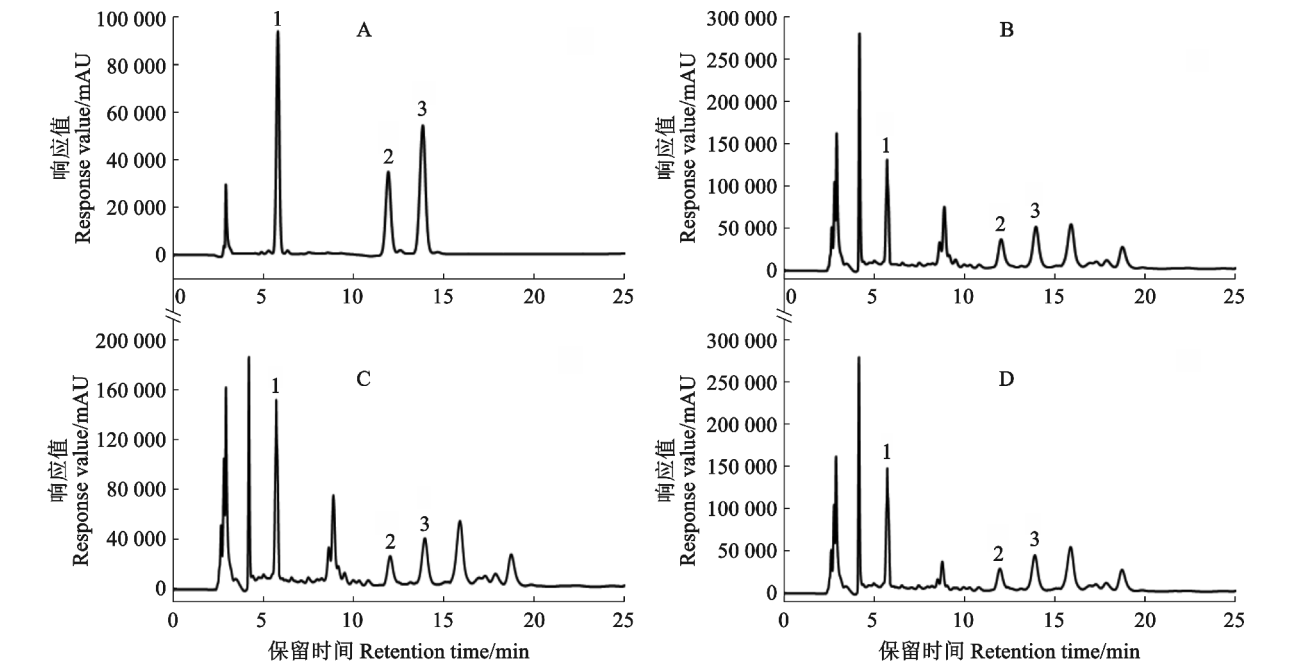
图 2 γ -CD 浓度、有机相比比例、磷酸浓度相互作用对羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度影响的三维效应面图

Fig. 2 Three dimensional response surface diagram of the interaction between γ -CD concentration, organic phase ratio, and phosphate concentration on the resolution of madecassoside or asiaticoside B

2.2.4 效应面预测与验证

依据数学模型,在优化的色谱条件下,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分离度的预测值为 4.43。按上述选化的色谱条件,重复进样分析混合对照品溶液

3 次。羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的色谱分析见图 3。羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度为 4.32,相对标准偏差(RSD)为 1.20%($n=3$),与预测值相对误差为 2.48%。



A. 混合对照品;B. 江苏产积雪草;C. 云南产积雪草;D. 陕西产积雪草;1. 积雪草苷;2. 积雪草苷 B;3. 羟基积雪草苷。

图 3 不同产地积雪草药材的 HPLC 色谱图

A. Standard mixture. B. *C. asiatica* from Jiangsu. C. *C. asiatica* from Yunnan.
D. *C. asiatica* from Shaanxi. 1, asiaticoside. 2, asiaticoside B. 3, madecassoside.

Fig. 3 HPLC chromatograms of medicinal herbs of *C. asiatica* (L.) Urban from different regions

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性试验

精密量取积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 混合对照品溶液,及供试品溶液各 10 μ L,按优化后的色谱条件进样分析,记录色谱图。结果(图 3)显示,积雪草供试品溶液色谱图中在与混合对照品溶液色谱图相应的位置上有相同的色谱峰,积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 色谱峰达到基线分离,其中羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度为 4.32。

2.3.2 线性考察

精密量取 1.3.2 节混合对照品溶液 2,4,8,12,16,20 μ L,按优化后的色谱条件进样分析,记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),进样量(X, ng)为横坐标,绘制标准曲线。结果显示,积雪草苷为 200~2 000 ng、积雪草苷 B 为 120~1 200 ng、羟基积雪草苷为 200~2 000 ng 内线性关系良好,线性方程分别为 $Y=5729.5X-748.6$ ($r=0.999\ 9$)、 $Y=4627.2X-493.4$ ($r=0.999\ 7$)和 $Y=7114.6X$

-586.5 ($r=0.999\ 9$)。

2.3.3 精密度试验

按优化后的色谱条件,精密量取 1.3.2 节混合对照品溶液重复进样 6 次,测定积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 色谱峰面积。结果显示,积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 三者峰面积的 RSD 均小于 1.65%,精密度良好。

2.3.4 重现性试验

精密称取同一批积雪草药材 5 份,按 1.3.1 节方法制备 5 份供试品溶液,按优化后的色谱条件进样分析,记录积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的峰面积,并计算三者含量。结果显示,积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的含量分别为(3.35 ± 0.11) mg/g、(3.84 ± 0.09) mg/g 和(3.67 ± 0.08) mg/g,RSD 均小于 2.02%,重现性良好。

2.3.5 稳定性试验

精密量取 1.3.1 节的供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8 h 分别进样 10 μ L,记录积雪草苷、羟基积雪

草苷和积雪草苷 B 的峰面积,计算 RSD。结果显示,积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的峰面积 RSD 均小于 1.62%,二者在 8 h 内稳定。

2.3.6 回收率试验

精密称取积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 含量分别为 3.35 mg/g、3.84 mg/g 和 3.67 mg/g 的积雪草药材 0.5 g,加入 1.3.2 节 2.0 mL 混合对照品储备液,按 1.3.1 节方法制备供试溶液,然后按优化后的色谱条件进样分析,计算加样回收率。结果显示,积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 三者的平均回收率分别为 99.0%(RSD=2.17%)、98.2%(RSD=2.30%)和 98.7%(RSD=2.11%),回收率良好。

2.4 样品测定

取不同产地的积雪草药材,按 1.3.1 节方法制备供试品溶液,按 1.3.5 节方法和优化后的色谱条件进样分析,计算药材中积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 含量。结果(表 4)显示,江苏产样品中积雪草苷含量最低,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 含量均最高;云南产样品中积雪草苷含量最高,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 含量均最低;陕西产样品中各成分含量均处于中等。

表 4 不同产地积雪草药材中积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 含量 (n=3)

Table 4 The content of asiaticoside, asiaticoside B, and madecassoside in <i>C. asiatica</i> (L.) Urban from different regions (n=3) mg/g			
产地 Region	积雪草苷 Asiaticoside	积雪草苷 B Asiaticoside B	羟基积雪草苷 Madecassoside
江苏 Jiangsu	3.35±0.11	3.84±0.09	3.67±0.08
云南 Yunnan	3.90±0.13	2.76±0.08	2.89±0.10
陕西 Shaanxi	3.79±0.12	3.05±0.10	3.22±0.11

3 讨 论

积雪草的主要活性成分是三萜类化合物,包括积雪草苷、羟基积雪草苷、积雪草苷 B、积雪草酸和羟基积雪草酸等。现有研究主要通过 HPLC 法测定积雪草药材中积雪草苷或积雪草苷和羟基积雪草苷的含量,并不能完全反映积雪草药材的质量^[11-13]。羟基积雪草苷和积雪草苷 B 为同分异构体,常规 C₁₈ 色谱柱不能进行有效地分离。邹准等^[14]采用 C₃₀ 色谱柱分离羟基积雪草苷和积雪草苷 B,但是二者仅仅达到基线分离,且分离时间较长。本研究采

用环糊精为流动相添加剂的高效液相色谱法,分离测定积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B,不仅分离效果较好,而且时间较短,能更全面的检测积雪草药材的质量。

环糊精是葡萄糖单元以 1,4-糖苷键结合而成的低聚糖,具有略呈锥形的中空圆筒立体环状结构^[15];其空腔内由于受到 C-H 键的屏蔽作用形成疏水区,可以包含各种适当的客体^[16]。羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分子与 α -CD 和 β -CD 内部空腔不匹配,不能形成稳定的包合物。 γ -CD 内部空腔较大,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的疏水部分-甾体部分可以进入 γ -CD 内部空腔,形成稳定的包合物。在 γ -CD 与羟基积雪草苷和积雪草苷 B 形成的包合物中,羟基积雪草苷的寡糖部分与 γ -CD 形成氢键,而积雪草苷 B 的寡糖和甾体部分均可与环糊精形成氢键,因此 γ -CD 与积雪草苷 B 的包合作用强于 γ -CD 与羟基积雪草苷的包合作用。

在反相液相色谱中,环糊精作为流动相添加剂,通过包合作用或分子间作用(如氢键作用)减弱分析物在固定相上保留,不仅使分析物的保留时间大幅度降低,还可改善同分异构体的分离,甚至用于拆分手性对映体^[17-18]。 γ -CD 内部空腔与羟基积雪草苷和积雪草苷 B 分子大小匹配,均能形成包合物。但由于积雪草苷 B 与 γ -CD 的包合作用强于羟基积雪草苷,因此积雪草苷 B 在色谱柱上先被洗脱掉,保留时间较小,色谱峰位于羟基积雪草苷之前。

BoxBehnken 效应面法优化结果显示,随着有机相乙腈比例的增加,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的分离度逐渐变小。其原因是有机相乙腈的增加不仅使羟基积雪草苷和积雪草苷 B 在固定相上保留时间减少,从而导致二者与 γ -CD 之间作用时间变短,而且不利于包合作用。若有机相乙腈用量过小,羟基积雪草苷和积雪草苷 B 在固定相上的保留时间过长,会造成二者色谱峰扩散严重。

4 结 论

研究采用分子设计和效应面法优化得到的 HPLC 色谱条件为:CAPCELL PAK C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μ m),流动相为乙腈-3 mmol/L γ -环糊精溶液(含 0.10% 磷酸)=20:80(V/V),流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 $^{\circ}$ C,检测波长为 205 nm。该方法可简单快速分离并测定积雪草苷、羟基积雪草苷和积雪草苷 B 的含量,结果准确可靠,可作为积雪草药材中主要三萜类化合物的测定方法。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第 1 部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 296.

[2] WANG L Q, GUO T, GUO Y F, *et al.* Asiaticoside produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice, involving reversion of inflammation and the PKA/pCREB/BDNF signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(3): 2364-2372.

[3] 边水秀, 皮佩仙, 汪秋颖, 等. 积雪草三萜类有效成分的抗肿瘤作用研究进展[J]. *中药材*, 2024, 47(3): 786-791.

BIAN S X, PI P X, WANG Q Y, *et al.* Research progress on anti-tumor effects of triterpenoid active ingredients from *Centella asiatica* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2024, 47(3): 786-791.

[4] 项佳媚, 肖伟, 许利嘉, 等. 积雪草的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(2): 233-238.

XIANG J M, XIAO W, XU L J, *et al.* Research progress in *Centella asiatica* [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2016, 18(2): 233-238.

[5] 刘瑜, 赵余庆. 积雪草化学成分的研究[J]. *中国现代中药*, 2008, 10(3): 7-9.

LIU Y, ZHAO Y Q. Chemical studies on the saponin compounds of *Centella asiatica* [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2008, 10(3): 7-9.

[6] WANG C H, LIU H J, ZHANG B H, *et al.* Determination of oleanolic and ursolic acid in Chinese herbs using HPLC and γ -CD as mobile phase modifier[J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(21): 3023-3028.

[7] AO Q, ZHAO H L, TONG T Z, *et al.* Enantioseparation of basic drugs by reverse phase high-performance liquid chromatography system using carboxymethyl- β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive[J]. *Chirality*, 2022, 34(8): 1128-1139.

[8] 张虎, 沈芒芒, 童胜强, 等. 高效液相色谱手性流动相添加法拆分阿卓乳酸对映体[J]. *色谱*, 2014, 32(6): 612-615.

ZHANG H, SHEN M M, TONG S Q, *et al.* Highperformance liquid chromatographic enantioseparation of atrolactic acids usingchiral mobile phase additive[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(6): 612-615.

[9] YOU H B, CHEN B, FANG L Q, *et al.* Analytical enantioseparation of *N*-alkyl drugs by reversed-phase liquid chromatography with carboxymethyl- β -cyclodextrin as mobile phase additive[J]. *Chirality*, 2023, 35(1): 58-66.

[10] ZENG A G, XING J F, WANG C H, *et al.* Simultaneous analysis and retention behavior of major isoflavonoids in Radix Puerariae lobatae and Radix Puerariae thomsonii by high performance liquid chromatography with cyclodextrins as a mobile phase modifier[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 712: 145-151.

[11] 曹金华, 谷莉, 吕磊, 等. HPLC-ELSD 法测定积雪草药材及配方颗粒剂中积雪草苷的含量[J]. *药学实践杂志*, 2013, 31(5): 384-385.

CAO J H, GU L, LÜ L, *et al.* Determination of asiaticoside in *Centella asiatica* and its formula particles by HPLC-ELSD [J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2013, 31(5): 384-385.

[12] 王虹丹, 胥维昌, 王远, 等. HPLC-ELSD 法测定积雪草中积雪草苷及羟基积雪草苷的含量[J]. *日用化学工业(中英文)*, 2023, 53(8): 976-980.

WANG H D, XU W C, WANG Y, *et al.* Determination of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* (L.) Urban by HPLC-ELSD[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2023, 53(8): 976-980.

[13] 杨梅, 李峻媛, 吴家彬, 等. HPLC 法测定积雪草配方颗粒中羟基积雪草苷和积雪草苷含量[J]. *药学实践杂志*, 2017, 35(4): 359-361.

YANG M, LI J Y, WU J B, *et al.* Determination of madecassoside and asiaticoside in *Centella asiatica* formula granules by HPLC method[J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2017, 35(4): 359-361.

[14] 邹淮, 闵建国, 吴敏菊, 等. 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[J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4217-4220.

ZOU Z, MIN J G, WU M J, *et al.* Determination of two isomers asiaticoside B and madecassoside in Sanjin Tablets by HPLC-CAD[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(14): 4217-4220.

[15] LIU H, GUO S L, WEI S J, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclodextrin-based oral drug delivery formulations for disease therapy[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 329: 121763.

[16] ALISHAHI M, ABOELKHEIR M, CHOWDHURY R, *et al.* Functionalization of cotton nonwoven with cyclodextrin/lawsone inclusion complex nanofibrous coating for antibacterial wound dressing[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 652: 123815.

[17] FENG B L, JIN J Q, WANG C H, *et al.* Analysis and retention behavior of isoflavone glycosides and aglycones in *Radiol Astragali* by HPLC with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a mobile phase additive[J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35(24): 3469-3476.

[18] IBRAHIM A E, EL GOHARY N A, ABOUSHADY D, *et al.* Recent advances in chiral selectors immobilization and chiral mobile phase additives in liquid chromatographic enantio-separations: A review[J]. *Journal of Chromatography A*, 2023, 1706: 464214.